



Universidad Austral de Chile  
Facultad de Ciencias  
Escuela de Química y Farmacia

**Profesor Patrocinante:** Dr. Guillermo Schmeda H.  
Instituto de Química de Recursos Naturales  
Universidad de Talca.

**Profesor Co-Patrocinante:** Dra. Karin Jürgens Sch.  
Instituto de Farmacia  
Facultad de Ciencias

"ACTIVIDAD GASTROPROTECTORA DEL DITERPENO  
AROMÁTICO FERRUGINOL"

**Tesis de Grado presentada como parte  
de los requisitos para optar al Título  
de Químico Farmacéutico.**

**OLGA CAROLINA ALBORNOZ TRONCOSO**

**VALDIVIA - CHILE**

2004

*“Con mucho cariño y mi eterno agradecimiento a todos los que me acompañaron en este hermoso camino, en especial a mis padres, a mi hermana, a Eduardo y a mi sobrino Cristóbal.”*

## **Agradecimientos**

Agradezco enormemente a todas las personas que incondicionalmente me ayudaron en el desarrollo de este trabajo, especialmente a:

- Proyecto Fondecyt 1030583, por el aporte económico para la realización de este y de otros trabajos de investigación que se realizan en la Universidad de Talca.
- Instituto de Química de Recursos Naturales de la Universidad de Talca y a todos los que allí trabajan
- Integrantes de la comisión de tesis: Sr. Guillermo Schmeda ,Sra. Karin Jürgens y Sra. Carin Akesson.
- Instituto de Cultivo celular de la Universidad de Talca.
- Compañeros de laboratorio
- A mis padres.

## Índice

<b>1- Resumen</b>	<b>4</b>
1.1 Abstract	6
<b>2- Introducción</b>	<b>7</b>
2.1 Descripción de la mucosa gástrica	9
2.2 Secreción ácida gástrica	10
2.3 Mecanismo de defensa de la mucosa gástrica	13
2.3.1 Mucus gástrico	14
2.3.2 Secreción de bicarbonato gástrico	15
2.3.3 Flujo sanguíneo en la mucosa gástrica	17
2.3.4 Proliferación y reconstitución del epitelio de la mucosa gástrica	18
2.4 Úlcera péptica	20
2.4.1 <i>Helicobacter pylori</i> en la enfermedad úlcero péptica.	24
2.5 Terapéutica de la úlcera gástrica	26
2.5.1 Antiácidos	26
2.5.2 Antagonistas muscarínicos	26
2.5.3 Antagonistas de los receptores H <sub>2</sub>	26
2.5.4 Citoprotectores	27
2.5.5 Inhibidores de la H <sup>+</sup> -K <sup>+</sup> -ATPasa	28
2.5.6 Otros agentes antiulcerogénicos	29
2.5.6.1 Sucralfato	29
2.5.6.2 Compuestos derivados del bismuto	29
2.5.6.3 Carbenoxolona sódica	29
2.6 Plantas medicinales con actividad antiulcerogénica	30
2.7 Terpenos	31
2.7.1 Aislamiento e identificación de terpenos	35
<b>3 Objetivos</b>	<b>37</b>
3.1 Objetivos generales	37
3.2 Objetivos específicos	37
<b>4 Materiales y métodos</b>	<b>38</b>
4.1 Animales	38
4.2 Drogas	38
4.3 Material vegetal	38
4.3.1 Origen geográfico	38
4.3.2 Obtención de extractos	38
4.3.3 Extracción y purificación del ferruginol	39
4.4 Evaluación de la actividad gastroprotectora del ferruginol	40

4.4.1 Determinación de la actividad gastroprotectora en el modelo de úlceras inducidas por HCl/EtOH en ratones .....	40
4.5 Determinación de toxicidad .....	41
4.5.1 Toxicidad in “vitro” .....	41
4.5.1.1 Determinación de la IC <sub>50</sub> .....	41
4.5.1.2 Citotoxicidad sobre fibroblastos .....	42
4.5.2 Citotoxicidad sobre células gástricas. Daño producido por NaT .....	44
4.5.3 Determinación de sulfhidrilos totales reducidos .....	45
4.6 Análisis estadístico .....	47
<b>5 Resultados y discusión</b> .....	<b>48</b>
<hr/>	
5.1 Actividad del diterpeno ferruginol sobre la úlcera gástrica .....	48
5.2 Citotoxicidad sobre fibroblastos .....	50
5.3 Citotoxicidad sobre células tumorales gástricas .....	52
5.4 Contenido de sulfhidrilos totales reducidos .....	55
5.5 Resumen de resultados .....	58
<hr/>	
<b>6 Referencias bibliograficas</b> .....	<b>60</b>
<hr/>	

## 1-Resumen

Se evaluó la actividad gastroprotectora del diterpeno aromático ferruginol en el modelo de úlcera gástrica inducida por etanol-HCl en ratones a las dosis de 25, 50 y 100 mg/kg. Además, se determinó la citotoxicidad del compuesto sobre fibroblastos y células gástricas AGS. El compuesto demostró ser activo como gastroprotector a las tres concentraciones ensayadas. El tratamiento con ferruginol redujo el índice de lesiones en un porcentaje que fluctúa entre el 65 y 80 %, mientras que el lansoprazol a 20 mg/kg, utilizado como control positivo, tuvo un efecto gastroprotector de un 56 % comparado con los animales no tratados. Estos resultados indican que el producto natural puede tener efecto gastroprotector aún a concentraciones inferiores a las evaluada.

La citotoxicidad del diterpeno ferruginol sobre fibroblastos representada como  $IC_{50}$  (concentración que inhibe en 50% la proliferación celular) fue de 22  $\mu$ M, mientras que esta tuvo un valor de 8,65  $\mu$ M en células tumorales gástricas humanas AGS (CRL1739).

A concentraciones de 0,1 a 4  $\mu$ M, el ferruginol protege a las células AGS contra el daño inducido por taurocolato de sodio, pero a concentraciones mayores este compuesto resultó ser más dañino para las células gástricas AGS que el propio taurocolato.

La cantidad de sulfhidrilos totales reducidos fue similar a las concentraciones de 0,1 y 1  $\mu$ M de ferruginol (6,79 y 6,5 nmoles/ $10^6$  células respectivamente), siendo esta levemente inferior a la cantidad obtenida con el control. Esto sugiere que el compuesto tiene poco o ningún efecto sobre el contenido de sulfhidrilos totales reducidos en las células AGS.

En base a los resultados anteriormente descritos se observa que el diterpeno aromático ferruginol presenta a dosis bajas ( $< 25$  mg/kg) un marcado efecto gastroprotector siendo necesario la realización de diversos estudios orientados a la determinación de la toxicidad y seguridad del compuesto.

## Abstract

Gastroprotective activity of ferruginol (an aromatic diterpene) was evaluated in a rodent model of gastric ulcer. Gastric ulcer was induced with ethanol-HCl and the lesions index was assessed after treatment with ferruginol (25, 50 and 100 mg/kg) and Lanzoprazol (20 mg/kg). The protective effect of ferruginol was also evaluated *in vitro*, using AGS cells (tumor gastric cells CRL 1739) previously exposed to taurocolate. Finally, the cytotoxicity of ferruginol was determined on human lung fibroblasts and gastric AGS cells. Ferruginol reduced the gastric lesion index between 65 and 80 % at the three assayed doses. This gastroprotective effect was higher than that of Lanzoprazol at 20 mg/kg. Ferruginol (0.1 to 4  $\mu\text{M}$ ) protected the AGS cells against the damage induced by sodium taurocolate, although total reduced sulphidriles remained practically unchanged after ferruginol treatment. The cytotoxicity of the compound ( $\text{IC}_{50}$ ) was 22  $\mu\text{M}$  on fibroblasts and 8,65  $\mu\text{M}$  on AGS cell line. The results confirmed the gastroprotective effects of low concentrations of ferruginol on the HCl/ethanol induced ulcer (lesions) in mice. Further *in vivo* studies are needed in order to establish the toxicity and security of this compound.

## 2- Introducción

Las úlceras pépticas, ya sean gástricas o duodenales son una enfermedad crónica que afecta aproximadamente al 10% de la población de países industrializados. Muchos son los médicos que estiman que el aumento de este tipo de enfermedades es un problema de salud pública de creciente importancia debido a los cambios en el estilo de vida que se presenta en la actualidad.

Inicialmente se pensaba que todas las úlceras del tracto gastrointestinal eran causadas por la acción agresiva del ácido clorhídrico y la pepsina sobre la mucosa. Sin embargo actualmente se sabe que este tipo de lesiones pueden ser ocasionadas o influenciada por múltiples factores ya sean defensivos (secreción de bicarbonato, secreción de moco, secreción de prostaglandinas, etc.) o agresivos (secreción de ácido, pepsina, infección por *Helicobacter pylori*) en personas que presentan algún tipo de predisposición o se encuentran constantemente expuestas a un factor de riesgo (Silva Melo *et al.*, 2003).

Una úlcera puede definirse como una lesión profunda generalmente de forma circular u ovalada, de aproximadamente 5 mm de diámetro, habitualmente localizada en el estómago denominándose úlcera gástrica o al inicio del duodeno en donde reciben el nombre de úlcera duodenal. Se trata de una enfermedad de tipo crónica que cursa con periodos de cicatrización de lesiones desapareciendo los síntomas, y periodos de activación de la enfermedad en donde reaparecen síntomas típicos como dolor y ardor en la parte superior del abdomen.

De acuerdo con Richardson (1993) los factores que pueden inducir o facilitar la aparición de úlceras pépticas gástricas o duodenales son:

- 1- Predisposición genética,
- 2- Anormalidades en la secreción de ácido y pepsina,
- 3- Reflujo de bilis y jugo pancreático,
- 4- Anormalidades de la defensa de la mucosa,
- 5- Estrés emocional,
- 6- Retardo del vaciamiento gástrico y
- 7- Factores exógenos como: tabaquismo, uso de antiinflamatorios no esteroideos (AINES), terapia con adrenocorticosteroides, presencia de agentes infecciosos (*Citomegalovirus*, *Candida albicans* y *Helicobacter pylori*) y uso de bebidas que contienen alcohol y/o cafeína.

*Helicobacter pylori* es un bacilo Gram negativo microaerófilo que típicamente aparece como bastón o espiral corto (Vinette *et al.*, 2002). Posee la capacidad de colonizar la mucosa gástrica humana, el mucus y adherirse a la superficie luminal del epitelio gástrico (Suresh *et al.*, 2000).

La infección con *H. pylori* está asociada con gastritis crónica, gastritis inflamatoria, enfermedad úlcera péptica y es un factor de predisposición a desarrollar un adenocarcinoma gástrico y linfoma gástrico (Harris *et al.*, 2000). Se ha observado que el 70 a 90% de los pacientes con úlcera gástrica o duodenal se encuentran infectados con *H. pylori* y que el tratamiento combinado utilizando antibióticos (amoxicilina y claritomicina) y un antisecretores (omeprazol) produce la erradicación del microorganismo en un 90% de los casos (Vut et Ng, 2000). Sin embargo *H. pylori* es relativamente frecuente en individuos sanos que no desarrollan úlcera péptica. Por lo tanto es poco probable que la infección por *H. pylori* baste por sí sola para producir úlcera (NIH, 1994, Hernández *et al.*, 1996).

El aumento de la prevalencia de esta enfermedad en la población y la necesidad de disminuir los efectos que esta produce ha sido el estímulo de muchos científicos para el desarrollo de nuevas técnicas y medicamentos seguros para la población estudiándose también alternativas naturales o derivados semisintéticos de productos naturales que ayuden a curar o prevenir el desarrollo de esta patología y sus efectos. Algunos productos naturales han sido reportados como antiulcerogénicos en modelos de úlcera gástrica en animales (Lewis y Hanson, 1991).

El presente trabajo de tesis busca demostrar el efecto gastroprotector del diterpeno Ferruginol en modelos de úlcera gástrica y la toxicidad *in vivo* e *in vitro* del compuesto en estudio.

## **2.1 Descripción de la mucosa gástrica.**

La mucosa gástrica humana esta constituida de un epitelio glandular compuesto por unidades gástricas (micropliegues de la mucosa). En términos de función gástrica, el estómago se divide en dos regiones, la región exocrina o glandular que se encuentra localizada en el cuerpo y formix gástrico, y la porción endocrina localizada en la región antral.

La mucosa de la región exocrina consiste en un epitelio columnar simple que delimita la superficie lineal. Estas células secretan moco y líquido alcalino, necesarios para la protección del estómago contra sus propias secreciones. Abriéndose a la superficie mucosa se encuentra una zona denominada "PIT", zona donde convergen entre 3 y 7 glándulas oxínticas.

La glándula oxíntica se divide en una zona proximal denominada cuello donde se encuentran las células parietales y las células endocrinas. En este sitio se inicia la proliferación y diferenciación celular de las células que migran a la superficie de la glándula para efectuar recambio celular, el

cual es permanente. La zona distal de la glándula se denomina fondo y en este lugar se encuentran las células principales y algunas parietales. En la glándula oxíntica, área de la lámina propia, se encuentran las células productoras de histamina. En el área antropilórica o endocrina se encuentran glándulas gástricas semejantes a las glándulas oxínticas, pero aparecen unas células productoras de gastrina que se denominan células G y el número de células parietales y principales en esta zona es mínimo. En esta área se encuentran las células D encargadas de producir somatostatina.

