



**ACTIVIDAD GASTROPROTECTORA DE
EXTRACTOS DE *CENTAUREA SOLSTITIALIS***

ESTUDIOS FITOQUÍMICOS Y FARMACOLÓGICOS

M.V. RICARDO TOSO

DIRECTOR: DR. MARIO SKLIAR

TESIS DOCTORAL EN BIOLOGÍA

**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA, BIOQUÍMICA Y
FARMACIA**

BAHÍA BLANCA

ARGENTINA

-2001-

Esta tesis es presentada como parte de los requisitos para optar al grado Académico de Doctor en Biología de la Universidad Nacional del Sur y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta Universidad u otras. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el laboratorio de Farmacognosia dependiente del Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia de la Universidad Nacional del Sur durante el período comprendido entre el 20 de noviembre de 1997 y el 27 de noviembre de 2001, bajo la dirección del Doctor Mario Ignacio Skliar.

Expreso mi agradecimiento al Dr. Mario Ignacio Skliar por todo el apoyo prestado para desarrollar esta tesis, al Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia de la Universidad Nacional del Sur, a la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Pampa y a todas aquellas personas que permitieron concretar este trabajo.

ÍNDICE

RESUMEN.....	1
SUMMARY.....	5
INTRODUCCIÓN	
RESEÑA.....	8
1.0. LA PLANTA.....	11
2.0. CARACTERÍSTICAS BOTÁNICAS Y FITOQUÍMICAS <i>CENTAUREA SOLSTITIALIS</i>	11
2.1. CARACTERÍSTICAS BOTÁNICAS DE LA PLANTA.....	11
2.2. TOXICIDAD DE LA PLANTA.....	15
2.3. CARACTERÍSTICAS FITOQUÍMICAS Y FARMACOLÓGICAS DE <i>CENTAUREA SOLSTITIALIS</i>	16
3.0. ANATOMÍA, HISTOLOGÍA Y FISIOLOGÍA DEL ESTÓMAGO.....	17
3.1. FUNCIONES DEL ESTÓMAGO.....	17
3.2. ANATOMÍA Y HISTOLOGÍA DEL ESTÓMAGO.....	18
3.2.1. GENERALIDADES.....	18
3.2.2. EPITELIO SUPERFICIAL.....	21
3.2.3. GLÁNDULAS GÁSTRICAS.....	21
3.2.4. CAPA MUSCULAR DE LA MUCOSA, LÁMINA PROPIA, LÁMINA MUSCULAR, TÚNICA SUBMUCOSA, MUSCULAR Y SEROSA.....	22
3.3. HISTOFISIOLOGÍA DEL ESTÓMAGO.....	23
3.3.1. MOTILIDAD GÁSTRICA.....	23
3.3.2. SECRECIÓN DE ÁCIDO CLORHÍDRICO.....	25
3.3.3. SECRECIÓN DE MUCUS Y BICARBONATO.....	28
3.3.4. BARRERA MUCOSA GÁSTRICA.....	29
3.3.5. ENZIMAS DEL JUGO GÁSTRICO.....	33
3.3.6. CONTROL E INTEGRACIÓN DE LA FUNCIÓN GASTROINTESTINAL.....	33
4.0. FISIOPATOLOGÍA DE LA ÚLCERA GÁSTRICA PROVOCADA POR ESTRÉS.....	36
5.0. TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO DE LA ÚLCERA GÁSTRICA.....	41
5.1. DROGAS ANTAGONISTAS DEL RECEPTOR DE LA H ₂	43
5.2. INHIBIDORES DE LA H ⁺ ,K ⁺ - ATPASA.....	43
5.3. ANTIÁCIDOS.....	44
5.4. DROGAS CON ACCIÓN CITOPROTECTORA.....	45
5.4.1. RELACIÓN ENTRE LA ACTIVIDAD DE LOS ÁCIDOS GRASOS ESENCIALES Y LA PRODUCCIÓN DE PGS.....	50
5.4.2. INHIBICIÓN DE SÍNTESIS DE EICOSANOIDES.....	51
5.4.3. MECANISMO DE ACCIÓN DE LA INDOMETACINA.....	52
5.4.4. PROPIEDADES QUÍMICAS Y FARMACOLÓGICAS DE LOS FLAVONOIDES.....	53
5.4.5. OTROS COMPUESTOS CON ACCIÓN CITOPROTECTORA.....	59

OBJETIVOS	63
------------------------	-----------

MATERIALES Y MÉTODOS

1.0. DETERMINACIÓN DEL EFECTO ANTIULCEROSO DE EXTRACTOS DE <i>CENTAUREA SOLSTITIALIS</i> EN RATAS.....	65
2.0. EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN CRÓNICA DE EXTRACTOS ACUOSOS DE <i>CENTAUREA SOLSTITIALIS</i> EN RATAS.....	69
3.0. DETERMINACIÓN DEL EFECTO ANTIULCEROSO DE <i>CENTAUREA SOLSTITIALIS</i> EN RATONES.....	71
4.0. DETERMINACIÓN DEL EFECTO CITOPROTECTOR DE EXTRACTOS DE <i>CENTAUREA SOLSTITIALIS</i> EN RATONES.....	78
4.1. EVALUACIÓN DEL EFECTO CITOPROTECTOR DE EXTRACTOS DE <i>CENTAUREA SOLSTITIALIS</i> UTILIZANDO INDOMETACINA.....	78
4.2. DETERMINACIÓN DEL EFECTO CITOPROTECTOR DE EXTRACTOS DE <i>CENTAUREA SOLSTITIALIS</i> EVALUANDO LA PRODUCCIÓN DE MUCUS A TRAVÉS DE ESTUDIOS HISTOLÓGICOS.....	81
4.3. DETERMINACIÓN DEL EFECTO CITOPROTECTOR DE EXTRACTOS DE <i>CENTAUREA SOLSTITIALIS</i> EVALUANDO LA PRODUCCIÓN DE MUCUS A TRAVÉS DE ESTUDIOS DE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA.....	83
5.0. EFECTO DEL ESTRÉS PROVOCADO POR HIPOTERMIA E INMOVILIZACIÓN SOBRE LA TEMPERATURA CORPORAL Y EL pH GÁSTRICO EN RATONES TRATADOS CON EXTRACTOS DE <i>CENTAUREA SOLSTITIALIS</i>	84
6.0. ESTUDIOS FITOQUÍMICOS DE EXTRACTOS METANÓLICO Y CLOROFÓRMICO DE <i>CENTAUREA SOLSTITIALIS</i>	86
6.1. AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS PRESENTES EN LA FRACCIÓN METANÓLICA DE <i>CENTAUREA SOLSTITIALIS</i>	86
6.2. CUANTIFICACIÓN DE QUERCETINA Y CANFEROL EN CAPÍTULOS DE <i>CENTAUREA SOLSTITIALIS</i>	89
6.3. CARACTERIZACIÓN DE COMPUESTOS PRESENTES EN LA FRACCIÓN CLOROFÓRMICA DE <i>CENTAUREA SOLSTITIALIS</i>	91
7.0. EFECTO DE EXTRACTOS DE <i>CENTAUREA SOLSTITIALIS</i> SOBRE EL TRÁNSITO GASTROINTESTINAL EN RATONES.....	93
8.0. EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE DROGAS RELACIONADAS CON LA MOTILIDAD GÁSTRICA SOBRE LA FORMACIÓN DE ÚLCERAS.....	95
9.0. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIULCEROSA DE FLAVONOIDES AISLADOS DE <i>CENTAUREA SOLSTITIALIS</i>	96
9.1. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIULCEROSA DE QUERCETINA EN RATONES	96
9.2. EFECTOS ANTIULCEROSOS DE LOS FLAVONOIDES QUERCETINA Y CANFEROL LIBRES Y CONJUGADOS.....	97
10.0. EFECTO DE LA QUERCETINA Y EL CANFEROL SOBRE EL TIEMPO DE VACIADO GASTROINTESTINAL EN RATONES.....	100
11.0. PARTICIPACIÓN DE LAS PROSTAGLANDINAS EN EL EFECTO ANTIULCEROSO DE LA QUERCETINA Y EL CANFEROL.....	102

12.0. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DEL EXTRACTO METANÓLICO DE <i>CENTAUREA SOLSTITIALIS</i>	103
13.0. DETERMINACIÓN DEL EFECTO SEDANTE DEL EXTRACTO ACUOSO DE <i>CENTAUREA SOLSTITIALIS</i> EN RATONES.....	105
14.0. EFECTO DEL ESTRÉS PROVOCADO POR HIPOTERMIA E INMOVILIZACIÓN SOBRE LOS NIVELES PLASMÁTICOS DE CORTICOIDES EN RATONES TRATADOS CON EXTRACTOS DE <i>CENTAUREA SOLSTITIALIS</i>	107
15.0. EFECTOS PRODUCIDOS POR COMPUESTOS RELACIONADOS ESTRUCTURALMENTE CON FLAVONOIDES Y LACTONAS SESQUITERPÉNICAS PRESENTES EN <i>CENTAUREA SOLSTITIALIS</i> SOBRE LA ACTIVIDAD GASTROPROTECTORA Y LA MOTILIDAD GASTROINTESTINAL.....	109
15.1. DETERMINACIÓN DEL EFECTO GASTROPROTECTOR DE COMPUESTOS RELACIONADOS ESTRUCTURALMENTE CON FLAVONOIDES Y LACTONAS SESQUITERPÉNICAS PRESENTES EN <i>CENTAUREA SOLSTITIALIS</i>	109
15.2. DETERMINACIÓN DEL EFECTO DE COMPUESTOS RELACIONADOS ESTRUCTURALMENTE CON FLAVONOIDES Y LACTONAS SESQUITERPÉNICAS PRESENTES EN <i>CENTAUREA SOLSTITIALIS</i> SOBRE LA MOTILIDAD GASTROINTESTINAL	110

