



**Universidad Nacional Autónoma de México**  
**Facultad de Estudios Superiores Zaragoza**



**Efecto gastroprotector de la combinación del ácido  
3 $\alpha$ -hidroximasticadienónico y diligustilida en un modelo de daño  
gástrico inducido con indometacina en rata.**

**TESIS**

**Que para obtener el título de:**

**Química Farmacéutica Bióloga**

**Presenta:**

**Dulce Guadalupe Meza Pérez**

**Director de tesis: Dr. Andrés Navarrete Castro**

**Asesor: M. en F. Leticia Huerta Flores**

**Ciudad de México 2019**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## **Jurado asignado**

Presidente: Q. F. B. Guadalupe Alejandra Aceves Rosas

Vocal: Dr. Andrés Navarrete Castro

Secretario: M. en F. Leticia Huerta Flores

Suplente: M. en C. José Luis Trejo Miranda

Suplente: M. en C. Alma Elena Ibarra Cázares

### **Sitio de elaboración de la tesis:**

Laboratorio 126 Farmacología de Productos Naturales. Conjunto E, Departamento de Farmacia de la Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México.

**Director:** Dr. Andrés Navarrete Castro

\_\_\_\_\_

**Sustentante:** Dulce Guadalupe Meza Pérez

\_\_\_\_\_

## **Agradecimientos**

Al financiamiento otorgado por la dirección General del personal Académico de la Facultad de Química a través del proyecto DGAPA-UNAM IN213418 y al Programa de Apoyo a la investigación y Posgrado a través del Proyecto PAIP5000-9143 así como a CONACYT por el apoyo para ayudante de investigador Nivel III.

A mi tutor Dr. Andrés Navarrete Castro por haberme dado la oportunidad de formar parte de su equipo de trabajo, por su apoyo académico durante la realización de este proyecto, así como el apoyo personal que me ha brindado, por sus consejos y paciencia durante mi estancia en el laboratorio.

A la Dra. Elizabeth Arlen Pineda por su tiempo, paciencia y ayuda brindada.

A la M. en F. Leticia Huerta por ser una guía durante mi estancia en la universidad y por el tiempo dedicado al presente trabajo.

Al Dr. Josué Velázquez Moyado por sus recomendaciones para este trabajo y el apoyo personal brindado desde el primer día en que llegué al laboratorio.

A los miembros del jurado Q. F. B. Guadalupe Alejandra Aceves Rosas, M. en C. José Luis Trejo Miranda y M. en C. Alma Elena Ibarra Cázares por el tiempo dedicado al presente trabajo.

## **Dedicatoria**

A mi mamá Hilda:

Hay personas que se cruzan en nuestro camino por un motivo y tal vez el tiempo de su estancia sea breve o prolongado, sin embargo, agradezco que tu permanencia en mi vida sea para siempre. Gracias por el amor y apoyo que me has brindado a lo largo de este trayecto, por los consejos, valores, educación, noches de desvelos para ayudarme a estudiar, por darme ánimos para seguir adelante y en resumen por ser una gran mamá en todos los aspectos.

A mis hermanas Abi y Lili:

Por estar presentes en todos los momentos importantes de mi vida animándome y brindándome su cariño.

A mi abuelita Catalina:

Por su confianza y sabios consejos que me ha dado desde que era pequeña, además de todo el amor que me ha regalado.

Gracias por formar parte de mi vida.

## Índice

<b>Agradecimientos</b> .....	iii
<b>Dedicatoria</b> .....	iv
Índice .....	v
Listad de figuras.....	vii
Listado de cuadros .....	vii
Listado de abreviaturas .....	vii
Resumen .....	1
I. Introducción.....	3
II. Marco teórico.....	5
2.1 Antiinflamatorios no esteroides (AINEs) .....	5
2.2 Clasificación de AINEs.....	5
2.2.1 Enzima ciclooxigenasa (COX-1 y COX-2) .....	5
2.3 Efectos adversos por AINEs .....	7
2.4 Úlcera gástrica .....	8
2.5 Mecanismos de daño gástrico por AINEs.....	9
2.5.1 Daño local .....	9
2.5.2 Daño sistémico .....	10
2.6 Gastroprotección.....	10
2.6.1 Pre-epiteliales .....	11
2.6.2 Elementos epiteliales .....	12
2.6.3 Elementos sub-epiteliales .....	12
2.7 Mediadores implicados en la gastroprotección.....	12
2.7.1 Prostaglandinas .....	13
2.7.2 Óxido nítrico (NO).....	13
2.7.3 Glutación (GSH) .....	15
2.8 Terapias actuales para el tratamiento de la úlcera gástrica .....	16
2.9 Diligustílida.....	17
2.10 Ácido 3 $\alpha$ -hidroximasticadienónico .....	18
2.11 Análisis isoblográfico .....	18
III. Planteamiento del problema .....	20
IV. Hipótesis .....	21
V. Objetivos .....	21
5.1 Objetivo general.....	21
5.2 Objetivos específicos .....	21
VI. Material y métodos.....	22
6.1 Fármacos y reactivos.....	22
6.2 Equipo e instrumentos .....	23
6.3 Animales .....	23

6.4 Inducción de daño gástrico con indometacina.....	23
6.5 Diseño experimental de la combinación de 3 $\alpha$ -hidroximasticadienónico-diligustílida .....	25
6.6 Análisis de los datos de la combinación de los compuestos .....	27
6.7 Análisis isoblográfico de las combinaciones.....	29
6.8 Cuantificación de glutatión (GSH).....	30
6.9 Cuantificación de nitritos .....	30
6.10 Análisis estadístico .....	31
VII. Resultados.....	32
7.1 Efecto gastroprotector del ácido 3 $\alpha$ -hidroximasticadienónico, diligustílida y la combinación de 3 $\alpha$ -hidroximasticadienónico-diligustílida .....	32
7.2 Interacción entre el ácido 3 $\alpha$ -hidroximasticadienónico y diligustílida.....	34
7.3 Cuantificación de mediadores de la gastroprotección .....	37
VIII. Discusión de resultados.....	40
IX. Conclusiones.....	45
X. Perspectivas.....	46
XI. Referencias .....	47
XII. Anexos.....	51

## Listado de figuras

Figura 1. Mecanismo de acción de los AINEs.....	7
Figura 2. Efecto antioxidante del óxido nítrico .....	15
Figura 3. Estructura de glutatión. ....	15
Figura 4. Estructura de diligustílida .....	18
Figura 5. Estructura del ácido 3 $\alpha$ -hidroximasticadienónico.....	18
Figura 6. Isoblograma.....	19
Figura 7. Diseño de la evaluación del efecto gastroprotector .....	25
Figura 8. Curva dosis-respuesta del efecto máximo de 3 $\alpha$ -HMD y DLG.....	29
Figura 9. Ulceración de estómago.....	33
Figura 10. Área de daño de los compuestos individuales y en combinación .....	33
Figura 11. Curva dosis- respuesta del porcentaje de gastroprotección .....	34
Figura 12. Isoblograma de la combinación.....	35
Figura 13. Representación del área de superficie de las combinaciones .....	36
Figura 14. Cuantificación de nitritos en muestras de tejido gástrico .....	38
Figura 15. Cuantificación de GSH en muestras de tejido gástrico .....	38

## Listado de cuadros

Cuadro 1. Dosis administradas individualmente y en combinación .....	26
Cuadro 2. DE <sub>50</sub> de los compuestos individuales y combinación .....	32
Cuadro 3. Magnitud de la interacción de las proporciones .....	35

## Listado de abreviaturas

AINEs	Antiinflamatorios no esteroideos
3 $\alpha$ -HMD	Ácido 3 $\alpha$ -hidroximasticadienónico
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
ANADEVA	Análisis de Varianza
CV	Cardiovascular
DNTB	Ácido 5,5'-Ditiobis(2-nitrobenzoico)
DE <sub>50</sub>	Dosis efectiva 50
DLG	Diligustílida
EEM	Error estándar de la media
eNOS	Enzima óxido nítrico sintasa del endotelio
EP	Receptor de prostaglandinas
EUP	Enfermedad de Ulcera Péptica
GI	Gastrointestinal
GMP	Guanosín monofosfato

GMPc	Guanosín monofosfato cíclico
GSH	Glutación reducido
GSR	Glutación-reductasa
GST	Glutación transferasa
GPX	Glutación peroxidasa
GSSG	Disulfuro de glutación
G	Gramos
H <sub>2</sub>	Receptores de histamina
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrógeno
HCl	Ácido clorhídrico
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Ácido carbónico
IP3	Inositol trifosfato
IBPs	Inhibidores de la bomba de protones
L-NAME	Ester metílico de NG-nitro-L-arginina
M	Molar
mg	Miligramo
µg	Microgramo
µL	Microlitro
mL	Mililitro
Mm	Milímetros
µM	Micromolar
mM	Milimolar
mm <sup>2</sup>	Milímetro cuadrado
Nm	Nanometro
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido
NO	Óxido nítrico
NO <sup>•</sup>	Radical óxido nítrico
•NO <sub>2</sub>	Radical dióxido de nitrógeno
•N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Trióxido de dinitrógeno
NOS	Óxido nítrico Sintasa
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Nitritos
ONOO <sup>-</sup>	Peroxinitrito
O <sub>2</sub>	Oxígeno molecular
O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>	Superóxido
OH <sup>•</sup>	Radical hidroxilo
PAG	Propargilglicina
PGE2	Prostaglandina E2
PGI2	Prostaciclina I2
PLC	Fosfolipasa C
PGs	Prostaglandinas

PGI <sub>2</sub>	Prostaciclina
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RNS	Especies reactivas de nitrógeno
SINAVE	Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica
-SH	Grupos sulfhidrilo libres
TX A <sub>2</sub>	Tromboxano A <sub>2</sub>

## Resumen

El ácido 3 $\alpha$ -hidroximasticadienónico, aislado de *Amphiptherygium adstringens* y diligustílida aislada de *Ligusticum porteri* son compuestos naturales que han mostrado actividad gastroprotectora en modelos de daño gástrico inducido con diclofenaco y etanol. En este estudio se muestra la evaluación de la interacción farmacodinámica que presentaron estos dos compuestos en las proporciones fijas 1:1, 1:3 y 3:1 en un modelo de daño gástrico inducido con indometacina en ratas.

A las ratas macho se les administró, vía oral, el ácido 3 $\alpha$ -hidroximasticadienónico, diligustílida o la mezcla de ambos compuestos (en las proporciones fijas de 1:1, 1:3 y 3:1). Después de treinta minutos, el daño gástrico fue inducido por la administración oral de indometacina (30 mg/Kg) y tres horas más tarde, la lesión gástrica fue medida. Los compuestos individuales mostraron un efecto gastroprotector ( $p < 0.05$ ), la dosis efectiva ( $DE_{50}$ ) determinada para cada compuesto fue de  $6.96 \pm 1.25$  mg/Kg para el ácido 3 $\alpha$ -hidroximasticadienónico y  $2.63 \pm 0.37$  mg/Kg para diligustílida. Las lesiones gástricas disminuyeron significativamente en las tres proporciones comparado con el grupo tratado con indometacina (30 mg/Kg). El análisis isoblográfico mostró que las combinaciones presentaron una interacción de tipo superaditiva, debido a que las dosis experimentales  $DE_{50}$  ( $Z_{exp}$ ) fueron más bajas que las dosis teóricas aditivas ( $Z_{add}$ ;  $p < 0.05$ ). El análisis de superficie también muestra el efecto sinergista obtenido con las combinaciones de los dos productos naturales.

La administración de indometacina provocó una disminución en los niveles de nitritos, sin embargo, no modificó los niveles de GSH ( $p < 0.05$ ). La administración de

las tres combinaciones de los compuestos, indujo un incremento significativo en los niveles de nitritos, pero no modificó los niveles de GSH.

Los resultados obtenidos indican que existe una interacción farmacodinámica de superaditividad (sinergismo) entre el ácido 3 $\alpha$ -hidroximasticadienónico y diligustílida en el modelo de daño gástrico inducido con indometacina, lo cual, sugiere su uso potencial en un futuro, como una estrategia para disminuir el daño asociado al uso crónico de AINEs.

## I. Introducción

Los fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINEs), son fármacos con propiedades antiinflamatorias, antipiréticas y analgésicas, sin embargo, su uso clínico está asociado a daño en la mucosa gástrica.<sup>1</sup> El daño en la mucosa gástrica inducida por estos fármacos puede deberse a dos mecanismos: daño local (alteración de la composición de la barrera de la mucosa gástrica) y daño sistémico (inhibición de la síntesis de prostaglandinas), estos mecanismos dependen del tipo de AINE empleado y de su selectividad hacia las diferentes isoformas de la enzima ciclooxigenasa (COX).<sup>2</sup> Debido a la selectividad de los AINEs por las isoformas de la enzima COX (COX-1 y COX-2) los procesos de secreción de moco, liberación de ácido clorhídrico, producción de glutatión (GSH), prostaglandina I<sub>2</sub> (PGI<sub>2</sub>) y prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) se ven afectados.<sup>3</sup> Los fármacos selectivos a la COX-2, como celecoxib, están relacionados con toxicidad cardiovascular y renal, de forma diferenciada. Ambas isoformas de COX son importantes para mantener la integridad de la mucosa gástrica, ya que, la inhibición de forma selectiva de alguna de las isoformas no reduce el daño gástrico inducido por el uso de AINEs.<sup>2</sup> En la actualidad se emplea como tratamiento de primera elección el omeprazol, un inhibidor de la bomba de protones (H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasa); sin embargo, su uso crónico está asociado a modificaciones en la biota nativa del intestino lo que provoca problemas intestinales severos, dolor abdominal, náuseas y diarrea.<sup>4,5</sup>

Debido al reducido número de fármacos empleados para el tratamiento de daño gástrico inducido por AINEs, la búsqueda de nuevas terapias alternativas para la gastroprotección incluye el aislamiento de compuestos derivados de plantas medicinales y su estudio en modelos animales de daño gástrico.<sup>6</sup> En este trabajo se

propone evaluar el efecto gastroprotector de dos compuestos naturales: diligustílida y el ácido 3 $\alpha$ -hidroximasticadienónico, de los cuales se ha reportado efecto gastroprotector en el modelo de daño gástrico con etanol, sin embargo, no hay estudios en los cuales se evalúen las combinaciones de estos compuestos. Para ello, se utilizará el análisis isobolográfico, en donde se evalúa si las respuestas biológicas obtenidas por la combinación de los dos compuestos activos resultan ser mayor, iguales o menores a la respuesta de la actividad individual de los componentes de la mezcla. De forma complementaria, para aumentar la evidencia acerca del mecanismo de acción de los compuestos, se realizará la evaluación de los niveles de glutatión reducido (GSH) y de forma indirecta al óxido nítrico (NO) mediante la cuantificación de nitritos, como mediadores de la protección gástrica.

## II. Marco teórico

### 2.1 Antiinflamatorios no esteroides (AINEs)

Los AINEs, forman parte de un grupo de compuestos con diversidad estructural, que presentan propiedades antiinflamatorias, antipiréticas y analgésicas.<sup>1</sup> Constituyen uno de los grupos de fármacos más consumidos en el mundo, la prescripción y automedicación con este tipo de fármacos está aumentando con el paso de los años debido al incremento en la esperanza de vida y en la prevalencia de afecciones inflamatorias.<sup>7</sup> Su mecanismo de acción es mediante la inhibición de la enzima ciclooxigenasa (COX), previniendo la sobre-activación del sistema inmune, que trae como resultado un efecto analgésico y antiinflamatorio, pero a la vez, reducen la capacidad intrínseca de la mucosa para prevenir las lesiones inducidas por agresores endógenos, exógenos y la agregación plaquetaria.<sup>3</sup> Por lo cual, sus efectos adversos están asociados principalmente a complicaciones gastrointestinales (GI), renales y cardiovasculares (CV).<sup>8</sup>

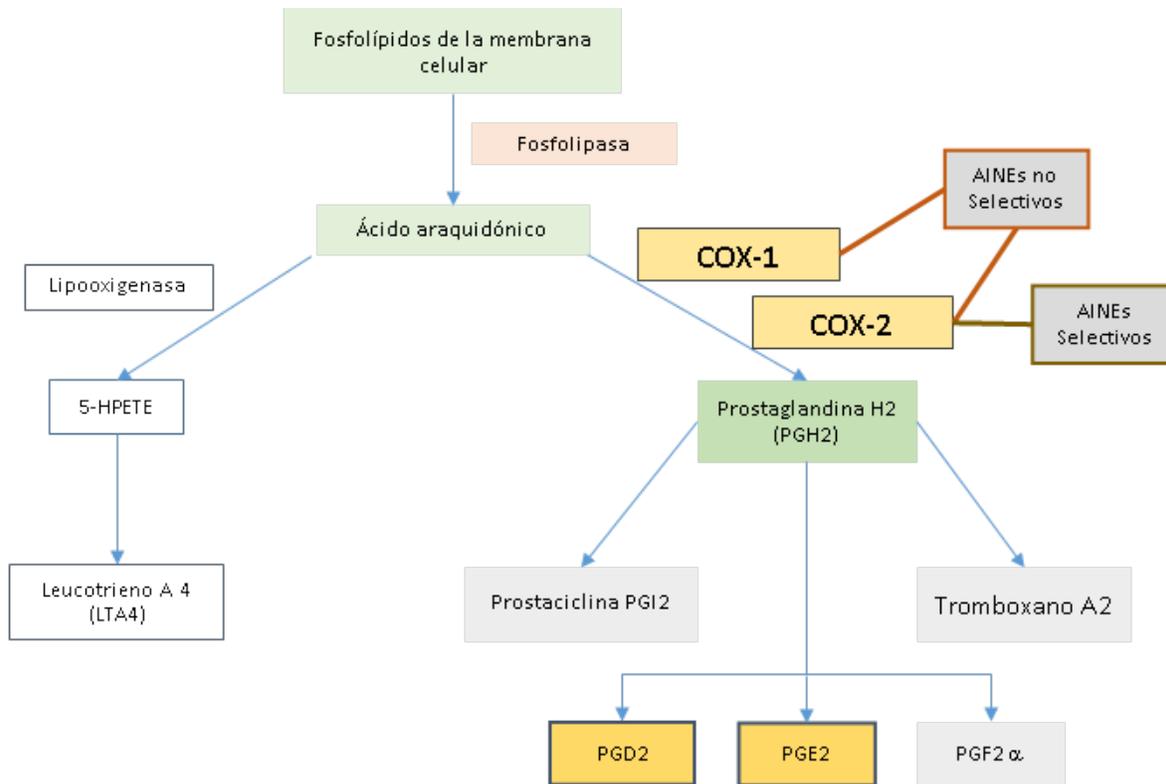
### 2.2 Clasificación de AINEs

Los AINEs pueden clasificarse de acuerdo a su selectividad sobre las isoformas de la enzima ciclooxigenasa (COX-1 y COX-2). Los AINEs no selectivos, inhiben ambas isoformas de ciclooxigenasa, y los selectivos inhiben preferentemente a la COX-2, a través de su unión al sitio activo de la enzima, generando un bloqueo para su unión con el ácido araquidónico, inhibiendo su actividad enzimática y por lo tanto la producción de eicosanoides como las prostaglandinas (**figura 1**).<sup>9</sup>

#### 2.2.1 Enzima ciclooxigenasa (COX-1 y COX-2)

Existen dos tipos de isoformas de la COX, la COX-1 llamada constitutiva, la cual desempeña un papel importante en la síntesis de los prostanoides regulando

funciones fisiológicas como la protección gastrointestinal, homeostasis vascular, la hemodinámica renal y regulación de la agregación plaquetaria.<sup>10</sup> Por el contrario, la COX-2 llamada inducible, se expresa en muy bajos niveles en los tejidos sanos, incluyendo el estómago y aumenta su expresión en el sitio de inflamación. De manera general la producción continua de prostaglandinas en la mucosa gástrica está regulada por la COX-1, ayuda a mantener el flujo sanguíneo adecuado en la mucosa y además estimula la generación de moco en la superficie del estómago. Sin embargo, también existe una contribución de la COX-2 a la defensa de la mucosa y su reparación.<sup>11</sup> La expresión de COX-2 puede ser regulada rápidamente y su incremento se puede observar al exponer a la mucosa a un agente irritante, por la inducción de isquemia o cuando la actividad de la COX-1 se suprime con aspirina o cualquier otro AINE. Esta regulación de la COX-2 parece ser una respuesta de defensa y antiinflamatoria dirigida a mejorar la integridad de la mucosa (a través del aumento del flujo sanguíneo y la reducción de la adherencia leucocitaria).<sup>2</sup>



**Figura 1.** Mecanismo de acción de los AINEs. Los fosfolípidos de membrana son transformados en ácido araquidónico por medio de la fosfolipasa A y a partir de este punto las isoformas de la COX catalizan la formación de  $PGH_{2a}$  para convertirse en  $PGE_2$ ,  $PGF_2$ ,  $PGD_2$ ,  $PGI_2$  y tromboxano  $A_2$  ( $TXA_2$ ). Los AINEs selectivos inhiben a la COX-2, mientras que los AINEs no selectivos inhiben ambas isoformas COX-1 y COX-2 evitando de esta forma la síntesis de prostaglandinas.<sup>9</sup>

### 2.3 Efectos adversos por AINEs

El uso clínico de los AINEs está limitado por sus efectos adversos principalmente a nivel gastrointestinal (GI), donde son capaces de inducir la formación de erosiones y úlceras. Existen reportes que indican que aproximadamente el 50% de las personas que usan AINEs en Estados Unidos desarrollan erosiones gástricas, de las cuales se estima que el 2-4% presentan secuelas graves como sangrado, perforación e incluso la muerte.<sup>1</sup> En México, de acuerdo a lo reportado por la Secretaría de Salud, la perforación por ulcera péptica es la segunda perforación

abdominal más frecuente debida a *H. pylori*, estrés, tabaquismo, dieta y al uso indiscriminado de AINEs.<sup>5</sup>

#### 2.4 Úlcera gástrica

La gastritis es una de las patologías más comunes del tracto digestivo, sobre todo en personas de mediana edad. Se caracteriza por la inflamación en la superficie de la mucosa, que, si no es controlada, puede convertirse en úlcera. La úlcera gástrica es un defecto de la mucosa de por lo menos de 0.5 cm de diámetro (lesiones menores se les denomina erosiones), que penetra la región *muscularis mucosae*; se dividen en proximales, que se encuentran en el cuerpo y las distales, que se encuentra en el antro, principalmente sobre la curvatura menor. Su formación se debe al desequilibrio entre los factores protectores de la mucosa gástrica y factores agresores. Entre los factores agresores se encuentran: la infección por *H. pylori*, el consumo de alcohol, tabaco, esteroides, alimentos irritantes, inmunosupresión y AINEs.<sup>12</sup>

A pesar de que en las últimas décadas se ha reducido la incidencia de la Enfermedad de Úlcera Péptica (EUP), la presencia de sus complicaciones no ha cambiado significativamente. Mientras que la reducción en la prevalencia de *Helicobacter pylori* ha condicionado una menor tasa de complicaciones en los jóvenes, se ha registrado un incremento en el uso de AINEs en ancianos con el consecuente incremento en la tasa de complicaciones en este grupo de edad.<sup>13</sup> De acuerdo al Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SINAVE) la úlcera gástrica ocupa el 4 lugar en morbilidad en México en hombres y mujeres a partir de los 15 años.<sup>14</sup>

## 2.5 Mecanismos de daño gástrico por AINEs

En la actualidad es conocido que los AINEs alteran los distintos elementos de la mucosa gástrica, los cuales se pueden dividir en dos clasificaciones: daño local y daño sistémico de acuerdo a los factores que se alteren en cada fase. De manera general el daño local hace más susceptible a la mucosa al daño externo, mientras que sistémicamente agrava dicho daño.<sup>2</sup>

### 2.5.1 Daño local

Los AINEs, una vez que entran en contacto con la mucosa, se asocian químicamente con fosfolípidos y alteran las propiedades tensoactivas de la capa surfactante. La gran mayoría de los AINEs son ácidos orgánicos débiles con constantes de ionización (pKa) entre 3 y 5. En un medio ácido, como el existente en el lumen gástrico (pH < 2,5), estos fármacos se encuentran en forma no ionizada esto les permite difundir libremente a través de las membranas celulares. El AINE al penetrar en su forma no ionizada en las células superficiales, que tienen un pH neutro, se produce la disociación del fármaco a la forma ionizada y una vez en este estado quedan atrapados en el interior de la célula produciendo daño celular directo por desacoplamiento de la fosforilación oxidativa. Esto conduce a un desbalance osmótico, a la pérdida de uniones intercelulares, aumento de la permeabilidad y un daño estructural celular irreversible. Si bien el efecto tóxico directo de los AINEs puede iniciar la erosión superficial de la mucosa gastroduodenal, existen numerosas evidencias que sugieren que para que se produzca enfermedad ulcerosa clínicamente relevante es necesaria la inhibición de la síntesis endógena de prostaglandinas.<sup>2,11</sup>

### 2.5.2 Daño sistémico

El daño sistémico por AINEs se genera como consecuencia de la disminución de prostaglandinas PGE<sub>2</sub> y PGI<sub>2</sub> producidas por COX-1 y COX-2. Al inhibirse su producción, existe la reducción en la síntesis de moco y de bicarbonato, del flujo sanguíneo de la mucosa, aumento de la secreción de ácido y se produce isquemia microvascular, debido a un incremento en la adherencia de los neutrófilos al endotelio vascular, que trae como consecuencia una hipoperfusión a la mucosa, la liberación de mediadores de daño tisular y finalmente la necrosis de las células de la mucosa generando la formación de úlceras gástricas.