## **2.2 La secreción ácida gástrica**

La secreción gástrica ácida resulta de mecanismos sumamente complejos y estímulos múltiples interrelacionados, coordinados y finamente regulados. La producción y secreción de ácido en el estómago, permite la destrucción de microorganismos presentes en los alimentos; activa la pepsina, enzima que necesita de un pH ácido (entre 1,8 a 3,5) para iniciar la digestión de las proteínas; y contribuye, químicamente, a la desintegración de los alimentos en sus componentes elementales, facilitando su absorción en la mucosa intestinal.

La secreción ácida gástrica se puede iniciar por una variedad de factores, relacionados con la ingesta de alimento y el estado calórico del individuo. La secreción ácida esta regulada por diversos mecanismos nerviosos y humorales, que han permitido distinguir en ella tres fases: cefálica, gástrica e intestinal. En la fase cefálica están involucrados mecanismos regulatorios del sistema nervioso central (hipotálamo y bulbo raquídeo), mientras que en la fase gástrica e intestinal, están involucrados mecanismos periféricos, que incluyen elementos neuronales, hormonales, paracrinos y autocrinos.

La regulación de la secreción ácida, a nivel celular, se ejerce sobre las células parietales u oxínticas de la mucosa gástrica. En la superficie de su membrana, la célula parietal presenta una variedad de receptores específicos para sustancias químicas endógenas, que pueden estimular o inhibir la secreción de ácido clorhídrico. Los receptores de la membrana de la célula parietal, conocidos en la actualidad, y que están relacionados con el control de la secreción ácida son:

- |                                |                        |
|--------------------------------|------------------------|
| a-Muscarínicos tipo $M_1, M_3$ | d-Prostaglandina $E_2$ |
| b-Histamínico tipo $H_2$       | e-Gastrina             |
| c-Somatostatina                |                        |

La activación de cada uno de estos receptores conduce a la activación de sistemas enzimáticos, que modifican la formación de segundos mensajeros intracelulares. La estimulación del receptor muscarínico  $M_3$  provoca aumento del calcio citosólico, vía inositol trifosfato. El calcio forma un complejo calcio-calmodulina, que termina activando proteínas-kinasa las que, a su vez, permiten la fosforilación de diferentes proteínas involucradas en la síntesis y secreción de HCl. Los receptores  $H_2$  y gastrina, promueven la síntesis de AMPc y la consecuente activación de proteínas-quinasas dependientes de AMPc (PKA).

Ello también lleva a la fosforilación de proteínas que participan en la síntesis y secreción de HCl. Los receptores de somatostatina y prostaglandina  $E_2$ , por medio de una proteína  $G_i$ , inhiben la enzima adenilciclase, reduciendo la formación de AMPc en la célula parietal con la consecuente disminución de la síntesis y secreción de ácido. La molécula que juega un rol protagónico en la secreción de ácido clorhídrico (HCl) en el estómago, es la bomba de protones  $H^+ - K^+ - ATPasa$ .

Esta proteína está localizada en la superficie luminal de las células parietales, y su estructura está constituida por dos subunidades: una subunidad mayor  $\alpha$  donde se encuentra el sitio de fosforilación, y una subunidad menor o  $\beta$ . El peso molecular de la bomba alcanza los 114 Kd y posee 10 regiones transmembrana (Hersey y Sachs, 1995). Esta bomba posee un alto grado de homología de secuencia con las  $\text{Na}^+\text{-K}^+$  y  $\text{Ca}^+\text{-ATPasas}$  transportadoras de protones, en comparación con otras ATPasas transportadoras de protones. Estudios electrofisiológicos permiten afirmar que la proteína intercambia  $\text{H}^+$  por  $\text{K}^+$  con una estequiometría de 1:1, por molécula de ATP. Estudios recientes han sugerido que la estequiometría puede variar hasta 2:1, cuando la bomba no alcanza el gradiente de pH necesario para el intercambio de 1:1 (Hersey y Sachs, 1995).

En las células parietales, la bomba de protones se encuentra almacenada en vesículas membranosas intracelulares. Cuando la célula parietal es estimulada, las vesículas se funden con la membrana luminal formando canalículos secretores, que contienen unidades de  $\text{H}^+\text{-K}^+\text{-ATPasa}$ , aumentando la capacidad de transporte de iones  $\text{H}^+$  llevando a la formación de más HCl.

La bomba de protones gástrica ( $\text{H}^+\text{-K}^+\text{-ATPasa}$ ) puede ser inhibida por diversos compuestos, como los benzimidazoles sustituidos. Entre estos últimos se encuentran el omeprazol, lanzoprazol y pantoprazol. El benzimidazol más conocido y usado clínicamente es el omeprazol. En medio ácido estos compuestos se unen covalentemente a la bomba de protones, inactivándola en forma irreversible (Hersey y Sachs, 1995).

Un grupo nuevo de compuestos inhibidores de la bomba de protones son las aminas. Ellos difieren de los benzimidazoles porque son inhibidores competitivos de la bomba, pues se unen al sitio que ocupa el ion  $K^+$ . Un compuesto de este grupo es el SCH28080, droga que se metaboliza muy rápido, y como consecuencia su tiempo de acción es muy breve. Otra droga de este tipo es el SKF-96067, con metabolización más lenta, pero muy baja efectividad y finalmente el BY841, que muestra una gran efectividad a dosis muy bajas, y no necesita de un pH ácido para reaccionar.

### **2.3 Mecanismo de defensa de la mucosa gástrica.**

El estómago mantiene la integridad de su mucosa por diferentes mecanismos, siendo los mismos: la producción de mucus, la secreción de bicarbonato ( $HCO_3^-$ ), el flujo sanguíneo local, la renovación celular y la producción de determinadas prostaglandinas (por ej.  $PGE_2$ ). El déficit de alguno de estos factores puede facilitar el daño de la mucosa del órgano.

Las células epiteliales de la mucosa actúan como barrera de defensa por medio de la secreción de mucus y el bicarbonato ( $HCO_3^-$ ). Dicha secreción protege a las células mucosas, las lubrica, retiene agua y forma una capa que bloquea el pasaje de iones hidrógeno ( $H^+$ ) desde la luz gástrica hacia las células epiteliales de la mucosa. Ese impedimento en la difusión de iones hidrógeno ( $H^+$ ) es un proceso producido gracias a la viscosidad del mucus y a que se mantiene una concentración adecuada de bicarbonato. En la úlcera producida por estrés, se piensa que el principal factor que la determina es el déficit en el flujo sanguíneo local.

La mucosa gástrica también puede sufrir daño durante los procesos digestivos como resultado del estrés que provoca el roce de los alimentos, la hiperosmolaridad de la comida o después de la

ingesta de drogas y químicos como aspirina y alcohol (Allen *et al.*1993). Ante tales antecedentes, parece evidente que la mucosa gástrica posee eficientes mecanismos fisiológicos de protección. La autoprotección de la mucosa del estómago, resulta de la combinación de factores pre-epiteliales (flujo sanguíneo, secreción de mucus y bicarbonato) con factores epiteliales (rápida regeneración y reparación del epitelio de la mucosa) (Morimoto *et al.*1991; Allen *et al.*1993).

Muchas de las investigaciones que se realizaron para conocer los factores que estaban involucrados en la protección de la mucosa, derivaron en la búsqueda de drogas que fortalecieran estos factores para de esta forma combatir las úlceras gástricas, debido a que se trata de una patología muy común, especialmente en los países desarrollados en donde afecta prácticamente al 10% de la población (Lewis y Hanson 1991).

### **2.3.1 Mucus Gástrico.**

El mucus gástrico puede ser identificado en tres fases:

- 1-Mucus presecretado, localizado dentro de las vesículas intracelulares de las células epiteliales.
- 2-Una lámina continua de gel mucoso firmemente adherido a la superficie epitelial, y
- 3-Mucus luminal móvil (muy soluble) mezclado con el contenido luminal (Allen *et al.*1993).

La lámina de gel mucoso firmemente adherida, constituye una barrera física, que mantiene separada la superficie apical de las células epiteliales de las secreciones del jugo gástrico disuelto en el lumen del estómago (Allen *et al.*1993). En un hombre, el espesor de esta lámina de gel está estimada en 180  $\mu\text{m}$  (Lewis y Hanson, 1991). El principal constituyente del gel mucoso es una glicoproteína, del tipo mucina, que constituye aproximadamente el 5% (50 mg/ml) y otras proteínas, lípidos y ácidos nucleicos, muchos de ellos derivados de la exfoliación de células

epiteliales y bacterias e IgA (Allen *et al.*1993). Las propiedades viscoelásticas del gel mucoso dependen de estos constituyentes, y el grado de polimerización de la mucina, lo que le permite mantener su estructura (Lewis y Hanson, 1991).

La estructura de la mucina es la que le confiere al gel mucoso, la capacidad de entorpecer la difusión de iones y moléculas de alto peso molecular como la pepsina, previniendo que ellos atraviesen el revestimiento celular del estómago. La mucina del estómago, así como la mayoría de las mucinas gastrointestinales tiene una alta masa molecular ( $\approx 10 \times 10^6$  Da), con un contenido de carbohidratos superior al 80%. Estas proteínas presentan carga eléctrica negativa, debido a la presencia de ésteres de sulfato y ácido siálico en las cadenas de azúcar. La unidad estructural de las mucinas está compuesta de un núcleo central de proteínas con regiones glicosiladas y no glicosiladas. La región glicosilada es la resistente a enzimas proteolíticas. La región no glicosilada forma puentes disulfuro con otras moléculas de mucinas, originando grandes conglomerados poliméricos con capacidad formadora de gel. Estos conglomerados bajan la velocidad de degradación del gel mucoso gastroduodenal por agentes endógenos como pepsina, debido a una penetración lenta en el gel de los agentes mucolíticos (Allen *et al.*1993).

### **2.3.2 Secreción de bicarbonato gástrico.**

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

Estudios en varias especies, incluyendo la humana, han mostrado que la acidificación del lumen gástrico, así como el duodenal, es un poderoso estímulo para la secreción de bicarbonato. Esta estimulación de la secreción de bicarbonato está mediada por la producción local de prostaglandinas del tipo  $E_2$ . La estimulación de la secreción gástrica alcalina es suprimida por indometacina o aspirina porque inhiben la síntesis de prostaglandinas. En el hombre la secreción es abolida por vagotomía proximal selectiva o administración de antagonistas muscarínicos, como bromuro de benzilonio y atropina. La inhibición de los antagonistas muscarínicos no se ve afectada por la presencia de indometacina, lo que permite suponer que la acción vagal estimulante de la secreción de bicarbonato gástrico es independiente de la síntesis de prostaglandinas mucosales (Allen *et al.*1993).

Existe una gran variedad de compuestos que pueden estimular o inhibir la secreción de bicarbonato gástrico. Dentro de los compuestos que la estimulan se encuentran las prostaglandinas del tipo  $E_2$ , agonistas muscarínicos, la hormona polipéptido pancreático, compuestos que contienen aluminio, como el sucralfato, y la administración directa de iones de aluminio al lumen gástrico. Los principales inhibidores de la secreción son los inhibidores de la ciclo-oxigenasa, antagonistas muscarínicos, agonistas  $\alpha_2$ - adrenérgicos y acetazolamida (Allen *et al.*1993).

La secreción de bicarbonato, proveniente de la superficie de las células epiteliales de la mucosa gástrica, alcaliniza al gel mucoso viscoelástico y proporciona la primera línea de defensa contra la acción agresiva del ácido clorhídrico luminal. Este proceso de neutralización del contenido ácido luminal, ocurre dentro de la matriz del gel mucoso firmemente adherido a las células epiteliales, y hace posible mantener un gradiente de pH que va desde un valor de pH ácido en el

lumen ( $\text{pH} > 2$ ) a uno cercano al neutral en la interfase muco-epitelial (Lewis y Hanson, 1991, Allen *et al.*1993). La existencia de este gradiente de pH ha sido determinada tanto *in vitro* como *in vivo*, en la mucosa gástrica de diversas especies como conejo, anfibios, perros, ratas y humanos (Allen *et al.*1993). Cuando la mucosa gástrica es dañada, se produce una difusión pasiva de líquido intersticial, incluyendo bicarbonato, a través de la membrana de la mucosa, alcalinizando la fibrina lo que estimula los procesos de reparación celular (Allen *et al.*1993).

### **2.3.3 Flujo sanguíneo en la mucosa gástrica.**

El adecuado flujo sanguíneo, asegurado por una microcirculación eficiente, juega un rol central en la eliminación de  $\text{H}^+$  de la mucosa, lo que previene la acidosis en los tejidos y mantiene el equilibrio ácido-base. Así, cuando la mucosa es expuesta a una acidez elevada, se puede observar un aumento en el flujo sanguíneo de la mucosa, sin alterar el pH intramucosal.

Varios estudios sugieren que esta respuesta vasodilatadora es mediada por nervios sensitivos intramusculares, vía liberación de un péptido. Sin embargo, cuando la acidez luminal excede 80 mM, el flujo sanguíneo no aumenta y el pH intramucosal se acidifica, indicando la acumulación de  $\text{H}^+$  dentro de la mucosa.

La isquemia de la mucosa gástrica, produce una rápida acidificación del pH intramucosal y hace que la mucosa sea más susceptible al daño de sustancias endógenas como el ácido, lo que puede contribuir a la aparición de úlceras en la mucosa gástrica por diversas formas de estrés: rotacional, de retención, quemaduras severas, choque séptico. También se ha observado que la isquemia, seguida por una reperfusión, promueve la generación de radicales libres de oxígeno, los

que inducen la formación de lesiones ulcerosas, incluso en ausencia de ácido clorhídrico luminal (Allen *et al.* 1993).