RESULTADOS

1.0. DETERMINACIÓN DEL EFECTO ANTIULCEROSO DE EXTRACTOS DE <i>CENTAUREA SOLSTITIALIS</i> EN RATAS.....	111
2.0. EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN CRÓNICA DE EXTRACTOS ACUOSOS DE <i>CENTAUREA SOLSTITIALIS</i> EN RATAS.....	118
3.0. DETERMINACIÓN DEL EFECTO ANTIULCEROSO DE <i>CENTAUREA SOLSTITIALIS</i> EN RATONES.....	120
4.0. DETERMINACIÓN DEL EFECTO CITOPROTECTOR DE EXTRACTOS DE <i>CENTAUREA SOLSTITIALIS</i> EN RATONES.....	125
4.1. EVALUACIÓN DEL EFECTO CITOPROTECTOR DE EXTRACTOS DE <i>CENTAUREA SOLSTITIALIS</i> UTILIZANDO INDOMETACINA.....	125
4.2. DETERMINACIÓN DEL EFECTO CITOPROTECTOR DE EXTRACTOS DE <i>CENTAUREA SOLSTITIALIS</i> EVALUANDO LA PRODUCCIÓN DE MUCUS A TRAVÉS DE ESTUDIOS HISTOLÓGICOS.....	129
4.3. DETERMINACIÓN DEL EFECTO CITOPROTECTOR DE EXTRACTOS DE <i>CENTAUREA SOLSTITIALIS</i> EVALUANDO LA PRODUCCIÓN DE MUCUS A TRAVÉS DE ESTUDIOS DE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA.....	133
5.0. EFECTO DEL ESTRÉS PROVOCADO POR HIPOTERMIA E INMOVILIZACIÓN SOBRE LA TEMPERATURA CORPORAL Y EL pH GÁSTRICO EN RATONES TRATADOS CON EXTRACTOS DE <i>CENTAUREA SOLSTITIALIS</i>	140
6.0. ESTUDIOS FITOQUÍMICOS DE EXTRACTOS METANÓLICO Y CLOROFÓRMICO DE <i>CENTAUREA SOLSTITIALIS</i>	142
6.1. AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS PRESENTES EN LA FRACCIÓN METANÓLICA DE <i>CENTAUREA SOLSTITIALIS</i>	143
6.2. CUANTIFICACIÓN DE QUERCETINA Y CANFEROL EN CAPÍTULOS DE <i>CENTAUREA SOLSTITIALIS</i>	148
6.3. CARACTERIZACIÓN DE COMPUESTOS PRESENTES EN LA FRACCIÓN CLOROFÓRMICA DE <i>CENTAUREA SOLSTITIALIS</i>	149

7.0.	EFFECTO DE EXTRACTOS DE <i>CENTAUREA SOLSTITIALIS</i> SOBRE EL TRÁNSITO GASTROINTESTINAL EN RATONES.....	150
8.0.	EFFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE DROGAS RELACIONADAS CON LA MOTILIDAD GÁSTRICA SOBRE LA FORMACIÓN DE ÚLCERAS.....	153
9.0.	DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIÚLCEROSA DE FLAVONOIDES AISLADOS DE <i>CENTAUREA SOLSTITIALIS</i>	155
9.1.	DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIÚLCEROSA DE QUERCETINA EN RATONES	155
9.2.	EFFECTOS ANTIÚLCEROSOS DE LOS FLAVONOIDES QUERCETINA Y CANFEROL LIBRES Y CONJUGADOS.....	157
10.0.	EFFECTO DE LA QUERCETINA Y EL CANFEROL SOBRE EL TIEMPO DE VACIADO GASTROINTESTINAL EN RATONES.....	161
11.0.	PARTICIPACIÓN DE LAS PROSTAGLANDINAS EN EL EFFECTO ANTIÚLCEROSO DE LA QUERCETINA Y EL CANFEROL.....	164
12.0.	DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DEL EXTRACTO METANÓLICO DE <i>CENTAUREA SOLSTITIALIS</i>	166
13.0.	DETERMINACIÓN DEL EFFECTO SEDANTE DEL EXTRACTO ACUOSO DE <i>CENTAUREA SOLSTITIALIS</i> EN RATONES.....	168
14.0.	EFFECTO DEL ESTRÉS PROVOCADO POR HIPOTERMIA E INMOVILIZACIÓN SOBRE LOS NIVELES PLASMÁTICOS DE CORTICOIDES EN RATONES TRATADOS CON EXTRACTOS DE <i>CENTAUREA SOLSTITIALIS</i>	170
15.0.	EFFECTOS PRODUCIDOS POR COMPUESTOS RELACIONADOS ESTRUCTURALMENTE CON FLAVONOIDES Y LACTONAS SESQUITERPÉNICAS PRESENTES EN <i>CENTAUREA SOLSTITIALIS</i> SOBRE LA ACTIVIDAD GASTROPROTECTORA Y LA MOTILIDAD GASTROINTESTINAL.....	172
15.1.	DETERMINACIÓN DEL EFFECTO GASTROPROTECTOR DE COMPUESTOS RELACIONADOS ESTRUCTURALMENTE CON FLAVONOIDES Y LACTONAS SESQUITERPÉNICAS PRESENTES EN <i>CENTAUREA SOLSTITIALIS</i>	172
15.2.	DETERMINACIÓN DEL EFFECTO DE COMPUESTOS RELACIONADOS ESTRUCTURALMENTE CON FLAVONOIDES Y LACTONAS SESQUITERPÉNICAS PRESENTES EN <i>CENTAUREA SOLSTITIALIS</i> SOBRE LA MOTILIDAD GASTROINTESTINAL	174
	DISCUSIÓN.....	176
	CONCLUSIONES.....	208
	BIBLIOGRAFÍA.....	210

FIGURAS

1	<i>Centaurea solstitialis</i> en floración.....	12
2	Capítulo de <i>Centaurea solstitialis</i>	12
3	Distribución mundial de <i>Centaurea solstitialis</i>	13
4	Distribución en Argentina de <i>Centaurea solstitialis</i>	14
5	Esquema anatómico de un estómago.....	19
6	Esquema indicando las zonas mucosas del estómago.....	20
7	Esquema de una glándula gástrica.....	22
8	Neutralización del ion H ⁺ en la barrera bicarbonato-mucus.....	30
9	Conversión del ácido araquidónico en eicosanoides.....	47
10	Principales estructuras básicas de los flavonoides.....	54
11	Estructura química de quercetina y canferol.....	55
12	Estructuras químicas de lactonas sesquiterpénicas de Cs.....	61
13	Estructura química de dehidroleucodina.....	62
14	Esquema de extracción y administración de extractos en ratas.....	68
15	Esquema de extracción y administración de extractos en ratones.....	73
16	Ratones colocados en jaulas de inmovilización.....	74
17	Baño termostatizado con ratones inmovilizados y sumergidos en agua.....	74
18	Método de extracción de los estómagos de ratones.....	75
19	Método de fijación en formol de los estómagos.....	76
20	Apertura del estómago por la curvatura mayor.....	76
21	Estómago mostrando los pliegues de la mucosa gástrica.....	77
22	Estómago retraído con úlceras.....	77
23	Esquema de obtención y administración de extractos en ratones para determinar el efecto citoprotector con indometacina...	80
24	Esquema de obtención de la fracción acetato de etilo para aislamiento e identificación de quercetina y canferol.....	88
25	Esquema de obtención de la fracción de acetato de etilo para cuantificación de quercetina y canferol.....	90
26	Esquema de obtención y administración de glicósidos de quercetina y canferol.....	99
27A	Estómago de rata perteneciente al grupo control.....	112
27B	Estómago de rata tratada con extracto acuoso.....	113
27C	Estómago de rata tratada con extracto metanólico.....	114
27D	Estómago de rata tratada con extracto metanólico-clorofórmico.....	115
27E	Estómago de rata tratada con extracto clorofórmico.....	115
28A	Estómago de ratón perteneciente al grupo control.....	121
28B	Estómago de ratón tratado con extracto acuoso.....	121
28C	Estómago de ratón tratado con extracto metanólico.....	122
28D	Estómago de ratón tratado con extracto metanólico-clorofórmico....	122
28E	Estómago de ratón tratado con extracto clorofórmico.....	123
29A-F	Estómagos de ratones tratados con extractos de Cs e indometacina.....	126
30A	Corte histológico teñido con PAS de un estómago normal.....	130
30B	Corte histológico teñido con PAS de un estómago perteneciente a un ratón sometido a estrés.....	130
30C	Corte histológico teñido con PAS de un estómago perteneciente a un ratón tratado con extracto metanólico.....	131

30D	Corte histológico teñido con PAS de un estómago perteneciente a un ratón tratado con extracto clorofórmico.....	131
31A	Micrografía electrónica de barrido de mucosa gástrica normal de ratón.	133
31B	Micrografía electrónica de barrido de mucosa gástrica de ratón sometido a estrés.....	134
31C	Micrografía electrónica de barrido de mucosa gástrica de ratón tratado con extracto metanólico.....	135
31D	Micrografía electrónica de barrido de mucosa gástrica de ratón tratado con extracto metanólico.....	136
32A	Micrografía electrónica de barrido mostrando células epiteliales de mucosa gástrica de un ratón normal.....	136
32B	Micrografía electrónica de barrido mostrando células epiteliales de mucosa gástrica de un ratón sometido a estrés.....	137
32C	Micrografía electrónica de barrido mostrando células epiteliales de mucosa gástrica de un ratón tratado con extracto metanólico.....	138
32D	Micrografía electrónica de barrido mostrando células epiteliales de mucosa gástrica de un ratón tratado con extracto metanólico.....	139
33A, B	HPLC quercetina (A) y canferol (B)	143
34A	Espectro de masas de quercetina.....	146
34B	Esquema indicando la formación de picos a partir del ion molecular de quercetina.....	146
35A	Espectro de masas de canferol.....	147
35B	Esquema indicando la formación de picos a partir del ion molecular de quercetina.....	147
36A-D	Radiografías seriadas mostrando el tiempo de vaciado gastrointestinal en ratones tratados con extractos acuoso, metanólico y clorofórmico.....	151
37A	Cromatograma en CCF de obtención de quercetina y canferol conjugados de <i>Centaurea solstitialis</i>	158
37B	Cromatograma en CCF de quercetina y canferol aislados de <i>Centaurea solstitialis</i>	158
38A-D	Radiografías seriadas mostrando el tiempo de vaciado gastrointestinal en ratones tratados con quercetina, quercetina-glicósido y canferol glicósido.....	162
39	Gráfico mostrando la actividad antioxidante de quercetina, BHT y extracto metanólico de <i>Centaurea solstitialis</i>	167
40A-C	Radiografías seriadas mostrando el tiempo de vaciado gastrointestinal en ratones tratados con apigenina, miricetina, silibina, rutina, canferol y α -metileno- γ -butirolactona.....	175
41	Hidrólisis de la rutina.....	191
42	Estructura química de la apigenina, miricetina, rutina y silibina.....	203

TABLAS

1	Efecto antiulceroso de extractos de <i>Centaurea solstitialis</i> sobre úlceras inducidas por estrés en ratas.....	116
2	Efecto de la administración crónica de extractos de <i>Centaurea solstitialis</i> sobre la temperatura corporal y la ganancia de peso.....	119
3	Variación del consumo de agua diario en ratas administradas con extractos acuosos disueltos en el agua de bebida.....	119
4	Efecto antiulceroso de extractos de <i>Centaurea solstitialis</i> sobre úlceras inducidas por estrés en ratones.....	124
5	Evaluación del efecto de la administración previa de indometacina en ratones tratados con extractos metanólico y clorofórmico.....	128
6	Evaluación del efecto de la administración de extractos metanólico y clorofórmico de <i>Centaurea solstitialis</i> sobre el pH medido en la superficie de la mucosa gástrica y la temperatura corporal en ratones normales y luego de ser sometidos a estrés por hipotermia e inmovilización.....	141
7	Efecto de la administración de atropina, pilocarpina, extracto metanólico y pilocarpina-extracto metanólico sobre las lesiones gástricas inducidas por hipotermia e inmovilización.....	154
8	Efecto de la quercetina sobre el porcentaje de inhibición de úlceras inducidas por estrés en ratones.....	156
9	Efecto de la quercetina y el canferol libres administrados intraperitonealmente y de la quercetina y el canferol conjugados aislados de Cs administrados por vía oral, sobre el porcentaje de inhibición de úlceras inducidas por estrés en ratones.....	159
10	Efecto de la administración previa de indometacina sobre la acción gastroprotectora de la quercetina y el canferol en ratones...	165
11	Actividad antioxidante de BHT, quercetina, canferol y extracto metanólico obtenido de <i>Centaurea solstitialis</i> sobre la oxidación de β -caroteno vs. tiempo.....	166
12	Influencia de la administración previa de extractos acuosos de <i>Centaurea solstitialis</i> sobre el período de inducción y sueño en ratones tratados con dosis hipnótica y subhipnótica de tiopental sódico.....	169
13	Evaluación del efecto de la administración de extractos metanólico y clorofórmico de <i>Centaurea solstitialis</i> sobre los niveles plasmáticos de corticoides en ratones sometidos a estrés por hipotermia e inmovilización.....	171
14	Evaluación del efecto antiulceroso de la apigenina, miricetina, silibina, rutina y α -metileno- γ -butirolactona.....	173