Se ha reportado que la inhibición de la COX-2 conduce a la adhesión de leucocitos al endotelio, disminución del aporte de oxígeno al tejido y generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) que contribuyen a formación de úlceras. Las PG derivadas de COX-2 son fundamentales para la restitución del epitelio mucosal, por lo tanto, ambas isoformas de COX son esenciales para mantener la integridad de la mucosa gastrointestinal (GI).<sup>1</sup>

### 2.6 Gastroprotección

La mucosa gástrica es una barrera fisicoquímica parcialmente permeable que recubre al estómago separándolo de la luz gástrica.<sup>15</sup> Está expuesta a factores endógenos (ácido clorhídrico, pepsina, ácidos biliares, enzimas pancreáticas), o exógenos (estrés, alcohol, fármacos y bacterias), por lo tanto, el organismo dispone de mecanismos protectores para contrarrestarlos. Su integridad se mantiene gracias a un sistema que proporciona su defensa y facilita su reparación y que se denomina defensa mucosal. Esta defensa se puede clasificar en factores pre-epiteliales (capa de moco-bicarbonato y surfactante), epiteliales (fosfolípidos de

superficie, bombas de intercambio iónico en la membrana apical de las células superficiales, uniones estrechas intercelulares y fenómeno de restitución celular) y sub-epiteliales (flujo sanguíneo mucoso) que mantienen la homeostasis de la mucosa.

### 2.6.1 Pre-epiteliales

Existe una capa continua de células mucosas superficiales, encargadas de secretar un moco viscoso para cubrir las células epiteliales, el cual actúa como una barrera fisicoquímica. Los componentes principales de este moco son mucinas (glicoproteínas), bicarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ), lípidos y agua (95%). El moco gástrico se divide en dos capas: 1) Capa interna, también denominada moco visible; la cual forma un recubrimiento gelatinoso con una alta concentración de bicarbonato para mantener un pH neutro (7.0) y de esta forma retarda la difusión de iones hidronio ( $\text{H}^+$ ), mantiene el  $\text{HCO}_3^-$  secretado por el epitelio y protege a la mucosa del ácido gástrico, sin embargo, el ácido también es necesario ya que una supresión crónica de éste, provoca el crecimiento excesivo de bacterias en el estómago y el intestino delgado. Las moléculas de mucina contenidas en esta capa se entrelazan por puentes disulfuro confiriéndole una consistencia altamente viscosa y con la capacidad de expansión al hidratarse. 2) Capa externa o moco soluble, es menos viscosa debido a la falta de enlaces disulfuro entre las moléculas de mucina que contiene. Esta capa permite la liberación constante de óxido nítrico (NO) y la unión con agentes nocivos, se mezcla con los alimentos y se desprende. Otros factores pre-epiteliales incluyen a los péptidos pequeños y compactos que participan en la reparación de las superficies mucosas mediante los procesos de restitución y regeneración epitelial, conocidos como factores trefoil.<sup>16</sup>

### 2.6.2 Elementos epiteliales

Las células epiteliales son *per se*, elementos de protección gástrica; debido a que gracias a sus uniones intercelulares forman una barrera física impermeable a cualquier agente externo, además brindan protección mediante la producción diversos factores. Entre estos se encuentran transportadores iónicos que mantienen el pH intracelular, la producción de moco,  $\text{HCO}_3^-$ , péptidos trefoil y proteínas de choque térmico (que impiden la desnaturalización de proteínas ante el incremento de temperatura, agentes citotóxicos o estrés oxidativo). Por otra parte las células epiteliales son las encargadas de renovación epitelial y trabajando en conjunto con la angiogénesis, cuyos principales reguladores son el factor de crecimiento de fibroblastos (FCF,) el factor de crecimiento endotelial vascular (FCEV) y las prostaglandinas (PGs).<sup>16</sup>

### 2.6.3 Elementos sub-epiteliales

La microvasculatura sub-epitelial tiene el efecto protector más importante de la mucosa gástrica. Mantiene el flujo sanguíneo ininterrumpido hacia las células epiteliales, funciona como medio de transporte de nutrientes y productos de desecho, además de ser una fuente productora de prostaglandinas importante, poseen receptores para prostaglandinas, lo que les permite modular su diámetro y por lo tanto la cantidad de sangre circulante.<sup>16</sup>

### 2.7 Mediadores implicados en la gastroprotección

Además de los factores que participan en la defensa de la mucosa gástrica, existen mediadores encargados de modular a todos estos factores, entre los cuales se encuentran las prostaglandinas, óxido nítrico y glutatión.<sup>17</sup>

### 2.7.1 Prostaglandinas

Las prostaglandinas son ácidos grasos no saturados, pertenecientes al grupo de los eicosanoides. Se sintetizan en el organismo, a partir del ácido araquidónico, por acción de enzimas ciclooxigenasas (COX). La PGE<sub>2</sub> y la PGI<sub>2</sub> se consideran prostaglandinas citoprotectoras, puesto que disminuyen la secreción gástrica de HCl y el contenido de pepsina, incrementan la secreción de moco y producen vasodilatación en la mucosa gástrica, mediante su unión a subtipos específicos de receptores EP. La activación de los receptores EP1 provoca un aumento de flujo sanguíneo en la mucosa, disminución de la motilidad gástrica y aumento en la secreción de bicarbonato. Por su parte la activación de los receptores EP3 provoca una disminución de AMPc y por tanto una inhibición de la secreción de ácido gástrico. La estimulación de la secreción de moco ocurre a través del receptor EP4.<sup>16</sup> El efecto antiinflamatorio disminuye la liberación de enzimas lisosomales, la generación de leucotrienos, radicales libres en los neutrófilos y la liberación de histamina de los mastocitos.<sup>2,9</sup>

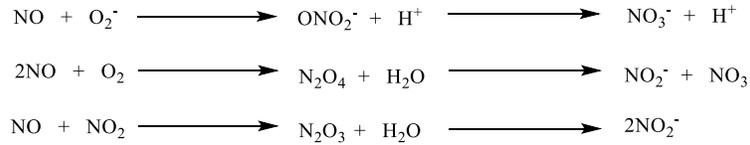
### 2.7.2 Óxido nítrico (NO)

Es uno de los principales gastrotransmisores, un gas soluble en lípidos y de vida corta, que tiene la capacidad de difundir a través de las membranas celulares. A diferencia de otros transmisores, no puede ser almacenado ni recapturado. Es sintetizado por numerosas células a partir de L-arginina, oxígeno molecular, NADPH y otros factores, por acción de la enzima óxido nítrico sintasa (NOS). Existen tres isoformas de NOS: endotelial (eNOS), neuronal (nNOS) e inducible (iNOS), que poseen dos patrones diferentes de expresión. Las isoformas eNOS y nNOS se expresan de manera constitutiva, generan pequeñas cantidades de NO y pueden

activarse rápidamente por el incremento del  $\text{Ca}^{2+}$ . Por el contrario, la iNOS es inducida en macrófagos, neutrófilos, células endoteliales, células musculares lisas bajo el estímulo de citocinas, endotoxinas bacterianas y otros agentes, generando grandes cantidades de NO sin requerir incrementos en el  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular en respuesta a estímulos inflamatorios o mitogénicos, y su función principal es la defensa contra los patógenos a través de la toxicidad oxidativa.<sup>18,19</sup>

El óxido nítrico media efectos fisiológicos cuando se produce en bajas cantidades, destacando el mantenimiento de la presión arterial y otras como la activación del sistema inmune, la regulación de la transmisión neural en el cerebro, agregación plaquetaria, memoria, aprendizaje, inflamación y gastroprotección a través de una adecuada irrigación en el tejido y actividad antioxidante gracias a su capacidad para inhibir al anión superóxido, previniendo así la formación de más especies prooxidantes. Se ha reportado que, en el estómago, el NO modula la actividad de la bomba de protones evitando el incremento del HCl en presencia de agentes nocivos como el etanol y por otra parte incrementando la secreción *in vivo* del moco gástrico, sin embargo, también está involucrado en la citotoxicidad cuando se genera en exceso, ya que conduce a la formación de peroxinitrito, destrucción de los grupos hierro-azufre, nitrosación de tioles y a la nitración de los residuos de la proteína tirosina.<sup>20</sup>

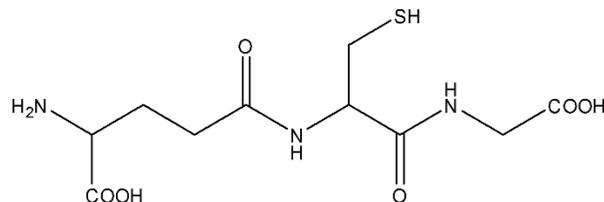
El NO se somete a una serie de reacciones con varias moléculas presentes en fluidos biológicos.<sup>21</sup> En la **figura 2** se muestran las reacciones que lleva a cabo el óxido nítrico en su función de antioxidante al reaccionar con un radical libre, para finalmente la obtención de 2 moléculas de nitritos.



**Figura 2.** Efecto antioxidante del óxido nítrico

### 2.7.3 Glutación (GSH)

El glutati3n (GSH) (**figura 3**), es un trip3ptido de bajo peso molecular cuyas concentraciones oscilan entre 1-10 mM a nivel celular y entre 10-30  $\mu\text{M}$  a nivel plasm3tico. Es uno de los antioxidantes m3s importantes en el organismo ya que se encarga del control del estr3s oxidativo, actuando como amortiguador r3dox y est3 presente en las c3lulas en su forma reducida. Es parte del sistema de glutati3n, junto con las enzimas glutati3n-reductasa (GSR), glutati3n-transferasa (GST) y glutati3n-peroxidasa (GPX). El glutati3n (GSH) protege a las c3lulas del da3o inducido por los radicales libres, evitando la peroxidaci3n de l3pidos o previniendo que los grupos sulfhidrilos sufran oxidaci3n irreversible despu3s del da3o oxidativo. La exposici3n del GSH a las especies reactivas de ox3geno (ROS) causa su oxidaci3n formando disulfuro de glutati3n que puede regresar a su forma reducida mediante la enzima glutati3n reductasa, cuya actividad depende directamente de la disponibilidad de nicotinamida adenina dinucle3tido fosfato (NADPH) celular.<sup>22</sup>



**Figura 3.** Estructura de glutati3n.

El per3xido de hidr3geno formado durante el metabolismo aer3bico es metabolizado formando GSSG. La reacci3n ocurre por la acci3n de la enzima glutati3n peroxidasa,

tanto en el citosol como en la mitocondria y también por la enzima catalasa que está ausente en la mitocondria. El GSSG formado luego es reducido para formar nuevamente GSH por acción de la enzima GSH reductasa usando NADPH, formando así un ciclo de óxido-reducción. Los peróxidos orgánicos (ROOH) pueden ser reducidos por dos enzimas, la glutatión peroxidasa o la enzima GSHT-transferasa. En condiciones de estrés oxidativo severo, la habilidad de la célula para reducir GSSG a GSH se encuentra superada, tendiendo entonces a la acumulación de GSSG. Para evitar un cambio en el equilibrio redox intracelular, el GSSG es activamente transportado fuera de la célula o bien reacciona con los sulfhidrilos de las proteínas para formar disulfuros mixtos (PSSH). En las últimas décadas se ha reportado que mediadores endógenos diferentes a las PGs pueden generar o contribuir a los efectos protectores en la mucosa. Dichos descubrimientos han llevado al desarrollo de nuevos tratamientos como los AINEs liberadores de óxido nítrico (NO) y fármacos donadores de sulfuro de hidrogeno (H<sub>2</sub>S), que exhiben muchos de los efectos producidos por las PGs en el tracto GI, sin embargo, en la actualidad se encuentran en investigación. Debido a que el NO y H<sub>2</sub>S también son potentes agentes antiinflamatorios, existe la posibilidad de impulsar la actividad antiinflamatoria de los AINEs por acoplamiento con los mediadores gaseosos.<sup>1,23</sup>

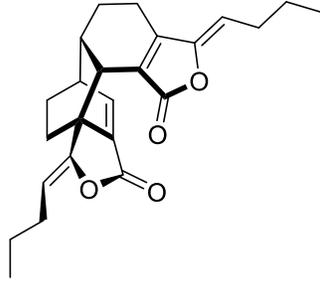
## 2.8 Terapias actuales para el tratamiento de la úlcera gástrica

En la actualidad el uso de los inhibidores de la bomba de protones (IBPs) es el tratamiento de primera elección para los pacientes con úlcera gástrica.<sup>5</sup> Los IBPs disminuyen la producción de HCl, lo cual trae como consecuencia un aumento del pH, y por lo tanto, una disminución del daño en la mucosa. Sin embargo, el ácido gástrico es necesario en el estómago ya que es una barrera de defensa que controla

el crecimiento bacteriano, por lo tanto, la supresión crónica del ácido puede provocar la sobrepoblación de bacterias en el estómago y el intestino delgado, aunado a cambios en el tipo de bacterias (disbiosis). Hay reportes que demuestran que el uso prolongado de IBPs en pacientes con uso crónico de AINEs, generan un cambio en el número y tipo de bacterias entéricas, incluidas una reducción significativa de *Actinobacteria* y *Bifidobacteria spp* (hasta en un 80%), además de una alta incidencia de daño en el intestino delgado; por lo que los IBPs no confieren protección al intestino delgado contra el daño por AINEs.<sup>4</sup> Debido a los efectos no deseados presentados por los IBPs, se ha incrementado el interés por nuevas alternativas terapéuticas<sup>24</sup> y en especial por aquellos compuestos derivados de plantas.<sup>6</sup> De manera específica aquellas plantas que tengan un uso terapéutico en la medicina tradicional.

### 2.9 Diligustílida

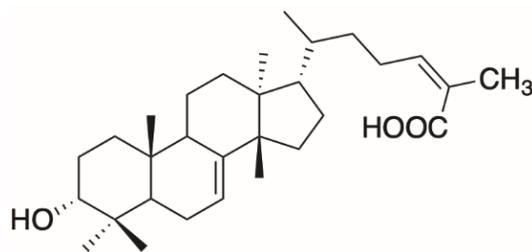
La diligustílida (DLG, **figura 4**) es un metabolito obtenido de la raíz de *Ligusticum porteri* (Chuchupaste). Recientemente se ha descrito su efecto gastroprotector en las lesiones gástricas inducidas por etanol y se ha sugerido que su actividad antiulcerosa depende de la participación de los grupos -SH no protéicos y prostaglandinas.<sup>25</sup> Se ha reportado que la diligustílida mantiene los niveles de glutatión, evita la formación de nitritos (sugiriendo la actividad de este metabolito como agente antioxidante), promueve la liberación sulfuro de hidrógeno y estabiliza los S-nitrosotioles como mecanismo de acción gastroprotector en el modelo de daño gástrico generado por etanol.<sup>20</sup>



**Figura 4.** Estructura de diligustílida.

### 2.10 Ácido 3 $\alpha$ -hidroximasticadienónico

El ácido 3 $\alpha$ -hidroximasticadienónico (3 $\alpha$ -HMD, **figura 5**) es un triterpeno obtenido de la corteza del tallo de *Amphiptherygium adstringens* Schiede ex Schlech (Cuachalalate). Se ha reportado que el principal mecanismo de gastroprotección de los triterpenoides es a través de un incremento en la secreción de moco en lugar de la inhibición de la secreción de HCl. Químicamente, este efecto gastroprotector está referido por la presencia de un grupo hidroxilo libre en la posición C-3. Algunos mecanismos farmacológicos para este tipo de productos naturales están atribuidos al papel de las prostaglandinas, glutatión (GSH), óxido nítrico (NO), grupos sulfhidrilo (-SH), y neuronas aferentes sensibles a capsaicina.<sup>26</sup>

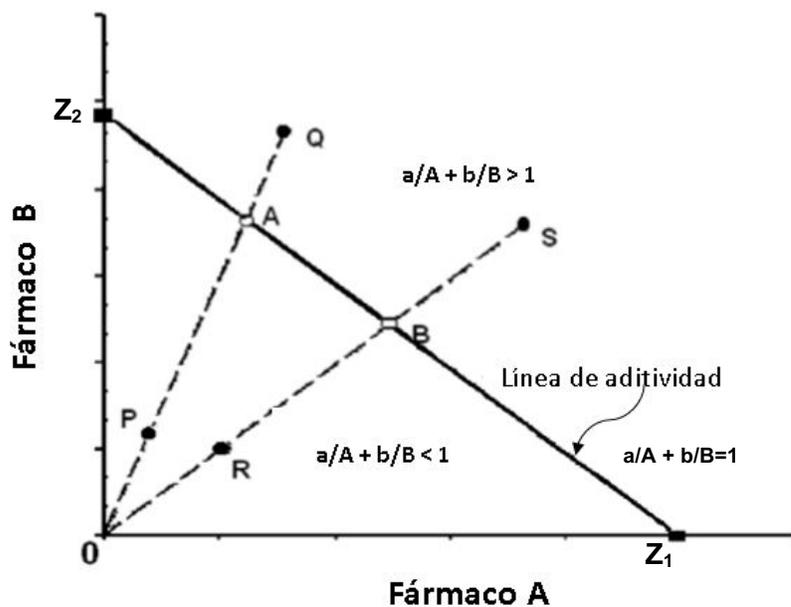


**Figura 5.** Estructura del ácido 3 $\alpha$ -hidroximasticadienónico

### 2.11 Análisis isoblográfico

El análisis isoblográfico es una metodología útil para evaluar las proporciones de los compuestos biológicamente activos que incrementen de manera importante la actividad biológica en comparación con la actividad individual que presenta cada

uno de ellos. El isoblograma recurre al empleo de pares de dosis equiefectivas para obtener un determinado nivel de efecto y ofrece una evaluación visual del comportamiento de la combinación (**Figura 6**).<sup>27</sup> Mediante este análisis se puede determinar si el efecto esperado es mayor (superaditivo), menor (subaditivo) o igual (aditivo) que el ejercido por los compuestos de manera individual, además permite estudiar las interacciones entre productos naturales y fármacos con la finalidad de evaluar los beneficios y riesgos potenciales que pueden ocurrir al administrarse de manera concomitantemente.<sup>28</sup>



**Figura 6.** Isoblograma. La línea continua representa la línea de aditividad;  $Z_1$  y  $Z_2$  son las dosis equiefectivas individuales. Los puntos A y B representan las dosis teóricas aditivas ( $Z_{add}$ ). P y R son puntos que representan cantidades experimentales ( $Z_{exp}$ ) con un efecto superaditivo, en tanto Q y S son puntos que representan las cantidades experimentales ( $Z_{exp}$ ) de un efecto subaditivo.<sup>28</sup>

Este análisis isoblográfico permite una evaluación rigurosa de la interacción entre dos sustancias activas que actúan juntas para producir efectos globalmente similares. Para dos fármacos que presentan el mismo tipo de efecto global o un efecto muy similar, se puede calcular la  $DE_{50}$  de cada uno de ellos, que da lugar al

mismo nivel de efecto, por ejemplo: la dosis efectiva 50 ( $DE_{50}$ ) y esta dosis es representada como  $Z^*$ . En este método el valor de  $Z^*$  se calcula de la región de la curva dosis-respuesta en donde existe una relación entre la dosis y el efecto que pueden relacionarse linealmente cuando se utiliza el logaritmo de la dosis. Aunque también puede existir una relación no lineal y entonces se puede utilizar el análisis no lineal para el cálculo de  $Z^*$ . Posteriormente en una curva dosis-respuesta de dos dimensiones se señala el valor de la  $DE_{50}$  y se traza una línea que conecte el valor de las  $DE_{50}$  de ambos fármacos que da origen a la gráfica llamada isoblograma, representación bidimensional de los ejes de las dosis de cada fármaco.<sup>29</sup>

### III. Planteamiento del problema

Los fármacos anti-inflamatorios no esteroideos (AINEs), son los más utilizados en el mundo para el tratamiento de enfermedades caracterizadas por inflamación y dolor. La principal limitante a su uso terapéutico son los efectos adversos generados a nivel gastrointestinal (GI), como son la gastritis y la úlcera gástrica, los cuales pueden evolucionar a condiciones más severas. El SINAVE, reporta que la gastritis y la úlcera gástrica se encuentra en la cuarta causa de morbilidad en la población mexicana en la última década.<sup>14</sup> Actualmente, el tratamiento de primera elección para el daño gástrico por AINEs consiste en: inhibidores de la bomba de protones.<sup>1</sup> Sin embargo, estudios relacionan esta terapia con la disminución de la biota nativa, que altera la calidad de vida del paciente.<sup>4</sup> Por lo cual, es importante la búsqueda de nuevos fármacos con actividad gastroprotectora, como el ácido  $3\alpha$ -HMD aislado de *Amphipterygium adstringens* (Cuachalalate) y la DLG aislada de *Ligusticum porteri* (Chuchupate). Estos compuestos de manera individual han demostrado

efectos citoprotectores en modelos experimentales de daño gástrico inducido con diclofenaco (el primero) y etanol (el segundo).<sup>25,30</sup> Por lo tanto, en este trabajo se realizaron combinaciones de los compuestos en diferentes proporciones para determinar el tipo de interacción farmacodinámica y el efecto de la combinación de tales compuestos sobre los niveles de óxido nítrico y glutatión reducido, en un modelo de daño gástrico inducido con indometacina en ratas, con la finalidad de aumentar la evidencia científica sobre las propiedades gastroprotectoras de ambos compuestos.