El estudio del flujo sanguíneo en la mucosa gástrica, ha mostrado que muchas de las ulceraciones que se producen en ella, no son provocadas por la alteración de sustancias endógenas, como el ácido o la pepsina, sino por la capacidad de la mucosa gástrica de disipar la sobrecarga de  $H^+$  intramucosal. Es en esta condición, donde se nota la importancia del flujo sanguíneo en la protección de la mucosa, porque actúa retirando el exceso de  $H^+$  intramucosal y, probablemente, aumentando la entrega de bicarbonato. El oxígeno y nutrientes para el metabolismo, son muy importantes para prevenir las úlceras gástricas (Allen *et al.*, 1993). También lo son las prostaglandinas del tipo  $E_2$ , agentes citoprotectores de la mucosa gástrica, que actúan aumentando el flujo en la mucosa gástrica, en respuesta a diversas condiciones ulcerogénicas (Lewis y Hanson, 1991).

#### **2.3.4 Proliferación y reconstitución del epitelio de la mucosa gástrica.**

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

La proliferación y reconstitución son los dos procesos encargados de mantener la integridad de la barrera celular epitelial en el estómago. La proliferación celular de la mucosa gástrica ocurre en la región del istmo de las glándulas del estómago. La mayoría de las células nuevas migran hacia

la superficie de la mucosa para reemplazar el revestimiento del lumen del estómago y la porción restante de células penetra en las glándulas para sustituir a las células parietales y principales. Debido a este hecho, la reepitelización superficial de la mucosa gástrica es rápida, estimándose que la vida media de las células epiteliales superficiales es de 1-2 días. En cambio, la reepitelización de las células epiteliales de las glándulas gástricas, requiere de varios meses (Allen *et al.*1993).

Muchos estudios indican que la presencia de nutrientes estimula la proliferación celular en el estómago, así como también varios péptidos entre los que se encuentra: la bombesina, colecistoquinina, glucagón y péptido intestinal vasoactivo (VIP). El factor más importante que estimula la proliferación celular en la mucosa gástrica es el péptido factor de crecimiento epidérmico (EGF). Este péptido es secretado por las glándulas salivales y de Brünner. El EGF es un potente agente mitogénico que actúa sobre las células epiteliales gástricas, más una amplia variedad de otras células. La mitogénesis, estimulada por el EGF, junto a una rápida inhibición de la secreción de ácido, permite la adecuada reparación de la mucosa gástrica (Allen *et al.*1993).

La restitución se describe como el proceso en que un daño superficial, causado por la propia digestión, alcohol y un amplio rango de drogas, no penetra la lámina basal del epitelio, y las células superficiales epiteliales migran por esta lámina permitiendo una rápida restitución epitelial (minutos u horas) (Allen *et al.*1993).

## **2.4 Úlcera péptica.**

Uno de los trastornos que con más frecuencia afecta a la población es la enfermedad ácido péptica, definida como el conjunto de síntomas debido a la acción de los jugos digestivos, ácidos en su naturaleza, sobre estructuras que no están preparadas para entrar en contacto con ellos, como es el caso del esófago, o que han perdido la capacidad de protegerse de aquellos, como puede suceder con el estómago o el intestino.

Lesiones como la gastritis o la esofagitis hacen parte de los trastornos agrupados bajo tal denominación, pero son las úlceras las más conocidas y sobre las cuales existe un mayor número de creencias erróneas, que muchas veces llevan a no buscar diagnóstico y tratamiento adecuados, debido a la percepción de que se trata de una enfermedad incurable para la cual no existe tratamiento efectivo.

Gran parte de estas concepciones inexactas tenían origen en los preceptos médicos que hasta hace poco eran la base del diagnóstico y manejo de la enfermedad. En los últimos años, sin embargo, las nociones sobre la forma como se desarrollan las úlceras y por consiguiente la manera de tratar las mismas, han sufrido cambios importantes que han beneficiado de gran manera a los pacientes que padecen las mencionadas lesiones.

El término de úlcera se aplica en el caso del tracto digestivo a lesiones tipo erosión que ocurren en el tejido que recubre las vísceras huecas del mismo como el estómago y el intestino delgado. Normalmente, aquellos tejidos están compuestos por células especializadas que pueden resistir la acción de los ácidos del jugo gástrico y revestidos por una capa de moco secretado por otro tipo de células, que evita el contacto directo entre el ácido y la pared de los órganos. La pérdida de

esta protección, por medio de diferentes vías, hace que el tejido expuesto al fluido digestivo sufra cambios similares a los que produce una quemadura química.

Este es quizá el campo en el que han ocurrido la mayor parte de los cambios en cuanto al conocimiento de las úlceras por cuanto hoy en día se acepta que entre 80% y 95% de ellas son debidas a la infección por una bacteria denominada *Helicobacter pylori*. Se sabe en la actualidad que la bacteria penetra las células que recubren estómago y duodeno y cambia las condiciones del entorno para protegerse a sí misma del ácido gástrico. En ese proceso, daña las barreras de protección de las células y estas se ven afectadas por las secreciones digestivas, causando la lesión. El papel que se le atribuía a otros factores como las comidas muy condimentadas, el exceso de estrés y la mala alimentación entre otros, como causantes de la enfermedad ha pasado ahora a ser el de factores que pueden agravar o hacer más evidentes los síntomas de una úlcera ya existente. Entre el pequeño porcentaje de úlceras en las que no participa *Helicobacter pylori*, se cuentan las denominadas úlceras de estrés, lesiones asociadas a los cambios en el funcionamiento normal del cuerpo ante situaciones de salud grave, como las que se presentan ante una hospitalización prolongada en áreas de cuidados intensivos.

La clasificación más empleada por los médicos para referirse a las úlceras se basa en la localización de las mismas dentro del tracto digestivo. De esta manera, las úlceras pueden dividirse en dos grandes grupos: las gástricas y las intestinales. A las primeras puede agregársele otro vocablo que determine su localización específica dentro del estómago. Por ejemplo, úlcera pilórica, fúndica o antral, son términos que describen la parte del estómago en donde el médico ha detectado la lesión. Entre las úlceras intestinales, las más frecuentes son las duodenales, es decir, aquellas que ocurren en la primera porción del intestino delgado.

Las úlceras pépticas, además de reducir de manera significativa la calidad de vida del individuo que la padece pueden acarrear serias complicaciones cuando no es tratada a tiempo, pudiendo incluso comprometer la vida del paciente. Penetración y perforación son términos que indican que la úlcera se ha hecho tan profunda, que ha atravesado la pared del estómago o el duodeno para dejar una comunicación entre la luz de la víscera y un órgano vecino, en el caso de la primera, o entre el sitio ulcerado y la cavidad abdominal en el caso de la segunda.

Además, una úlcera puede comprometer uno o más vasos sanguíneos dando origen a un sangrado masivo que puede manifestarse con vómitos de sangre si es agudo o llevando al paciente a una anemia si es crónico. Por otra parte, los trastornos digestivos secundarios a los síntomas de la enfermedad, pueden agravar la condición del paciente.

Desde hace mucho tiempo los científicos habían observado una relación entre la presencia de úlceras gástricas y el desarrollo posterior de cáncer de estómago. Hasta que se pudo comprobar que el origen de las úlceras gástricas era principalmente la infección por *Helicobacter pylori*, a finales de la década de los ochenta, no se sabía con exactitud cual era la relación entre las dos lesiones. Hoy se ha podido establecer que algunos de los productos derivados del microorganismo son un factor de riesgo para desarrollar lesiones cancerosas. Por ello, es importante que se logre la erradicación de la bacteria cuando se ha diagnosticado su presencia en el estómago o intestino del paciente. Sin embargo, es importante destacar que la mayoría de las úlceras no evolucionan a cáncer.

Los mecanismos por los cuales se adquiere la infección por *Helicobacter pylori* no están esclarecidos del todo. Lo que en la actualidad se conoce es que la infección aparece con mayor frecuencia en los primeros años de vida y que puede transmitirse en familias o personas en

estrecho contacto por transmisión oral y/o fecal. Esto quiere decir que la contaminación de alimentos con materia fecal infectada, que puede ocurrir por malos hábitos higiénicos, puede ser al menos una de las formas de transmisión de la bacteria. Estudios científicos han demostrado ciertas condiciones, conocidas como factores de riesgo, que hacen más propensa a una persona a contraer la infección.

Es importante señalar que no todas las personas infectadas por *Helicobacter pylori* desarrollan algún tipo de úlcera y que no todas las personas que padecen de la enfermedad úlcera péptica albergan esta bacteria en el estómago o intestino, sino que, el hecho de presentar esta infección vuelve al paciente mucho más propenso a desarrollar la enfermedad.

Como en casi todos los trastornos de salud, la primera indicación de que existe una úlcera la constituyen los síntomas y signos de la enfermedad. Para el caso específico de tales lesiones, estas deben sospecharse ante la presencia de dolor o ardor en la parte alta del estómago, casi siempre por debajo del esternón, con una intensidad variable y casi siempre más fuerte cuando el estómago esta vacío. Suele ocurrir también que el dolor empeore durante la noche y que pueda ser aliviado por la ingesta de alimentos. En casos más severos, cuando ya hay sangrado, pueden ocurrir vómitos de sangre, que puede ser de color rojo intenso o café oscuro, deposiciones oscuras y pérdida de peso. Ante estos síntomas, el médico deberá practicar exámenes que confirmen el diagnóstico de úlcera y que busquen la presencia de *Helicobacter pylori* en el tejido infectado.

En resumen, los síntomas más comunes y característicos de la enfermedad úlcero péptica, son los siguientes y su intensidad dependerán de la condición personal del paciente y de que tan comprometido se encuentre:

Dolor sordo o sensación de ardor en la parte alta del abdomen.	Nauseas.
Empeoramiento del dolor en la noche.	Vómitos con sangre (en sangramiento).
Aumento del dolor con el estómago vacío.	Deposiciones negras.
	Pérdida de peso.
	Dolor en la región de la espalda.

#### **2.4.1 *Helicobacter pylori* en la enfermedad úlcero péptica.**

Trabajos realizados en los últimos años, han establecido que el factor de mayor riesgo en la etiología de la úlcera péptica, es la infección por la bacteria *H. pylori*. Se ha observado que un 95 a 100% de los pacientes con úlcera gástrica o duodenal, se encuentran infectados por *H. pylori* (Johnson, 1997). Esta bacteria, un bacilo Gram negativo, se sitúa en el microambiente neutral existente entre el mucus producido por la mucosa y la superficie del epitelio del estómago (Ernst y Gold, 2000). *H. pylori* posee una gran actividad de tipo ureasa, lo que le permite metabolizar la urea en amoníaco  $\text{NH}_4^+$ , haciendo que la bacteria resista el medio ácido y colonice la mucosa. El amoníaco es citotóxico, daña las células epiteliales incrementando la permeabilidad de la mucosa gástrica al ácido y la pepsina (Jonhson, 1997). Además, esta bacteria puede estimular la producción de sustancias vasodilatadoras y activar el sistema inmune, causando gastritis crónica (Ernst y Gold, 2000). Todos estos factores contribuyen a la formación de úlceras gastroduodenales y cáncer gástrico (Jonhson, 1997; Ernst y Gold, 2000).

Recientemente, la Organización Mundial de la Salud clasificó al *H. pylori* como carcinógeno humano del tipo I (Chelimsky y Czinn 2000). Se ha observado que la infección crónica por *H. pylori*, particularmente cuando se adquiere en la niñez, predispone al individuo a desarrollar

úlceras gástricas o duodenales e incrementa significativamente el riesgo que el individuo desarrolle linfoma gástrico. A pesar de ello, sólo un pequeño número de niños infectados con *H. pylori* desarrolla úlceras pépticas (Chelimsky y Czinn 2000) en la etapa adulta de su vida.

La infección con *H. pylori* es común entre las personas sanas, lo que hace pensar que la bacteria misma no es suficiente para inducir por sí sola el apareamiento de úlceras, pero investigaciones recientes realizadas en ratones, han mostrado que existiría una cepa de *H. pylori* portadora de un gen que la hace extremadamente tóxica, y que induciría el apareamiento de úlceras en la mucosa gástrica. Esta misma cepa retrasa la curación de las lesiones, debido a que disminuye la microcirculación en la zona ulcerada, lo que provoca una prolongada inflamación de la zona afectada. Se ha sugerido también, que existiría una regulación inapropiada de la respuesta inmune gástrica, frente a la infección de *H. pylori* (Makino *et al.*, 1998; Konturek *et al.*, 1999; Ernst y Gold, 2000).

La terapéutica de la infección con *H. pylori* combina el uso de antiseoretos (omeprazol) y antibióticos (amoxicilina y claritromicina), lo que produce la erradicación del microorganismo de un 61 a un 67% luego de tres días de tratamiento (Flores *et al.*, 2000). Trabajos realizados en ratones infectados, a los que se les induce una úlcera crónica, muestran que la amoxicilina, a dosis de 10 mg/kg/día, por cinco días, erradica el microorganismo y promueve la curación de la lesión (Makino *et al.* 1998).