RESUMEN

**ACTIVIDAD GASTROPROTECTORA DE
EXTRACTOS DE *CENTAUREA SOLSTITIALIS*
ESTUDIOS FITOQUÍMICOS Y FARMACOLÓGICOS**

En esta tesis se evaluó la actividad antiulcerosa de la *Centaurea solstitialis* (Cs) a través de estudios fitoquímicos y farmacológicos. La capacidad que poseen los extractos acuoso, metanólico y clorofórmico obtenidos a partir de capítulos secos de la planta para prevenir las lesiones gástricas se determinó utilizando un modelo de inducción de úlceras por estrés por hipotermia e inmovilización en ratas. Estos resultados permitieron realizar ensayos tendientes a elucidar principios activos y acciones farmacológicas con potencial importancia fitoterapéutica para el tratamiento de las úlceras gástricas. Se utilizaron ratones como animales de experimentación, ya que esta especie mostró ser más sensible al modelo experimental empleado, el cual induce úlceras a través de cambios en la microcirculación mucosal, secretorios y motilidad. El efecto citoprotector de los extractos acuoso, metanólico y clorofórmico se evaluó administrando indometacina. La inhibición de la síntesis de prostaglandinas evidenció que éstas participan aproximadamente en un 50 % del efecto antiulceroso exhibido por la fracción clorofórmica, mientras que tienen un moderado efecto en la fracción metanólica. Estos resultados fueron confirmados evaluando la producción de mucus de la mucosa gástrica a través de estudios histológicos por medio de la reacción del ácido periódico de Schiff y microscopía electrónica de barrido. Los extractos metanólico y clorofórmico, aumentaron la secreción de mucus, siendo mayor el efecto producido por este último.

Ensayos realizados en ratones sometidos a estrés por hipotermia e inmovilización evidenciaron una drástica disminución de la temperatura corporal y el pH medido sobre la mucosa gástrica. El tratamiento previo de

los animales con extractos metanólico y clorofórmico mantuvo el pH en valores significativamente más altos.

Estudios fitoquímicos permitieron caracterizar la presencia de lactonas sesquiterpénicas en el extracto clorofórmico y aislar, identificar y cuantificar dos flavonoides en la fracción metanólica. La identificación de quercetina y canferol permitió realizar una serie de estudios que explicaron la acción gastroprotectora encontrada en la fracción metanólica. La caracterización de lactonas sesquiterpénicas y los datos que hasta el momento se conocen de sus acciones farmacológicas, hicieron posible realizar ensayos en forma conjunta con la fracción metanólica que determinaron que ambas fracciones comparten algunos mecanismos de acción.

Se investigó la capacidad de inhibir la motilidad gastrointestinal de los extractos acuoso, metanólico y clorofórmico. Se evaluó comparativamente el tiempo de vaciado gástrico a través de estudios radiológicos y se encontró que todos los extractos retrasaron el vaciado gastrointestinal. Para determinar la importancia de la hipermotilidad gástrica en la génesis de las úlceras gástricas inducidas por estrés, se administró atropina como inhibidor de la motilidad, logrando prevenir totalmente las lesiones ulcerosas. Por el contrario, la administración de pilocarpina, que aumenta la motilidad, incrementó las lesiones ulcerosas. Estos estudios revelaron la posibilidad de evaluar a la quercetina como un agente gastroprotector que actuaría inhibiendo la motilidad gastrointestinal.

La administración de altas dosis de quercetina en animales sometidos a estrés, mostraron actividad gastroprotectora sólo cuando se la administró por vía intraperitoneal, evidenciando una dificultad en la absorción por vía oral del compuesto en su forma libre. Posteriores ensayos, utilizando quercetina en forma conjugada aislada de Cs, evidenciaron que este flavonoide conjugado es efectivo por vía oral en cantidades similares a las contenidas en una dosis preventiva de extracto metanólico. El canferol aislado de la Cs, mostró un leve efecto inhibitorio de

la motilidad gastrointestinal en estudios radiológicos cuando se lo administró en las mismas condiciones que la quercetina. Asimismo, se determinó que el canferol posee un efecto aditivo con la quercetina en la expresión de los efectos gastroprotectores. Estos estudios permitieron determinar que es necesaria la acción combinada de efectos citoprotectores y espasmolíticos para que el extracto metanólico exhiba un efecto gastroprotector. En forma complementaria, la acción antioxidante encontrada en la fracción metanólica contribuiría a mantener la integridad de las células de la mucosa gástrica que se verían afectadas por anoxia durante los trastornos circulatorios provocados por la hipotermia.

Estudios radiológicos realizados con el extracto clorofórmico en forma conjunta con el metanólico permitieron determinar un importante efecto inhibidor de la motilidad gástrica. Este hallazgo, sumado a la acción citoprotectora encontrada en los ensayos realizados con indometacina y complementados con pruebas histológicas y de microscopía electrónica de barrido, evidenciaron la presencia de mecanismos de acción similares en ambos extractos.

El efecto sedante del extracto acuoso de Cs fue demostrado por el aumento del efecto hipnótico que se produce al administrar en conjunto un barbitúrico y un agente depresivo. Este efecto puede resultar de importancia ya que el estado emocional es un importante factor que contribuye a inducir úlceras por hipotermia e inmovilización. Los niveles plasmáticos de corticosterona aumentaron significativamente en ratones sometidos a estrés. Los extractos metanólico y clorofórmico no produjeron cambios significativos, evidenciando que no existe relación entre los niveles del corticoide y la respuesta farmacológica de los extractos. Con el fin de encontrar una relación estructura-actividad se utilizaron flavonoides relacionados estructuralmente con la quercetina y el canferol, tales como la apigenina, miricetina, silibina y rutina. Estos estudios mostraron una relación entre el número de sustituyentes oxhidrilos en el anillo B con la acción gastroprotectora. La silibina, que no tiene estos sustituyentes, no

previno la formación de úlceras. La acción gastroprotectora estuvo relacionada, en todos los casos, con la presencia de un efecto inhibitorio sobre la motilidad gastrointestinal. La administración de α -metileno- γ -butirolactona, un compuesto sintético que posee el grupo funcional activo de algunas lactonas sesquiterpénicas presentes en los extractos clorofórmicos, mostró una actividad gastroprotectora y una acción inhibitoria sobre la motilidad gastrointestinal.

SUMMARY

GASTROPROTECTIVE ACTIVITY OF *CENTAUREA SOLSTITIALIS* EXTRACTS.

PHYTOCHEMICAL AND PHARMACOLOGICAL STUDIES.

In this Doctoral Thesis the antiulcerous of the *Centaurea solstitialis* (Cs) activity was evaluated through phytochemical and pharmacological studies. The capacity of de aqueous, methanolic and chloroformic extracts, obtained from dry heads of the plant to prevent from gastric lesions, was determined by mean of a model in which ulcers were induced by stress through hypothermia and immobilization of rats. These results allowed carrying out assays aiming to elucidate active principles and pharmacological actions with potential phytotherapeutical importance for gastric ulcerous treatment. Mice were used as experimental animals, since they showed being more sensitive to the employed model. It induces ulcerous through changes in the mucosal microcirculation, secretories and motility. Cytoprotector effect of aqueous, methanolic and chloroformic extracts was evaluated given indomethacin. The inhibition of prostaglandin's synthesis showed that they participate approximately in a 50 % of the effect antiulcerous exhibited for the chloroformic fraction, while they have a slight effect in the methanolic fraction. Evaluating mucus production of the gastric mucosa through histological studies by means of Schiff's reaction with periodic acid and scanning electron microscopy corroborated these results. Both, methanolic and chloroformic extracts increased the mucus secretion, specially in the last case.

Assays carried out in mice under stress by hypothermia and immobilization showed a drastic decrease of corporal temperature and pH measured in gastric mucosa. Previous treatment of animals with methanolic and chloroformic extracts raised the pH to significantly higher values.

Capacity to inhibit the gastrointestinal motility of aqueous, methanolic and chloroformic extracts was investigate. The time of gastric emptiness through radiological studies was comparatively evaluated and it was found

that all the extracts delayed gastrointestinal emptiness. To determinate the importance of gastric hypermotility in the gastric ulcerous formation induced by stress, atropine, as motility inhibitor, was administered. This compound avoided the ulcerous lesions completely. On the other hand, pilocarpine administration, that enhances motility, increased the ulcerous lesions. These studies revealed the possibility to evaluate quercetin as a gastroprotective agent, which would inhibit gastrointestinal motility.

High doses of quercetin administered to animals submitted to stress showed gastroprotective activity only when given by intraperitoneal way, making it difficult the absorption by oral way of the compound in its free form. Further assays, using quercetin as glycoside isolated from Cs, revealed to be effective by oral way in similar amounts as those contained in a preventive dose of methanolic extract. Kaempferol isolated from Cs produce inhibitor effect on gastrointestinal motility in radiological studies when administered in the same conditions as quercetin. It was also determined that kaempferol has an additional effect on quercetin in the gastroprotective effect expressions. These studies allowed determining that the combined action of cytoprotective and spasmolytical effects is necessary for the methanolic extract has a gastroprotective effect. The antioxidant action found in the methanolic fraction would contribute to support the integrity of gastric mucosa cells which would be affected by anoxemia during the circulatory disorders produced by hypothermia.

Studies carried out with both methanolic and chloroformic extracts showed an important inhibit effect of gastric motility. This result, in addition to the cytoprotective action in the assays with indomethacin, histological test and the scanning electron microscopy, showed the presence of similar action mechanisms in both extracts.

Sedative effect of the aqueous extract of Cs was demonstrated by the increase of the hypnotic effect that in produced when a barbituric and a depressed agent are administered altogether. This is an important effect since the emotional state is a factor that contributes to induce ulcerous by

hypothermia and immobilization. Corticosterone plasmatic levels increased significantly in mice under stress. Methanolic and chloroformic extracts did not produce significative changes, showing that there is not relationship between the corticosteroid levels and the pharmacological response of the extracts. To find a structure-activity relation flavonoids structurally related with quercetin and kaempferol, such us apigenin, myricetin, silybin and rutin were used. These studies showed a relation between the number of hydroxyl substituting in the B ring with the gastroprotective action, except silybin with which does not have them. Gastroprotective action was related, in all cases, with the presence of inhibit effects over gastrointestinal motility. The administration of α -methylene- γ -butyrolactone, a synthetic compound that possess the active functional group of some sesquiterpene lactones in the chloroformic extract, showed a gastroprotective activity and an inhibitory action over gastrointestinal motility.