#### IV. Hipótesis

La administración de la combinación del ácido 3 $\alpha$ -hidroximasticadienónico y diligustílida en diferentes proporciones fijas presentarán un efecto sinergista gastroprotector en el modelo de daño gástrico inducido por indometacina, con la consecuente disminución de los niveles de nitritos y el aumento de los niveles de glutatión en el tejido gástrico.

#### V. Objetivos

##### 5.1 Objetivo general

Determinar el tipo de interacción farmacodinámica gastroprotectora entre el ácido 3 $\alpha$ -hidroximasticadienónico (3 $\alpha$ -HMD) y diligustílida (DLG) en el modelo de daño gástrico inducido con indometacina en rata Wistar a través del análisis isobolográfico y la cuantificación de los niveles de óxido nítrico y glutatión.

##### 5.2 Objetivos específicos

- Evaluar el efecto gastroprotector del ácido 3 $\alpha$ -hidroximasticadienónico y diligustílida en forma individual en las dosis: 1,3, 10 y 30 mg/Kg y en la combinación en las proporciones fijas: 1:1, 1:3 y 3:1, para determinar la dosis

efectiva 50 (DE<sub>50</sub>) gastroprotectora en el daño gástrico inducido por indometacina en rata.

- Determinar el tipo de interacción farmacodinámica del efecto gastroprotector de la combinación del ácido 3 $\alpha$ -hidroximasticadienónico y diligustílida por medio del análisis isoblográfico.
- Cuantificar los niveles de glutatión y óxido nítrico en tejido gástrico homogenado tras la administración de los diferentes tratamientos, por medio de la reacción de Ellman y de Griess respectivamente.

## VI. Material y métodos

### 6.1 Fármacos y reactivos

El ácido 3- $\alpha$ HMD fue extraído de *Amphiteryium adstringens* y la DLG de la raíz de *Ligusticum porteri* como ha sido descrito por Arrieta et al. 2003<sup>31</sup> y Velazquez-Moyado et al. 2015<sup>25</sup> respectivamente. Estos compuestos fueron suspendidos con tween 80 al 0,5% en solución salina. El omeprazol fue solubilizado en solución salina y adquirido es Sigma-Aldrich. La indometacina fue adquirida en Simga-Aldrich (Toluca, México) y fue disuelta en NaHCO<sub>3</sub> al 5%. El glutatión reducido, el ácido 5,5-ditio-bis-(2-nitrobenzoico) (DTNB), el nitrito de sodio, así como la sulfanilamida (reactivo de Griess 1) fueron adquiridos en Sigma Aldrich. La N-naftiletildiamina (reactivo de Griess 2) en Fluka, mientras que la enzima y su cofactor fueron adquiridos en Cayman.

Todas las soluciones fueron preparadas el día del experimento.

## 6.2 Equipo e instrumentos

Microscopio Celestron 44302-A, homogenizador ULTRA-TURRAX T8®, microcentrifuga refrigerada IEC Micromax RF, lector de placas modelo 680 microplate Reader de la marca BIO-RAD.

## 6.3 Animales

Se utilizaron ratas Wistar macho (180-250 g), provenientes del Centro de Producción UNAM-Envigo, Envigo México, S.A. de C.V. Los animales se mantuvieron en grupos de 6 en cajas de policarbonato, a una temperatura constante de  $22 \pm 2$  °C bajo un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas, con libre acceso a agua y alimento, durante 2 semanas previas al experimento. El protocolo fue sometido a aprobación ante el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Facultad de Química de la UNAM (Oficio/FQ/CICUAL/241/17). Todos los procedimientos experimentales fueron realizados bajo las normas internacionales y acorde a la Norma Oficial Mexicana de Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio (NOM- 062- ZOO-1999).

## 6.4 Inducción de daño gástrico con indometacina

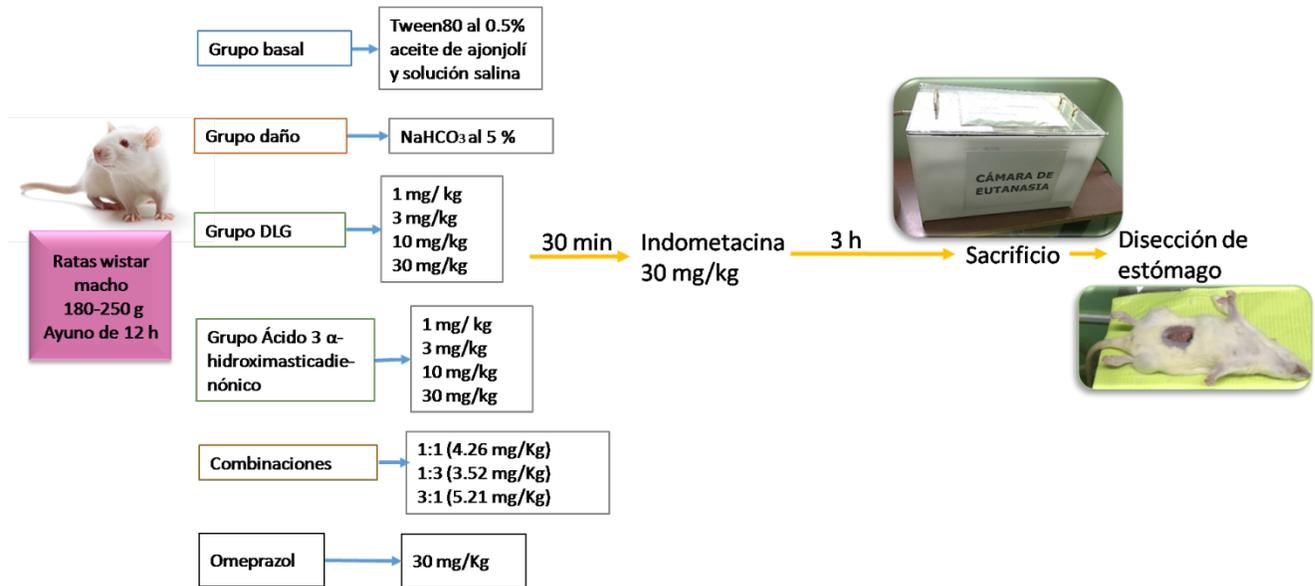
En la evaluación del daño gástrico se empleó el modelo de daño gástrico generado con indometacina, previamente descrito por Díaz-Triste et al.<sup>32</sup> En este modelo se establece una dosis de: 30 mg/Kg, a la cual se observa daño gástrico significativo. El agente ulcerante fue indometacina, fármaco representante de la familia de los AINEs, conocido por su alta capacidad de generar úlceras gástricas a través de diversos procesos, incluido la generación de especies reactivas de oxígeno, la

iniciación de la peroxidación lipídica, infiltración de leucocitos, inducción de apoptosis e inhibición de la síntesis de prostaglandinas.<sup>33</sup>

Se formaron aleatoriamente grupos de 6 ratas Wistar macho. Los compuestos individuales (DLG o 3 $\alpha$ -HMD), omeprazol (fármaco de referencia) y las combinaciones 3 $\alpha$ -HMD-DLG en las tres diferentes proporciones (1:1, 1:3 y 3:1), y el vehículo (grupo basal) se administraron por vía oral por medio de una cánula metálica, de acuerdo al diseño mostrado en la **figura 7**. Treinta minutos después, se les administró una dosis de 30 mg/kg, p.o. de indometacina (excepto al grupo basal) para la inducción del daño gástrico y tres horas después se sacrificó a los animales en cámara de CO<sub>2</sub>, acorde a la técnica de eutanasia descrita en la NOM-062-ZOO-1999. Posteriormente se removió el estómago, se abrió por la curvatura mayor para una completa extensión y se lavó con solución salina. Se realizó el análisis macroscópico de las lesiones, mediante el análisis fotográfico (usando un microscopio digital) del estómago extendido por medio del programa ImageJ (Versión 1.45). El cual, consistió en medir el área de cada lesión, para obtener la sumatoria total por cada estómago del área de daño (mm<sup>2</sup>), definiéndose como: índice de úlcera (*IU*). El porcentaje de gastroprotección se calculó de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de protección} = (IUC - IUT) \times \frac{100}{IUC}$$

donde IUC es el índice de úlcera del grupo control (mm<sup>2</sup>) e IUT es el índice de úlcera de los tratamientos (mm<sup>2</sup>).<sup>34</sup> Estos resultados fueron empleados para el cálculo de la DE<sub>50</sub> de cada compuesto y las muestras de tejido gástrico fueron almacenadas a -70°C para su posterior análisis.



**Figura 7.** Diseño de la evaluación del efecto gastroprotector del ácido 3 $\alpha$ -hidroximasticadienónico, diligustílida y las combinaciones de los compuestos.

### 6.5 Diseño experimental de la combinación de 3 $\alpha$ -hidroximasticadienónico-diligustílida

Para evaluar la interacción del efecto gastroprotector del ácido 3 $\alpha$ -hidroximasticadienónico-diligustílida contra el daño gástrico inducido con indometacina se probaron tres combinaciones a una proporción fija (1:1, 1:3 y 3:1) basada en las fracciones de sus valores individuales de DE<sub>50</sub> (6.96 mg/Kg para el ácido 3 $\alpha$ -HMD y 2.63 mg/Kg para DLG) obtenidos de las curvas dosis-respuesta individuales. Las dosis y los tiempos de administración usados en todos los experimentos, fueron seleccionados de acuerdo a los resultados de estudios reportados.<sup>20,25,35</sup> El diseño experimental de las dosis probadas en cada combinación es mostrada en el **cuadro 1**.

**Cuadro 1.** Dosis usadas en el estudio de la interacción del efecto gastroprotector entre ácido 3 $\alpha$ -hidroximasticadienónico–diligustílida en un modelo de daño gástrico inducido con indometacina y área de lesiones gástricas.

Tratamiento		Dosis (mg/Kg, p.o.)	Lesiones de daño gástrico (mm <sup>2</sup> )
Solución salina (Grupo de daño)		--	40.07 $\pm$ 1.25
Ácido 3 $\alpha$ -hidroximasticadienónico			
		0.333	30.94 $\pm$ 2.10
		1	33.96 $\pm$ 1.46
		3	25.92 $\pm$ 1.91*
		10	13.79 $\pm$ 2.66*
		30	9.90 $\pm$ 1.35*
Diligustílida			
		0.333	30.05 $\pm$ 3.25
		1	26.88 $\pm$ 1.86
		3	15.37 $\pm$ 2.99*
		10	4.63 $\pm$ 0.71*
		30	4.37 $\pm$ 1.25*
Combinación 1:1 ácido 3 $\alpha$ -hidroximasticadienónico-diligustílida			
Ácido 3 $\alpha$ -hidroximasticadienónico	Diligustílida	Total	Lesiones de daño gástrico (mm <sup>2</sup> )
0.08	0.04	0.12	19.15 $\pm$ 2.10*
0.17	0.08	0.25	18.49 $\pm$ 2.76*
0.36	0.15	0.51	19.43 $\pm$ 2.68*
0.71	0.31	1.02	12.88 $\pm$ 1.88*
2.86	1.25	4.11#	10.78 $\pm$ 1.81*
11.48	4.98	16.46	5.40 $\pm$ 1.61*

---

Combinación 1:3 ácido 3 $\alpha$ -hidroximasticadienónico-diligustílida

---

Ácido 3 $\alpha$ -hidroximasticadienónico	Diligustílida	Total	Lesiones de daño gástrico(mm <sup>2</sup> )
0.02	0.03	0.05	40.20 $\pm$ 2.27
0.09	0.11	0.20	27.70 $\pm$ 2.97*
0.18	0.23	0.41	27.93 $\pm$ 2.16*
1.42	1.88	3.30 <sup>#</sup>	22.86 $\pm$ 3.15*
5.73	7.49	13.22	12.25 $\pm$ 2.44*

---

Combinación 3:1 ácido 3 $\alpha$ -hidroximasticadienónico-diligustílida

---

Ácido 3 $\alpha$ -hidroximasticadienónico	Diligustílida	Total	Lesiones de daño gástrico(mm <sup>2</sup> )
0.06	0.01	0.07	35.41 $\pm$ 1.87
0.27	0.03	0.30	26.00 $\pm$ 1.02*
0.53	0.08	0.61	22.06 $\pm$ 2.79*
4.3	0.62	4.92 <sup>#</sup>	13.24 $\pm$ 2.13*
17.21	2.50	19.71	10.98 $\pm$ 2.07*

---

Omeprazol

30                      1.15  $\pm$  0.72\*

---

Dosis usadas para la construcción de las curvas dosis-respuesta para cada combinación de dosis evaluada. Estas dosis corresponden a Zadd (n=6). Administración a ratas por vía oral de ácido 3 $\alpha$ -hidroximasticadienónico, diligustílida y la combinación de ácido 3 $\alpha$ -hidroximasticadienónico –diligustílida en las proporciones fijas 1:1, 1:3 y 3:1. Los datos son representados como la media  $\pm$  EEM (n=6). \*p<0.05 contra el grupo de daño.

### 6.6 Análisis de los datos de la combinación de los compuestos

La interacción entre el ácido 3 $\alpha$ -HMD y DLG fue caracterizada mediante un análisis isoblográfico. Este análisis requiere la dosis equiefectivas (DE<sub>50</sub>) de los compuestos individuales en cada combinación, debido a que las curvas dosis-

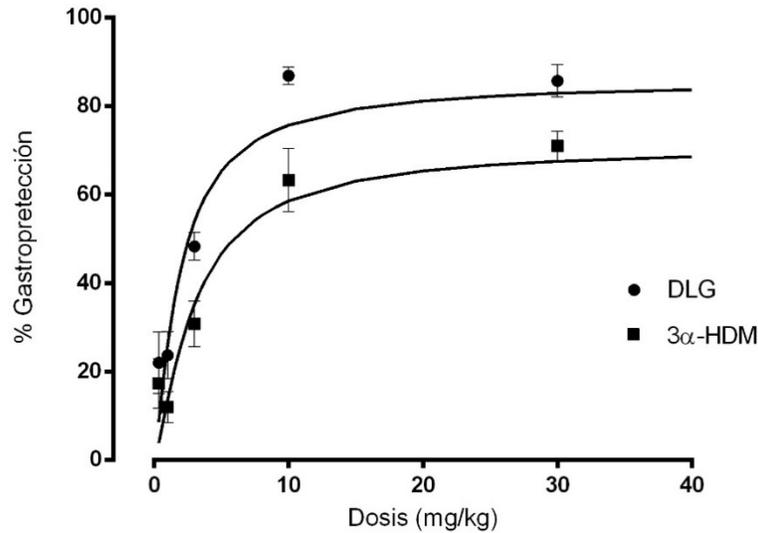
respuesta mostraron que cada compuesto tiene diferente efecto máximo (**Figura 8**). Los valores de las coordenadas cartesianas en la isobola de la curva correspondiente del par (a, b) que pertenece a la dosis a para el ácido 3 $\alpha$ -hidroximasticadienónico (en el eje x) y dosis b para diligustílida (en el eje y) se estimaron como se describe en reportes previos.<sup>36,37</sup> Los pares (a, b) de la isobola curvilínea se calcularon con la relación:

$$b = B_{50} (A_{50} (A_{50}-a/A_{50})^{q/p} \dots\dots(1)$$

Donde  $A_{50}$  es la  $DE_{50}$  del ácido 3 $\alpha$ -hidroximasticadienónico y  $B_{50}$  la  $DE_{50}$  de la diligustílida. Las dosis aditivas teóricas ( $Z_{add}$ ) y el EEM para cada combinación en la misma proporción de compuesto (1:1, 1:3 y 3:1) fueron calculadas a partir de las dosis efectivas individuales ( $DE_{50}$ ), acorde al método descrito por Tallarida.<sup>27</sup> Que sigue la siguiente ecuación:

$$Z_{add} = fA_{50} + (1-f) B_{50} \dots\dots(2)$$

El valor de  $fA_{50}$  representa la fracción de la  $DE_{50}$  del ácido 3 $\alpha$ -hidroximasticadienónico y (1-f) representa la fracción de la  $DE_{50}$  de diligustílida en la respectiva combinación.<sup>27,37,38</sup> Se determinaron los valores aditivos experimentales ( $Z_{exp}$ ) (y sus límites de confianza al 95%) obtenidos para cada mezcla fueron determinados (1:1, 1:3 y 3:1 en la proporción fija de la combinación) (**Cuadro 1**) y el 95% de los límites de confianza fue subsecuentemente transformado al EEM. Finalmente, las dosis aditivas teóricas ( $Z_{add}$ ) de cada combinación y los valores de la dosis aditiva experimental fueron comparados estadísticamente con la prueba t-student.<sup>27,37,38</sup>



**Figura 8.** Curva dosis-respuesta del efecto máximo del ácido 3 $\alpha$ -HMD y DLG (en las dosis de 1, 3, 10 y 30 mg/kg). Las dosis son representadas en el eje de las x y el porcentaje de efecto gastroprotector en el eje de las y de los componentes individuales. Los datos son presentados como la media  $\pm$  EEM con una n=6 ratas. Efecto máximo ( $E_{max}$ ) para DLG fue  $85.69 \pm 3.68$  % y para el 3 $\alpha$ -HDM  $70.96 \pm 3.26$ . Las dosis que representan la mitad del  $E_{max}$  fueron  $1.85 \pm 0.18$  mg/kg para DLG y  $3.06 \pm 0.56$  mg/Kg del ácido 3 $\alpha$ -HMD.

### 6.7 Análisis isoblográfico de las combinaciones

Acorde a la metodología reportada previamente por Tallarida,<sup>37</sup> una vez que se evaluaron las  $DE_{50}$  teóricas de las combinaciones de cada una de las proporciones, se calcularon las  $DE_{50}$  experimentales, por medio de una regresión no lineal realizada a los datos obtenidos de las curvas dosis respuesta de cada ensayo (gastroprotección). Se graficaron las  $DE_{50}$  teóricas y experimentales en un plano cartesiano de 2 dimensiones; graficando en el eje de las “x” la dosis  $DE_{50}$  experimental del ácido 3 $\alpha$ -hidroximasticadienónico, en el eje de la “y” la  $DE_{50}$  experimental de diligustílida y por último las  $DE_{50}$  experimentales de las combinaciones. En la isobola o línea de aditividad, se representan todas las dosis efectivas teóricas de cada una de las proporciones fijas de los compuestos. Posteriormente se calculó el coeficiente de interacción por medio de la siguiente ecuación:

$$\frac{a}{A} + \frac{b}{B} = 1 \dots \dots (3)$$

En donde “A”, “B” son las DE<sub>50</sub> de cada compuesto y “a”, “b” son las proporciones de cada compuesto en la combinación. Si el valor de esta relación es mayor de la unidad (1), esta relación indica que existe una interacción farmacodinámica de tipo subaditiva; si el valor es igual o cercano a la unidad, esta relación indica que no existe interacción y que se está llevando a cabo una relación aditiva; si el valor es menor a la unidad, esta relación indica que se está presentando una interacción de tipo superaditiva.