## **2.5 Terapéutica de la úlcera gástrica.**

Los recursos farmacológicos para tratar la úlcera gástrica están dirigidos a reducir o inhibir la secreción ácida en el estómago y a favorecer o promover los mecanismos protectores de la mucosa gástrica, por ejemplo, aumentar la secreción de mucus, bicarbonato y flujo sanguíneo.

### **2.5.1 Antiácidos**

Los antiácidos gástricos son sustancias alcalinas, que neutralizan o remueven el ácido clorhídrico del contenido gástrico. Entre los antiácidos disponemos de los aniónicos básicos (carbonato, bicarbonato, citrato y trisilicato), con efectividad sintomática, pero con efectos secundarios. También están las sales no absorbibles de hidróxido de magnesio, aluminio y calcio, con metales di o trivalentes, con una capacidad mayor de neutralización y menores efectos secundarios.

### **2.5.2 Antagonistas muscarínicos**

A nivel antral, el nervio vago estimula la secreción de gastrina, la cual actúa sobre células cromafines, promoviendo la liberación de histamina, la que actúa sobre la célula parietal aumentando la secreción de ácido clorhídrico. Estos efectos pueden ser bloqueados por antagonistas muscarínicos  $M_1$ . Entre los agentes nuevos, que antagonizan selectivamente con los receptores  $M_1$ , está la pirenzepina. La eficacia de esta droga se aproxima a la Cimetidina cuando se administra en dosis 100 mg/ día.

### **2.5.3 Antagonistas de los receptores $H_2$ .**

La célula parietal presenta un receptor de histamina de tipo  $H_2$ , que al unirse a histamina o agonistas  $H_2$ , se activa y estimula a las células parietales para secretar ácido clorhídrico. Este

receptor puede ser bloqueado selectivamente por antagonistas  $H_2$  (A-RH<sub>2</sub>). Los A-RH<sub>2</sub>, pueden inhibir también la secreción de ácido provocada por gastrina y agonistas muscarínicos, aunque el efecto no es siempre completo. Dentro de los A-RH<sub>2</sub> están la Cimetidina (inhibe la producción de HCl hasta un 88%) y la Ranitidina (cuatro a seis veces más potente que la cimetidina). Un A-RH<sub>2</sub> más reciente es la Famotidina, el más potente que se conoce, 34 veces más potente que la Cimetidina y 9 veces más que la Ranitidina. Actualmente siguen apareciendo drogas de acción similar a la Famotidina, como la Nizatidina y la Ebrotidina.

#### **2.5.4 Citoprotectores.**

La mucosa gástrica cuando está expuesta a la acidez luminal, secreta mucus y bicarbonato ( $HCO_3^-$ ), acción conocida como citoprotección. Esta respuesta citoprotectora de la mucosa está mediada por la síntesis de prostaglandinas ( $PG_S$ ) de tipo  $E_2$  e  $I_2$ , secretadas por la propia mucosa gástrica. Las  $PG_S$  estimulan la secreción de  $HCO_3^-$  y mucus, aumentando también el flujo sanguíneo de la mucosa del estómago, lo que permite la disipación de carga. Está demostrado que las  $PG_S$  protegen la mucosa gástrica contra varios agentes ulcerogénicos, efecto que ha sido atribuido al fortalecimiento de la barrera mucosa. Considerando esta acción de las  $PG_S$ , y que la vida media de estas moléculas es extremadamente corta, se han desarrollado análogos estructurales de metabolización más lenta. La droga de este tipo disponible actualmente es el Misoprostol.

### 2.5.5 Inhibidores de la $H^+-K^+$ -ATPasa

El primer compuesto de este grupo fue el Omeprazol, que es un benzimidazol sustituido. Este compuesto tiene un grupo sulfinil, el cual es protonado en medio ácido originando una sulfonamida, que reacciona en forma covalente con los grupos sulfhidrilos de cisteínas ubicadas en la porción extracelular de la subunidad  $\alpha$  de la bomba  $H^+-K^+$ -ATPasa. Ello hace que la bomba de protones quede inhibida irreversiblemente (Sachs *et al.*, 1995).

Omeprazol, en dosis de 20 mg/día, reduce en un 65% la secreción ácida a la 4-6 horas, y su administración diaria tiene efecto acumulativo. Así, a los cuatro días, la inhibición es de 80% y a la semana puede llegar a un 92%. El uso prolongado de Omeprazol conduce al aumento de la secreción de gastrina, lo que ocasiona la hiperplasia de las células enterocromafines que secretan histamina (Sachs *et al.*, 1995).

## **2.5.6 Otros agentes antiulcerogénicos.**

### **2.5.6.1 Sucralfato**

Es una sal de aluminio del disacárido sulfatado octosulfato de sucrosa, sustancia que posee la capacidad de facilitar la cura de las lesiones ulcerosas de la mucosa. Se ha demostrado que la suspensión de sucralfato inhibe la enzima ureasa del *H. pylori*, lo que facilita la erradicación de la bacteria y la adsorción de sus toxinas, cuando se usa en el tratamiento de úlcera gástrica conjuntamente con amoxicilina y claritromicina (Ikezawa *et al.*, 1998).

### **2.5.6.2 Compuestos derivados del bismuto**

Esta sustancia es una suspensión coloidal estable, que posee una potente afinidad por las glucoproteínas de la mucosa y es utilizada para el tratamiento de las úlceras gástricas y duodenales. Es tan eficaz como la cimetidina.

### **2.5.6.3 Carbenoxolona sódica**

Es un derivado del triterpeno oleanano obtenido de un extracto de *Glycyrrhiza glabra*. Esta droga estimula la síntesis de mucus, mantiene alto nivel de PGs en la mucosa gástrica, promoviendo la acción de los factores que protegen la mucosa contra la ulceración. Además, ha sido observado que la carbenoxolona inhibe la secreción de pepsina (Lewis y Hanson, 1991).

## **2.6 Plantas medicinales con actividad antiulcerogénica.**

Algunas de las drogas que se utilizan actualmente para el tratamiento de la úlcera gástrica, se han obtenido de plantas medicinales. Un ejemplo de ello es la carbenoxolona. Varias de las sustancias puras o extractos crudos que presentan actividad antiulcerogénica son de origen vegetal (Lewis y Hanson, 1991), lo que demuestra que las plantas son una rica fuente de moléculas para desarrollar nuevas drogas y herramientas farmacológicas que permitan tratar o curar enfermedades.

La lista de compuestos obtenidos de plantas medicinales que se usan en la medicina tradicional de varios países porque poseen actividad antiulcerogénica es amplia. Por ello, las estructuras químicas y los mecanismos de acción propuestos para tales actividades son variados. Entre los compuestos estudiados, que poseen actividad sobre la úlcera gástrica o duodenal se encuentran flavonoides, triterpenos, diterpenos, alcaloides y glicósidos (Lewis y Hanson, 1991). La mayoría de los compuestos antiulcerogénicos de origen vegetal ejercen su acción mejorando o favoreciendo los mecanismos de defensa de la mucosa gástrica, por ejemplo, aumentando la secreción de mucus o el nivel de prostaglandinas (Lewis y Hanson 1991; Garg *et al.*, 1993; Attaguile *et al.*, 1995; Vela *et al.*, 1997; Hiruma-Lima *et al.*, 1998; Souza *et al.*, 1998; Carvajal *et al.*, 2000; González *et al.*, 2000; Hiruma-Lima *et al.*, 2000).

El lleuque, *Prumnopitys andina* (Poepp. ex Endl.) de Laub., Podocarpaceae, es un árbol endémico de Chile, con una distribución muy pequeña, en la precordillera andina desde la VII a la IX Región. Por las características de su madera ha sido un importante recurso, especialmente para la obtención de leña, dando origen en ocasiones a una explotación desmedida. Es por esto que se encuentra en estado crítico de conservación, siendo una planta considerada como Rara de

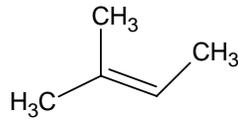
acuerdo a los criterios establecidos por la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza.

*Prumnopitys andina* es una planta de gran valor ornamental por sus hojas siempreverdes y su hermosa silueta, siendo muy apreciada en jardinería. Por otro lado, el arilo carnoso que rodea la semilla en la madurez es comestible y se ha usado a baja escala en la preparación de mermeladas y para la alimentación de animales.

Por ser una planta de escasa distribución geográfica, popularmente no son muy conocidas sus propiedades medicinales. Sin embargo, investigaciones y estudios científicos han demostrado que son múltiples las propiedades medicinales de una serie de compuestos que aparecen en este árbol, además de otras especies.

## **2.7 Terpenos.**

En general los “Terpenos” son compuestos formados por unidades de cinco átomos de carbono. Los terpenos constituyen uno de los grupos de compuestos más ampliamente distribuidos en la naturaleza junto con los alcaloides y los compuestos fenólicos. En un comienzo, se aislaron de las fracciones volátiles de muchos aceites esenciales hidrocarburos de fórmula  $C_{10}H_{16}$  a los que se denominó “terpenos”. Más tarde se aislaron compuestos oxigenados que también se incluyeron dentro de esta clasificación general, por lo que la terminación “eno” resultó inadecuada y se los llamó “terpenoides”. Estos compuestos que se encuentran principalmente en el reino vegetal, están formados por la unión virtual de unidades de isopreno.



**Figura 1:** Molécula de isopreno

Esta relación del isopreno con los terpenoides es absolutamente formal, ya que, por lo que se sabe del camino biogénico de estos compuestos, los vegetales no lo sintetizan a partir del isopreno, el cual nunca ha sido aislado como producto natural. Sin embargo, el conocimiento de la unión de dos o más unidades isoprénicas y del isopreno como un componente de la estructura ha sido de gran ayuda en la elucidación de sus estructuras. Esto llevó a la formulación de la regla del “isopreno”, enunciada por Ruzicka en el año 1953, que dice que un terpenoide debe ser divisible en unidades de isopreno. En dicha regla se basa la definición de estos compuestos: “Son aquellos compuestos que tienen una arquitectura *sui generis* químicamente relacionada con la molécula simple  $C_5H_{10}$  (isopreno)”.

De acuerdo con la “regla del isopreno”, los terpenos se clasifican de acuerdo a la multiplicidad de este grupo, de la siguiente manera:

Nombre	Nº Unidades	Fórmula molecular
Hemiterpeno	1	$C_5H_8$
Monoterpeno	2	$C_{10}H_{16}$
Sesquiterpeno	3	$C_{15}H_{24}$
Diterpeno	4	$C_{20}H_{32}$
Sesterpeno	5	$C_{25}H_{40}$
Triterpeno	6	$C_{30}H_{48}$
Tetraterpeno	8	$C_{40}H_{64}$
Politerpeno	N	$(C_5H_8)_n$ (n $7,5 \times 10^3$ a $3 \times 10^5$ )

**Tabla 1:** Clasificación de terpenos

Algunas excepciones a esta regla la constituyen aquellos compuestos cuyas estructuras no poseen un número de átomos de carbono múltiplo de cinco, como por ejemplo las iononas, las que son consideradas dentro de este grupo por su naturaleza isoprenoide. Por otra parte se conocen terpenoides que a pesar de tener un número de átomos de carbono múltiplo de cinco, la disposición de los mismos impide su subdivisión en las mencionadas unidades isoprenicas, debido a que se encuentran enmascaradas, aunque provienen de un compuesto de este tipo.

Dentro del grupo de los terpenos se encuentran los diterpenos, compuestos ampliamente difundidos en el reino vegetal. Por definición se consideran “Productos Naturales que poseen un esqueleto de átomos de carbono formados por cuatro unidades de isopreno”.

Dentro de las divisiones Angiospermas y Gimnospermas del reino vegetal, podemos encontrar una variedad de metabolitos secundarios con amplia actividad biológica dentro de las cuales es necesario mencionar los terpenoides del tipo abietano que se encuentran especialmente distribuidos en las familias Asteraceae, Celastraceae, Hydrocharitaceae y Lamiaceae pertenecientes a la división Angiospermas, mientras que en las Gimnospermas tenemos a las familias Araucariaceae, Cupressaceae, Pinaceae y Podocarpaceae (San Feliciano *et al.*, 1993).

Los diterpenos del tipo abietano han mostrado variadas actividades biológicas como antimicrobiana, antiulcerosa, cardiovascular, antialérgica, cosmética, inmunosupresora (Duan *et al.*, 1999), atrapadora de radicales libres y antiproliferativa en líneas celulares de cáncer humano (Gaspar *et al.*, 2002).

El Ferruginol, aislado por primera vez de *Podocarpus ferruginea* es un diterpeno aromático del tipo abietano que también se ha aislado de *Prumnopitys andina*. Presenta las siguientes

actividades biológicas: antibacteriano (Ulubelen *et al.*, 2001), efecto cardiovascular (Ulubelen *et al.*, 2002), antioxidante (Ono *et al.*, 1999), antiplasmodial (Clarkson *et al.*, 2003), antitumoral (Iwamoto *et al.*, 2003) y antihipertensivo (Ulubelen *et al.*, 2000).

La familia Podocarpaceae, que incluye árboles y arbustos, está representada por siete géneros y alrededor de 125 especies distribuidas principalmente en el Hemisferio sur, extendiéndose también al norte de Japón y Centroamérica. En Chile podemos encontrar cuatro géneros (Marticorena y Rodríguez, 1995):

1-*Lepidothamnus*

3-*Prumnopitys*

2-*Saxe-gothea*

4-*Podocarpus*

*Prumnopitys andina* (Poepp ex. Endl.) de Laub. exhibe un alto endemismo y crece en áreas restringidas como la cordillera de la VII a IX región del país y es un árbol de importancia forestal. Estas plantas producen metabolitos secundarios de gran interés, por ello diversos investigadores han orientado sus estudios a evaluar su actividad antibacteriana y antifúngica (Flores *et al.*, 2001, Becerra *et al.*, 2002).