INTRODUCCIÓN

Entre los procedimientos de búsqueda de nuevas drogas, los grupos de investigación, pertenecientes a la industria farmacéutica y a organismos públicos y privados, concentran gran parte de sus esfuerzos en estudios fitoquímicos y farmacotxicológicos del inmenso arsenal de plantas que nos ofrece la naturaleza.

La presencia de numerosos compuestos en distintas combinaciones que se encuentran en forma espontánea en las plantas, es en esencia el hecho que justifica el invalorable aporte realizado por la fitomedicina al tratamiento de las enfermedades. Los beneficios de la utilización de drogas vegetales están centrados en que las plantas se encuentran disponibles en grandes cantidades en la naturaleza, por lo general pueden cultivarse sin mayores problemas, su preparación es sencilla y son una fuente económica de medicamentos, siendo este último uno de los factores claves que evalúa la industria para decidir su fabricación y comercialización.

Estas poderosas razones se minimizan al analizar las ventajas terapéuticas que ofrecen los medicamentos que tienen una acción menos agresiva ejercida, la mayoría de las veces, por la combinación de varios compuestos logrando modificaciones atenuadas, pero a su vez más equilibradas en el organismo (Evans, 1995). Por lo general, pueden administrarse durante largos períodos de tiempo sin producir toxicidad tanto con fines terapéuticos como profilácticos. Estos beneficios han renovado el interés de la industria farmacéutica en la investigación de los principios activos de las plantas medicinales.

La mayoría de las drogas sintéticas utilizadas en la actualidad están presentes en las plantas, de las que se reprodujo su estructura química. Es necesario continuar los estudios de los componentes vegetales para contribuir a la búsqueda de tratamientos más adecuados.

La utilización de compuestos vegetales, por su variada composición, pueden representar una alternativa eficaz para la prevención y/o el tratamiento de la úlcera gástrica, la que por sus características etiopatológicas es difícil de precaver.

El estrés es considerado como un factor predisponente en la ocurrencia de distintas enfermedades. Si bien es difícil describir las causas de estrés debido a que son múltiples, podemos indicar en términos generales que los procesos evolutivos de la sociedad moderna contribuyen a agravarlas. Los cambios en los hábitos naturales del hombre y los animales y en sus conductas alimentarias son causas frecuentes. Las causas de estrés debidas a variaciones ambientales y nutricionales actúan como factores debilitantes que provocan la enfermedad. La ingesta de alimentos inadecuados que resultan agresivos e irritantes para el aparato gastrointestinal, sumados al estrés, son las causas principales de la formación de úlceras gástricas. Esta es una enfermedad de elevada morbilidad, asociada con la frecuente necesidad de internación. La población de sexo masculino tiene una probabilidad del 10 % de padecer gastritis ulcerosa y la de sexo femenino un 4 % (Crawford, 1998). Quienes padecen estos disturbios gástricos están expuestos a sufrir con cierta frecuencia complicaciones que ponen en peligro su vida. Por otro lado, un alto costo financiero relacionado con los gastos médicos y el lucro cesante del paciente está asociado a la enfermedad (Giordano et al., 1997).

En medicina veterinaria, la úlcera gástrica tiene gran incidencia en animales domésticos y salvajes mantenidos en cautiverio. La alimentación inadecuada, la permanencia en un hábitat inusual y las condiciones de hacinamiento, ponen a los animales en situación de estrés desencadenando procesos ulcerativos en la mucosa gástrica. Esta patología suele permanecer asintomática debido a que las manifestaciones clínicas pasan desapercibidas para los dueños o cuidadores, encontrándose en la necropsia cuando los animales mueren por hemorragias profusas o perforaciones de la pared del estómago. Esta enfermedad ocasiona una significativa pérdida de productividad por la muerte en forma espontánea en pistas de engorde o en cerdas confinadas en jaulas en sistemas de producción intensiva (Berruecos et al., 1986).

Los animales de compañía que son forzados a permanecer fuera de

sus hábitats naturales o ingerir alimentos que no son habituales en sus dietas, pueden desarrollar úlceras por estrés. El curso asintomático de estas lesiones generalmente impide su diagnóstico y son halladas en las necropsias. En los casos más severos puede diagnosticarse por las hemorragias, las mismas son intermitentes y se exteriorizan en forma de hematemesis o de melenas. Signos clínicos menos orientadores resultan en una atonía y sobrecarga de los reservorios gástricos en los bovinos, así como anemia y precario estado general en animales de compañía (Blood, 1988a).

Aún cuando el estrés es un factor predisponente de la enfermedad, la multiplicidad de factores que se mencionan como causas probables de úlceras hace difícil determinar tanto la etiología como el tratamiento. Por otra parte, los factores que se han indicado como probables y que están relacionados con los factores ambientales y nutricionales son virtualmente imposibles de evitar en el mundo moderno. Estas circunstancias han determinado tratamientos orientados a fortalecer los mecanismos de defensa naturales de la mucosa gástrica. En la actualidad se ha logrado un gran avance con el uso de bloqueantes H₂ y de la bomba de protones, antiácidos y antibióticos en los casos de complicaciones con *Helicobacter pylori*. Este organismo de forma espiralada, Gram negativo, conocido antiguamente como *Campylobacter pylori*, posee una gran actividad enzimática de ureasa, propiedad que se utiliza para su investigación. La forma espiralada del *Helicobacter* le permite invadir la capa de mucus que recubre la pared del estómago produciendo inflamación, gastritis, dispepsia y en algunos casos la erosión de la pared estomacal desarrollando úlceras. Sin embargo, incluso con curación, la tendencia a las recidivas se mantiene en la mayoría de los casos (Crawford, 1998). Las recidivas y los efectos colaterales de las medicaciones empleadas en los tratamientos de úlceras impulsan a la industria farmacéutica a una búsqueda continua de nuevas drogas que ofrezcan ventajas sobre las utilizadas en la actualidad.

1.0. LA PLANTA

La *Centaurea solstitialis* L. (nombre vulgar Abrepuño), (Asteraceae, Cardueae), planta originaria de la región del Mediterráneo (Maddox, 1985), adventicia en América (Lamberto et al., 1997), ha sido reportada por su uso en Turquía como antiulcerogénica, siendo éste el único dato etnomedicinal que informa la bibliografía (Yesilada et al., 1993a). Esta planta, que se desarrolla en la provincia de La Pampa y zona húmeda de Argentina (Gallo, 1979), donde se la conoce por ser una maleza invasiva y tóxica, no es reconocida en nuestro país como una planta medicinal.

2.0. CARACTERÍSTICAS BOTÁNICAS Y FITOQUÍMICAS DE *CENTAUREA SOLSTITIALIS*

2.1. Características botánicas

La *Centaurea solstitialis* (Cs) que se desarrolla en la zona pampeana, ha sido identificada como *Centaurea solstitialis* L. subsp. *solstitialis*^a, es una hierba anual o bienal, con tormento lanoso y grisáceo, que forma una roseta de hojas basales y antes de la floración emite tallos de 30 - 70 cm de altura, erectos o ascendentes, ramosos, lanuginosos y con alas enteras, de 1 - 2 mm de ancho (Fig. 1). Hojas basales lirado-pinnatisectas de 12 - 15 cm de largo, con segmento terminal grande y lóbulos laterales oval-lanceolados, angostos, cortos, con márgenes enteros, sinuosos o con algunos dientes. Hojas superiores lanceoladas o lineales, generalmente enteras, decurrentes sobre el tallo, de 2 - 3 cm de largo, por 1 - 2 mm de ancho. Capítulos solitarios en el extremo de las ramas (Fig. 2).

^a Determinada por el Dr. Carlos Villamil / IV-97, apud Tutin, T.G. et al. Flora Europea - Vol. IV - 1976.



Fig. 1: *Centaurea solstitialis* en floración.



Fig. 2: Capítulo de *Centaurea solstitialis*.

Involucro de 10 mm de altura, formado por brácteas ovadas, terminadas en una espina amarilla, rígida, de 14 - 22 mm de largo, con una o más espinitas en su base, a cada lado. Receptáculo plano, velludo. Flores hermafroditas exertas, amarillas, isomorfas, con corola tubulosa, pentasecta. Gineceo con ovario ínfero, bicarpelar, unilocular y uniovulado. Estilo simple bífido con una coronita de pelos bajo el punto de bifurcación y ramas del estilo unidas entre sí hasta la punta. Androceo formado por 5

estambres insertos en el tubo de la corola, con filamentos libres y antenas soldadas entre sí por sus bordes, notablemente sagitadas. Aquenios glabros, grisáceos, lisos, brillosos, de 2 - 3 mm de largo, insertos en el receptáculo por una articulación lateral. Pappus formado por numerosas cerdas suaves, blancas, desiguales, de 3 - 4 mm de largo. Pappus ausente en los aquenios marginales, que son más oscuros. (Lamberto et al., 1997).

Esta maleza se propaga principalmente con semillas de alfalfa, razón por la cual se ha distribuido en diversas áreas geográficas del mundo donde se realiza este cultivo (Fig. 3) (Maddox et al., 1985), llegando posiblemente de esa forma a nuestro país, proliferando en las provincias de Buenos Aires, Entre Ríos, Santa Fe, Córdoba y La Pampa que conforman la llamada Pampa Húmeda.



Fig. 3: Distribución mundial de *Centaurea solstitialis*. Las regiones indicadas en amarillo y negro corresponden a las zonas de distribución primaria y secundaria de la planta respectivamente.

En la figura 4 se observa la distribución en nuestro país (Gallo, 1979), aunque debe considerarse que debido a los cambios climáticos y al

aumento de praderas destinadas a la implantación de pasturas la maleza a invadido otras provincias.

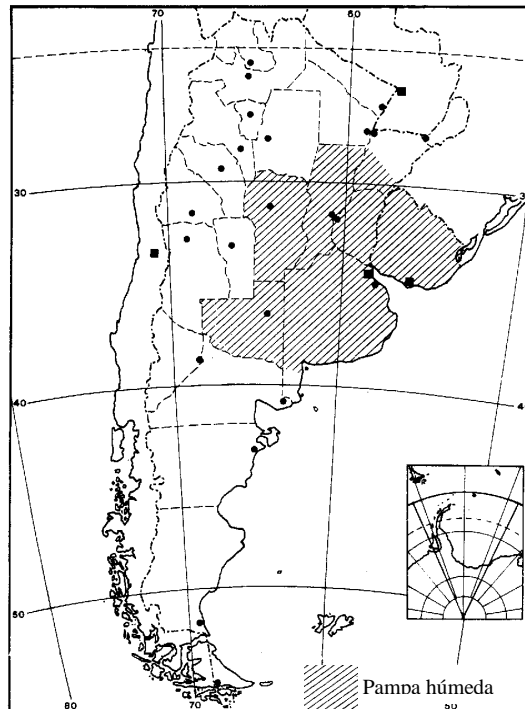


Fig. 4: Distribución de *Centaurea solstitialis* en Argentina.