#### 6.8 Cuantificación de glutatión (GSH)

A 200 mg de tejido gástrico, se le adicionó 1 mL de buffer de fosfatos 0.1 M (que contiene 1 mM de EDTA ajustado a pH= 8); se cortó en pequeños fragmentos con tijeras. Posteriormente se le adicionaron 100 µL de ácido tricloroacético al 5% p/v y se homogenizó durante 5 minutos. El homogenizado obtenido se centrifugó (9000 g) durante 16 min a 4°C. Se tomaron 100 µL del sobrenadante, al cual se le adicionaron 800 µL de buffer de fosfatos (previamente descrito) y 100 µL de DTNB 0.01M. A los 5 minutos se realizó la lectura de las absorbancias a una longitud de onda de 480 nm. Los valores obtenidos fueron interpolados en una curva estándar de GSH reducido que comprendió las siguientes concentraciones: 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 y 100 µM. Para la realización de esta curva se utilizó una solución stock de GSH reducido 0.2 M y como blanco buffer de fosfatos.<sup>20</sup>

#### 6.9 Cuantificación de nitritos

A 200 mg de tejido gástrico, se le adicionó 1 mL de buffer de fosfatos salino ajustado a pH= 7.4 y se cortó en pequeños fragmentos con tijeras. Posteriormente fue incubado en baño de agua (37 ° C) con movimiento continuo por 20 min, después

se centrifugó (9000 g) durante 1 min. El sobrenadante obtenido fue utilizado para la cuantificación de nitritos usando el ensayo colorimétrico mediante la reacción de Griess. Se adicionaron 50  $\mu$ L de reactivo de Griess 1 (Sulfanilamida al 1% en ácido fosfórico al 5%) y 50  $\mu$ L de reactivo de Griess 2 (N-naftiletilendiamina al 2%). Se incubó por 10 minutos a temperatura ambiente y se realizó la lectura de las absorbancias a una longitud de onda de 540 nm. La curva de calibración fue construida con nitrito de sodio en las concentraciones 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 30, 45 y 50  $\mu$ M. Como blanco fue utilizado buffer de fosfatos.<sup>32</sup>

#### 6.10 Análisis estadístico

Todos los datos fueron expresados como la media  $\pm$ EEM (n=6 ratas). Las dosis obtenidas fueron analizadas por medio de un análisis de varianza (ANADEVA) de una vía seguida por una prueba post hoc de Dunnett. Un valor de  $p < 0.05$  fue considerada como estadísticamente significativa entre las medias. La comparación entre los valores las dosis efectivas medias teóricas ( $Z_{add}$ ) y las dosis efectivas medias experimentales ( $Z_{exp}$ ) fueron analizados usando la prueba  $t$  de Student acorde a los procesos previamente descritos por Tallarida.<sup>27</sup> Los valores de  $Z_{exp}$  que fueron menores que el valor de  $Z_{add}$ , con diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) en ambas direcciones indicaron interacciones superaditivas. Los valores de  $Z_{exp}$  que fueron mayores que los valores de  $Z_{add}$ , con diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en ambas direcciones X e Y, se interpretaron como interacciones subaditivas. La ausencia de una diferencia significativa entre los valores de  $Z_{exp}$  y  $Z_{add}$  se interpretó como una relación de tipo aditiva (aditividad) en la combinación.<sup>37,38</sup> Para obtener un valor para describir la magnitud de interacción, se realizó un análisis fraccional utilizando los valores de la  $DE_{50}$  del

ácido 3 $\alpha$ -HMD, DLG y su combinación respectivamente de acuerdo con los procedimientos descritos anteriormente por Tallarida.<sup>37,38</sup>

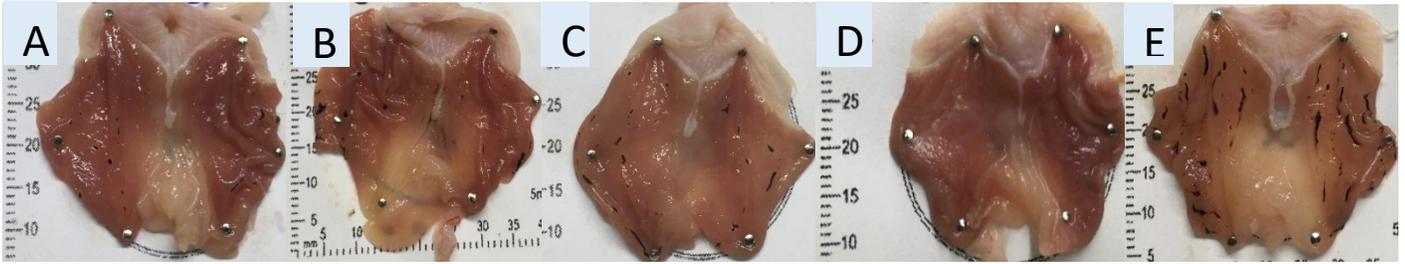
## VII. Resultados

### 7.1 Efecto gastroprotector del ácido 3 $\alpha$ -hidroximasticadienónico, diligustílida y la combinación de 3 $\alpha$ -hidroximasticadienónico-diligustílida

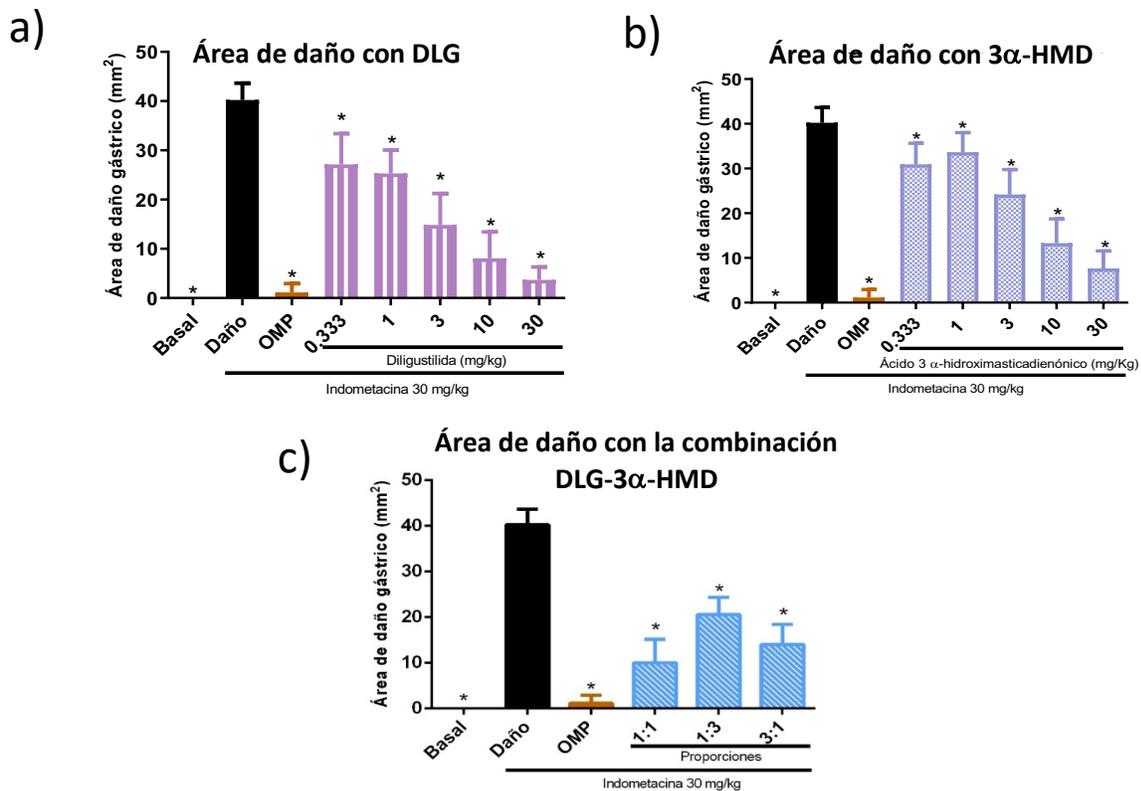
El pretratamiento con 3 $\alpha$ -hidroximasticadienónico y diligustílida como compuestos individuales (en las dosis 0.33, 1, 3, 10, 30 mg/kg, p.o.) y las tres combinaciones probadas 1:1, 1:3 y 3:1, disminuyeron las lesiones gástricas inducidas con indometacina comparadas con el grupo de daño, tratado con indometacina (**Figura 9 y figura 10**; p<0.05). Los compuestos fueron efectivos como omeprazol (fármaco de referencia) para proteger el tejido gástrico contra el daño por indometacina (**Cuadro 1**). Las curvas dosis-respuesta son mostradas en la **figura 11** y las DE<sub>50</sub> con sus respectivos límites de confianza en el **cuadro 2**.

**Cuadro 2.** DE<sub>50</sub> y límites de confianza al 95% de los compuestos individuales y en combinación.

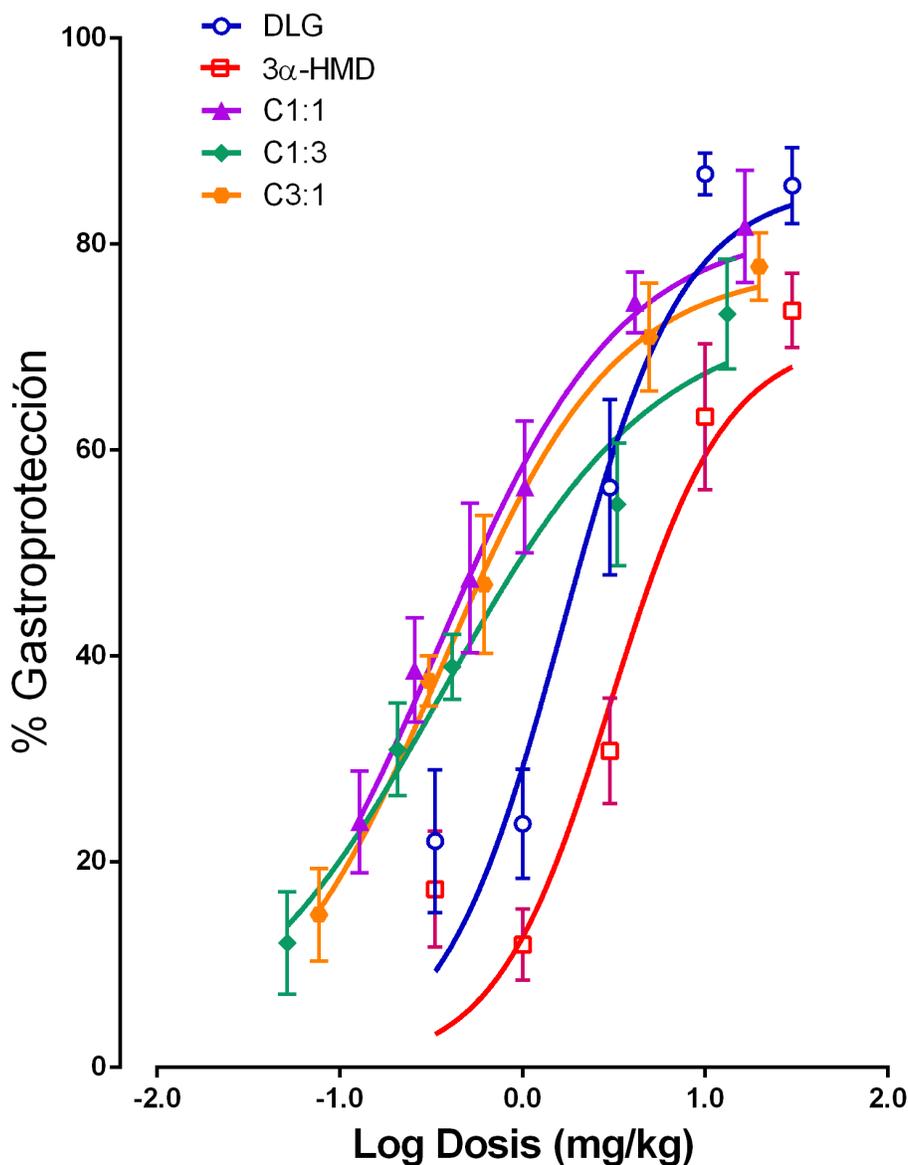
Compuesto	DE <sub>50</sub> (mg/Kg, p.o.)	Límite de confianza 95%
Ácido 3 $\alpha$ -hidroximasticadienónico	6.96	4.79-10.10
Diligustílida	2.63	1.96-3.51
Combinación ácido 3 $\alpha$ -hidroximasticadienónico-diligustílida		
1:1	0.70	0.47-1.04
1:3	1.67	1.04-2.68
3:1	1.04	0.65-1.51



**Figura 9.** Ulceración de estómago con el pretratamiento de la combinación 3 $\alpha$ -HMD-DLG. A) Proporción 1:1 dosis 4.26 mg/Kg, B) Proporción 1:3 dosis 3.52, C) Proporción 3:1 dosis 5.21, D) Basal administración de vehículo, E) Daño con indometacina en la dosis 30 mg/Kg.



**Figura 10.** Área de daño de los compuestos individuales y en combinación en modelo de daño gástrico inducido con indometacina. Los datos representan la media EEM del total de daño gástrico (n=6). Daño: indometacina 30 mg/Kg, OMP: omeprazol 30 mg/Kg, basales: solución salina. ANADEV A de una vía, prueba post hoc de Dunnett \*p<0.05 vs daño.



**Imagen 11.** Curva dosis- respuesta del porcentaje de gastroprotección. El Log de la dosis se representa en el eje de las abscisas en las dosis 0.33, 1, 3, 10, 30 y en las dosis de las combinaciones  $4.26 \pm 0.48$ ,  $3.52 \pm 0.40$  y  $5.21 \pm 0.72$  mg/kg. Los datos son representados como la media  $\pm$  EEM con una n=6 ratas.

## 7.2 Interacción entre el ácido 3 $\alpha$ -hidroximasticadienónico y diligustílida

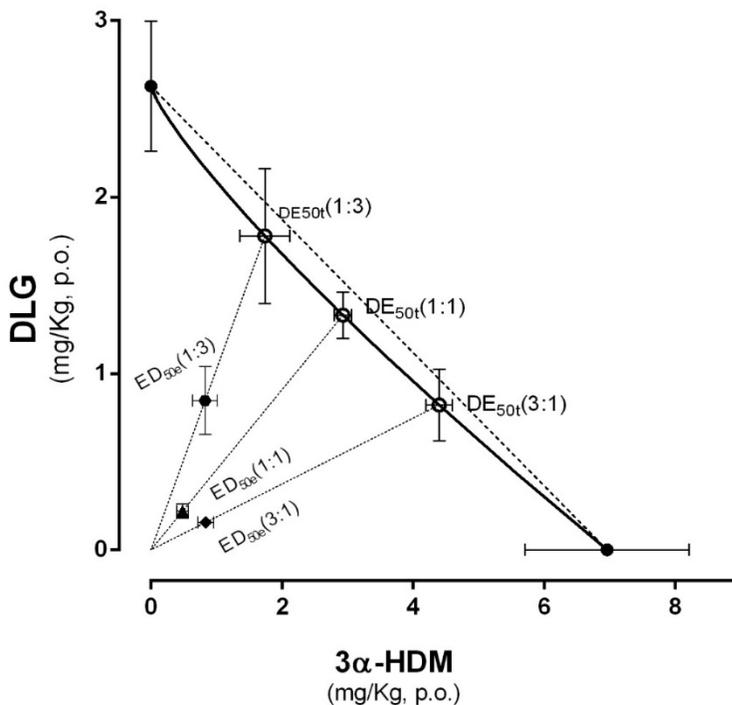
La administración de las combinaciones de ácido 3 $\alpha$ -hidroximasticadienónico y diligustílida en las tres proporciones mostraron efecto gastroprotector en el daño gástrico con indometacina (**Cuadro 1**  $p < 0.05$ ). Los valores teóricos de las  $DE_{50}$  (Zadd) de las combinaciones 1:1, 1:3 y 3:1 son mostradas en el **cuadro 2**. Los valores experimentales obtenidos (Zexp) en la administración concomitante de los compuestos fueron

significativamente diferentes respecto a los valores teóricos (Zadd) en las tres combinaciones probadas (**Figura 3**). El análisis de las tres combinaciones demostró que en la relación a/A + b/B fueron significativamente menores que 1.0 (**Cuadro 3**,  $p < 0.05$ ), lo que indica una interacción sinérgica o superaditiva. Tal resultado se puede observar en la figura 12, en la cual se muestra que las DE<sub>50</sub> de las combinaciones se encuentran por debajo de la isobola o línea de aditividad.

**Cuadro 3.** Magnitud de la interacción de las proporciones

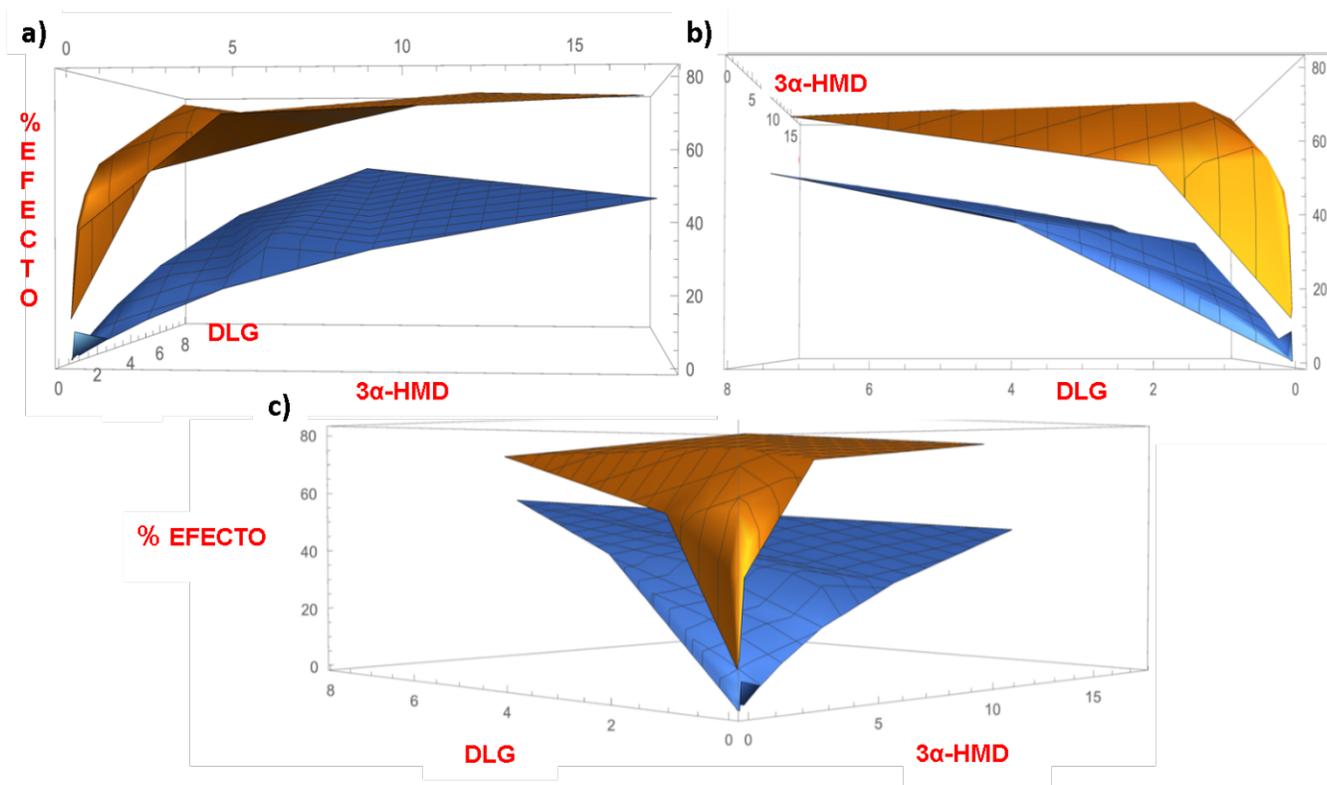
Proporción	Zadd (mg/kg)	Zexp (mg/kg)	Magnitud de la interacción
1:1	4.26±0.48	0.70±0.13	0.15*
1:3	3.52±0.40	1.67±0.38	0.44*
3:1	5.21±0.72	1.04 ±0.20	0.18*

Valores teóricos de la DE<sub>50</sub> (Zadd), valores teóricos de experimentales de la DE<sub>50</sub> (Zexp) y magnitud de interacción entre el ácido 3 $\alpha$ -HMD y DLG. \* Interacción de superaditividad.<sup>37</sup>



**Figura 12.** Isoblograma de la combinación de los compuestos 3 $\alpha$ -hidroximasticadienonico y diligustílida en el modelo de daño gástrico inducido con indometacina. La dosis individual de los valores DE<sub>50</sub> (•), valor teórico calculado de DE<sub>50</sub> para efecto aditivo en una proporción fija 1:1, 1:3 y 3:1 (o), los valores experimentales de la DE<sub>50</sub> en una proporción fija (•). Las barras horizontales y verticales indican el ± EEM.

Un análisis complementario al análisis isoblográfico es el análisis de sinergismo, por medio de la superficie de interacción sinérgica en el cual se observó que el efecto experimental (área naranja) fue mayor al efecto teórico (área azul) ya que se encuentra por encima de la superficie teórica (**figura 13c**) y que la proporción 1:1 fue que generó un mayor efecto gastroprotector (**figura 13a**).

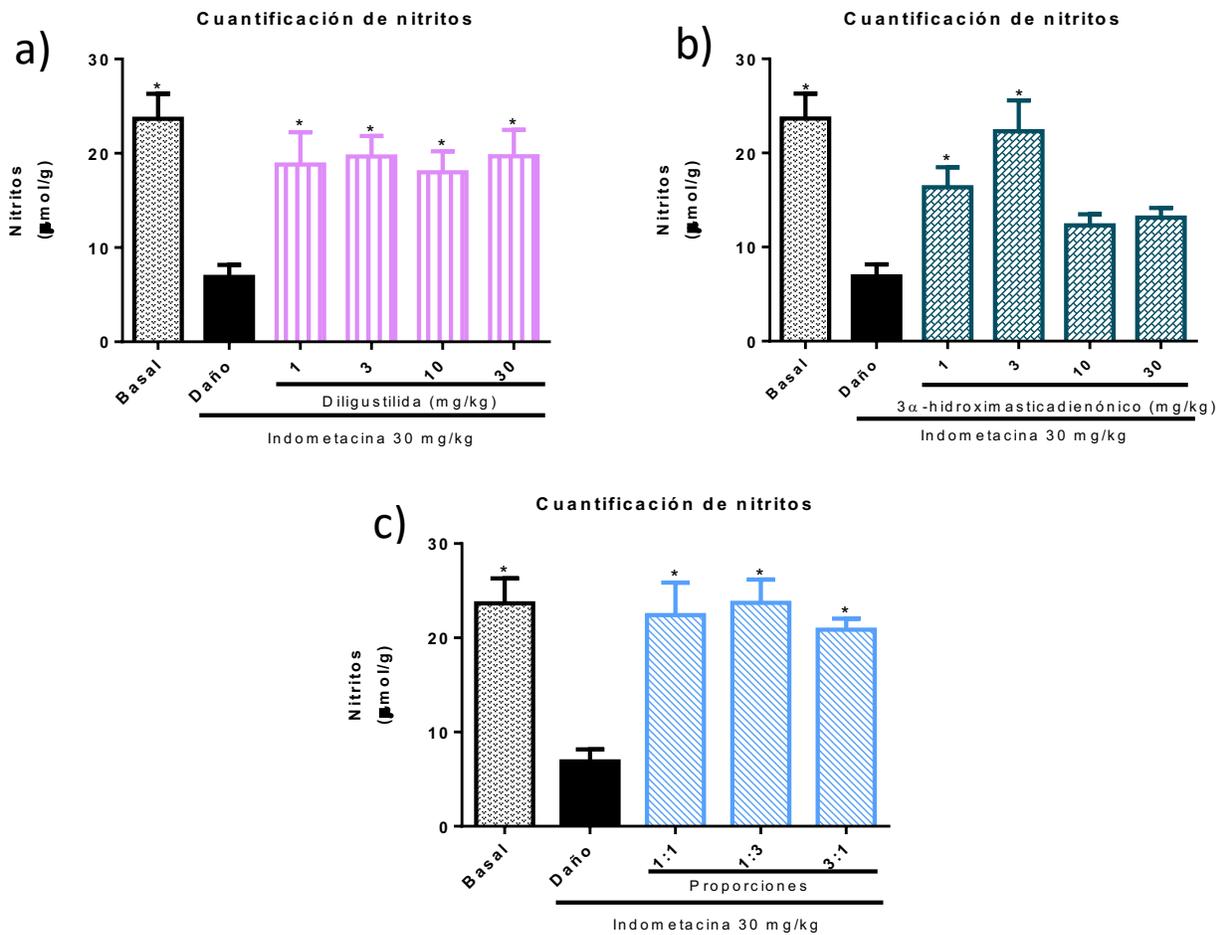


**Figura 13.** Representación del área de superficie de las combinaciones de 3 $\alpha$ -HMD-DLG en las proporciones 3:1, 1:1 y 1:3. En el gráfico experimental (naranja) se observa que se encuentra por encima del efecto teórico (azul) indicando un efecto de superaditividad en todas las combinaciones. Eje Y las dosis de DLG, eje X las dosis de 3 $\alpha$ -HMD empleadas en la administración concomitante y en el eje Z el porcentaje de efecto de gastroprotector.