No existen investigaciones sistemáticas sobre el efecto gastroprotector de los diterpenos pertenecientes a la familia Podocarpaceae. Por tal motivo es de gran interés aislar y evaluar los compuestos presentes en la corteza de *Prumnopitys andina* (Poepp ex. Endl.) de Laub. en modelos de úlcera gástrica *in vivo*.

### 2.7.1 Aislamiento e identificación de terpenos

Cuando se desea saber que partes de la planta se deben recolectar por ser las más ricas en principios activos o compuestos que se quiere estudiar, es útil el uso de pruebas preliminares que permitan localizar cualitativa o cuantitativamente uno o varios principios activos. Algunos de los posibles métodos que pueden utilizarse son:

Histológicos, es decir, observación del comportamiento de cortes de tejidos frente a ciertos reactivos que formen colores, precipitados, etc.

Químicos, tratamiento de extractos con agentes cromógenos, sustancias que formen precipitados, etc.

Fisicoquímicos, uso de cromatografía, localización de ciertas bandas en el infrarrojo o ciertas señales características en la Resonancia Magnética Nuclear de protones ( $^1\text{H}$  RMN) y carbono trece ( $^{13}\text{C}$  RMN).

Biológicos, el efecto de extractos sobre cultivos de organismos, reacciones de hemólisis, test en ratones, embriones, órganos aislados, tejidos, enzimas, receptores, etc.

El uso de plantas o de sus extractos para propósitos medicinales es una práctica de la especie humana desde los principios de su existencia. La fitoterapia y la medicina tradicional incluyen preparados vegetales en forma natural o como derivados. Múltiples son las actividades biológicas de productos naturales que han sido identificadas, así como también se ha determinado la toxicidad de algunos preparados tradicionales.

Las plantas constituyen una alternativa en la estrategia para la búsqueda de nuevas drogas tanto por su actividad biológica como por su potencial como herramienta bioquímica (Foye, 1995). Una revisión de la literatura publicada durante los últimos años revela que la actividad antiulcerosa de productos naturales no está confinada sólo a una clase de compuestos e incluye compuestos puros y extractos de origen natural para el tratamiento de desordenes gástricos.

### 3- Objetivos

#### 3.1 Objetivos generales.

- Determinar la actividad gastroprotectora del ferruginol en modelos de úlcera gástrica inducida por HCl/etanol en ratones.
- Determinar la toxicidad *in vivo* e *in vitro* del compuesto en estudio.

#### 3.2 Objetivos específicos.

- Aislar el Ferruginol de la corteza de *Prumnopitys andina*.
- Evaluar la relación dosis respuesta del Ferruginol a 25, 50 y 100 mg/kg en el modelo de úlcera gástrica inducida por HCl/etanol en ratones.
- Determinar la citotoxicidad del ferruginol sobre fibroblastos.
- Determinar la citotoxicidad del ferruginol sobre células AGS.

## **4- Materiales y Métodos.**

### **4.1 Animales**

Se usaron ratones machos de la cepa Swiss albino ( $35 \pm 5$  g), comprados al bioterio del Instituto de Salud Pública (ISP) de nuestro país. Los animales fueron alimentados con una dieta certificada Champion S.A. con libre acceso al agua y bajo condiciones controladas de luz/oscuridad (12/12), humedad y temperatura.

### **4.2 Drogas**

Se utilizó lanzoprazol (Losec<sup>®</sup>, Merell Lepetit) como control positivo en la determinación de la actividad gastroprotectora del compuesto en estudio. El ferruginol fue obtenido a partir de un extracto de lleuque de acuerdo al método que se detalla más adelante.

### **4.3 Material Vegetal**

#### **4.3.1 Origen geográfico.**

*Prumnopitys andina*, más conocido como lleuque, fue colectado en la zona de Nahuelbuta, IX región de nuestro país. La muestra fue identificada por el profesor Patricio Peñailillo, en la Universidad de Talca, donde se ha depositado un ejemplar de herbario.

#### **4.3.2 Obtención de extractos.**

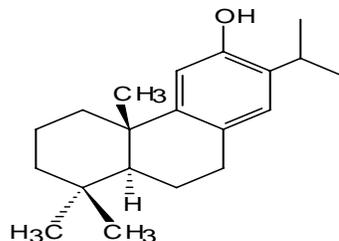
Los diferentes extractos se obtuvieron al tratar la corteza seca, molida y en forma de astillas dos veces consecutivas con: éter de petróleo (EP, rendimiento 4% p/p), diclorometano ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) y acetato de etilo (EtoAc), en reflujo por 30 minutos. Los extractos fueron filtrados y concentrados

a presión reducida. Una comparación de los extractos mediante TLC (cromatografía en capa fina) demostró que no había evidencia de la presencia del ferruginol en los extractos diclorometano y acetato de etilo, por lo que se trabajó con el extracto EP para aislar el ferruginol.

#### 4.3.3 Extracción y purificación del Ferruginol.

El Ferruginol se aisló del extracto crudo EP mediante cromatografía en columna de silica gel, eluyendo con mezclas de EP y EtOAc (columna 1); *n*-hexano y *n*-hexano-éter etílico de polaridad creciente (columna 2), de donde se obtiene un rendimiento total del 1.2% p/p. El compuesto se purificó por recristalizaciones sucesivas en *n*-hexano como pequeños cristales blancos.

Una vez aislado el Ferruginol se realizó su elucidación estructural mediante técnicas espectroscópicas (FT-IR y <sup>1</sup>H-RMN) y métodos físicos (rotación óptica, punto de fusión). Los datos son coincidentes con los informados en literatura (Becerra *et al.*, 2002).



**Figura 2:** Estructura química del ferruginol

#### **4.4 Evaluación de la actividad gastroprotectora del ferruginol.**

##### **4.1 Determinación de la actividad gastroprotectora en el modelo de úlceras inducidas por HCl/etanol.**

Este experimento se realizó de acuerdo al método descrito por Yesilada *et al.* (1997). Un total de 35 ratones machos de la cepa Swiss albino, fueron distribuidos al azar en 5 grupos de 7 animales cada uno. Siete ratones, usados como control positivo, fueron tratados oralmente con lanzoprazol (20mg/Kg). Un grupo al que se le administró por vía oral una solución al 12% de Tween 80 fué el control negativo. Los grupos restantes fueron tratados con el compuesto en estudio a diferentes concentraciones (25, 50 y 100 mg/Kg, respectivamente).

Los animales se mantuvieron en ayunas por 24 horas con libre acceso de agua previo al experimento. La lesión fue inducida por la administración oral de 0,2 ml de una solución 0,3 M HCl/etanol 60%, una hora después del tratamiento con el compuesto. Los animales fueron sacrificados al cabo de una hora de la administración de la solución de HCl/etanol 60%, sus estómagos fueron inflados con 2 ml de suero fisiológico, removidos y fijados en formalina al 5 % por 30 minutos y, finalmente, abiertos a lo largo de la curvatura mayor. Se midió la longitud (mm) de cada lesión empleando una lupa estereoscópica y una regla milimétrica. El índice de lesión fue expresado como la suma de la longitud de todas las lesiones.

## 4.5 Determinación de toxicidad

### 4.5.1 Toxicidad “in vitro”.

El ensayo de citotoxicidad celular fué uno de los primeros bioensayos *in vitro* para predecir la toxicidad de sustancias en diferentes tejidos (Harbell *et al.*1997).

#### 4.5.1.1 Determinación de la IC<sub>50</sub>

La IC<sub>50</sub> se define como la concentración a la que se inhibe en 50% el crecimiento celular del sistema de prueba. Puede ser calculada tanto gráfica como matemáticamente .

Matemáticamente se define que:

$$\text{Inhibición} = a * (\text{concentración de la muestra}) + b$$

$$\text{Donde } a = \frac{\text{inhibición de la concentración 2} - \text{inhibición de la concentración 1}}{\text{Concentración 2} - \text{concentración 1}}$$

$$b = \text{inhibición de la concentración 1} - a * \text{concentración 1}$$

Siendo:

Concentración 1:

La concentración más alta de la muestra que provoca menos del 50% de actividad con respecto al control.

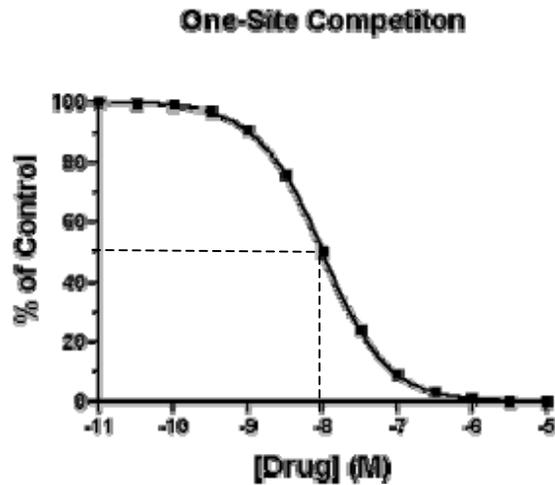
Concentración 2:

La concentración más baja de la muestra que provoca más del 50% de actividad con respecto al control.

De la anterior se define la IC<sub>50</sub> como:

$$IC_{50} = \frac{50 - b}{a}$$

Este valor puede obtenerse o representarse gráficamente considerando el % de inhibición con respecto al control vs. la concentración de la muestra, tal como se representa en el siguiente esquema.



**Figura 3:** Representación del cálculo de la IC<sub>50</sub>

#### 4.5.1.2 Citotoxicidad sobre fibroblastos.

Para realizar el estudio de citotoxicidad del compuesto en estudio se utilizaron fibroblastos de pulmón humano (MR-C5). Este estudio fue realizado usando como base el siguiente protocolo de trabajo.

Se prepara una placa de 96 pocillos con una densidad aproximada de 25-30.000 células/ml incubando por una semana o el tiempo necesario hasta que las células estén completamente confluentes. Una vez transcurrido este tiempo se remueve el medio de cultivo (10% SFB) y se reemplaza por medio de cultivo 2% SFB conteniendo DMS 1% final (medio-DMSO).

Los compuestos son preparados el mismo día del ensayo, disolviéndolos en DMSO (concentración final no mayor al 1%) y completando el volumen necesario con medio 2% SFB. Estos compuestos son filtrados en filtros de 0,22  $\mu\text{m}$  antes de ser agregados a las células en cultivo.

El medio se reemplaza columna por columna, de modo de evitar que las células se deshidraten.

Posteriormente se procede a incubar la placa durante 24 horas para luego ser revelada con el colorante neutral red, el que es preparado el mismo día del ensayo. El neutral red se prepara de modo estéril en medio de cultivo sin SFB y se incuba a 37°C por 24 horas. Al cabo de este tiempo se filtra y se recolecta en un recipiente estéril antes de ser agregado a la placa.

Luego de transcurridas 24 horas de incubación de la placa, se retira el medio de cultivo/compuestos y se reemplaza por 100 µl de la solución de neutral red bajo flujo laminar. Una vez incorporado el neutral red la placa se incuba nuevamente por tres horas a 37°C. Transcurrido este tiempo se descarta el revelador (en esta etapa ya no es necesario trabajar bajo flujo laminar) y los pocillos son lavados con 100 µl de una solución acuosa de 1% de formalina y 1% cloruro de calcio, descartando la solución por inversión.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A		Control	3,9 µM	7,8 µM	15,63 µM	31,25 µM	Control	62,5 µM	125 µM	250 µM	500 µM	
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

**Figura 4:** Esquema del ensayo en placa de ELISA

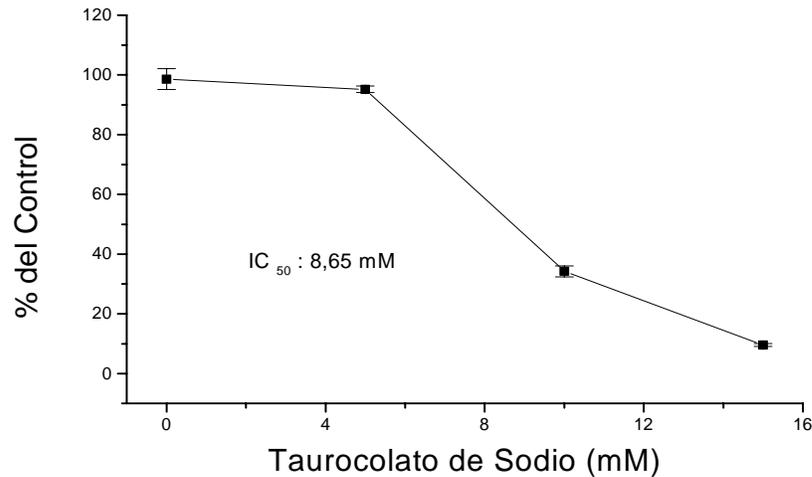
Para retirar el colorante se usa una solución de 50% etanol y 1% ácido acético glacial y se deja a temperatura ambiente por 20 minutos, agitando suavemente. Luego se procede a determinar la absorbancia en el lector de placas a 540 nm. Los resultados se expresan en % de absorbancia respecto del control.