La Cs es capaz de producir 29.000 semillas por metro cuadrado, de las cuales el 95% son viables, conservando su poder germinativo por un período de más de 10 años en el suelo. Las semillas son fácilmente transportadas por vehículos de distinto tipo, maquinarias agrícolas, animales, forrajes y simientes.

El trabajo intensivo de las tierras y las tareas de mantenimiento de caminos, favorecen su característica invasora colonizando rápidamente extensas áreas en las cuales desplaza a los cultivos, incluso los nativos (Turner, 1995).

La invasión de Cs en las pasturas produce pérdidas económicas por atraso en el desarrollo del ganado debido a la alta competitividad y mala palatabilidad de la planta, por contaminar las pasturas de alfalfa y por

producir en los equinos una encefalomalacia nigropálida que cursa con un síndrome nervioso fatal (Cordy, 1978).

2.2. Toxicidad de la planta

Los animales comen la planta antes que comience la floración ya que en ese período las hojas son lisas, a medida que se desarrolla se hace más leñosa y las hojas más ásperas. En el momento de la floración, comienzan a aparecer las espinas que, sumadas a su sabor amargo, hacen que sean consumidas solamente ante la falta de otros forrajes verdes. La enfermedad se presenta en verano y a finales del otoño. Se ha demostrado que el equino muestra los primeros síntomas después de haber ingerido entre 270 - 360 kg de Cs en un período de 35 a 85 días (Gallo, 1979).

Los síntomas que se observan están caracterizados al comienzo de la intoxicación por una dificultad para comer y beber. Esta puede variar desde un grado leve hasta una incapacidad total para la masticación, deglución y prensión de los alimentos. La parálisis da al animal una expresión de fijeza facial con la boca entreabierta, que puede estar acompañada de retracción de la piel de labios y hocico con protrusión de la lengua. Se observa una masticación permanente, aunque el animal no posea alimentos en la boca, con movimientos torpes y protrusión rítmica de la lengua. La somnolencia y bostezos son frecuentes, aunque los animales reaccionan con facilidad a cualquier estímulo. Estos síntomas pueden ir acompañados de ambulación lenta y sin objeto o en círculos. La enfermedad puede producirse experimentalmente en los equinos, pero no afecta a otras especies tales como rumiantes, simios y roedores (Blood, 1988b). Los síntomas están relacionados con la parálisis del 5º, 6º y 12º par craneano. No se observa fiebre durante el curso de la intoxicación. La enfermedad generalmente es fatal debido a las lesiones cerebrales que conducen a la falta de ingesta y deshidratación. El sistema nervioso presenta lesiones visibles macroscópicamente que serán más o menos extensas dependiendo de la cronicidad del proceso.

Ensayos con cultivos de células cerebrales de ratas demostraron la neurotoxicidad de algunas lactonas sesquiterpénicas (LSQ) tales como solstitialina, cinaropicrina y repina. Se postula que el mecanismo de acción estaría relacionado con la reducción de glutatión intracelular, sustancia que actúa protegiendo los tejidos cerebrales contra los mecanismos oxidativos, principalmente en la sustancia nigra donde el metabolismo de la dopamina potencia la generación de radicales libres (Robles et al., 1995; Robles et al., 1998).

2.3. Características fitoquímicas y farmacológicas de *Centaurea solstitialis* y especies relacionadas

Dentro del género *Centaurea* se encuentra una larga lista de especies que representan un importante aporte a la fitoterapia ya que poseen una gran variedad de efectos farmacológicos. Algunas de ellas se mencionan a continuación indicando sus usos medicinales:

C. calcitrapa: febrífuga, diurética, antipirética, antidiabética, abortiva e hipoglucemiante.

C. centaurium: desórdenes gastrointestinales y hepáticos.

C. chilensis: infecciones, antiasmática, emenagoga y como colirio oftálmico.

C. depressa: dolor abdominal y antimalaria.

C. iberica: febrífuga y afecciones renales.

C. melitensis: hipotensora, hipoglucemiante, antidiarreica, infecciones urinarias y diurética.

Los compuestos mayoritarios aislados de estas especies son los flavonoides y lactonas sesquiterpénicas.

La Cs ha sido informada por sus usos como antidiabética (Masso et al., 1979), febrífuga (Kamanzi et al., 1983), antiulcerogénica (Yesilada et al., 1993b), antimalaria, desórdenes de estómago y dolor abdominal (Yesilada et al., 1995), para combatir la infección por herpes alrededor de los labios (Fujita et al., 1995) y por ser activa contra el *Helicobacter pylori* (Yesilada, et al., 1999). Estudios fitoquímicos de la planta han revelado la presencia

de poliacetilenos (Stevens et al., 1990), cumarinas (Bubenchikova, 1990), flavonoides, triterpenoides y lactonas sesquiterpénicas (Hamburger et al., 1993).

3.0. ANATOMÍA, HISTOLOGÍA y FISIOLOGÍA DEL ESTÓMAGO

3.1. *Funciones del estómago*

Es difícil referirse a las funciones del estómago en particular sin incluir las funciones generales del tracto gastrointestinal y sus órganos accesorios. Estas funciones comprenden la digestión y la absorción de nutrientes esenciales para los procesos metabólicos del animal. Además, la mucosa debe evitar la absorción de sustancias tóxicas para el organismo. Por consiguiente, la luz del conducto gastrointestinal se considera como un medio externo al organismo. Las células del epitelio superficial que cubren la superficie interna realizan diversas funciones, incluidas digestión, secreción y absorción y son la única barrera entre este ambiente externo y la sangre. Tienen enzimas capaces de digerir azúcares y péptidos y en su interior funcionan sistemas de transporte que favorecen la incorporación de contenidos específicos del lumen. Las membranas celulares y los complejos de unión entre ellas proporcionan una barrera tan eficiente, que se requiere un sistema específico de transporte para muchas sustancias hidrosolubles (Blanco, 1997).

Otra función importante asociada con la digestión y la absorción es el tránsito de los contenidos luminales. Este es regulado por procesos digestivos específicos permitiendo la exposición del contenido alimenticio a la superficie celular epitelial para su absorción. Estas condiciones las produce la función motora del conducto gastrointestinal, la cual es un proceso que requiere energía y está bajo control neuroendócrino (Swenson et al., 1999).

En resumen, las funciones principales del conducto gastrointestinal son la digestión y la absorción de nutrientes. Las etapas motora y secretora proporcionan el ambiente necesario para estas dos funciones. Las

secreciones digestivas se recuperan mediante el proceso de reabsorción y regresan al líquido extracelular (Argenzio, 1999a).

El estómago participa en estos procesos recibiendo los alimentos ingeridos a través del esófago y reteniéndolos hasta que se mezclen con la saliva y el jugo gástrico hasta tomar una consistencia blanda transformándose en el quimo. De esta manera, este órgano cumple funciones de almacenamiento, mecánicas y de digestión realizando una hidrólisis parcial de proteínas y carbohidratos. Cuando el alimento ha sido dividido en partículas pequeñas y ha adquirido ciertas condiciones químicas es expulsado al intestino delgado donde se continúa el proceso de la digestión.

3.2. Anatomía y histología del estómago

3.2.1. Generalidades

La estructura del estómago simple, en las distintas especies que lo poseen, está determinada por sus hábitos de vida y alimentación, por otro lado, la estructura anatómica no concuerda con las divisiones fisiológicas. Debido a esto y considerando que la presente investigación trata los procesos que determinan la formación de úlceras gástricas provocadas por estrés, se realizará una descripción en general de la estructura anatomofisiológica del estómago, señalando alguna de las diferencias más relevantes entre especies, describiendo en particular los detalles de las estructuras fisiológicas que están comprometidas en la génesis de las úlceras gástricas.

El estómago se ubica en posición caudal al diafragma y se interpone entre el esófago y el intestino delgado.

La mezcla del contenido gástrico y su progreso hacia el intestino se produce en los animales a través de dos capas de músculo liso. La capa externa posee fibras longitudinales continuas y la interna fibras circulares. La capa circular se adelgaza en la zona pilórica y cardial para formar los esfínteres pilórico y cardial. El plexo mioentérico de Auerbach se encuentra

entre estas dos capas musculares, mientras que el submucoso de Meissner está en la submucosa. Una red de fibras nerviosas y células ganglionares interconecta ambos plexos (Ruckebusch et al., 1994a). En el hombre se distinguen tres capas musculares, una externa longitudinal, otra media circular y la capa interna oblicua (Jerzy Glass, 1978a).

La unión del esófago con el estómago se denomina cardias, mientras que la unión con el intestino, píloro.

El órgano fresco presenta un color pardo rosado, que se aclara cerca del cardias y el píloro. Presenta pliegues longitudinales llamados pliegues o arrugas gástricas que desaparecen cuando el estómago se llena (Fig. 5).

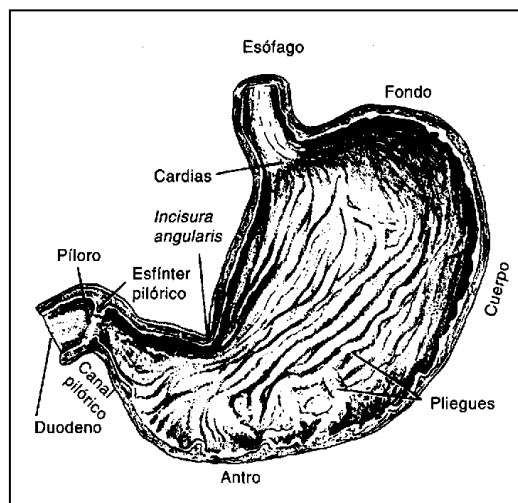


Fig. 5: Esquema de un corte longitudinal de estómago mostrando las distintas partes anatómicas. Extraído de Argenzio (1999a).

La estructura histológica del estómago está representada por cuatro capas. La túnica mucosa, ubicada hacia la luz del órgano a la cual le siguen la túnica submucosa, túnica muscular y túnica adventicia o serosa. Estas capas son constantes para todo el tubo digestivo pero la diferencia entre el esófago, estómago, intestino delgado e intestino grueso está dada por las características propias que adopta la mucosa en cada una de estos órganos que le confieren diferencias funcionales.

De acuerdo a las características de la mucosa pueden distinguirse diferentes regiones en el estómago ya que el resto de las tunicas son

esencialmente similares. De esa manera pueden diferenciarse las regiones pilórica, fúndica y cardial (Reith y Ross, 1969).

La mucosa gástrica se divide en no secretora o aglandular y secretora o glandular, zonas que varían en su distribución e importancia entre especies. El estómago simple de los humanos, cerdos y perros está recubierto de tres tipos principales de tejidos: mucosa pilórica, mucosa propia gástrica y mucosa del cardias. La mucosa pilórica recubre la porción aboral del estómago simple. En posición oral con respecto a ésta, se encuentra un segmento relativamente grande de mucosa propia gástrica, la cual secreta pepsinógeno y HCl. La mucosa propia gástrica se funde con la mucosa del cardias cerca de la unión gastroesofágica. El estómago del caballo también es simple pero su extremidad oral está cubierta por una extensa región de epitelio escamoso estratificado (Fig.6).