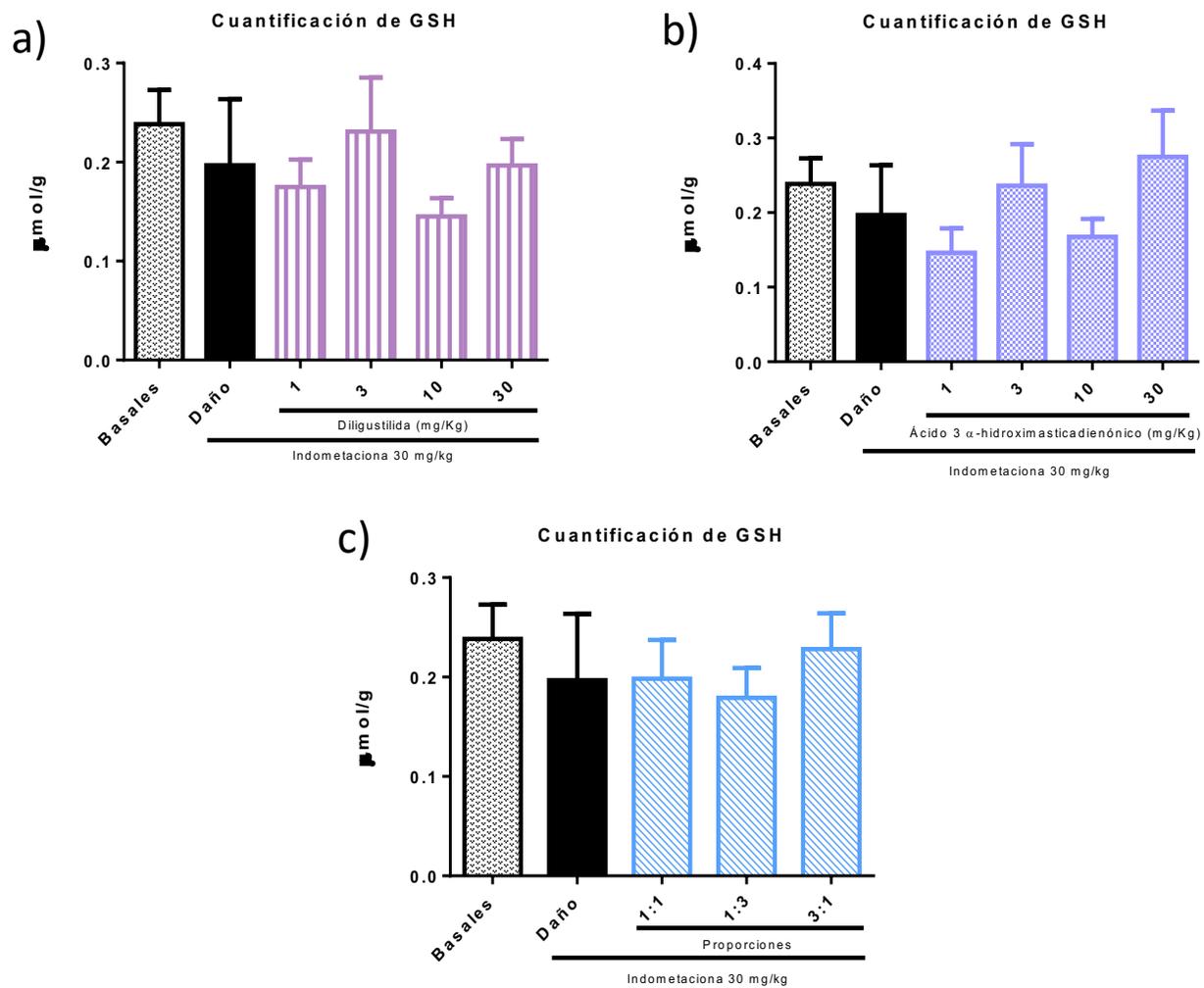
### 7.3 Cuantificación de mediadores de la gastroprotección

La administración de indometacina (grupo de daño) provocó un decremento en los niveles de nitritos. Al administrar los compuestos individuales, diligustílida aumenta los niveles en todas las dosis, el ácido en 1 y 3, sin embargo, en las combinaciones los niveles de nitritos aumentan en las tres proporciones en comparación con el grupo de daño (**Figura 14**,  $p < 0.05$ ).

Los niveles de GSH disminuyeron al administrar la indometacina comparando los niveles con el grupo basal. Al administrar los compuestos individuales y en combinación los niveles se mantuvieron constantes contra el grupo de daño (**Figura 15**,  $p < 0.05$ ).



**Figura 14.** Cuantificación de nitritos en muestras de tejido gástrico. a) diligustilida en las dosis 1,3 10 y 30, b) 3α-hidroximasticadienónico en las dosis 1, 3, 10 y 30, c) combinación en las proporciones 1:1 (4.26 mg/Kg), 1:3 (3.52 mg/Kg) y 3:1 (5.21 mg/Kg), daño: indometacina 30 mg/Kg y basales: solución salina administrados vía oral. Los datos representan la media ±EEM (n=6). ANADEVA de una vía, prueba post hoc de Dunnett \*p<0.05 vs daño.



**Figura 15.** Cuantificación de GSH en muestras de tejido gástrico. a) diligustilida en las dosis 1, 3, 10 y 30, b) 3α-hidroxicasticadienónico en las dosis 1, 3, 10 y 30, c) combinación en las proporciones 1:1 (4.26 mg/Kg), 1:3 (3.52 mg/Kg), 3:1 (5.21 mg/Kg), daño: indometacina 30 mg/Kg y basales: solución salina administrados vía oral. Los datos representan la media ±EEM (n=6). ANADEVIA de una vía, prueba post hoc de Dunnett \*p<0.05 vs daño.

## VIII. Discusión de resultados

Los resultados obtenidos demuestran que la administración oral de ácido 3 $\alpha$ -HMD y DLG como compuestos individuales, disminuyen significativamente las lesiones gástricas en el modelo de daño con indometacina, obteniendo que el efecto gastroprotector de DLG ( $DE_{50}$ =2.63 mg/Kg) fue más potente respecto al efecto del ácido 3 $\alpha$ -HMD ( $DE_{50}$ =6.96 mg/Kg). Sin embargo, la administración de la combinación en las tres proporciones fijas (1:1, 1:3 y 3:1) presentó un mayor efecto que los compuestos individuales, mostrando una reducción de la dosis ( $DE_{50}$ 1:1= 0.70 mg/kg,  $DE_{50}$ 1:3=1.67 mg/Kg y  $DE_{50}$ 3:1=1.04 mg/Kg, respectivamente), sugiriendo una interacción de tipo superaditiva. Los resultados concuerdan con reportes previos donde evalúan el efecto gastroprotector de los compuestos de forma individual en modelos con etanol y diclofenaco, en los cuales, ambos compuestos mostraron actividad gastroprotectora.<sup>25,34</sup> En estos reportes, el efecto gastroprotector se obtuvo en dosis superiores a 10 mg/Kg para el ácido 3 $\alpha$ -hidroximasticadienónico y dosis superiores a 3 mg/Kg para diligustílida. El estudio de la combinación de estos dos compuestos es el primero en investigar el potencial efecto gastroprotector entre el ácido 3 $\alpha$ -hidroximasticadienónico y diligustílida en un modelo de daño gástrico con indometacina determinando que la  $DE_{50}$  ( $Z_{exp}$ ) de cada combinación probada fue significativamente más baja que la  $DE_{50}$  teórica ( $Z_{add}$ ) **Cuadro 1**. En este sentido cabe mencionar que el uso de una combinación farmacológica para la prevención y el tratamiento del daño gástrico relacionado con los AINEs es una alternativa para la reducción de las dosis de los compuestos. Por ejemplo, algunos estudios han probado el efecto gastroprotector de la

coadministración de N-acetilcisteína y genisteína en un modelo experimental de lesión gástrica inducida por indometacina, en la que se obtuvo significativamente un mejor efecto gastroprotector.<sup>39</sup> Además de que varios estudios han probado la combinación de compuestos naturales como el bisabol<sup>40</sup>, citral<sup>41</sup>, curcumina<sup>42</sup> y el ácido docosahexaenóico<sup>43</sup>, con los AINEs de mayor importancia en la clínica (indometacina, diclofenaco y naproxeno) para exhibir su actividad antiinflamatoria, antinociceptiva y evaluar la seguridad gástrica resultante de la combinación en modelos murinos. Por lo tanto, este estudio intenta mostrar la interacción farmacodinámica de la combinación de los dos compuestos, obtenidos de plantas medicinales para disminuir la gastropatía por AINEs, que son usadas frecuentemente en la medicina tradicional mexicana para problemas relacionados con úlcera gástrica. El efecto producido por las dosis más altas de ácido 3 $\alpha$ -hidroximasticadienónico, diligustílida y las combinaciones no fueron significativamente diferentes en el efecto gastroprotector producido por omeprazol, que es uno de los tratamientos comercialmente disponibles contra la gastropatía por AINEs. La combinación a la dosis más baja logró un efecto similar al omeprazol, por lo cual podría ser una alternativa a su uso ya que los IBPs en tratamientos prolongados se han asociado a la aparición de neoplasias gástricas, incremento de infecciones digestivas, riesgo de la absorción de hierro o vitamina B12 y cambios en la biota nativa del intestino<sup>2,4</sup>. Por otro lado, se ha reportado que la gastroprotección no está relacionada directamente con la producción del HCl y que requiere la expresión de las dos isoformas de COX.<sup>2,7</sup> Debido a esto, los inhibidores de la bomba de protones no son los más adecuados para el tratamiento de daño gástrico. En la actualidad, no se han reportado efectos adversos debido al uso de

*A. adstringens* y *L. porteri* en la medicina tradicional <sup>34,44,45</sup>, en consecuencia, la combinación entre 3 $\alpha$ -HDM-DLG tiene un alto potencial, para ser utilizado como una estrategia para disminuir el daño gástrico asociado al uso crónico de AINEs. Para realizar el análisis de dicha combinación, se utilizó el análisis isoblográfico como una metodología que proporciona las bases fundamentales para evaluar si las respuestas biológicas inducidas por una mezcla de sustancias activas resultan ser mayor, iguales o menores a la respuesta esperada, considerando las actividades individuales de los componentes de la mezcla.<sup>38</sup> Debido a que los compuestos demostraron tener diferentes efectos máximos como compuestos individuales en las curvas dosis-respuesta, la determinación de una curva isobólica permite una mejor interpretación y análisis de los datos experimentales en comparación con una línea recta.<sup>37</sup> Con ello se sabe que el isobolo puede ser una línea recta o curva, que es lineal cuando las curvas dosis-efecto individuales tienen una relación de potencia constante, y curvada cuando la relación es variable.<sup>37</sup> El isobolo que se obtuvo con los resultados fue curvado, lo que indica que la potencia del ácido 3 $\alpha$ -HMD y DLG es variable y que el tipo de interacción que se presenta es de tipo superaditivo debido a que se encuentra por debajo del isobolo (**Figura 12**).<sup>37</sup> Cabe mencionar que el uso de una combinación farmacológica para la prevención y el tratamiento de toxicidad gastrointestinal relacionada con los AINEs es un nuevo enfoque que podría reducir las dosis de los compuestos administrados. Por cual el aislamiento de compuestos en estudios de interacción de productos naturales es un aspecto importante, especialmente en aquellos con potencial farmacéutico. Sin embargo, pocos estudios han evaluado las interacciones entre productos naturales, debido a que los extractos obtenidos de plantas medicinales contienen gran cantidad de

metabolitos activos, limitando el estudio de las interacciones de éstos.<sup>34,43,46</sup> Como en algunos estudios, la interacción resultante puede variar dependiendo de la proporción del compuesto administrado en la combinación<sup>27</sup>, se ha asegurado que dichos compuestos se encuentren puros, para garantizar que la dosis de compuesto administrado sea la correcta.

Con base en los resultados el ácido 3 $\alpha$ -hidroximasticadienónico y diligustílida podrían tener mecanismos de acción complementarios. Hay reportes sobre el efecto antiulceroso de una fracción del 3 $\alpha$ -hidroximasticadienónico en daño gástrico con diclofenaco <sup>31,34,47</sup> donde se sugiere que las prostaglandinas, sulfhidrilos libres y óxido nítrico son el principal mecanismo gastroprotector, por otro lado, lo reportado sobre diligustílida acerca de sus propiedades antiulcerosas, es que protege a la mucosa gástrica a través de prostaglandinas sin inhibición de secreción gástrica<sup>44</sup> y recientemente su efecto gastroprotector mediante la regulación de óxido nítrico y sulfuro de hidrogeno por medio de la estabilización de nitrosotioles.<sup>20,25</sup>

El análisis de superficie o de sinergismo realizado, concuerda con los resultados obtenidos en el análisis isoblográfico, ya que el área de superficie del efecto experimental fue mayor al área de efecto teórico, indicando que hay interacción de tipo superaditiva. Este análisis es de gran utilidad para conocer a partir de una gama de diferentes proporciones de una combinación, el tipo de interacción que se puede presentar entre dos compuestos. Además de permitir determinar la proporción que fue más eficaz, por el grado de efecto que se generó, siendo esta la proporción 1:1, por lo cual es indicado para mostrar los diferentes grados de potenciación o antagonismo de las proporciones, identificando así aquella proporción con mayor grado de potenciación o mayor efecto gastroprotector. Las dosis probadas

permitieron obtener un panorama completo del tipo de interacción que presentaron estos compuestos, así como detectar la proporción más eficaz y la que genera el mayor grado de potenciación.<sup>48</sup>

Debido a que el óxido nítrico es un gas inestable, se realizó la determinación indirecta por medio de la cuantificación de nitritos en sobrenadante (**Figura 14**), los resultados obtenidos concuerdan con lo reportado por Díaz-Triste et al.<sup>32</sup>, quien reporta que el daño con indometacina provoca una disminución de los niveles de nitritos y con un pretratamiento gastroprotector un aumento en dichos niveles. Se ha reportado la participación de DLG en el mantenimiento de concentraciones endógenas de NO y al ácido 3 $\alpha$ -HMD se le ha relacionado con el NO por tener un papel importante en la gastroprotección debido a que solamente hay participación parcial de las prostaglandinas y sulfhidrilos endógenos, lo que indica que el efecto gastroprotector puede deberse a un aumento de los factores gastroprotectores<sup>34</sup> en el modelo de daño gástrico con etanol.<sup>20</sup> Lo cual coincide con los resultados obtenidos en este trabajo como compuestos individuales y en la combinación, debido a que los niveles en las tres proporciones son similares al grupo basal, lo cual sugiere que el mecanismo de acción de la combinación actúa sobre la vía de NO.

Se ha reportado que los AINEs causan daño a las células por medio de la oxidación, en este caso el mecanismo de la indometacina es generar daño por medio de la formación de radicales libres. En cuanto a los niveles basales y de daño se observó que sí hubo una disminución, pero esta no fue significativa y al compararlos con los grupos que recibieron un pre-tratamiento los niveles de GSH se mantuvieron

estables. Lo cual sugiere que el efecto gastroprotector de los compuestos no está relacionado con la vía de GSH.

Con todo lo anterior, el presente trabajo contribuye con datos experimentales que servirán como base para la realización de más estudios pre-clínicos que finalmente permitan a largo plazo, realizar el diseño de una formulación farmacéutica adecuada para implementar estudios clínicos en personas que se encuentren bajo tratamiento con AINEs y poder determinar si hay una mejora en el daño gástrico, y de esta manera introducirlo al mercado para sustituir las terapias actuales debido a los efectos adversos que se han reportado.

## IX. Conclusiones

1. La administración concomitante de 3 $\alpha$ -HMD-DLG en las tres proporciones probadas, tuvo interacción de tipo superaditiva en el modelo de daño gástrico inducido con indometacina. La proporción que presentó mayor efecto gastroprotector fue la proporción 1:1.
2. El 3 $\alpha$ -HMD y la DLG en forma individual o en combinación inhibieron la disminución de los niveles de óxido nítrico, ocasionado por el daño gástrico inducido por indometacina. Lo cual sugiere que su mecanismo de acción está relacionado con la vía del NO.
3. Los niveles de GSH no se modificaron con ninguno de los tratamientos, lo cual indica que esta vía no participa en el mecanismo de acción gastroprotector del 3 $\alpha$ -HMD y DLG.

## X. Perspectivas

1. Realizar la cuantificación de otros gastroprotectores para determinar cómo se encuentran influenciados por la administración concomitante de los metabolitos 3 $\alpha$ -HMD-DLG y por lo tanto tener una mejor comprensión de su mecanismo de acción.
2. Evaluar la combinación de los compuestos naturales en un modelo crónico de daño gástrico inducido con AINEs.
3. Desarrollar una forma farmacéutica para la administración de los compuestos naturales como agentes gastroprotectores.

## XI. Referencias

1. Wallace JL, Vong L. NSAID-induced gastrointestinal damage and the design of GI-sparing NSAIDs. *Curr Opin Investig Drugs*. 2008;9(11):1151-1156.
2. Wallace JL. Prostaglandins, NSAIDs, and Gastric Mucosal Protection: Why Doesn't the Stomach Digest Itself? *Physiol Rev*. 2008. doi:10.1152/physrev.00004.2008
3. Takeuchi K. Pathogenesis of NSAID-induced gastric damage: Importance of cyclooxygenase inhibition and gastric hypermotility. *World J Gastroenterol*. 2012. doi:10.3748/wjg.v18.i18.2147
4. Wallace JL, Syer S, Denou E, et al. Proton pump inhibitors exacerbate NSAID-induced small intestinal injury by inducing dysbiosis. *Gastroenterology*. 2011;141(4):1314-1322.e5. doi:10.1053/j.gastro.2011.06.075
5. Salud S de. : : *Tratamiento de La Perforación de Úlcera Péptica En Pacientes Adultos En El 2° Nivel de Atención*. México; 2012. www.cenetec.salud.gob.mx.
6. Arrieta J, Reyes-Trejo B, Reyes-Ramírez A, Rodríguez-Silverio J, Sánchez-Mendoza ME. Papel de los grupos sulfhidrilos, las prostaglandinas y el óxido nítrico endógeno, en la gastroprotección del lanosterol sobre las lesiones gástricas inducidas por etanol en rata. *Rev Mex Ciencias Farm*. 2009;40(3):17-21.
7. Shin S. Safety of celecoxib versus traditional nonsteroidal anti-inflammatory drugs in older patients with arthritis. *J Pain Res*. 2018. doi:10.2147/JPR.S186000
8. Wallace JL, Caliendo G, Santagada V, Cirino G, Fiorucci S. Gastrointestinal Safety and Anti-Inflammatory Effects of a Hydrogen Sulfide-Releasing Diclofenac Derivative in the Rat. *Gastroenterology*. 2007;132(1):261-271. doi:10.1053/J.GASTRO.2006.11.042
9. Lorenzo-Velázquez B 1901-1985., Lorenzo Fernández P de. *Farmacología Básica y Clínica*. Médica Panamericana; 2008. <https://www.medicapanamericana.com/Libros/Libro/3987/Velazquez-Farmacologia-Basica-y-Clinica.html>. Accessed November 14, 2018.
10. Su CW, Zhang Y, Zhu YT. Stromal COX-2 signaling are correlated with colorectal cancer: A review. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2016. doi:10.1016/j.critrevonc.2016.08.010
11. Wallace JL, McKnight W, Reuter BK, Vergnolle N. NSAID-induced gastric damage in rats: Requirement for inhibition of both cyclooxygenase 1 and 2. *Gastroenterology*. 2000;119(3):706-714. doi:10.1053/gast.2000.16510
12. Tratamiento de ARTRITIS REUMATOIDE del Adulto Evidencias Recomendaciones D, Tratamiento de Artritis Reumatoide Del Adulto D. GUÍA DE PRÁCTICA CLÍNICA gpc. www.cenetec.salud.gob.mx. Accessed March 17, 2018.
13. Blackler R, Syer S, Bolla M, Ongini E, Wallace JL. Gastrointestinal-sparing effects of novel nsoids in rats with compromised mucosal defence. *PLoS One*. 2012. doi:10.1371/journal.pone.0035196
14. Secretaría de Salud, Subsecretaría de Integración y Desarrollo del Sector Salud D de E del D. *Informe Sobre La Salud de Los Mexicanos 2015* :

- Diagnóstico General de La Salud Poblacional.*; 2015. [https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/64176/INFORME\\_LA\\_SALUD\\_DE\\_LOS\\_MEXICANOS\\_2015\\_S.pdf](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/64176/INFORME_LA_SALUD_DE_LOS_MEXICANOS_2015_S.pdf).
15. Sociedad Española de Reumatología. E. *Revista Española de Reumatología : Órgano Oficial de La Sociedad Española de Reumatología*. Vol 27. La Sociedad; 2000. <http://www.elsevier.es/es-revista-revista-espanola-reumatologia-29-articulo-efectos-los-aime-sobre-mucosa-8543>. Accessed November 14, 2018.
  16. Díaz-Casasola L. Mucosa gástrica: mecanismos protectores y efectos dañinos del ácido acetilsalicílico. Enfoques fisiológico y bioquímico. *Med e Investig*. 2015;3(1):100-103. doi:10.1016/j.mei.2015.02.011
  17. Suleyman H, Albayrak A, Bilici M, Cadirci E, Halici Z. Different mechanisms in formation and prevention of indomethacin-induced gastric ulcers. *Inflammation*. 2010;33(4):224-234. doi:10.1007/s10753-009-9176-5
  18. Nishida K, Ohta Y, Ishiguro I. Contribution of NO synthases to neutrophil infiltration in the gastric mucosal lesions in rats with water immersion restraint stress. *FEBS Lett*. 1998. doi:10.1016/S0014-5793(98)00237-3
  19. Wallace JL. Nitric Oxide in the Gastrointestinal Tract: Opportunities for Drug Developm1. Wallace JL. Nitric Oxide in the Gastrointestinal Tract: Opportunities for Drug Development. *Br J Pharmacol*. *Br J Pharmacol*. 2018. doi:10.1111/bph.14527
  20. Velázquez-Moyado JA, Balderas-López JL, Pineda-Peña EA, Sánchez-Ortiz BL, Tavares-Carvalho JC, Navarrete A. Diligustilide releases H<sub>2</sub>S and stabilizes S-nitrosothiols in ethanol-induced lesions on rat gastric mucosa. *Inflammopharmacology*. 2018;26(2):611-619. doi:10.1007/s10787-017-0392-6
  21. Bryan NS, Grisham MB. Methods to detect nitric oxide and its metabolites in biological samples. *Free Radic Biol Med*. 2007. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2007.04.026
  22. Dalle-Donne I, Rossi R, Giustarini D, Colombo R, Milzani A. S-glutathionylation in protein redox regulation. *Free Radic Biol Med*. 2007;43(6):883-898. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2007.06.014
  23. Wallace JL, Vaughan D, Dicay M, MacNaughton WK, de Nucci G. Hydrogen Sulfide-Releasing Therapeutics: Translation to the Clinic. *Antioxid Redox Signal*. 2017. doi:10.1089/ars.2017.7068
  24. Wallace JL, Ferraz JGP. New Pharmacologic Therapies in Gastrointestinal Disease. *Gastroenterol Clin North Am*. 2010. doi:10.1016/j.gtc.2010.08.020
  25. Velázquez-Moyado JA, Martínez-González A, Linares E, Bye R, Mata R, Navarrete A. Gastroprotective effect of diligustilide isolated from roots of *Ligusticum porteri* Coulter & Rose (Apiaceae) on ethanol-induced lesions in rats. *J Ethnopharmacol*. 2015;174:403-409. doi:10.1016/j.jep.2015.08.030
  26. Chavez-Piña A, Navarrete A. Gastroprotective Triterpenoids: Pharmacological Mechanism. In: Alejandro V, Ibañez J, eds. *Medicinal Plants Classification, Biosynthesis and Pharmacology*. New York; 2009:97-100.
  27. Tallarida RJ. *Drug Synergism and Dose-Effect Data Analysis*. New York: Chapman and Hall/CRC; 2000.
  28. Balderas, José: Alfaro, Alejandro: Navarrete A. *Volumen 1. Farmacometría:*