#### **4.5.2 Citotoxicidad sobre células gástricas. Daño producido por taurocolato.**

Cultivos de células AGS de 24 horas post-confluencia, mantenidas en placas de ELISA de 96 pocillos, se incubaron por 60 minutos con el compuesto en estudio (ferruginol) a concentraciones de 0,1; 0,5; 1,0; 4; 8; 12; 16; 20 y 24  $\mu\text{M}$ . Posteriormente se reemplazó el medio de tratamiento por uno sin suero fetal ni antibióticos, conteniendo taurocolato de sodio a una concentración de 10 mM, con el fin de inducir daño celular. El taurocolato de sodio (NaT) fue agregado a todas las celdas de la placa utilizada a excepción del control de viabilidad, incubando la placa por 30 minutos. Transcurrido este tiempo se procede a agregar el neutral red incubando nuevamente la placa por tres horas a 37°C. Finalmente se descarta el revelador y los pocillos son lavados con 100  $\mu\text{l}$  de una solución acuosa de formalina al 1% y 1% cloruro de calcio, descartando la solución por inversión. Luego se procede a determinar las absorbancias en el lector de placas a 540 nm.

Los resultados son expresados como porcentaje de absorbancia respecto al control.

La concentración de taurocolato de sodio utilizada (10 mM) se definió al realizar una curva dosis respuesta tal como se muestra en el siguiente gráfico.



**Gráfico 1:** Daño inducido por taurocolato de sodio en células AGS. Curva dosis-respuesta

#### 4.5.3 Determinación de sulfhidrilos totales reducidos solubles.

En las células gástricas la mayor parte de los sulfhidrilos reducidos solubles se encuentran como glutatión reducido. El contenido celular de esta sustancia (glutatión reducido) es determinante en la capacidad de protección de las células contra agentes oxidantes.

El trabajo correspondiente a la determinación de sulfhidrilos totales solubles reducidos se realizó basado en el siguiente protocolo de trabajo.

Se cultivaron cuatro placas de Petri de 3,5 cm de diámetro con células AGS. Una vez crecidas se enumeran las placas y se le agrega 5 ml de una de las siguientes soluciones, incubando luego cada placa por un tiempo de cuatro horas:

Placa N° 1: Medio solo

Placa N° 2: NAC (N-acetil cisteína) 0,75 mM.

Placa N° 3: Ferruginol 0,1  $\mu$ M.

Placa N° 4: Ferruginol 1,0  $\mu$ M.

Es importante destacar que no se utilizó suero ni antibióticos en el medio de cultivo usado para los tratamientos ni el control.

Luego de la incubación con los respectivos tratamientos, se lavan las monocapas de células 3 veces con 1 ml de 0,002% EDTA en PBS. Posteriormente se agrega a cada una de las placas 1,4 ml de 0,2% Tritón X-100 y 2,5% ácido sulfosalicílico en buffer 0,02% EDTA-PBS. Las células son desprendidas mediante un “cell scraper” y sonicadas por 1 minuto en un vaso plástico mantenido en hielo. Las condiciones del sonicador fueron: output control: 2, duty cycle: 90. Esto hace referencia a la frecuencia necesaria para la destrucción de las células sin que se dañe la sustancia de interés que en este caso corresponde al glutatión.

Posteriormente, se centrifugan las células en centrífuga refrigerada a 3.000 rpm por 10 minutos.

Después de la centrifugación se toma cuidadosamente 1 ml del sobrenadante el cual se agrega a un tubo de vidrio que contiene 2 ml de buffer 0,3 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  determinando su absorbancia a 412 nm, 30 segundos después de haber agregado 0,25 ml de una solución de DTNB [5-5'-ditio-bis(2- ácido nitrobenzoico)] (1 mg/2,5 ml en 1% citrato de sodio). Esta solución debe ser preparada en el momento y mantenida en frío.

En forma paralela a lo anteriormente descrito se realiza una curva de calibración con cantidades conocidas de glutatión reducido, el que debe ser preparado en el momento disolviéndolo en buffer Tritón X-100-ácido sulfosalicílico al igual que las muestras. Las determinaciones se realizan a 412 nm y los resultados se expresan como nanomoles de sulfhidrilos reducidos/ $10^6$  células.

#### **4.6 Análisis estadístico**

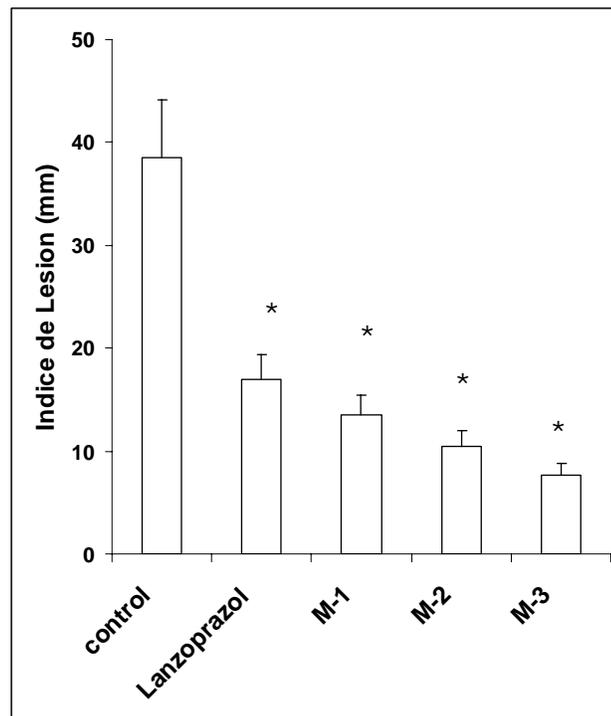
La evaluación estadística de los resultados fué realizada empleando análisis de varianza de una vía (ANOVA), con un nivel crítico igual o menor a 0,05 para rechazar la hipótesis nula. Ante la presencia de significancia se procedió a realizar un análisis *post-hoc* de la varianza, utilizando el test de Tukey – Kramer. Todos los análisis estadísticos fueron realizados por el programa computacional Statistica for Windows, versión 4.3, producido por StatSoft, Inc.1993.

## 5- Resultados y Discusión

### 5.1 Actividad del diterpeno ferruginol sobre la úlcera gástrica

La actividad antiulcerogénica del diterpeno ferruginol, aislado de un extracto de lleuque, fue estudiada empleando el método de las lesiones gástricas inducidas por una solución de HCl/etanol en ratones. Este método fue descrito por Yesilada *et al.* (1997).

El ferruginol se administró por vía oral a las dosis de 25, 50 y 100 mg/kg. El compuesto en estudio fue efectivo, inhibiendo en forma significativa la formación de úlceras en las tres concentraciones ensayadas (Gráfico2). En nuestras condiciones de estudio, la droga de referencia lansoprazol inhibió la formación de lesiones en un 56 % a la dosis de 20 mg/kg.



**Gráfico 2:** Efecto del lansoprazol (20 mg/kg) y ferruginol (25, 50 y 100 mg/kg) en la formación de úlceras gástricas inducidas por HCl/etanol en ratones. Los resultados están expresados como la media  $\pm$  sd (n = 7). Diferencia significativa con respecto al control, ANOVA seguido por test de Tukey – Kramer. \* P < 0,0001.

El efecto observado en el modelo de las lesiones gástricas inducidas por HCl/ etanol en ratones indica que el ferruginol previene la formación de lesiones y puede favorecer o promover los mecanismos protectores de la mucosa gástrica.

Pese a que gráficamente se observa lo que parece ser un efecto dependiente de la dosis, al realizar el análisis estadístico se obtiene que el efecto producido por el ferruginol a las tres concentraciones probadas fue similar, no encontrándose diferencias significativas entre los tres grupos. Por esto, se deduce que el efecto que puede conseguirse al usar una dosis que fluctúe entre 25 y 100 mg/kg es el mismo, lo que es de gran importancia para las industrias farmacéuticas o laboratorios que pretendan diseñar un nuevo fármaco a partir de este compuesto. Los datos obtenidos en este trabajo fueron analizados estadísticamente. En primer lugar se realizó un análisis de varianza, ANOVA que reflejó la existencia de diferencias significativas entre los diferentes grupos y el control, arrojando un valor  $P < 0,0001$ . Posteriormente se realizó el test de Tukey – Kramer, que se resume en la siguiente tabla

<b>Grupo</b>	<b>Índice promedio de lesiones (mm)</b>	<b>Reducción de lesiones %</b>	<b>Diferencias significativas con los grupos</b>	<b>Sin diferencia significativas con los grupos</b>
<b>1</b> Control	38,57		2, M1, M2, M3	-
<b>2</b> Lanzoprazol 20 mg/kg	17	55,92	M3,1	M <sub>1</sub> , M <sub>2</sub>
Ferruginol (mg/kg)				
<b>M<sub>1</sub></b> (25)	13,5	64,99	1	2, M <sub>2</sub> , M <sub>3</sub>
<b>M<sub>2</sub></b> (50)	10,5	72,28	1	2, M <sub>1</sub> , M <sub>3</sub>
<b>M<sub>3</sub></b> (100)	7,71	80,01	2,1	M <sub>2</sub> , M <sub>3</sub>

**Tabla 2:** Resumen del análisis estadístico. Test de Tukey – Kramer; n =7

## 5.2 Citotoxicidad sobre fibroblastos.

La citotoxicidad del ferruginol se determinó sobre fibroblastos, analizando la relación concentración del compuesto/viabilidad celular. Las absorbancias entregadas por el lector de placas, son presentadas a continuación, así como el porcentaje de inhibición del crecimiento celular con respecto al control.

<b>Control</b>	<b>3, 9 <math>\mu</math>M</b>	<b>7, 8 <math>\mu</math>M</b>	<b>15, 6 <math>\mu</math>M</b>	<b>31, 25 <math>\mu</math>M</b>	<b>62, 0 <math>\mu</math>M</b>	<b>125, 0 <math>\mu</math>M</b>	<b>250, 0 <math>\mu</math>M</b>	<b>500, 0 <math>\mu</math>M</b>
	0,131	0,140	0,098	0,013	0,015	0,015	0,018	0,024
	0,130	0,135	0,094	0,013	0,014	0,014	0,015	0,021
	0,134	0,136	0,097	0,013	0,015	0,015	0,017	0,025
	0,131	0,141	0,098	0,013	0,013	0,014	0,016	0,023
	0,140	0,135	0,109	0,015	0,015	0,015	0,017	0,022
0,1315	0,134	0,145	0,103	0,013	0,014	0,015	0,017	0,021
<b>% de inhibición con respecto al control: Valor / promedio control x 100</b>								
	99,62	106,46	74,52	9,89	11,41	11,41	13,69	18,25
	98,86	102,66	71,48	9,89	10,65	10,65	11,41	15,97
	101,90	103,42	73,76	9,89	11,41	11,41	12,93	19,01
	99,62	107,22	74,52	9,89	9,89	10,65	12,17	17,49
	106,46	102,66	82,89	11,41	11,41	11,41	12,93	16,73
	101,90	110,27	78,33	9,89	10,65	11,41	12,93	15,97
<b>Promedio</b>	<b>101,39</b>	<b>105,45</b>	<b>75,92</b>	<b>10,14</b>	<b>10,90</b>	<b>11,16</b>	<b>12,62</b>	<b>17,24</b>
<b>sd</b>	<b>16,90</b>	<b>17,57</b>	<b>12,65</b>	<b>1,69</b>	<b>1,82</b>	<b>1,86</b>	<b>2,11</b>	<b>2,87</b>

**Tabla 3:** Resumen de los valores de absorbancia entregados por el lector de placas y % de inhibición con respecto al control.

### Cálculo de la IC<sub>50</sub>.

De acuerdo a lo explicado anteriormente, para el cálculo de la IC<sub>50</sub>, se debe considerar la concentración más alta de la muestra que provoca menos del 50% de actividad con respecto al control y la concentración más baja de la muestra que provoca más del 50% de actividad con respecto al control. En base a esto se seleccionan los valores obtenidos y se realiza el cálculo matemático (el que se muestra a continuación), el cual puede ser respaldado gráficamente.

$$IC_{50} = \frac{50 - b}{a}$$

$$a = \frac{\text{Inhibición (concentración 2)} - \text{inhibición (concentración 1)}}{\text{concentración 2} - \text{concentración 1}}$$

$$b = \text{Inhibición (concentración 1)} - a * \text{concentración 1}$$

Concentración 1: 15,6  $\mu\text{M}$  75,92%

Concentración 2: 31,25  $\mu\text{M}$  10,14%

$$a = \frac{10,14 - 75,92}{31,25 - 15,6} = -4,203$$

$$b = 75,92 - (-4,203) * 15,6 = 141,487$$

$$IC_{50} = \frac{50 - 141,487}{-4,203}$$

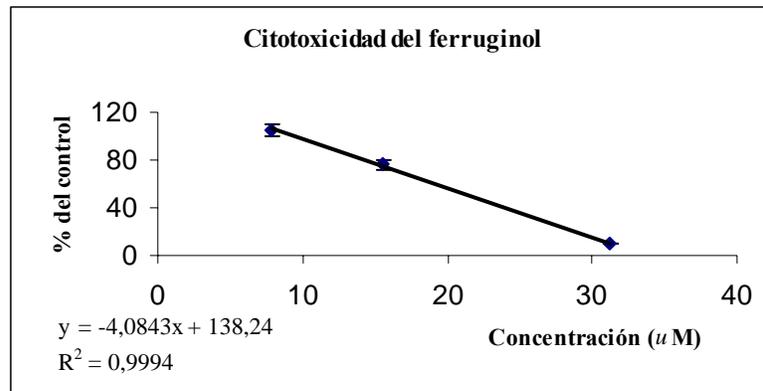
$$IC_{50} = 21,767 \mu\text{M}$$

Analizando los valores obtenidos en la tabla anterior se puede deducir que la  $IC_{50}$  buscada se encuentra entre 15,6 y 31,25  $\mu\text{M}$  (lo que coincide con los cálculos realizados).