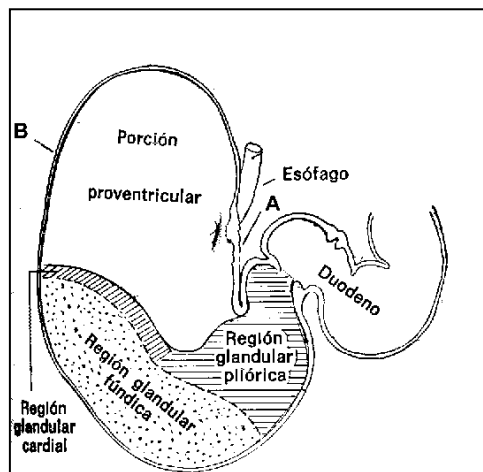


Fig 6: Esquema de las zonas mucosas del estómago de los equinos. A: curvatura menor. B: curvatura mayor. Modificado de Sisson (1996).

La distribución de epitelio gástrico en la rata y en los ratones es similar a la del caballo, pero en éste la cavidad está dividida parcialmente en dos compartimentos por una constricción en la unión de los epitelios glandular del cardias y escamoso estratificado.

La superficie de la zona glandular del estómago tiene numerosas depresiones llamadas favéolas, fositas o criptas gástricas. En el fondo de

las criptas se abren glándulas que, cuando se encuentran en la vecindad del orificio cardial se denominan glándulas cardiales, de la misma manera, las que se encuentran en proximidad del orificio pilórico se denominan glándulas pilóricas. Si bien toda la superficie del estómago está ocupada por glándulas gástricas y el epitelio superficial que se continúa en las criptas es igual en todas las partes del estómago, las glándulas son diferentes. Esta diferencia hace que se describan tres zonas mucosas, cardial, fúndica y pilórica.

Se describirán a continuación las distintas estructuras de la capa mucosa y sus funciones que resultan de importancia en la fisiopatología de la formación de la úlcera gástrica y sus tratamientos.

3.2.2. Epitelio superficial

El epitelio de la superficie gástrica y de las criptas es cilíndrico, sin embargo, constituye un tipo especial de epitelio ya que sus células producen mucus.

En el estómago, el citoplasma de cada célula de la superficie y de las criptas contiene un cáliz mucoso distal al núcleo de tal modo que todo el epitelio forma a este nivel una capa compuesta de células que reciben el nombre de células parietales superficiales que secretan mucus insoluble y una solución salina basal.

El contenido de gránulos de mucígeno disminuye a medida que se penetra en las criptas y simultáneamente las células se hacen más bajas. La parte apical posee cortas microvellosidades.

3.2.3. Glándulas gástricas

Las características histológicas y funcionales de las glándulas gástricas varían según la región en que se encuentren recibiendo el nombre de glándulas fúndicas, cardiales y pilóricas. Cada túbulo glandular se compone de tres secciones: una principal profunda, un cuello medio y un istmo superior.

En cada glándula se encuentran cuatro tipos celulares: principales, parietales, mucosas del cuello que elaboran un contenido mucoso que difiere del producido por la células superficiales y endócrinas.

Las células principales contienen gránulos con pepsinógeno, un precursor de la enzima proteolítica pepsina. Las células parietales u oxínticas producen el contenido de ácido clorhídrico. Mientras que las células principales se encuentran en mayor número en la parte principal de las glándulas, las parietales se localizan a nivel del cuello. Las células mucosas del cuello están ubicadas entre las células parietales del cuello de la glándula, son cilíndricas bajas con un núcleo algo aplanado (Fig. 7).

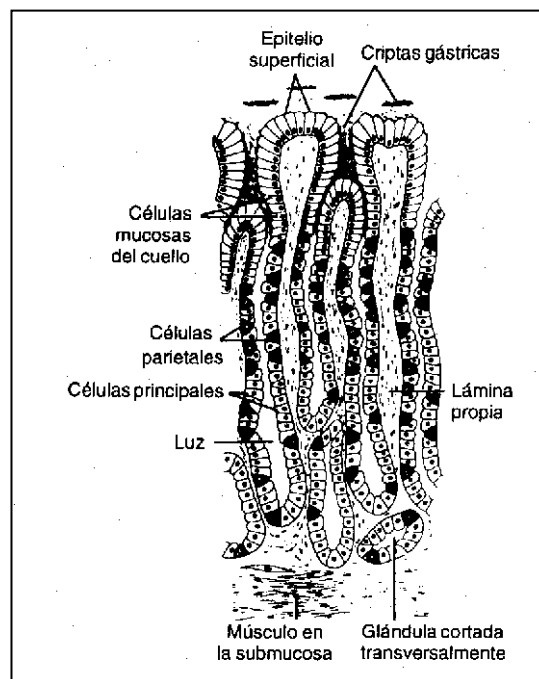


Fig. 7: Esquema de una glándula gástrica. Extraído de Ganong (1998).

3.2.4. Capa muscular de la mucosa, lámina propia, lámina muscular, túnica submucosa, muscular y serosa

Por debajo de la capa muscular se encuentra la lámina propia que

ocupa el espacio existente entre las glándulas y las criptas y está formada por tejido conectivo reticular laxo muy rico en fibroblastos, linfocitos pequeños, células plasmáticas, macrófagos, eosinófilos y mastocitos. El tejido está ricamente vascularizado y posee fibras nerviosas que no llegan a conectarse en forma directa con las células glandulares. Debajo de la lámina propia se encuentra la lámina muscular de la mucosa formada por dos capas, una interna circular y otra externa longitudinal. Finalmente, por debajo de la muscular de la mucosa se encuentra la túnica submucosa, muscular y serosa (Geneser, 1997).

3.3. Histofisiología del estómago

3.3.1. Motilidad gástrica

Según las funciones mecánicas que permiten almacenar y liberar en forma controlada el bolo alimenticio se puede dividir al estómago en tres zonas. La porción dorsal o fondo recibe y almacena el contenido adaptándose al volumen para evitar la acumulación de presión excesiva. La región fúndica mezcla el alimento con la saliva y el jugo gástrico y por último el antro bombea y regula la propulsión del alimento a través del píloro, por otra parte, impele hacia atrás el contenido evitando el pasaje de partículas groseras al intestino.

El alimento que ingresa a la luz del órgano se localiza en el centro del contenido gástrico existente quedando expuesto en mayor grado la parte externa del bolo alimenticio. De esta forma, los alimentos que ingresan desplazan a los que se encuentran en la periferia exponiéndolos en mayor grado a los jugos gástricos, mientras tanto, el centro del bolo mantiene un pH relativamente alto permitiendo aún la acción de la ptilina. Si no ingresa más alimento, la estructura del bolo alimenticio que se aloja en la región fúndica no cambia su configuración hasta que éste se desplaza hasta el antro pilórico. Si el alimento no está en condiciones de atravesar el píloro, éste es expulsado desde el antro hacia la porción cefálica desde donde reanuda el proceso. (Jerzey Glass, 1978b).

El vaciamiento gástrico está controlado principalmente por reflejos inhibidores. La actividad electromiográfica que se presenta en la mitad del cuerpo y antro del estómago está representada por potenciales eléctricos que se generan en el cuerpo medio. Luego se diseminan al cuerpo y antro en dirección al píloro. Estas ondas lentas tienen la particularidad de propagarse desde el punto de origen en intensidad y velocidad creciente y pueden coincidir o no con contracciones musculares. Cuando se presentan, por ser que éstas se propagan con mayor intensidad hacia el antro, producen vigorosas contracciones. De esta forma, las ondas lentas actúan como un reloj que indican, en el caso que deba producirse una contracción, cuando debe hacerlo.

La respuesta mecánica a la onda lenta está gobernada por influencias nerviosas y hormonales. Por ejemplo, la distensión del estómago produce un estímulo vagal a través de receptores mecánicos localizados en su pared que induce la aparición de contracciones peristálticas.

El reflejo inhibitor de estas contracciones, llamado enterogástrico, se produce a través de receptores ubicados en el duodeno que controlan la composición química del contenido expulsado por el estómago. Un conjunto de osmorreceptores y de receptores que controlan el pH actuarían sobre nervios sensitivos inhibiendo la motilidad. Otros reflejos como el dolor y la distensión duodenal también tendrían efecto inhibitor.

La presencia de lípidos de 12 a 18 átomos de carbono provocarían una liberación de tipo hormonal de colecistoquinina produciendo disminución de la motilidad gástrica.

Algunos aminoácidos como el triptofano provocan la liberación de colecistocinina, mientras que algunas proteínas y carbohidratos estimulan los osmorreceptores.

Por lo expuesto, puede decirse en general que la liberación gradual del contenido del estómago está regulada por mecanismos hormonales y nerviosos locales que desencadenan una respuesta inhibitoria en presencia

de soluciones hipertónicas o demasiado ácidas y en presencia de cantidades excesivas de lípidos, carbohidratos, proteínas o soluciones irritantes (Argenzio, 1999b). La motilidad además, es inhibida por la hormona péptido inhibitoria gástrica producida por las células K de la mucosa del intestino delgado.

3.3.2. *Secreción de ácido clorhídrico*

Las células parietales de la región oxíntica secretan iones H^+ y Cl^- en altas concentraciones. Este proceso requiere de energía que proviene de la hidrólisis del ATP ya que la concentración de iones H^+ en el jugo gástrico es de 3 a 4 millones de veces mayor que en el plasma.

La liberación de ácido gástrico por parte de las células parietales puede estimularse por medio de tres sustancias. La acetilcolina lo hace a través de los receptores muscarínicos M_3 , la histamina por medio de los receptores H_2 y por último la gastrina a través de los receptores de la gastrina ubicados en las células parietales (Ganong, 1998).

Estas tres sustancias actúan activando las células parietales, sin embargo, es preciso que esté presente la histamina para que las otras dos incrementen su acción. Un bloqueo del receptor de la histamina produce respuestas débiles a la acción de la acetilcolina y gastrina, lo que explica la mayor eficacia de los medicamentos que bloquean la histamina, como la cimetidina, frente a otros que bloquean los receptores colinérgicos como la atropina o la proglumida que inhiben a los receptores de la gastrina.

La regulación de la secreción gástrica según Ruiz de Aguiar y Orejas (1992) y Ruckebusch et al. (1994b), puede dividirse para su estudio en cuatro etapas que no están perfectamente separadas, sino que una se interpone con la otra.

Las tres vías principales que regulan la secreción de ácido gástrico tienen como efectos principales la estimulación neuronal a través del nervio vago, la estimulación endócrina por medio de la gastrina liberada por las células G antrales y la estimulación paracrina por la liberación local de

histamina a partir de células de tipo enterocromafines.

Una de las etapas llamada cefálica, comienza con estímulos visuales, olfatorios, gustativos y por la masticación y deglución de alimentos a nivel central. Estos estímulos, según su origen, producen respuestas de distinta intensidad que desencadenan una respuesta vagal con liberación posganglionar de acetilcolina. Esta actividad estimuladora de las células parietales puede ser suprimida por atropina o pirenzepina. Por otra parte, el nervio vago produce la liberación de gastrina, teniendo esta acción como intermediario a la bombesina que se libera de los nervios entéricos.