- Curvas Dosis-Respuesta de Tipo Gradual*. UNAM. México; 2017.
29. Tallarida RJ. *Drug Synergism: Its Detection and Applications*. Vol 298.; 9205. <http://jpet.aspetjournals.org>.
  30. Navarrete A, Sánchez-Mendoza ME, Arrieta J, Cruz-Antonio L, Oliva I, Castañeda-Hernández G. Gastroprotection and effect of the simultaneous administration of Cuachalalate ( *Amphipterygium adstringens* ) on the pharmacokinetics and anti-inflammatory activity of diclofenac in rats. *J Pharm Pharmacol*. 2005;57(12):1629-1636. doi:10.1211/jpp.57.12.0013
  31. Arrieta J, Benitez J, Flores E, Castillo C, Navarrete A. Purification of Gastroprotective Triterpenoids from the Stem Bark of *Amphipterygium adstringens*; Role of Prostaglandins, Sulfhydryls, Nitric Oxide and Capsaicin-Sensitive Neurons. *Planta Med*. 2003;69(10). doi:10.1055/s-2003-45098
  32. Díaz-Triste NE, González-García MP, Jiménez-Andrade JM, Castañeda-Hernández G, Chávez-Piña AE. Pharmacological evidence for the participation of NO–cGMP–KATP pathway in the gastric protective effect of curcumin against indomethacin-induced gastric injury in the rat. *Eur J Pharmacol*. 2014. doi:10.1016/j.ejphar.2014.02.030
  33. Heeba GH, Hassan MKA, Amin RS. Gastroprotective effect of simvastatin against indomethacin-induced gastric ulcer in rats: Role of nitric oxide and prostaglandins. *Eur J Pharmacol*. 2009. doi:10.1016/j.ejphar.2009.02.008
  34. Navarrete A, Oliva I, Sánchez-Mendoza ME, Arrieta J, Cruz-Antonio L, Castañeda-Hernández G. Gastroprotection and effect of the simultaneous administration of Cuachalalate (*Amphipterygium adstringens*) on the pharmacokinetics and anti-inflammatory activity of diclofenac in rats. *J Pharm Pharmacol*. 2005;57(12):1629-1636. doi:10.1211/jpp.57.12.0013
  35. Arrieta J, Benitez J, Flores E, Castillo C, Navarrete A. Purification of Gastroprotective Triterpenoids from the Stem Bark of *Amphipterygium adstringens* ; Role of Prostaglandins, Sulfhydryls, Nitric Oxide and Capsaicin-Sensitive Neurons. *Planta Med*. 2003;69(10):905-909. doi:10.1055/s-2003-45098
  36. Lorenzo JI. Comments on “Isobolographic Analysis for Combinations of a Full and Partial Agonist: Curved Isoboles.” *J Pharmacol Exp Ther*. 2005;316(1):476-478. doi:10.1124/jpet.105.095091
  37. Tallarida RJ. Drug combinations: Tests and analysis with isoboles. *Curr Protoc Pharmacol*. 2016. doi:10.1002/0471141755.ph0919s72
  38. Tallarida RJ. Combination analysis. *Adv Exp Med Biol*. 2010;678:133-137.
  39. Hegab II, Abd-Elatif RN, Sadek MT. The gastroprotective effect of N - acetylcysteine and genistein in indomethacin-induced gastric injury in rats . *Can J Physiol Pharmacol*. 2018;96(11):1161-1170. doi:10.1139/cjpp-2017-0730
  40. Ortiz MI, Cariño-Cortés R, Ponce-Monter HA, Castañeda-Hernández G, Chávez-Piña AE. Pharmacological interaction of  $\alpha$ -bisabolol and diclofenac on nociception, inflammation, and gastric integrity in rats. *Drug Dev Res*. 2018;79(1):29-37. doi:10.1002/ddr.21418
  41. Ortiz MI, González-García MP, Ponce-Monter HA, Castañeda-Hernández G, Aguilar-Robles P. Synergistic effect of the interaction between naproxen and citral on inflammation in rats. *Phytomedicine*. 2010;18(1):74-79.

- doi:10.1016/j.phymed.2010.05.009
42. De Paz-Campos MA, Ortiz MI, Chávez Piña AE, Zazueta-Beltrán L, Castañeda-Hernández G. Synergistic effect of the interaction between curcumin and diclofenac on the formalin test in rats. *Phytomedicine*. 2014;21(12):1543-1548. doi:10.1016/j.phymed.2014.06.015
  43. Arroyo-Lira AG, Rodríguez-Ramos F, Chávez-Piña AE. Synergistic antinociceptive effect and gastric safety of the combination of docosahexaenoic acid and indomethacin in rats. *Pharmacol Biochem Behav*. 2014;122:74-81. doi:10.1016/j.pbb.2014.03.015
  44. Brindis F, Rodríguez R, Bye R, González-Andrade M, Mata R. (Z)-3-butylidenephthalide from *Ligusticum porteri*, an  $\alpha$ -glucosidase inhibitor. *J Nat Prod*. 2011;74(3):314-320. doi:10.1021/np100447a
  45. Linares E, Bye RA. a Study of Four Medicinal Plant Complexes of Mexico. *J Ethnopharmacol*. 1987;19:153-183.
  46. Ugalde M, Reza V, González-Trujano ME, Avula B, Khan IA, Navarrete A. Isobolographic analysis of the sedative interaction between six central nervous system depressant drugs and *Valeriana edulis* hydroalcoholic extract in mice\* . *J Pharm Pharmacol*. 2005;57(5):631-639. doi:10.1211/0022357056000
  47. Navarrete A, Martínez-Urbe LS, Reyes B. Gastroprotective activity of the stem bark of *Amphipterygium adstringens* in rats. *Phyther Res*. 1998;12(1):1-4. doi:10.1002/(SICI)1099-1573(19980201)12:1<1::AID-PTR177>3.0.CO;2-H
  48. Martínez A, González M, López F. Análisis de la interacción antinociceptiva entre hesperidina y ketorolaco por medio de la exploración de superficie de interacción sinérgica. *Rev Mex Anesthesiol*. 2013;36(4):249-256.

## XII. Anexos

Este trabajo formó parte de la publicación:

Pineda-Peña EA, Meza-Pérez DG, Chávez-Piña AE, Velázquez-Moyado JA, Tavares-Carvalho JC, Navarrete Castro A. **Pharmacodynamic interaction of 3 $\alpha$ -hydroxymasticadienonic acid and diligustilide against indomethacin-induced gastric damage in rats.** Drug Dev Res. 2019;1–10. <https://doi.org/10.1002/ddr.21535>

# Pharmacodynamic interaction of 3 $\alpha$ -hydroxymasticadienonic acid and diligustilide against indomethacin-induced gastric damage in rats

Elizabeth A. Pineda-Peña<sup>1</sup> | Dulce G. Meza-Pérez<sup>1</sup> | Aracely E. Chávez-Piña<sup>2</sup>  |  
 Josué A. Velázquez-Moyado<sup>1,3</sup> | José C. Tavares-Carvalho<sup>3</sup>  | Andrés Navarrete Castro<sup>1</sup> 

<sup>1</sup>Facultad de Química, Departamento de Farmacia, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Ciudad de México, Mexico

<sup>2</sup>Laboratorio de Farmacología, Programa Institucional en Biomedicina Molecular, Escuela, Nacional de Medicina y Homeopatía del Instituto Politécnico Nacional, Ciudad de México, Mexico

<sup>3</sup>Laboratório de Pesquisa em Fármacos, Curso de Farmácia, Departamento de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal do Amapá, Macapá, Amapá, Brazil

## Correspondence

Andrés Navarrete Castro, Facultad de Química, Departamento de Farmacia, Universidad Nacional, Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Coyoacán 04510, Ciudad de México, Mexico.  
 Email: anavarrt@unam.mx

## Funding information

Dirección General de Asuntos del Personal Académico, Universidad Nacional Autónoma de México, Grant/Award Numbers: DGAPA-UNAM IN213418, Programa de Becas Postdoctorales DGAPA-UNAM 2017; Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Grant/Award Number: PAIP 5000-9143

## Abstract

The aims of the study were to evaluate the pharmacodynamic interaction between 3 $\alpha$ -hydroxymasticadienonic acid and diligustilide (DLG), isolated from the plants *Amphitherygium adstringens* and *Ligusticum porteri*, respectively, using the indomethacin-induced gastric injury model, as well as their individual gastroprotective efficacy in this model. Male Wistar rats were orally administered with 3 $\alpha$ -hydroxymasticadienonic acid, DLG or the mixture of 3 $\alpha$ -hydroxymasticadienonic acid-DLG (at a fixed-ratio combination of 1:1, 1:3, and 3:1). Thirty minutes later, the gastric damage was induced by a single oral dose of indomethacin (30 mg/kg). Three hours later, the gastric injury (mm<sup>2</sup>) was determined. 3 $\alpha$ -hydroxymasticadienonic acid and DLG as individual compounds showed a gastroprotective effect against indomethacin-induced gastric damage ( $p < .05$ ). The effective dose (ED<sub>50</sub>) values for each compound were 6.96  $\pm$  1.25 mg/kg for 3 $\alpha$ -hydroxymasticadienonic acid and 2.63  $\pm$  0.37 mg/kg for DLG. The isobolographic analysis performed showed that the combination exhibited super-additive interaction as the experimental ED<sub>50</sub> values (Z<sub>exp</sub>) were lower than theoretical additive dose values (Z<sub>add</sub>;  $p < .05$ ). Our results identify the super-additive (synergist) interaction between 3 $\alpha$ -hydroxymasticadienonic acid and DLG and the gastric safety of both compounds in the indomethacin-induced gastric injury model, suggesting their potential in the future as a strategy to decrease the gastric damage associated to the chronic use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs).

## KEYWORDS

3 $\alpha$ -hydroxymasticadienonic acid, diligustilide, gastric injury, isobolographic analysis, NSAIDs

## 1 | INTRODUCTION

The clinical use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) is limited by their significant adverse effects at gastrointestinal (GI) level (Sehajpal, Prasad, & Singh, 2018; Wallace et al., 2011). The NSAID-gastropathy is the result of the imbalance between mucosal defensive and noxious factors (Laine, Takeuchi, & Tarnawski, 2008; Martin & Wallace, 2006), and it is associated with some multifactorial

mechanisms such as gastric acid induced necrosis, prostaglandins (PGs) inhibition, exacerbated inflammatory process, oxidative damage, decrease in blood flow and ischemia (Bindu et al., 2013; Boegh & Nielsen, 2015; Laine et al., 2008; Wallace, McKnight, Reuter, & Vergnolle, 2000). The current treatment options against NSAID gastric damage such as the proton pump inhibitors (PPIs) leads to potential adverse effects as its long-term use is increased (Wallace et al., 2011; Yu et al., 2017).

The Traditional Medicine in Mexico is rich in medicinal plants used to heal or prevent gastric ulcers (Arrieta, Benitez, Flores, Castillo, & Navarrete, 2003; Navarrete, Martínez-Urbe, & Reyes, 1998). Among them, the stem barks of *Amphiterygium adstringens* (Schtdl.) Schiede ex Standl. (Anacardaceae) locally named as “Cuachalalate” (Navarrete et al., 1998) and the roots of *Ligusticum porteri* Coulter & Rose (Apiaceae) commonly referred to as “Chuchupate” (Juárez-Reyes, Ángeles-López, Rivero-Cruz, Bye, & Mata, 2014; Linares & Bye, 1987; Velázquez-Moyado et al., 2015). Our group reported the antiulcer and gastroprotective properties of the extracts of *L. porteri* and *A. adstringens* in the ethanol-induced gastric damage (Navarrete et al., 1998; Velázquez-Moyado et al., 2015) and only for *A. Adstringens* extract in diclofenac-induced gastric damage model (Arrieta et al., 2003; Navarrete et al., 2005). Previously, we identified a triterpenoid, 3 $\alpha$ -hydroxymasticadienonic acid isolated from *A. adstringens* and a phthalide, diligustilide isolated of *L. porteri* as the major active compounds responsible for its gastroprotective effect in ethanol–(Arrieta et al., 2003; Navarrete et al., 1998; Velázquez-Moyado et al., 2015) and diclofenac-induced gastric damage model (Navarrete et al., 2005). In addition, our group demonstrated the participation of endogenous sulfhydryls groups and the partial participation of prostaglandins in the gastroprotective mechanism of both compounds in the ethanol-induced gastric damage model (Arrieta et al., 2003; Velázquez-Moyado, 2017; Velázquez-Moyado et al., 2015). In addition, anti-inflammatory properties in inflammatory models for both compounds have been reported (Del-Ángel, Nieto, Ramírez-Apan, & Delgado, 2015; Navarrete et al., 2005). As both exhibit, gastroprotective effect, the probability of interactions between the two compounds may be possible. However, there are no reports of their gastroprotective effect in the indomethacin induced-gastric damage, and more important the interaction of these compounds has not been previously evaluated in any gastric-damage model.

The mix of traditional herbal remedies is frequently used in several countries, mainly for the treatment of gastrointestinal diseases (Farzaei, Abdollahi, & Rahimi, 2015; Schmeda-Hirschmann & Yesilada, 2005). In the evaluation of newly isolated compounds, the interaction studies are an important aspect to evaluate, especially in those with a pharmaceutical potential (Balderas et al., 2008; Ugalde et al., 2005). However, there are few studies that evaluate interactions with natural compounds (Navarrete et al., 2005; Rodríguez-Ramos, Andrade-Moreno, Alfaro-Romero, Balderas-López, & Navarrete,

2016; Ugalde et al., 2005). The aim of the current study was to determine the type of pharmacodynamic interaction between 3 $\alpha$ -hydroxymasticadienonic acid and diligustilide (DLG), by using an isobolographic analysis in a reproducible and clinically relevant experimental model for the induction of acute gastric ulcers such as the indomethacin-induced damage.

## 2 | MATERIAL AND METHODS

### 2.1 | Animals

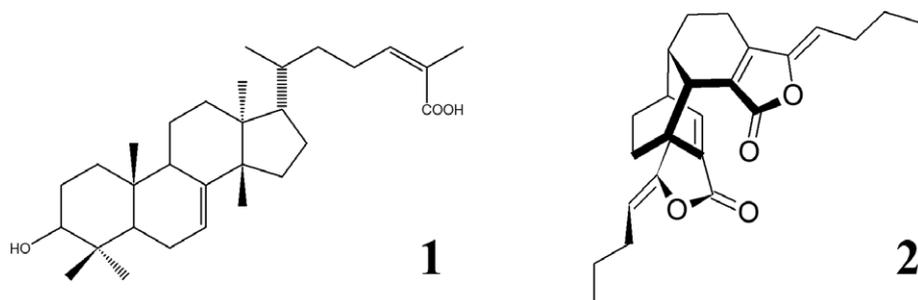
Male Wistar rats (180–250 g) were obtained from Centro UNAM-Envigo (Envigo México S.A. de C.V.). The care and handling of animals were conducted in accordance with the Mexican official guidelines for laboratory animals (NOM-062-ZOO-1999) and international norms. The protocol of this study was approved by the Institutional Committee for use and care of laboratory animals (CICUAL) from Facultad de Química UNAM (file number: OFICIO/FQ/CICUAL/241/17 and date of approval: September 7, 2017). All experiments were carried out with six to eight animals per group. The rats were placed singly in cages with wire net floors and fasted 12 hr before experimentation and were allowed free access to tap water while fasting. Each rat was used in only one experiment and euthanized in a CO<sub>2</sub> chamber at the end of the assay.

### 2.2 | Drugs and compounds

Indomethacin (I7378) and omeprazole (O104) were purchased from Sigma Aldrich (Toluca, México). Omeprazole was dissolved in saline solution 0.9%, 3 $\alpha$ -hydroxymasticadienonic acid and DLG were suspended in 0.5% tween 80 in saline solution 0.9% and indomethacin was dissolved in NaHCO<sub>3</sub> 5%. All reagents were prepared prior to use and administrated by intragastric route. Basal group received the vehicle (0.5% tween 80 in saline solution 0.9% or NaHCO<sub>3</sub> 5%) in the same volume (0.1 mL/100 mg) by the same route.

### 2.3 | 3 $\alpha$ -hydroxymasticadienonic acid and DLG

The extraction of 3 $\alpha$ -hydroxymasticadienonic acid **1** and DLG **2** (Figure 1) isolated from *Amphiterygium adstringens* stem bark and *Ligusticum porteri* roots, respectively, have been previously described (Arrieta et al., 2003; Velázquez-Moyado et al., 2015). *A. adstringens* stem



**FIGURE 1** Chemical structures of 3 $\alpha$ -hydroxymasticadienonic acid (a) and diligustilide (DLG) (b)

bark was kindly provided by Laboratorios Mixim S.A. de C.V., in México in June 2016. *L. porteri* roots were collected in Basigochi (Chihuahua, México) as reported in a previous work (Velázquez-Moyado et al., 2015).

## 2.4 | Gastric lesions induced by indomethacin

Gastric lesions were generated by the oral administration of indomethacin (30 mg/kg) according to the method described previously (Chávez-Piña et al., 2008; Pineda-Peña, Jiménez-Andrade, Castañeda-Hernández, & Chávez-Piña, 2012). The compounds 3 $\alpha$ -hydroxymasticadienonic acid and DLG, were administered orally and individually (0.33, 1, 3, 10, and 30 mg/kg) to the different groups of animals 30 min before the generation of gastric mucosal lesions with indomethacin. The reference drug (omeprazole, 30 mg/kg) was also administered orally 30 min before the generation of gastric mucosal lesions with indomethacin. Three hours later, rats were euthanized in a CO<sub>2</sub> chamber. The stomach was removed, being opened along the greater curvature, and thoroughly rinsed with saline solution. A photograph of the stomach was taken using a digital microscope (Celestron 44302-A), then the extent of the gastric-damage area (mm<sup>2</sup>) was scored blindly using Image J software (Version 1.45) and reported as gastric hemorrhagic lesions (mm<sup>2</sup>) (Pineda-Peña et al., 2018; Velázquez-Moyado, 2017). Gastroprotection (%) was calculated according to: % Gastroprotection = (UIC-UIT)  $\times$  100/UIC, where UIC is ulcer index in control and UIT is ulcer index in test (Navarrete et al., 2005). Dose-response curves were constructed to assess the individual gastroprotective effect of 3 $\alpha$ -hydroxymasticadienonic acid and DLG using at least five doses (0.33, 1, 3, 10, and 30 mg/kg). The dose that produced 50% of gastroprotection (ED<sub>50</sub>) for the individual compounds and its associated 95% confidence intervals were calculated using a nonlinear fit using the Hill Equation (Tallarida 2000).

## 2.5 | Histological study

Samples of gastric tissue were excised and fixed with 10% formaldehyde in phosphate buffered saline (PBS) for 24 hr. The samples were processed routinely, stained by haematoxylin and eosin, and examined as previously reported (Pineda-Peña et al., 2018).

## 2.6 | Experimental design of 3 $\alpha$ -hydroxymasticadienonic acid–DLG combination

To evaluate the nature of the interaction of 3 $\alpha$ -hydroxymasticadienonic acid and DLG in the gastroprotective effect against indomethacin-induced gastric damage, the combinations were tested in this model at a fixed constant ratio-combinations (1:1, 1:3, and 3:1) based on fractions of their individual ED<sub>50</sub> values (6.96 mg/kg for 3 $\alpha$ -hydroxymasticadienonic acid and 2.63 mg/kg for DLG) obtained from individual dose-response curves. The drug dosage and administration time schedules used for all the experiments were selected based on the results obtained in the dose-response curves performed in this study

and previous reports (Arrieta et al., 2003; Velázquez-Moyado, 2017; Velázquez-Moyado et al., 2015). The experimental design of the concentrations tested in each combination is shown in Table 1.

## 2.7 | Data analysis of the compound combinations

The interaction between 3 $\alpha$ -hydroxymasticadienonic acid and DLG was characterized through an isobolographic analysis. This analysis requires the equi-effective doses (ED<sub>50</sub>) of the individual compounds in each combination (Tallarida 2006, 2010). Because the dose-response curves shows that each compound have different maximum effects (Figure 2), the values of Cartesian coordinates in the corresponding curve isobole of the pair (*a*, *b*) that belongs to *dose a* for 3 $\alpha$ -hydroxymasticadienonic acid (on the x-axis) and *dose b* for DLG (on the y-axis) were estimated as described in previous reports (Tallarida 2006, 2011; Grabovsky, 2004). The pairs (*a*, *b*) of the curvilinear isobole was calculated for the relationship:

$$b = B_{50}(A_{50} - a/A_{50})^{q/p}$$

Where A<sub>50</sub> was the ED<sub>50</sub> of 3 $\alpha$ -hydroxymasticadienonic acid and B<sub>50</sub> was the ED<sub>50</sub> of DLG. The theoretical additive doses (Zadd) and their SEM for each combination in the same component ratio (1:1, 1:3, and 3:1) were computed from the equi-effective doses (ED<sub>50</sub>) of the individual compounds, according to the method described by Tallarida (Tallarida 2000, 2010, 2016). That follows the equation:

$$Zadd = fA_{50} + (1 - f)B_{50}$$

The value fA<sub>50</sub> represents the fraction of the ED<sub>50</sub> of 3 $\alpha$ -hydroxymasticadienonic acid and (1-f)B represents the fraction of ED<sub>50</sub> of DLG in the respective combination (Tallarida 2000, 2010, 2016). The experimental additive (Zexp) values (and their 95% confidence limits) obtained in for each mixture (1:1, 1:3, and 3:1 fixed-ratio combination) (Table 1) were determined (Tallarida 2000), and the 95% confidence limits were subsequently transformed into SEM. Finally, the theoretical additive doses (Zadd) of each combination and the experimental additive (Zexp) values were statistically compared with the use of Student's t-test (Tallarida 2000, 2010, 2016).