De acuerdo a lo obtenido se realiza un gráfico % de inhibición respecto al control v/s concentración de ferruginol, considerando los siguientes puntos de la tabla:

Concentración $\mu\text{M}$	7,8	15,6	31,25
% Inhibición con respecto al control	105,45	75,92	10,14
Sd	12,57	12,65	1,69

Al interpolar el gráfico en el 50% se obtiene una  $IC_{50}$  (Gráfico 3) con un valor entre 21 y 22  $\mu\text{M}$ , similar al valor obtenido matemáticamente.



**Gráfico 3:** Cálculo de la IC<sub>50</sub> del diterpeno ferruginol.

De acuerdo a lo obtenido, se puede concluir que el ferruginol a una concentración aproximada de 22  $\mu$ M disminuye en un 50% la viabilidad celular.

### 5.3 Citotoxicidad sobre células tumorales gástricas (AGS).

Se determinó la citotoxicidad del ferruginol en células tumorales gástricas (AGS). En la Tabla 4, se muestran las absorbancias entregadas por el lector de placas a 540 nm. La columna ennegrecida (G) corresponde al control de viabilidad empleado. Cabe señalar que para los análisis no se consideraron las columnas 1 y 12, y las filas A y H. Esto se debe a que las lecturas aquí obtenidas no son completamente confiables, lo que puede ocasionar interferencias en los resultados obtenidos.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,041	0,035	0,035	0,039	0,040	0,036	0,036	0,036	0,035	0,034	0,036	0,040
B	0,035	0,204	0,204	0,216	0,205	0,200	0,155	0,136	0,104	0,075	0,106	0,033
C	0,036	0,206	0,207	0,208	0,204	0,204	0,167	0,139	0,120	0,107	0,092	0,035
D	0,036	0,203	0,220	0,210	0,206	0,206	0,170	0,157	0,138	0,108	0,100	0,035
E	0,035	0,198	0,209	0,210	0,216	0,206	0,177	0,152	0,127	0,096	0,095	0,036
F	0,037	0,198	0,215	0,212	0,208	0,202	0,204	0,151	0,117	0,084	0,087	0,038
G	<b>0,034</b>	<b>0,270</b>	<b>0,280</b>	<b>0,276</b>	<b>0,293</b>	<b>0,291</b>	<b>0,288</b>	<b>0,290</b>	<b>0,288</b>	<b>0,284</b>	<b>0,293</b>	<b>0,033</b>
H	0,035	0,038	0,038	0,036	0,037	0,036	0,038	0,037	0,042	0,034	0,034	0,033

**Tabla 4:** Valores de absorbancia entregados por el lector de placas a 540 nm. La fila ennegrecida representa el control de viabilidad.

Columnas:

2: control+ NaT 10 mM  
 3: Ferruginol 0,1  $\mu$ M  
 4: Ferruginol 0,5  $\mu$ M  
 5: Ferruginol 1  $\mu$ M  
 6: Ferruginol 4  $\mu$ M

7: Ferruginol 8  $\mu$ M  
 8: Ferruginol 12  $\mu$ M  
 9: Ferruginol 16  $\mu$ M  
 10: Ferruginol 20  $\mu$ M  
 11: Ferruginol 24  $\mu$ M

FilaG: representa el control de viabilidad, las celdas de esta fila solo llevan control.

A cada valor de absorbancia obtenido se le resta 0,035 que corresponde a la absorbancia del blanco, obteniéndose los siguientes valores:

	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
B	0,169	0,169	0,181	0,205	0,200	0,155	0,136	0,104	0,075	0,106
C	0,206	0,207	0,208	0,204	0,204	0,167	0,139	0,120	0,107	0,092
D	0,203	0,220	0,210	0,206	0,206	0,170	0,157	0,138	0,108	0,100
E	0,198	0,209	0,210	0,216	0,206	0,177	0,152	0,127	0,096	0,095
F	0,198	0,215	0,212	0,208	0,202	0,204	0,151	0,117	0,084	0,087
G	<b>0,270</b>	<b>0,280</b>	<b>0,276</b>	<b>0,293</b>	<b>0,291</b>	<b>0,288</b>	<b>0,290</b>	<b>0,288</b>	<b>0,284</b>	<b>0,293</b>

**Tabla 5.** Citotoxicidad del ferruginol sobre células AGS. Valores de absorbancia corregidos

El promedio obtenido del control de viabilidad fue de  $0,285 \pm 0,03$ .

Una vez corregidas las lecturas y calculado el promedio del control de viabilidad, se calcula el porcentaje de protección respecto al control de viabilidad, obteniéndose los siguientes resultados, mostrados en la Tabla 6:

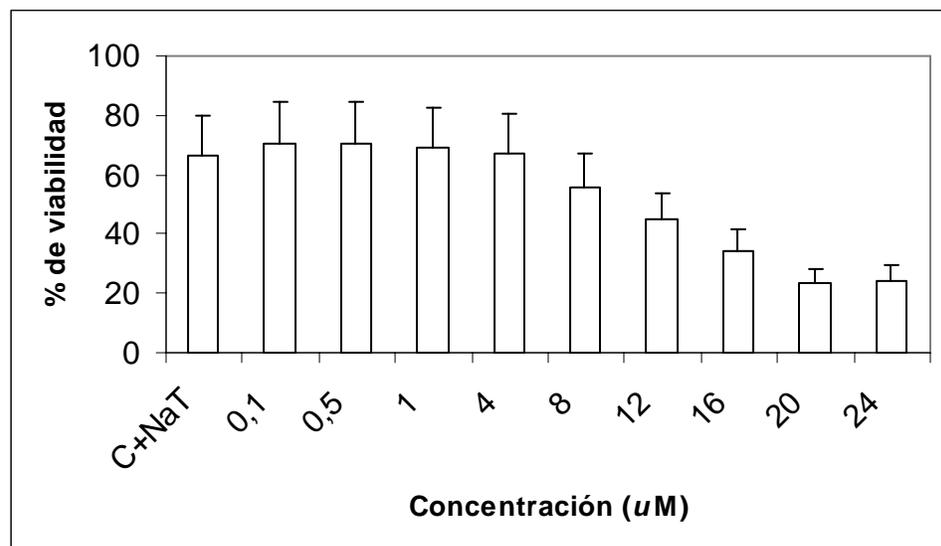
Valor/ promedio x 100

	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
B	67,52	67,52	72,31	67,92	65,92	47,94	40,35	27,57	15,98	28,37
C	68,32	68,72	69,12	67,52	67,52	52,74	41,55	33,96	28,77	22,77
D	67,12	73,91	69,92	68,32	68,32	53,94	48,74	41,15	29,17	25,97
E	65,12	69,52	69,92	72,31	68,32	56,73	46,74	36,76	24,37	23,97
F	65,12	71,91	70,72	69,12	66,72	67,52	46,34	32,76	19,58	20,78
<b>Promedio</b>	<b>66,64</b>	<b>70,32</b>	<b>70,40</b>	<b>69,04</b>	<b>67,36</b>	<b>55,77</b>	<b>44,74</b>	<b>34,44</b>	<b>23,57</b>	<b>24,37</b>
<i>sd</i>	<b>13,13</b>	<b>14,06</b>	<b>14,08</b>	<b>13,81</b>	<b>13,47</b>	<b>11,15</b>	<b>8,94</b>	<b>6,89</b>	<b>4,71</b>	<b>4,87</b>

**Tabla 6:** Citotoxicidad del ferruginol sobre células AGS. Porcentaje de protección con respecto al control de viabilidad.

Los resultados son graficados (Gráfico 4), observándose que las muestras tratadas con concentraciones de 0,1; 0,5; 1,0 y 4  $\mu\text{M}$  de ferruginol presentan un grado de protección mayor que el control al daño inducido por taurocolato de sodio sobre las células gástricas. También se observa que a las concentraciones más altas empleadas en el estudio, el ferruginol resultó ser más dañino sobre las células gástricas que el taurocolato.

Los resultados fueron analizados estadísticamente, encontrándose mediante un análisis de varianza ANOVA la existencia de diferencias significativas entre las diferentes muestras y el control, arrojando un valor  $P < 0,0001$ . Luego se realizó el test de Tukey – Kramer. Este test demostró que entre los grupos tratados con concentraciones de ferruginol de 0,1; 0,5; 1,0 y 4  $\mu\text{M}$  no existen diferencias, lo que indica que el uso de ferruginol a concentraciones que fluctúen entre 0,1 y 4  $\mu\text{M}$  protege de la misma forma a las células contra el daño inducido por taurocolato.



**Gráfico 4:** Porcentaje de protección del ferruginol contra el daño inducido por NaT, respecto al control de viabilidad. Los resultados están expresados como la media  $\pm$  sd ( $n = 5$ ). Diferencia significativa con respecto al control, ANOVA seguido por test de Tukey – Kramer.  $P < 0,0001$ .

#### 5.4 Contenido de sulfhídridos totales reducidos.

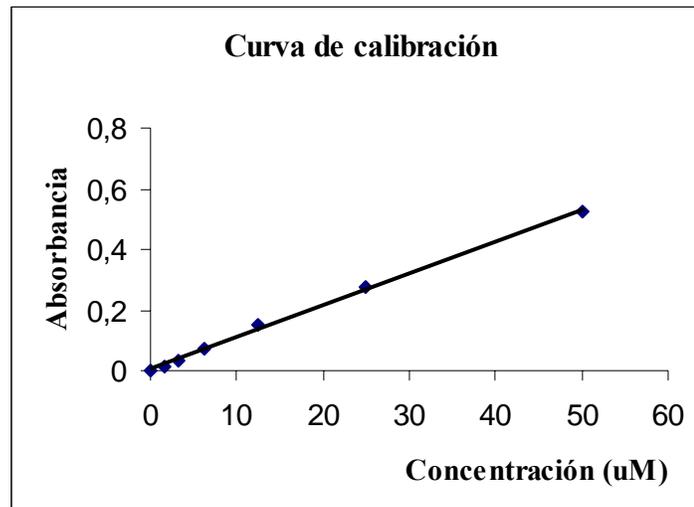
Se determinó la cantidad de sulfhídridos totales reducidos en células gástricas AGS. Para esto se realizó una curva de calibración con cantidades conocidas de glutatión de la que se interpolaron las absorbancias obtenidas del control y el ferruginol a 0,1 y 1  $\mu\text{M}$ , de modo de obtener las concentraciones de glutatión necesarias para la posterior determinación de la cantidad de sulfhidrilos totales reducidos.

En la tabla 7 se resumen las absorbancias obtenidas a las concentraciones conocidas de glutatión (1,56; 3,12; 6,25; 12,50; 25,0 y 50,0  $\mu\text{M}$ ) empleadas para la realización de la curva de calibración.

Concentración( $\mu\text{M}$ )	Abs <sub>1</sub>	Abs <sub>2</sub>	Abs promedio	Sd
50	0,517	0,526	0,522	0,260
25	0,276	0,280	0,278	0,139
12,5	0,148	0,154	0,151	0,076
6,25	0,074	0,075	0,075	0,037
3,12	0,036	0,034	0,035	0,018
1,56	0,016	0,016	0,016	0,008

**Tabla 7:** Absorbancias obtenidas a concentraciones conocidas de glutatión reducido.

Posteriormente estos valores son representados gráficamente obteniéndose la siguiente curva de calibración representada por el gráfico 5.



**Gráfico 5:** Curva de calibración.

Una vez que se tiene el gráfico representativo de la curva de calibración se interpolan las absorbancias obtenidas por el control y el ferruginol a las concentraciones de 0,1 y 1  $\mu\text{M}$ .

Ej: Si la lectura fue de 0,149 (ferruginol 0,1  $\mu\text{M}$ ), corresponde a 13,58  $\mu\text{M}$  en el gráfico (5)

$$13,58 \mu\text{M} \longrightarrow \frac{13,58 \mu\text{moles}}{1000\text{ml}} = \frac{X \mu\text{moles}}{1 \text{ ml}}$$

13,58 $\mu\text{moles}$ $\rightarrow$ 1 ml
X $\mu\text{moles}$ $\rightarrow$ 1,4 ml

X= 19,012 nmoles (en la placa de Petri)

(1,4 ml = volumen en el que son resuspendidas las células)

$$\frac{13,58 \text{ nmoles}}{2.800.000 \text{ cels.}} = \frac{x \text{ nmoles}}{1.000.000 \text{ cels.}}$$

$$X = 6,79 \text{ nmoles} / 10^6 \text{ células.}$$

2.800.000 células corresponden al número de células promedio que había en la placa de Petri.

Esta cantidad fue determinada en forma previa al experimento.

Los valores obtenidos fueron los siguientes:

Control: 6,875 nmoles/  $10^6$  células.

Ferruginol 0,1  $\mu$ M : 6,79 nmoles/ $10^6$  células.

Ferruginol 1  $\mu$ M: 6,5 nmoles/ $10^6$  células.