La estimulación de las células G duodenales y antrales producen un reflejo vagal que libera histamina por parte de las células enterocromafines. La histamina, a su vez, activa los receptores H₂ de la célula parietal que están relacionados con la estimulación de la adenil ciclasa, con activación de la vía del AMPc. La gastrina y los estímulos muscarínicos pueden actuar de manera directa en la célula parietal activando las vías sensibles al Ca⁺⁺. Debido a este mecanismo de acción, los antagonistas de los receptores H₂ bloquean los efectos de la histamina en forma efectiva, mientras que interfieren los efectos de la acetilcolina y la gastrina. Se debe observar que tanto la gastrina como la acetilcolina estimulan de forma indirecta a las células parietales promoviendo la liberación paracrina de histamina por parte de las células enterocromafines.

La bomba de protones puede activarse por la vía del AMPc y la dependiente del Ca⁺⁺ o por ambas por medio de la activación de la H⁺,K⁺-ATPasa en las células parietales. Estas células poseen una estructura que les permite aumentar el área de contacto con la luz gástrica para facilitar el intercambio de H⁺ y K⁺. Un sistema de canalículos que se abren hacia la membrana apical de la célula parietal se conectan con estructuras tubovesiculares que contienen en sus paredes moléculas de H⁺,K⁺-ATPasa cuando la célula es activada, quedando esta enzima expuesta al K⁺ en el líquido extracelular permitiendo el intercambio H⁺ por K⁺.

Estos mecanismos que involucran a la etapa cefálica explican el

moderado efecto que producen los agentes anticolinérgicos sobre la formación de ácido gástrico, la eficacia con que los bloqueantes H₂ inhiben la secreción, los efectos de los antiácidos en la neutralización y la conservación de la acidez gástrica y los inhibidores de la bomba de protones como el omeprazol.

La presencia de alimento en el estómago produce reflejos locales y vagales. Los reflejos locales activan a los receptores de estiramiento a través de fibras cortas intramurales provocando la secreción ácida. La vagotomía reduce en un 80 % el reflejo a la distensión, siendo éste el principal mecanismo activador de la secreción, al cual se suman la calidad del alimento principalmente de alto contenido proteico y el pH. La elevación del pH hasta 3,0 - 3,5 produce estimulación de la gastrina, la cual se inhibe cuando los valores descienden a 1,5. Este mecanismo es conocido como la segunda etapa y se la responsabiliza de la secreción del 40 al 50 % del total de la secreción ácida.

La tercera etapa o fase intestinal comienza con la entrada del alimento al duodeno y la posterior secreción de hormonas. La presencia de estas hormonas y su acción no es constante en todas las especies y suelen denominarse como enterogastronas. Entre ellas pueden mencionarse la gastrina intestinal, colecistocinina, enterogastrona y péptido inhibidor gástrico.

Mecanismos de retroalimentación negativa e inhibidores sucesivos o sinérgicos se producen a medida que el proceso de digestión avanza. De esta manera, la llegada al duodeno de soluciones hiperosmolares o ácidas inhibe la secreción ácida y como se señalara anteriormente la motilidad gástrica. Por otra parte puede señalarse que la fase intestinal cuenta con un componente colinérgico para estimular la secreción gástrica.

Durante la etapa basal o interdigestiva se segregan cantidades pequeñas de jugo gástrico sin estímulo externo. Esta secreción, tanto en la fase digestiva como en ayunas es mayor en los varones, hecho que coincide con las estadísticas de incidencia de la enfermedad (Crawford,

1998) y se postula que esta particularidad estaría producida por una mayor masa de células parietales en la población masculina en contraposición de una sensibilidad menor a la gastrina por parte de las células parietales de las mujeres (Ruiz de Aguiar y Orejas, 1992). En los animales no hay descritos datos diferenciales entre sexos en la incidencia de la enfermedad.

La cuarta etapa o etapa basal tiene particular importancia para la génesis de las úlceras provocadas por estrés, que son uno de los motivos de la presente investigación, ya que factores emocionales o de estrés de los sujetos pueden aumentar notablemente la secreción de jugo gástrico basal o interdigestivo (Ruiz de Aguiar y Orejas, 1992). La contribución realizada por William Beaumont sobre su paciente Alexis Saint Martin quien convivió luego de un accidente durante 59 años con una fístula gástrica, revolucionaron el pensamiento científico sobre las funciones del estómago y el jugo gástrico mediante detalladas experiencias, entre las que observó las influencias de las emociones sobre la digestión de los alimentos. Investigaciones posteriores en otros pacientes con fístulas gástricas han determinado una respuesta diferencial según el estado emocional que manifieste el paciente, así, aquellos que manifiestan ira y hostilidad se relacionan con aumento de la turgencia, hiperemia e hipersecreción de la mucosa gástrica, mientras que el temor y la depresión disminuyen la secreción gástrica, el flujo sanguíneo e inhiben la motilidad (Ganong, 1998).

3.3.3. Secreción de mucus y bicarbonato

El epitelio de la mucosa gástrica y de las células mucosas del cuello secretan el moco gástrico. Esta sustancia es químicamente una glucoproteína llamada mucina que posee un núcleo proteico, unida por puentes disulfuro y cadenas laterales de hidratos de carbono. Estas moléculas, a través de un proceso de polimerización, forman un gel viscoso que contiene un 5 % de proteínas y un 95 % de agua.

El bicarbonato es producido y secretado a nivel de las glándulas del cuerpo gástrico y de la secreción no parietal.

El moco secretado forma una capa sobre la superficie mucosa que le permite resistir las agresiones producidas por el ácido clorhídrico, la pepsina y agentes nocivos que ingresan con la ingesta tales como agentes microbianos y químicos. Este mecanismo, denominado "citoprotección" por Robert (1979), está integrado por un conjunto de factores que actúan formando lo que ha dado en llamarse barrera mucosa gástrica.

3.3.4. *Barrera mucosa gástrica*

En la actualidad se consideran varios mecanismos implicados en preservar la mucosa gástrica. Entre ellos se describen la secreción de moco y bicarbonato, barrera bicarbonato-moco, resistencia eléctrica de la membrana apical, capacidad regenerativa de las células, restitución celular, flujo sanguíneo de la mucosa y los mecanismos de citoprotección mediados a través de las prostaglandinas (PGs).

La barrera bicarbonato-moco produce un gradiente de pH que va de 1,5 a 7,0 desde la luz del órgano hacia la superficie del epitelio. El moco forma una capa inmóvil adyacente a la superficie que retiene al bicarbonato liberado. A medida que éste progresa hacia la luz del órgano neutraliza el ion H^+ que está difundiendo en sentido contrario y lo neutraliza. Debido a que la concentración del ion H^+ es mucho mayor en la luz del órgano que la de la célula o lámina propia, esta barrera bicarbonato-moco evita la difusión retrógrada del ion hacia los tejidos circundantes (Fig. 8).

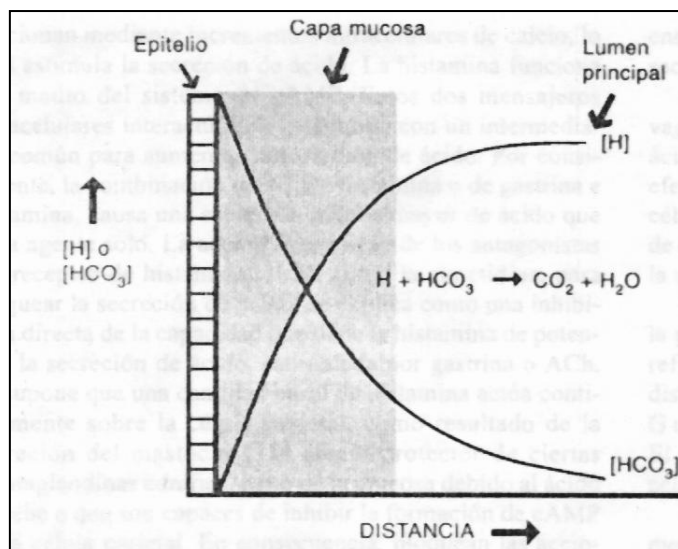


Fig. 8: Esquema del mecanismo de neutralización del ion H^+ en la barrera bicarbonato-moco de la mucosa gástrica.

Sobre la superficie mucosa gástrica hay una capa de fosfolípidos y sus ácidos grasos relacionados que se denomina capa surfactante. Esta posee carga eléctrica positiva hacia la mucosa y negativa hacia el lumen creando una capa fuertemente hidrofóbica que impide el paso de sustancias hidrosolubles.

Cuando el *Helicobacter pylori* coloniza la mucosa gástrica digiere la capa surfactante, cubriéndose con la misma para su propia defensa. Este organismo de forma espiralada, Gram negativo, conocido antiguamente como *Campylobacter pylori*, posee una gran actividad enzimática de ureasa, propiedad que se utiliza para su investigación. La forma espiralada del *Helicobacter* le permite la invasión del mucus que recubre la pared del estómago produciendo inflamación, gastritis, dispepsia y en algunos casos la erosión de la pared estomacal desarrollando úlceras.

La resistencia eléctrica de la membrana celular apical y de los complejos de unión del área de la glándula oxíntica es extremadamente grande. Esta resistencia eléctrica, junto con sus cargas positivas actúan como una barrera para los cationes H^+ .

La diferencia de potencial a través de la mucosa se toma como un índice del buen funcionamiento del complejo mucosa-barrera mucosa ya que se lo ha relacionado con la capacidad regenerativa de las células. Por otra parte, el mecanismo secretorio de ácido estaría restringido a determinados sitios, penetrando el gel mucoso a través de canales estrechos labrados hacia la superficie, evitando de esta manera la difusión y posterior acidificación del mucus.

El epitelio de la superficie secreta iones bicarbonato y éstos quedan atrapados en el gel mucoso. Los iones H^+ que se difunden del lumen hacia el epitelio, se neutralizan en esta zona y su concentración se aproxima a cero cerca del epitelio.

Las prostaglandinas endógenas, que se originan a partir de los fosfolípidos de la bicapa lipídica de la membrana celular, parecen ser importantes en la defensa de la mucosa gástrica. Aunque no se conoce el mecanismo preciso por el que las PGs protegen al epitelio, ciertos efectos, como el aumento del flujo sanguíneo de la mucosa y el estímulo de secreción de bicarbonato por células de la superficie, son probablemente importantes. Además, estos compuestos pueden conferir cierto grado de citoprotección directa a la mucosa.