## 2.8 | Statistical analysis

All data are expressed as mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM) (*n* = 6–8). The dose-response data were analyzed by a one-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Newman-Keuls test for the post hoc comparisons. *p* < .05 was considered as a statistically significant difference between means. The comparisons between the Zadd and Zexp values were performed using Student's t test according to procedures previously described by Tallarida (Tallarida 2000, 2006, 2010, 2011). Zexp values that were lower than the Zadd value, with statistically significant differences (*p* < .05) in both the X and Y

**TABLE 1** Doses used in the study of gastroprotective effect interaction between 3 $\alpha$ -hydroxymasticadienonic acid and diligustilide (DLG) against indomethacin-induced gastric damage and area of gastric lesions

Drug /treatment	Dose (mg kg <sup>-1</sup> , p.o.)		Gastric hemorrhagic lesions (mm <sup>2</sup> )
Saline (damage group)	–		40.07 $\pm$ 1.25
3 $\alpha$ -hydroxymasticadienonic acid			
	0.333		30.94 $\pm$ 2.10
	1		33.96 $\pm$ 1.46
	3		25.92 $\pm$ 1.91*
	10		13.79 $\pm$ 2.66*
	30		9.90 $\pm$ 1.35*
Diligustilide (DLG)			
	0.333		30.05 $\pm$ 3.25
	1		26.88 $\pm$ 1.86
	3		15.37 $\pm$ 2.99*
	10		4.63 $\pm$ 0.71*
	30		4.37 $\pm$ 1.25*
Combination 1:1 of 3 $\alpha$ -hydroxymasticadienonic acid-DLG			
3 $\alpha$ -hydroxymasticadienonic acid	Diligustilide (DLG)	Total	Gastric hemorrhagic lesions (mm <sup>2</sup> )
0.08	0.04	0.12	19.15 $\pm$ 2.10*
0.17	0.08	0.25	18.49 $\pm$ 2.76*
0.36	0.15	0.51	19.43 $\pm$ 2.68*
0.71	0.31	1.02	12.88 $\pm$ 1.88*
2.86	1.25	4.11 <sup>a</sup>	10 $\pm$ 1.81*
11.48	4.98	16.46	5.40 $\pm$ 1.61*
Combination 1:3 of 3 $\alpha$ -hydroxymasticadienonic acid-DLG			
3 $\alpha$ -hydroxymasticadienonic acid	Diligustilide (DLG)	Total	Gastric hemorrhagic lesions (mm <sup>2</sup> )
0.02	0.03	0.05	40.2 $\pm$ 2.27
0.09	0.11	0.2	27.70 $\pm$ 2.97*
0.18	0.23	0.41	27.93 $\pm$ 2.16*
1.42	1.88	3.30 <sup>a</sup>	22.86 $\pm$ 3.15*
5.73	7.49	13.22	12.25 $\pm$ 2.44*
Combination 3:1 of 3 $\alpha$ -hydroxymasticadienonic acid-DLG			
3 $\alpha$ -hydroxymasticadienonic acid	Diligustilide (DLG)	Total	Gastric hemorrhagic lesions (mm <sup>2</sup> )
0.06	0.01	0.07	35.41 $\pm$ 1.87
0.27	0.03	0.3	26.00 $\pm$ 1.02*
0.53	0.08	0.61	22.06 $\pm$ 2.79*
4.3	0.62	4.92 <sup>a</sup>	13.24 $\pm$ 2.13*
17.21	2.5	19.71	10.98 $\pm$ 2.07*
Omeprazole			
	10		12.87 $\pm$ 1.17*
	30		1.15 $\pm$ 0.72*

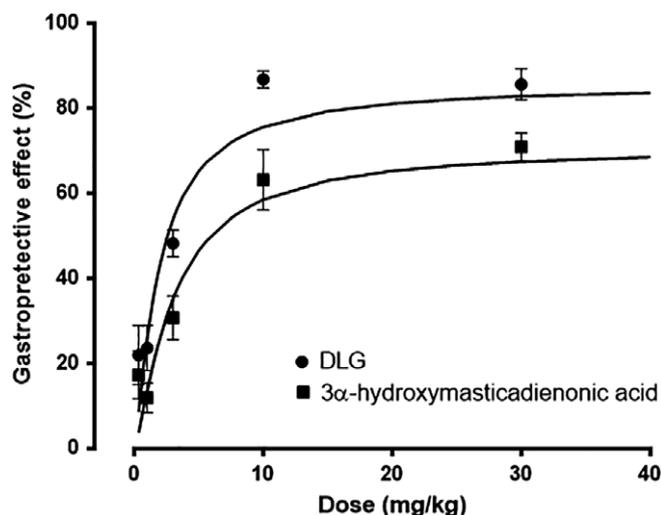
Note. Doses used to construct the dose–effect curves for each combination for each dose evaluated.

<sup>a</sup>These doses correspond to Zadd ( $n = 6–8$ ). Rats were treated orally with 3 $\alpha$ -hydroxymasticadienonic acid, DLG, and 3 $\alpha$ -hydroxymasticadienonic acid-DLG combination in 1:1, 1:3, and 3:1 fixed ratio combination. Data are represented as mean  $\pm$  SEM ( $n = 6–8$ ).

\* $p < .05$  versus damage group

directions, were interpreted as significant super-additive interactions. Values of Zexp that were higher than Zadd values, with differences at  $p < .05$  in both the X and Y directions, were interpreted as significant subadditive interactions. The absence of a significant difference between

the Zexp and Zadd values was interpreted as no interaction, and an additive relationship (additivity) was thus established in the combination (Tallarida 2010, 2016). To obtain a value to describe the magnitude of the interaction (interaction index), a fractional analysis was performed



**FIGURE 2** Dose-dependent maximal effects of 3 $\alpha$ -hydroxymasticadienonic acid (■) and diligustilide (DLG) (●) (at doses of 1, 3, 10, and 30 mg/kg). Doses (mg/kg) are represented on the x-axis on the y-axis the percentage of gastroprotective effect of the individual compounds. Data are presented as mean  $\pm$  SEM. ( $n = 6-8$ ). Maximum effects ( $E_{max}$ ) for DLG and 3 $\alpha$ -hydroxymasticadienonic acid were  $85.69 \pm 3.68\%$  and  $70.96 \pm 3.26\%$ , respectively. The doses that give the individual half maximum effect of each compound were  $1.85 \pm 0.18$  mg/kg for DLG and  $3.06 \pm 0.56$  mg/kg for 3 $\alpha$ -hydroxymasticadienonic acid

using the respective  $ED_{50}$  values of 3 $\alpha$ -hydroxymasticadienonic acid, DLG, and their combination according to procedures described previously by Tallarida (Tallarida 2006, 2010).

### 3 | RESULTS

#### 3.1 | Gastroprotective effect produced by 3 $\alpha$ -hydroxymasticadienonic acid, DLG, and the 3 $\alpha$ -hydroxymasticadienonic acid-DLG combination

The pretreatment with 3 $\alpha$ -hydroxymasticadienonic acid or DLG as individual compounds (at doses 0.33, 1, 3, 10, 30 mg/kg, p.o.) and all the tested combinations (1:1, 1:3, and 3:1 fixed ratios) decreased the indomethacin-induced gastric hemorrhagic lesions as compared to the indomethacin-treated group (Table 1 and Figure 3;  $p < .05$ ). Histological examination showed the disruption in the surface region of the glands of the gastric mucosa (red arrow), congestion (blue arrow), and cell infiltration (black arrow) in the indomethacin-treated group (Figure 3), while all the pretreatments and their combinations preserved the well-defined gastric folds and pits without congestion, cellular infiltrate, or any damage as is seen in the control group (Figure 4). In addition, both compounds were as effective as the reference drug (omeprazole) in equi-effective doses to protect gastric tissue against indomethacin-induced gastric damage (Table 1 and Figure 3). For all the treatments, the dose-response curves are showed in Figure 5 and the  $ED_{50}$  and their 95% confidence limits of each compound and their combination appear in Table 2.

#### 3.2 | Interactions between 3 $\alpha$ -hydroxymasticadienonic acid and DLG

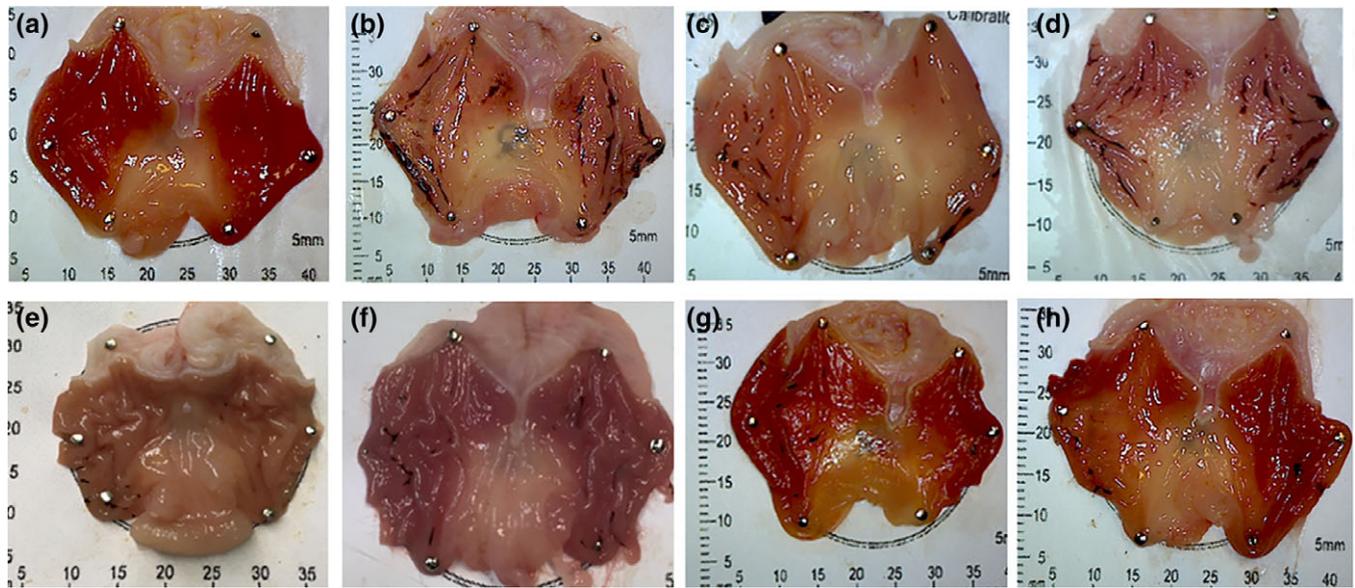
The administration of 3 $\alpha$ -hydroxymasticadienonic acid-DLG mixture (1:1, 1:3, and 3:1 fixed ratios) showed a gastroprotective effect against indomethacin gastric damage (Table 1 and Figure 2;  $p < .05$ ). Theoretical  $ED_{50}$  values ( $Z_{add}$ ) for the 1:1, 1:3, and 3:1 combination are given in Table 3. The  $Z_{exp}$  values, obtained for the simultaneous administration of 3 $\alpha$ -hydroxymasticadienonic acid and DLG were significantly lower ( $p < .05$ ) than the respective  $Z_{add}$  values in all the combinations tested (Table 3). The fractional analysis of these combinations demonstrated that the relationship  $a/A + b/B$  was significantly less than 1.0 (Table 3,  $p < .05$ ), indicating a super-additive or synergistic interaction for all combinations that can be appreciated in Figure 6 as the experimental  $ED_{50}$  for all the combinations is located below of additivity isobole.

### 4 | DISCUSSION

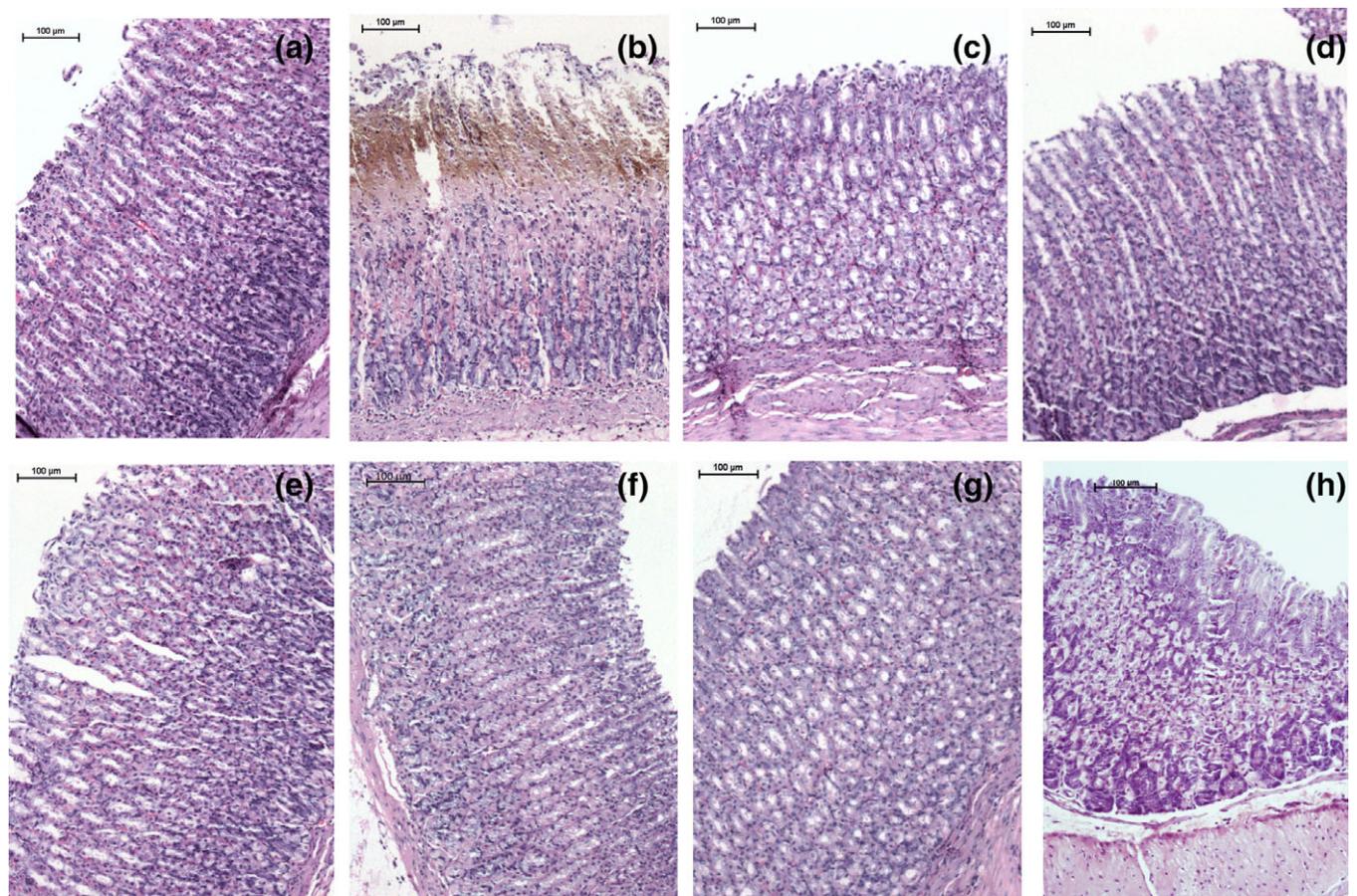
The results obtained in this study clearly demonstrate that the oral administration of 3 $\alpha$ -hydroxymasticadienonic acid and DLG as individual compounds decrease in a significant manner the area of hemorrhagic lesions against indomethacin-induced gastric injury ( $mm^2$ ). The gastroprotective effect of DLG ( $ED_{50} = 2.63$  mg/kg) was twofold more potent than gastroprotective effect of 3 $\alpha$ -hydroxymasticadienonic acid ( $ED_{50} = 6.96$  mg/kg). Moreover, the administration of 3 $\alpha$ -hydroxymasticadienonic acid-DLG combination (at fixed ratios of 1:1, 1:3, and 3:1) has a gastroprotective effect as effective as the effect of the compounds alone. However, our results showed a significant reduction in the doses used in the combination ( $ED_{50} = 0.70, 1.68, 0.99$  mg/kg, respectively) which is at least threefold lower than the used for each compound alone, suggesting that a synergist effect is taking place in the gastroprotective effect.

Our results agree with previous reports in experimental gastric injury models using ethanol and diclofenac, where 3 $\alpha$ -hydroxymasticadienonic acid and DLG showed gastroprotective activity (Navarrete et al., 2005; Velázquez-Moyado et al., 2015). In these models, the significant anti-ulcer effect was achieved at doses above 10 mg/kg for 3 $\alpha$ -hydroxymasticadienonic acid and, doses above of 3 mg/kg for DLG (Velázquez-Moyado et al., 2015). Although, these compounds had not previously been studied in an individual administration in the indomethacin-induced gastric damage, which is a model commonly used for its reproducibility and clinically relevant for the induction of acute gastric ulcer in experimental animals, in order to search new gastroprotective agents (Chanudom & Tangpong, 2015; Pineda-Peña et al., 2018; Souza, Lemos, Oliveira, & Cunha, 2004; Wallace et al., 2011).

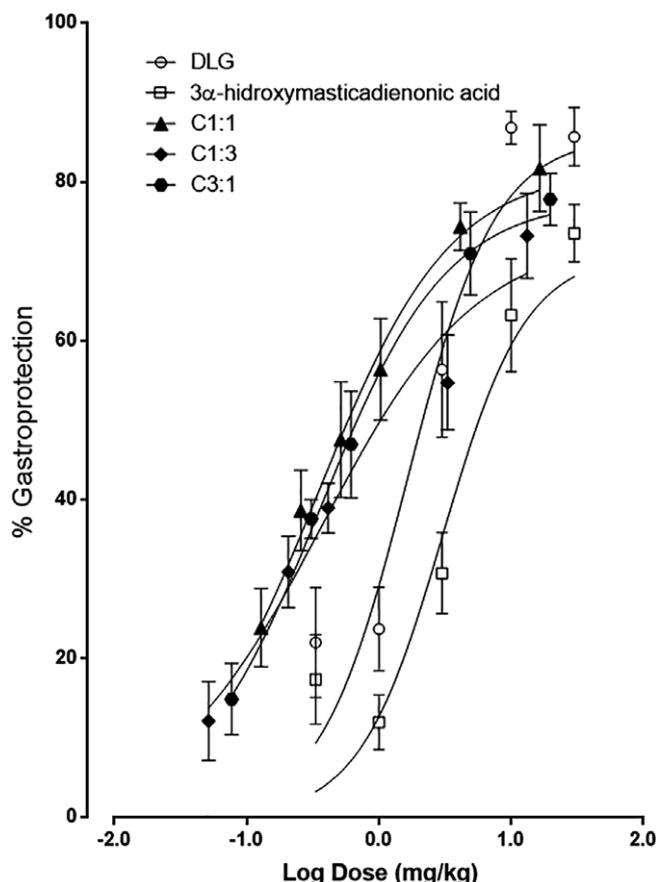
The present study is the first to investigate the gastroprotective potential of the combination of 3 $\alpha$ -hydroxymasticadienonic acid and DLG in a gastric-injury model. We found that the experimental value of the  $ED_{50}$  ( $Z_{exp}$ ) of each combination tested was significantly lower than the  $ED_{50}$  theoretical ( $Z_{add}$ ) value predicted for an additive



**FIGURE 3** Representative images of gastric lesions in the corpus of the stomach following different treatments. Basal (a), indomethacin (30 mg/kg) (b),  $3\alpha$ -hydroxymasticdienonic acid (10 mg/kg) + indomethacin (30 mg/kg) (c), diligustilide (DLG) (10 mg/kg) indomethacin (30 mg/kg) (d), combination of  $3\alpha$ -hydroxymasticdienonic acid-DLG corresponding to 1:1 (e), 3:1 (f), and 1:3 (g) fixed ratio + indomethacin (30 mg/kg) and omeprazole (10 mg/kg) indomethacin (30 mg/kg) (h)



**FIGURE 4** Representative histopathological sections of gastric mucosa following different treatments. Basal (a), indomethacin (30 mg/kg) (b),  $3\alpha$ -hydroxymasticdienonic acid (10 mg/kg) (c), diligustilide (DLG) (10 mg/kg) (d), combination of  $3\alpha$ -hydroxymasticdienonic acid-DLG corresponding to 1:1 (e), 3:1 (f), and 1:3 (g) fixed ratio and omeprazole (10 mg/kg) (h). Disruption in the surface region of the glands of the gastric mucosa (red arrow), congestion (blue arrow), and cell infiltration (black arrow)



**FIGURE 5** Dose–response curve plotting percentage of gastroprotection with respect to its control represented on the y-axis for the gastroprotective effect of the oral administration of 3 $\alpha$ -hydroxymasticadienonic acid, diligustilide (DLG), and 3 $\alpha$ -hydroxymasticadienonic acid-DLG combination (at fixed ratios of 1:1, 1:3, and 3:1). Data are presented as mean  $\pm$  SEM. ( $n = 6-8$ ). Doses (mg/kg) are represented logarithmically on the x-axis

relationship (Figure 5). In this sense, it is worth mentioning that the use of pharmacological combination for the prevention and management of NSAID-related gastrointestinal toxicity is a new approach that would reduce the doses of the administered compounds (Arroyo-Lira, Rodríguez-Ramos, & Chávez-Piña, 2014; Fong, Wong, Xie, & Zuo, 2015; Ortiz, 2017). For example, some studies tested the gastroprotective effect of the coadministration N-acetylcysteine (NAC) and genistein (GEN) on an experimental model of indomethacin-induced gastric injury, in which a significantly better gastroprotective effect was obtained (Hegab, Abd-Ellatif, & Sadek, 2018). In addition, other studies show that the combination of some compounds (gallic acid and famotidine) with antioxidant properties exerts a synergistic effect in aspirin plus pyloric ligation induced ulcer (Asokkumar, Sen, Umamaheswari, Sivashanmugam, & Subhadradevi, 2014). In addition, several studies tested the combination of natural compounds such as  $\alpha$ -bisabolol (Ortiz, Cariño-Cortés, Ponce-Monter, Castañeda-Hernández, & Chávez-Piña, 2018), citral (Ortiz, González-García, Ponce-Monter, Castañeda-Hernández, & Aguilar-Robles, 2010), curcumin (De Paz-Campos, Ortiz, Chávez Piña, Zazueta-Beltrán, & Castañeda-Hernández, 2014), and docosahexaenoic acid (Arroyo-Lira et al., 2014;

**TABLE 2** ED<sub>50</sub> values and 95% confidence limits of 3 $\alpha$ -hydroxymasticadienonic acid, diligustilide (DLG), and their combination against indomethacin-induced gastric damage in rat

Drug	ED <sub>50</sub> (mg/kg, p.o.)	CL 95%
3 $\alpha$ -hydroxymasticadienonic acid	6.96	(4.79–10.10)
Diligustilide	2.63	(1.96–3.51)
Combination 3 $\alpha$ -hydroxymasticadienonic acid-DLG		
1:1	0.70	(0.47–1.04)
1:3	1.67	(1.04–2.68)
3:1	1.04	(0.65–1.51)

Abbreviation: ED, effective doses.

Arroyo-Lira, Rodríguez-Ramos, Ortiz, Castañeda-Hernández, & Chávez-Piña, 2017; Miranda-Lara, Ortiz, Rodríguez-Ramos, & Chávez-Piña, 2018), with the most relevant NSAIDs in the clinic (indomethacin, diclofenac, and naproxen) in order to exhibit their anti-inflammatory and antinociceptive activity, and moreover the resulting gastric safety of the combination in murine models. Therefore, our study attempts to show the importance of the combination of two natural compounds, from two medicinal plants frequently used in traditional medicine in order to decrease the NSAID-gastrotoxicity.