Como puede observarse, los valores obtenidos (cantidad de sulfhídricos totales reducidos) a las dos concentraciones ensayadas de ferruginol fueron mas bajos que el control lo que demuestra que el diterpeno aromático ferruginol a las concentraciones probadas no aumenta la concentración de sulfhidrilos totales reducidos, por lo que no produciría una protección celular contra agentes oxidantes.

## 5.5 Resumen de resultados.

Los resultados pueden resumirse como sigue:

- El ferruginol fue activo como gastroprotector a las concentraciones de 25, 50 y 100 mg/kg, en el modelo de lesiones gástricas inducidas por HCl/etanol en ratones, no detectándose diferencias significativas entre los efectos a las tres concentraciones.
- El tratamiento con ferruginol (25-100 mg/kg) redujo el índice de lesiones gástricas en un porcentaje que fluctúa entre un 65 y 80 %, mientras el lansoprazol a 20 mg/kg tuvo un efecto gastroprotector de 56 % comparado con los animales no tratados. Esto demuestra que el ferruginol fue efectivo al inhibir la aparición de lesiones gástricas en un porcentaje superior, pero estadísticamente similar al compuesto de referencia, lanzoprazol, un conocido inhibidor de la bomba de protones  $H^+ - K^+ - ATPasa$ . El efecto gastroprotector observado en el modelo HCl/etanol indica que el diterpeno aromático ferruginol puede favorecer o promover los mecanismos protectores de la mucosa gástrica.
- La citotoxicidad ( $IC_{50}$ ) del diterpeno ferruginol sobre fibroblastos fue de 22  $\mu M$ .
- La citotoxicidad ( $IC_{50}$ ) del diterpeno ferruginol sobre células AGS fue de 8,65  $\mu M$ .
- Si se comparan los resultados de las  $IC_{50}$ , se observa que el ferruginol sería más dañino para las células AGS que para los fibroblastos.
- Entre las concentraciones de 0,1 a 4  $\mu M$ , el ferruginol protege a las células AGS contra el daño inducido por taurocolato de sodio, pero a concentraciones mayores, resulto ser más tóxico que el taurocolato produciendo un mayor daño celular que este compuesto.

- A las concentraciones ensayadas ( 0,1 y 1  $\mu\text{M}$ ) el diterpeno aromático ferruginol no aumento la concentración de sulfhidrilos totales reducidos, por lo que no tendría un rol protector contra agentes oxidantes.
- Entre las concentraciones de 0,1 a 4  $\mu\text{M}$ , el ferruginol protege a las células AGS contra el daño inducido por taurocolato de sodio pero a concentraciones mayores produce más daño celular que el taurocolato de sodio.

Basado en los resultados obtenidos en este trabajo, el paso siguiente sería la realización de diversos estudios “in vivo” e “in vitro” tanto en celulas como en animales, orientados a:

- Modificar la estructura química del ferruginol mediante semisíntesis y/o biotransformaciones.
- Determinar la relación estructura actividad del producto natural y de sus derivados de semisíntesis/ biotransformaciones.
- Determinar el o los mecanismos de acción de los diterpenos que presentan este esqueleto químico.
- Definir los niveles de seguridad del compuesto.
- En base a lo anterior, proponer modificaciones sintéticas selectivas para aumentar el efecto gastroprotector disminuyendo la toxicidad del compuesto.

## 6- Referencias bibliográficas

- Allen A, Flemstrom G, Garner A, Kivilaaso E. (1993) Gastroduodenal mucosal protection. *Physiol Res.*, 73, 823-357.
- Attaguile G, Caruso A, Pennisi G, Savoca F. (1995) Gastroprotective effect of aqueous extract of *Cistus incanus* L. in rats. *Pharmacol Res.*, 31, 29-32.
- Becerra, J., Flores, C., Mena, J., Aqueveque, P., Alarcón, J., Bittner, M., Hernández, V. Hoeneisen, M., Ruiz, E., Silva, M. (2002). Antifungal and antibacterial activity of diterpenes isolated from wood extractables of Chilean Podocarpaceae. *Bol. Soc. Chil. Quim.*, 47, 151-157.
- Carvajal D., Molina V., Noa M., Valdes S., Arruzazabala M.L., Aguilar C., mas R. (2000) Effect of D-002 on gastric mucus composition in etanol-induced ulcer. *Pharmacol Res.*, 42, 329- 332.
- Chelimsky G., Czinn SJ. (2000) *Helicobacter pylori* infection in children : update. *Current Opinion in pediatry.* 12, 460-462.
- Clarkson, C. , Musonda, C., Chibale, K., Campbell, W.E., Smith, P. (2003) Synthesis of Totarol amino alcohol derivatives and their antiplasmodial activity and cytotoxicity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry.* 11, 4417-4422
- Duan, H., Takaishi, Y., Momota, H., Ohmoto, Y., Taki, T., Jia, Y., Li, D. (1999) Immunosuppressive diterpenoids from *Tripterygium wilfordii*. *J. Nat. Prod.*, 62, 1522-1525.

Ernst P.B., Gold B.D. (2000) The disease spectrum of *Helicobacter pylori*: the immunopathogenesis of gastroduodenal ulcer and gastric cancer. *Ann. Rev. of Microbiology*. 54, 615-640.

Flores S., Opazo H., Valderrama D., Aguilera R., Marchese A., Valderrama S. (2000) Triple therapy of short-term with azithromycin, amoxycilin and omeprazole for the eradication of *Helicobacter pylori*. *Review of Medical Chile*. 128, 509-512.

Flores, C., Alarcón, J., Becerra, J., Bittner, M., Hoeneisen, M., Silva M. (2001). Extractable compounds of native trees chemical and biological study I: bark of *Prumnopytis andina* (Podocarpaceae) and *Austrocedrus chilensis* (Cupressaceae). *Bol. Soc. Chil. Quim.*, 46, 61-64.

Foye, W.O. (1995) Medicinals of Plant Origin: Historical Aspects. *In Medicinal Chemistry*. 4<sup>th</sup> Ed. Foye, W.O., Lemke, T.O., Williams, D.A. *Williams & Wilkins*. USA pp.7-11.

Gar G.P., Nigam S.K., Ogle C.W. (1993) The gastric antiulcer effects of the leaves of neem tree. *Planta Med.*, 59, 215-217.

Gaspar, C., Pedro, M., Simoes, M.F.A., Nascimento, M.S.J., Pinto, M.M.M., Rodríguez, B. (2002). Effect of abietane diterpenes from *Plectranthus grandidentatus* on the growth of human cancer cell lines. *Planta Med.*, 68, 839-840.

Gonzales E., Iglesias I., Carretero E., Villar A. (2000) Gastric cytoprotection of Bolivian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*. 70, 329-333.

Harbell, J.W., Koontz., S.W., Lewis, R.W., Lovell, D., Acosta, D. (1997) Cell cytotoxicity assays. *Food and Chemical Toxicology*. 35, 79-126.

Harris, A.G., Hazell, S.L., Netting, A.G. (2000) Use of digoxigenin-labelled ampicillin in the identification of penicillin-binding proteins in *Helicobacter pylori*. *J. Antimicrobial Chemotherapy*. 45, 591-598.

Hernández, S., Poquet, J., Borrego, M., Gangoso, A., Arias, L. (1996) Tratamiento de la úlcera péptica por *Helicobacter pylori*. *Farm. Hosp.*, 20 , 17-22.

Hersey S.J., Sachs G. (1995) Gastric acid secretion. *Physiol Res.*, 75, 155-89.

Hiruma-Lima, C.A., Gracioso, J.S., Rodríguez, J.A., Haun, M., Nunes, D.S., Souza Brito, A.R.M. (2000) Gastroprotective effect of essential oil from *Croton cajucara* Benth (Euphorbiaceae). *J. Pharmacol.*, 69, 229-234.

Hiruma-Lima, C.A., Spadari-Bratfisch, R.C., Gras-Kassisse, D.M., Souza Brito, R.M. (1999) Antiulcerogenic mechanisms of dehydrocrotonin, a diterpene lactone obtained from *Croton cajucara*. *Planta Med.*, 65, 325-330.

Hiruma-Lima, C.A., Toma, W., Souza-Gracioso, G., Albino de Almeida, A.B., Batista, L.M., Magri, L., Bensuaski de Paula, A.C., Soares, F.R., Nunes D.S., Souza Brito, A.R.M. (2002) Natural trans-Crotonin: The antiulcerogenic effect of another diterpene isolated from the bark of *Croton cajucara* Benth. *Biol. Pharm. Bull.*, 25, 452-456.

Ikezawa K., Kashimura H., Mahmudul H., Nakahara A., Yanaka A., Matsuzaki Y., Mutoh H., Tanaka N. (1998) Miconazole gel increases the cure rate of *Helicobacter pylori* infection when added to lansoprazole and amoxicillin in a randomized trial. *Helicobacter*. 3, 120-124.

Iwamoto, M., Minami, T., Tokuda, H., Ohtsu, H., Tanaka, R. (2003) Potential antitumor promoting diterpenoids from the stem bark of *Thuja standishii*. *Planta Med.* 69, 69-72.

Johnson, L.R. Gastric secretion. (1997). *Gastrointestinal physiology*. Ed. Leonard R. Johnson. Mosby, St. Louis. 69-88.

Konturek P.C., Brzozowski T., Konturek S.J., Stachura J., Karczewska E., Pajdo R., Ghiara P., Hahn E.G. (1999) Mouse model of *Helicobacter pylori* infection: studies of gastric function ulcer healing. *Aliment Pharmacology Therapy*. 13, 333-346.

Lewis, D.A., Hanson, P.J. (1991) Anti-Ulcer drugs of plant origin. In: *Progress in Medicinal Chemistry*. Ed. Ellis G.P., West, G.B. (Editors) Elsevier. 28, 201-231.

Makino M, Koga T, Ito K, Kawada H, Tabata K. (1998) Delayed healing of chronic gastric ulcer after *Helicobacter pylori* infection in mice. *Journal of Pharmacology*. 50: 943-8.

Martcorena, C., Rodríguez, R. (1995) *Flora de Chile. Pteridophyta-Gymnospermae Vol. I.* Universidad de Concepción. pp. 316-323.

Morimoto Y., Shimohara, K., Oshima S., Sukamoto T. (1991) Effects of the new antiulcer agent KB-5492 on experimental gastric mucosal lesions and gastric mucosal defensive factors, as compared to those teprenone and cimetidine. *Jpn. J. Pharmacol.*, 57, 495-505.

- NIH. (1994) consensus development panel *Helicobacter pylori* in peptic ulcer disease. *JAMA*. 272, 65-69.
- Ono, M., Yamamoto, M., Masuoka, C., Ito, Y., Yamashita, M., Nohara, T. (1999) Diterpenes from the fruits of *Vitex rotundifolia*. *J. Nat. Prod.*, 62, 1532-1537.
- San Feliciano, A., Gordaliza, M., Salinero, M. A., Del Corral, J. M. M. (1993) Abietane acids: Sources, biological activities, and therapeutic uses. *Planta Med.*, 59, 485-490.
- Silva Melo, P., Duran, N., Hiruma-Lima, C.A., Souza Brito, A.R.M., Haun, M. (2003) Comparison of the gastroprotective effect of a diterpene lactone isolated from *Croton cajucara* with its synthetic derivatives. *J. Ethnopharmacol.*, 87, 169-174.
- Souza- Brito A.R., Rodriguez J.,Hiruma-Lima C, Haun M, Nunes D. (1998) Antiulcerogenic activity of trans-dehydrocrotonin from *Croton cajucara*. *Planta Med.*, 64, 126-9.
- Suresh, M.R., Fanta, M.B., Kriangkum, J., Jiang, Q., Taylor, D.E. (2000) Colonization and immune responses in mice to *Helicobacter pylori* expressing different Lewis antigens. *J. Pharm. Pharmaceut. Sci.*, 3, 259-266.
- Ulubelen, A., Birman, H., Oksuz, S., Topcu, G., Kolak, U., Barla, A., Voelter, W. (2002) Cardioactive diterpenes from the roots of *Salvia eriophora*. *Planta Med.*, 68, 818-821.
- Ulubelen, A., Oksuz, S., Kolak, U., Birman, H., Voelter, W. (2000) Cardioactive terpenoids and a new rearranged diterpene from *Salvia syriaca*. *Planta Med.*, 66, 627-629.
- Ulubelen, A., Oksuz S., Topcu, G., Goren, A.C., Voelter, W. (2001) Antibacterial diterpenes from the roots of *Salvia blepharochlaena*. *J. Nat. Prod.*, 64, 549-551.

Vela S.M., Souccar C., Lima- Landman M.T., Lapa A.J. (1997) Inhibition of gastric acid secretion by the aqueous extract and purified extracts of *Stachytarpheta cayenensis*.

*Planta Med.*, 63, 36-9.

Vinette, K.M., Gibney, K.M., Proujansky, R., Fawcett, P.T. (2002) Growth of *Helicobacter pylori* in a long spiral form does not alter expression of immunodominant proteins. *BMC Microbiology* 2(24). 1471-1479.

Vu, C., Ng, Y. (2000) Prevalence of *Helicobacter pylori* in peptic ulcer disease in a Singapore hospital. *Singapore Med. J.*, 41, 478-481.

Yesilada, E., Gurbuz, I., Ergun, E. (1997) Effects of *Cistus laurifolius* L. flowers on gastric and duodenal lesion. *J. Ethnopharmacol.*, 55, 201-211.