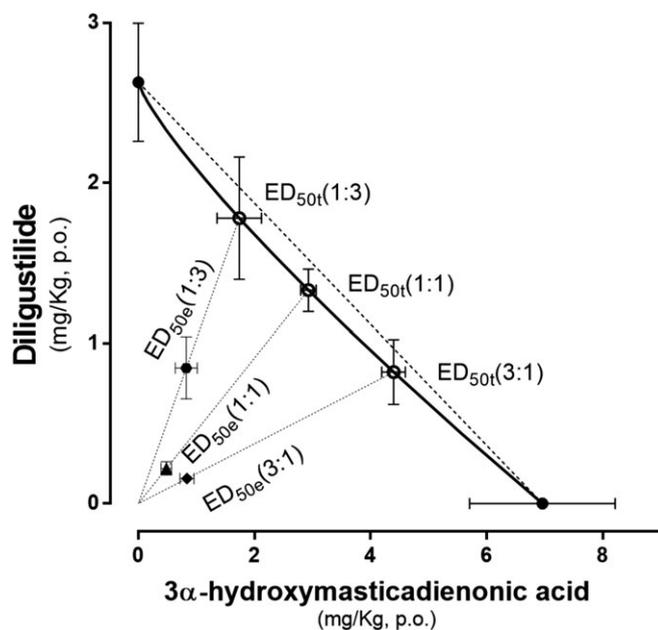
The gastroprotection exerts by natural products and crude extract mixtures in the traditional medicine plays an important role, because the mix of traditional herbal remedies is frequently used in several countries, mainly for the treatment of gastrointestinal diseases (Farzaei et al., 2015; Schmeda-Hirschmann & Yesilada, 2005). In the evaluation of newly isolated compounds, the interaction studies are an important aspect to evaluate, especially in those with a pharmaceutical potential (Balderas et al., 2008; Ugalde et al., 2005). Nonetheless, few studies have evaluated natural product-natural product interactions, especially in those that come from plants with an important traditional use (Navarrete et al., 2005; Rodríguez-Ramos et al., 2016; Ugalde et al., 2005). In addition, most studies of interactions with natural products are limited, as the herb extract contains more than one active constituent. We consider that the use of the isobolographic analysis in this study offers an optimal and accurate solution for the study of interactions of these two main compounds.

As its well know the isobole is a straight line that connecting the ED<sub>50</sub> doses of two individual compounds which predict the equivalent-

**TABLE 3** Theoretical (Zadd) and experimental (Zexp) ED<sub>50</sub> values SEM for combinations of 3 $\alpha$ -hydroxymasticadienonic acid-diligustilide and magnitude of the interaction values

Combination	Zadd (mg/kg)	Zexp (mg/kg)	Magnitude of the interaction
1:1	4.26 $\pm$ 0.48	0.70 $\pm$ 0.13	0.15*
1:3	3.52 $\pm$ 0.40	1.67 $\pm$ 0.38	0.44*
3:1	5.21 $\pm$ 0.72	1.04 $\pm$ 0.20	0.18*

\*Super-additive interaction was statistically  $<1.0$  ( $p < .05$ ), see Material and Methods.



**FIGURE 6** Curved Isobologram of the combination of 3 $\alpha$ -hydroxymasticadienonic acid-diligustilide (DLG) on the indomethacin-induced gastric damage model. The individual ED<sub>50</sub> values of each compound (●), the theoretical calculated ED<sub>50</sub> value for an additive effect (Zadd) in a fixed ratio 1:1, 1:3, or 3:1 (o), the corresponding experimental ED<sub>50</sub> values in a fixed ratio 1:1 (Zexp, ▲), 1:3 (Zexp, ●), or 3:1 (Zexp ◆) are represented in the graph. Horizontal and vertical bars indicate SEM. The experimental values (Zexp) were below and to the left of the theoretical additive values (Zadd) indicating synergistic relationship for all the combination studies

dose of each compound that is required to achieve a specific effect (an additive effect) when they are administered in combination (Tallarida 2010). In this study, the dose–response curves of each compounds showed that each compound has different maximum effects. Thus, the determination of a curve isobole allows a better interpretation and analysis of the experimental data obtained (Tallarida 2006, 2011; Grabovsky, 2004). The isobolographic analysis in our study suggests a super-additive (synergist) effect between 3 $\alpha$ -hydroxymasticadienonic acid and DLG, which is demonstrated through the enhancement of the gastroprotective effect against indomethacin damage (Figure 5). In this case, the potency of the compounds is due to its complementary mechanism of action, which means that DLG could act as a total agonist and 3 $\alpha$ -hydroxymasticadienonic acid as a partial agonist. This is evinced by the super additive effect being maintained through the three different proportions evaluated (1:1, 1:3, and 3:1). Thus, this combination is not a case of sharing identical mechanism of actions, which would lead to simple additivity or in certain cases a subadditivity effect (Tallarida, Cowan, & Raffa, 2003). As in some studies the resulting interaction may vary depending on the proportion of the compound administered in the combination (Tallarida 2000; Tallarida et al., 2003), and in some cases, the extraction method could affect the proportion of major compounds (Kim et al., 2016). In this study, we tested the pure compounds and not the extract obtained from the herbal mixture, in this way we make sure that the quantity of each compound in the mixture is strictly controlled.

Based on the results obtained, 3 $\alpha$ -hydroxymasticadienonic acid and DLG could have complementary mechanisms of action. There are reports in the literature about the antiulcer effect of a fraction rich in 3 $\alpha$ -hydroxymasticadienonic acid obtained from the stem bark of *A adstringens* in a diclofenac-induced gastric damage (Arrieta et al., 2003; Navarrete et al., 1998; Navarrete et al., 2005), in which prostaglandins and endogenous sulfhydryls and nitric oxide are suggested as their main gastroprotective mechanism. On the other hand, few studies have reported the anti-ulcer and gastroprotective properties of DLG obtained from the roots of *L porteri* (Velázquez-Moyado et al., 2015). In those reports DLG was able to significantly protect the rat gastric mucosal from ethanol-induced injury via prostaglandins (PG) without inhibition of gastric secretion (Navarrete, Mata, Bye, & Linares, 2011). Recently it has been reported that DLG exerts its gastroprotective effect by regulating two important gasotransmitters, nitric oxide and hydrogen sulfide, and by the stabilization of nitrosothiols (Velázquez-Moyado, 2017). Hence in our study, the super-additive gastroprotective effect observed by the coadministration 3 $\alpha$ -hydroxymasticadienonic acid and DLG suggested that this super-additive effect could occur through enhance of the individual mechanism of action of the compounds. Moreover, histological examination confirms these results (Figure 3).

Another novel finding from this study is that the effect produced by the highest doses of 3 $\alpha$ -hydroxymasticadienonic acid, DLG, and the tested combinations was not significantly different from the gastroprotective effect exerted by omeprazole (PPIs), which is one of the commercially available strategies against NSAIDs-gastropathy (Thomson, Sauve, Kassam, & Kamitakahara, 2010; Wallace et al., 2011). This means that the combination 3 $\alpha$ -hydroxymasticadienonic acid-DLG achieves a similar gastroprotective effect as omeprazole, and in a lower dose. At present, no adverse effects have been reported due to the long-term use of *A adstringens* and *L porteri* in traditional medicine (Brindis, Rodríguez, Bye, González-Andrade, & Mata, 2011; Delgado, Reza-Garduño, Toscano, Bye, & Linares, 1988; Navarrete et al., 2005), which contain as major components 3 $\alpha$ -hydroxymasticadienonic acid and DLG, respectively (Déciga-Campos et al., 2007; Nguyen, Sparks, & Omoruyi, 2016). In contrast, it has been reported that long-term use of PPIs for the treatment of gastric damage, may lead to adverse effects, such as osteoporotic fracture, renal damage, nutritional deficiencies (vitamin B12, magnesium, and iron), and dysbiosis (Thomson et al., 2010; Wallace et al., 2011; Xu et al., 2015). In consequence, this combination has high potential, for in the future, to use as a strategy to decrease the gastric damage associated to the chronic use of NSAIDs. Therefore, the results obtained in this study generate more information about the possible therapeutic uses of the combination of these natural products. Further experimental support is needed to investigate the clinical significance of this combination.

## 5 | CONCLUSIONS

In the present study, we demonstrated through an isobolographic analysis that the co-administration of 3 $\alpha$ -hydroxymasticadienonic acid and DLG produces a synergist gastroprotective effect in all combinations

tested. Suggesting that the combination of these compounds could be useful as an alternative treatment for NSAID-gastropathy.

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors acknowledge the support provided by the Grants PAIP 5000-9143, from Facultad de Química and DGAPA-UNAM IN213418 from Dirección General de Asuntos del Personal Académico, Universidad Nacional Autónoma de México. E. A. Pineda-Peña acknowledges to Programa de Becas Postdoctorales DGAPA-UNAM 2017 for postdoctoral fellowship.

## CONFLICT OF INTEREST

The authors report no conflict of interest related to the present investigation.

## ORCID

Aracely E. Chávez-Piña  <https://orcid.org/0000-0002-0607-2545>

José C. Tavares-Carvalho  <https://orcid.org/0000-0001-5256-1422>

Andrés Navarrete Castro  <https://orcid.org/0000-0002-2858-8710>

## REFERENCES

- Arrieta, J., Benitez, J., Flores, E., Castillo, C., & Navarrete, A. (2003). Purification of gastroprotective triterpenoids from the stem bark of *Amphipterygium adstringens*; role of prostaglandins, sulfhydryls, nitric oxide and capsaicin-sensitive neurons. *Planta Medica*, *69*(10), 905–909.
- Arroyo-Lira, A. G., Rodríguez-Ramos, F., & Chávez-Piña, A. E. (2014). Synergistic antinociceptive effect and gastric safety of the combination of docosahexaenoic acid and indomethacin in rats. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, *122*, 74–81.
- Arroyo-Lira, A. G., Rodríguez-Ramos, F., Ortiz, M. I., Castañeda-Hernández, G., & Chávez-Piña, A. E. (2017). Supra-additive interaction of docosahexaenoic acid and naproxen and gastric safety on the formalin test in rats. *Drug Development Research*, *78*(7), 332–339.
- Asokkumar, K., Sen, S., Umamaheswari, M., Sivashanmugam, A. T., & Subhadradevi, V. (2014). Synergistic effect of the combination of gallic acid and famotidine in protection of rat gastric mucosa. *Pharmacological Reports*, *66*(4), 594–599.
- Balderas, J. L., Reza, V., Ugalde, M., Guzmán, L., Serrano, M. I., Aguilar, A., & Navarrete, A. (2008). Pharmacodynamic interaction of the sedative effects of *Ternstroemia pringlei* (rose) Standl. With six central nervous system depressant drugs in mice. *Journal of Ethnopharmacology*, *119*(1), 47–52.
- Bindu, S., Mazumder, S., Dey, S., Pal, C., Goyal, M., Alam, A., ... Bandyopadhyay, U. (2013). Nonsteroidal anti-inflammatory drug induces proinflammatory damage in gastric mucosa through NF- $\kappa$ B activation and neutrophil infiltration: Anti-inflammatory role of Heme Oxygenase-1 against nonsteroidal anti-inflammatory drug. *Free Radical Biology and Medicine*, *65*, 456–467.
- Boegh, M., & Nielsen, H. M. (2015). Mucus as a barrier to drug delivery - understanding and mimicking the barrier properties. *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology*, *116*(3), 179–186.
- Brindis, F., Rodríguez, R., Bye, R., González-Andrade, M., & Mata, R. (2011). (Z)-3-butylidenephthalide from *Ligusticum porteri*, an  $\alpha$ -glucosidase inhibitor. *Journal of Natural Products*, *74*(3), 314–320.
- Chanudom, L., & Tangpong, J. (2015). Anti-inflammation property of *Syzygium cumini* (L.) Skeels on indomethacin-induced acute gastric ulceration. *Gastroenterology Research and Practice*, *2015*, 343642.
- Chávez-Piña, A. E., Vong, L., McKnight, W., Dickey, M., Zanardo, R. C. O., Ortiz, M. I., ... Wallace, J. L. (2008). Lack of effects of acemetacin on signalling pathways for leukocyte adherence may explain its gastrointestinal safety. *British Journal of Pharmacology*, *155*(6), 857–864.
- De Paz-Campos, M. A., Ortiz, M. I., Chávez Piña, A. E., Zazueta-Beltrán, L., & Castañeda-Hernández, G. (2014). Synergistic effect of the interaction between curcumin and diclofenac on the formalin test in rats. *Phytomedicine*, *21*(12), 1543–1548.
- Déciga-Campos, M., Rivero-Cruz, I., Arriaga-Alba, M., Castañeda-Corral, G., Angeles-López, G. E., Navarrete, A., & Mata, R. (2007). Acute toxicity and mutagenic activity of Mexican plants used in traditional medicine. *Journal of Ethnopharmacology*, *110*(2), 334–342.
- Del-Ángel, M., Nieto, A., Ramírez-Apan, T., & Delgado, G. (2015). Anti-inflammatory effect of natural and semi-synthetic Phthalides. *European Journal of Pharmacology*, *752*, 40–48.
- Delgado, G., Reza-Garduño, R. G., Toscano, R. A., Bye, R., & Linares, E. (1988). Secondary metabolites from the roots of *Ligusticum porteri* (Umbelliferae). X-ray structure of Z-6.6',7.3a'-dilignostilide. *Heterocycles*, *27*(6), 1305–1312.
- Farzaei, M. H., Abdollahi, M., & Rahimi, R. (2015). Role of dietary polyphenols in the management of peptic ulcer. *World Journal of Gastroenterology*, *21*(21), 6499–6517.
- Fong, S. Y. K., Wong, Y. C., Xie, C., & Zuo, Z. (2015). Herb-drug interactions between *scutellariae radix* and mefenamic acid: Simultaneous investigation of pharmacokinetics, anti-inflammatory effect and gastric damage in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, *170*, 106–116.
- Grabovsky, Y. (2004). Isobolographic analysis for combinations of a full and partial agonist: Curved Isoboles. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *310*(3), 981–986.
- Hegab, I. I., Abd-Elattif, R. N., & Sadek, M. T. (2018). The gastroprotective effect of N-acetylcysteine and genistein in indomethacin-induced gastric injury in rats. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, *96*(11):1161–1170.
- Juárez-Reyes, K., Angeles-López, G. E., Rivero-Cruz, I., Bye, R., & Mata, R. (2014). Antinociceptive activity of *Ligusticum porteri* preparations and compounds. *Pharmaceutical Biology*, *52*(1), 14–20.
- Kim, J.-H., Ha, W.-R., Park, J.-H., Lee, G., Choi, G., Lee, S.-H., & Kim, Y.-S. (2016). Influence of herbal combinations on the extraction efficiencies of chemical compounds from *Cinnamomum cassia*, *Paeonia lactiflora*, and *Glycyrrhiza uralensis*, the herbal components of Gyeji-tang, evaluated by HPLC method. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, *129*, 50–59.
- Laine, L., Takeuchi, K., & Tarnawski, A. (2008). Gastric mucosal defense and cytoprotection: Bench to bedside. *Gastroenterology*, *135*(1), 41–60.
- Linares, E., & Bye, R. J. (1987). A study of four medicinal plant complexes of Mexico and adjacent United States. *Journal of Ethnopharmacology*, *19*, 153–183.
- Martin, G. R., & Wallace, J. L. (2006). Gastrointestinal inflammation: A central component of mucosal defense and repair. *Experimental Biology and Medicine (Maywood, NJ)*, *231*(2), 130–137.
- Miranda-Lara, C. A., Ortiz, M. I., Rodríguez-Ramos, F., & Chávez-Piña, A. E. (2018). Synergistic interaction between docosahexaenoic acid and diclofenac on inflammation, nociception, and gastric security models in rats. *Drug Development Research*, *79*(5), 239–246.
- Navarrete, A., Martínez-Urbe, L. S., & Reyes, B. (1998). Gastroprotective activity of the stem bark of *Amphipterygium adstringens* in rats. *Phytotherapy Research*, *12*(1), 1–4.
- Navarrete, A., Mata, R., Bye, R., and Linares, M. (2011). Uso de compuestos Ftálicos como Citoprotectores de la mucosa. MX334537.
- Navarrete, A., Oliva, I., Sánchez-Mendoza, M. E., Arrieta, J., Cruz-Antonio, L., & Castañeda-Hernández, G. (2005). Gastroprotection and effect of the simultaneous Administration of Cuachalalate (*Amphipterygium adstringens*)

- on the pharmacokinetics and anti-inflammatory activity of diclofenac in rats. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 57(12), 1629–1636.
- Nguyen, K., Sparks, J., & Omoruyi, F. (2016). Effects of *Ligusticum porteri* (Osha) root extract on human promyelocytic leukemia cells. *Pharmacognosy Research*, 9(2), 156–160.
- Ortiz, M. I. (2017). Synergistic interaction between diclofenac and pyrrolamine on nociception, inflammation, and gastric damage in rats. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 95(1), 51–58.
- Ortiz, M. I., Cariño-Cortés, R., Ponce-Monter, H. A., Castañeda-Hernández, G., & Chávez-Piña, A. E. (2018). Pharmacological interaction of  $\alpha$ -bisabolol and diclofenac on nociception, inflammation, and gastric integrity in rats. *Drug Development Research*, 79(1), 29–37.
- Ortiz, M. I., González-García, M. P., Ponce-Monter, H. A., Castañeda-Hernández, G., & Aguilar-Robles, P. (2010). Synergistic effect of the interaction between naproxen and citral on inflammation in rats. *Phytomedicine*, 18(1), 74–79.
- Pineda-Peña, E. A., Jiménez-Andrade, J. M., Castañeda-Hernández, G., & Chávez-Piña, A. E. (2012). Docosahexaenoic acid, an Omega-3 polyunsaturated acid protects against indomethacin-induced gastric injury. *European Journal of Pharmacology*, 697(1–3), 139–143.
- Pineda-Peña, E. A., Martínez-Pérez, Y., Galicia-Moreno, M., Navarrete, A., Segovia, J., Muriel, P., ... Chávez-Piña, A. E. (2018). Participation of the anti-inflammatory and antioxidative activity of docosahexaenoic acid on indomethacin-induced gastric injury model. *European Journal of Pharmacology*, 818, 585–592.
- Rodríguez-Ramos, F., Andrade-Moreno, M. Á., Alfaro-Romero, A., Balderas-López, J. L., & Navarrete, A. (2016). Gnaphaliin A and gnaphaliin B synergize the relaxant effect of salbutamol but not of ipratropium in Guinea pig trachea. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 68(4), 533–541.
- Schmeda-Hirschmann, G., & Yesilada, E. (2005). Traditional medicine and gastroprotective crude drugs. *Journal of Ethnopharmacology*, 100(1–2), 61–66.
- Sehajpal, S., Prasad, D. N., & Singh, R. K. (2018). Prodrugs of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs): A long march towards synthesis of safer NSAIDs. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 18(14), 1199–1219.
- Souza, M. H. L. P., Lemos, H. P., Oliveira, R. B., & Cunha, F. Q. (2004). Gastric damage and granulocyte infiltration induced by indomethacin in tumour necrosis factor receptor 1 (TNF-R1) or inducible nitric oxide synthase (iNOS) deficient mice. *Gut*, 53(6), 791–796.
- Tallarida, R. J. (2000). *Drug synergism and dose-effect data analysis*. New York: Chapman and Hall/CRC.
- Tallarida, R. J. (2006). An overview of drug combination analysis with isobolograms. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 319(1), 1–7.
- Tallarida, R. J. (2010). Combination analysis. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 678, 133–137.
- Tallarida, R. J. (2011). Quantitative methods for assessing drug synergism. *Genes & Cancer*, 2(11), 1003–1008.
- Tallarida, R. J. (2016). Drug combinations: Tests and analysis with isoboles. *Current Protocols in Pharmacology*, 72, 1–19.
- Tallarida, R. J., Cowan, A., & Raffa, R. B. (2003). Antinociceptive synergy, additivity, and subadditivity with combinations of oral glucosamine plus nonopioid analgesics in mice. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 307(2), 699–704.
- Thomson, A. B. R., Sauve, M. D., Kassam, N., & Kamitakahara, H. (2010). Safety of the long-term use of proton pump inhibitors. *World Journal of Gastroenterology*, 16(19), 2323–2330.
- Ugalde, M., Reza, V., González-Trujano, M. E., Avula, B., Khan, I. A., & Navarrete, A. (2005). Isobolographic analysis of the sedative interaction between six central nervous system depressant drugs and *Valeriana edulis* hydroalcoholic extract in mice\*. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 57(5), 631–639.
- Velázquez-Moyado. (2017). Diligustilide releases H<sub>2</sub>S and stabilizes S-nitrosothiols in ethanol-induced lesions on rat gastric mucosa. *Inflammopharmacology*, 26, 611–619.
- Velázquez-Moyado, J. A., Martínez-González, A., Linares, E., Bye, R., Mata, R., & Navarrete, A. (2015). Gastroprotective effect of diligustilide isolated from roots of *Ligusticum porteri* Coulter & Rose (Apiaceae) on ethanol-induced lesions in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 174, 403–409.
- Wallace, J. L., McKnight, W., Reuter, B. K., & Vergnolle, N. (2000). NSAID-induced gastric damage in rats: Requirement for inhibition of both cyclooxygenase 1 and 2. *Gastroenterology*, 119(3), 706–714.
- Wallace, J. L., Syer, S., Denou, E., de Palma, G., Vong, L., McKnight, W., ... Ongini, E. (2011). Proton pump inhibitors exacerbate NSAID-induced small intestinal injury by inducing dysbiosis. *Gastroenterology*, 141(4), 1314–1322.e5.
- Xu, H. B., Wang, H. D., Li, C. H., Ye, S., Dong, M. S., Xia, Q. J., ... Dong, J. H. (2015). Proton pump inhibitor use and risk of spontaneous bacterial peritonitis in cirrhotic patients: A systematic review and meta-analysis. *Genetics and Molecular Research*, 14(3), 7490–7501.
- Yu, L.-Y., Sun, L.-N., Zhang, X.-H., Li, Y.-Q., Yu, L., Yuan, Z.-Q.-Y., ... Wang, Y.-Q. (2017). A review of the novel application and potential adverse effects of proton pump inhibitors. *Advances in Therapy*, 34(5), 1070–1086.

**How to cite this article:** Pineda-Peña EA, Meza-Pérez DG, Chávez-Piña AE, Velázquez-Moyado JA, Tavares-Carvalho JC, Navarrete Castro A. Pharmacodynamic interaction of 3 $\alpha$ -hydroxymasticadienonic acid and diligustilide against indomethacin-induced gastric damage in rats. *Drug Dev Res.* 2019;1–10. <https://doi.org/10.1002/ddr.21535>