Aunque estos mecanismos proporcionan normalmente una barrera eficaz contra el ion H^+ y la pepsina, hay algunos compuestos capaces de franquear la barrera, por ejemplo ácidos débiles tales como la aspirina y el ácido acético, medicamentos antiinflamatorios no esteroideos y sales biliares. La acción de las drogas antiinflamatorias no esteroideas sobre la mucosa gástrica puede deberse a la inhibición de la síntesis endógena de prostaglandinas. La administración de prostaglandinas exógenas previene el daño gástrico provocado por la aspirina (Kauffman y Grossman, 1978; Tepperman et al., 1978; Guth et al., 1979). Cantidades importantes de iones H^+ difunden nuevamente hacia el tejido una vez que la barrera se rompe. Esto provoca que las células cebadas o mastocitos liberen histamina e incrementen la permeabilidad capilar. El resultado es la

formación de edema y el desplazamiento de líquido extracelular hacia el lumen. El daño a las células causa fuga de K^+ hacia el lumen y si el daño es grave, se presenta sangrado capilar y aparece sangre en la luz del estómago.

Para mantener la integridad del epitelio de la mucosa gástrica es necesario que se produzca un proceso de renovación celular continua. Cuando se producen lesiones, compuestos como las PGs endógenas o sintéticas exógenas promueven la reparación celular y la cicatrización (Svanes et al., 1982).

En la saliva y secreción duodenal, se ha encontrado un polipéptido que contribuye al aumento de las PGs endógenas y promueve el flujo sanguíneo mucoso. Otra sustancia de naturaleza proteica secretada por macrófagos, mastocitos y tejidos neuroectodérmicos actuarían favoreciendo la formación de tejido de granulación induciendo neoformación vascular, el crecimiento de fibroblastos y macrófagos del epitelio.

Estudios recientes proporcionan pruebas de un mecanismo adicional en la protección de la mucosa gástrica. Este fenómeno denominado restitución, es un proceso por el cual el epitelio superficial se restablece en minutos después de denudación completa por diversos agentes agresivos. El proceso incluye mecanismos migratorios activos del epitelio, células viables adyacentes a áreas dañadas migran a la superficie y se extienden sobre el área denudada mediante pseudópodos. Así, una superficie completamente llana se cubre rápidamente con tales células, lo que proporciona una barrera eficaz contra moléculas grandes en el lumen. Algunos consideran este proceso como la primera línea de defensa contra el daño a la mucosa (Argenzio et al., 1999b; Ruíz de Aguiar y Orejas, 1992).

Todos estos mecanismos de regeneración celular requieren de un pH cercano a 3,0 para que se produzcan, de ahí la importancia de la terapia con antisecretorios.

3.3.5. *Enzimas del jugo gástrico*

En el estómago se produce la hidrólisis parcial de las proteínas. Esta función es cumplida por la pepsina secretada por las células principales en forma de la proenzima pepsinógeno, la cual por acción del HCl pasa a pepsina.

La mucosa gástrica puede secretar varios tipos de pepsinógenos que pueden dividirse en dos grupos histoquímicos diferentes el pepsinógeno I y el pepsinógeno II.

El pepsinógeno I se encuentra sólo en la zona secretora de ácido mientras que el pepsinógeno II es secretado también en la región pilórica.

La producción máxima de HCl se correlaciona con esta enzima que puede determinarse a través de los niveles eliminados por orina, ya que del total de la proenzima producida se estima que un 99 % es liberado a la luz del órgano y el 1 % restante se absorbe por sangre y es eliminado por orina recibiendo el nombre de uropepsina.

Esta enzima degrada todas las proteínas a excepción de queratinas, mucoproteínas y protaminas. El producto de la reacción enzimática da por resultado moléculas de alto peso molecular denominadas proteasas y peptonas, ya que hidroliza uniones peptídicas alejadas de los extremos de la cadena proteica.

La enzima es activa a pH menores de 3,0, siendo el óptimo de 1,0 a 2,0. Esto es particularmente importante ya que liberación excesiva de HCl y de la pro-enzima facilita los procesos ulcerativos propendiendo a la autodigestión de la mucosa gástrica.

3.3.6. *Control e integración de la función gastrointestinal*

La motilidad gástrica, los mecanismos secretores y de absorción están regulados por dos sistemas, endócrino y nervioso. A su vez el sistema nervioso está integrado por el sistema nervioso autónomo y el sistema nervioso entérico.

Las señales nerviosas emitidas por el sistema nervioso autónomo regulan la actividad del sistema nervioso entérico. En general las fibras parasimpáticas aumentan la actividad contráctil y la secreción aunque éstas también terminan en neuronas que liberan sustancias inhibitoras, mientras que el sistema simpático inhibe la motilidad y el flujo sanguíneo, una respuesta protectora ante situaciones de estrés.

Los nervios adrenérgicos inhiben en forma indirecta la secreción al actuar sobre las terminaciones presinápticas impidiendo la liberación de acetilcolina.

Por otro lado las neuronas adrenérgicas posganglionares que inervan al conducto gastrointestinal cumplen distintas funciones dependiendo del neurotransmisor, así las que liberan neuroepinefrina y somatostatina pueden aumentar la absorción intestinal por medio de inervación directa de la mucosa, las que liberan norepinefrina y neuropéptido γ actuarían sobre los vasos sanguíneos y las que liberan neuroepinefrina sola, estarían relacionadas con patrones de motilidad.

La regulación de las funciones gastrointestinales son complejas ya que si bien la información que se transmite de receptores aferentes en el conducto gastrointestinal al núcleo dorsal del vago y de regreso a las neuronas del sistema nervioso entérico actúan como un acto reflejo, muchas fibras aferentes vagales terminan en el núcleo del tracto solitario, mientras que otras se originan en el núcleo dorsal del vago. En ocasiones se interponen interneuronas entre estos núcleos lo que permite que se procese y se altere información en el bulbo raquídeo antes de que regrese a estómago o intestino.

Las neuronas colinérgicas motoras que inervan al músculo o epitelios actúan a través de receptores muscarínicos colinérgicos por medio de la liberación de acetilcolina.

El sistema nervioso entérico posee cuerpos celulares localizados en el plexo submucoso y mioentérico de la pared del conducto gastrointestinal. Posee tres tipos celulares, las neuronas motoras que inervan al músculo o

epitelio pudiendo provocar tanto excitación como inhibición, las neuronas sensitivas que reciben información del músculo y mucosa y la transmiten a las neuronas motoras o a las interneuronas; estas últimas conforman el tercer tipo y su función es enviar información de un ganglio a otro y también, como fuera anteriormente mencionado, se proyectan fuera del conducto gastrointestinal.

Se conocen dos tipos de neuronas motoras, las colinérgicas que son excitadoras y liberan acetilcolina provocando aumento de la secreción por parte del tejido epitelial y contracción de músculo liso longitudinal y las vipérgidas que liberan el péptido intestinal vasoactivo que son básicamente inhibitoras.

El péptido intestinal vasoactivo produce relajación del músculo liso y vasodilatación, a la vez que aumenta la secreción por parte del tejido epitelial.

Las interneuronas se dividen en dos grupos. Las serotoninérgicas que contienen serotonina o 5-hidroxitriptamina, sustancia que puede activar tanto neuronas motoras excitatorias como inhibitoras. El otro grupo contiene péptidos en vez de aminas dentro de las cuales se incluyen las encefalinas con una actividad similar a la del opio. Otras neuronas peptidérgicas contienen somatostatina, una sustancia capaz de producir la parálisis total del músculo liso del conducto gastrointestinal.

Los cuerpos de las neuronas sensitivas se localizan en los ganglios nudosos de los nervios vagales, los ganglios de la raíz dorsal de la médula espinal y los ganglios del sistema nervioso entérico. Los ganglios nudosos y espinales transmiten información sensitiva al sistema nervioso central (SNC), mientras que los ganglios del sistema nervioso entérico transmiten información en forma de arcos reflejos locales o se conectan centralmente a los ganglios simpáticos prevertebrales y al SNC. Los receptores químicos y de presión transmiten la información sensitiva en forma de potenciales de acción al sistema nervioso entérico, SNC y ganglios prevertebrales.

El sistema endócrino posee dos mecanismos de acción. Una acción endócrina verdadera, que libera las hormonas peptídicas sobre un órgano lejano y una acción paracrina donde las células liberan sustancias que actúan en la cercanía inmediata.

Se conoce la existencia de varias hormonas gastrointestinales, siendo las más comunes la gastrina, secretina y colecistocinina, mientras que otras como el polipéptido pancreático, polipéptido inhibidor gástrico, motilina y enteroglucagón se encuentran en estudio y aún no se han caracterizado completamente sus funciones.

La gastrina actúa aumentando la secreción gástrica y estimulando el crecimiento de la mucosa, mientras que la colecistocinina estimula la secreción de enzimas pancreáticas y la secretina aumenta la secreción pancreática de HCO_3^- , sin embargo, estas serían las funciones primordiales de estas hormonas ya que también poseen otras funciones secundarias. Así la gastrina y la colecistocinina poseen acciones en común tales como la secreción de ácido gástrico, motilidad, secreción enzimática y crecimiento del tejido gástrico y pancreático (Argenzio, 1999a).

4.0. FISIOPATOLOGÍA DE LA ÚLCERA GÁSTRICA PROVOCADA POR ESTRÉS

La úlcera gástrica se produce como consecuencia del desequilibrio entre los mecanismos de defensa de la mucosa gastroduodenal y los agentes dañinos.

Se puede definir a las úlceras como una interrupción en la mucosa de la pared gástrica que penetra a través de la muscular de la mucosa hasta el interior de la submucosa o más profundamente.

Las úlceras pueden clasificarse como úlceras pépticas crónicas o úlceras gástricas agudas según su etiología. Las primeras tienen la característica de estar asociadas con las alteraciones secretorias del ácido y la pepsina mientras que las segundas están relacionadas con el estrés y su grado de afección se extiende a una lesión erosiva de la mucosa.

Las úlceras pépticas generalmente se localizan en la curvatura menor del estómago en las proximidades del límite de la mucosa corporal y antral. Con menor frecuencia en las paredes anterior y posterior. Generalmente se trata de lesiones en forma de sacabocados, de paredes relativamente rectas, redondeadas y ovals. El borde mucoso puede sobresalir de la base ligeramente, especialmente en la región más proximal de su circunferencia. Los márgenes suelen estar al nivel de la mucosa circundante o sólo ligeramente elevados. La profundidad de las úlceras varía desde lesiones superficiales que sólo interesan a la mucosa a profundamente excavadas y penetrantes. Puede ocurrir la perforación completa de la pared del estómago pudiendo ser ésta una perforación libre hacia la cavidad peritoneal o su base estar formada por otros órganos adheridos como el páncreas, hígado o grasa del epiplón.

La base de la úlcera péptica es lisa y brillante debido a la digestión peptídica de todo el exudado. Suelen observarse vasos trombosados que con frecuencia producen gravísimas hemorragias.

La mayoría de las úlceras sufre una retracción fibrosa de los bordes de manera que la mucosa circundante se contrae en forma de rayos que se irradian desde el cráter. Las zonas adyacentes se presentan edematosas y enrojecidas debido a la presencia, casi invariable, de gastritis.

El aspecto microscópico varía desde necrosis activa, pasando por inflamación crónica con cicatrización, hasta curación. En las úlceras activas con necrosis se visualizan cuatro zonas: la base y los márgenes, con una fina capa superficial de detritus fibronecróticos, no visibles macroscópicamente, debajo de esta capa está la zona de infiltración celular no específica, con predominio de neutrófilos, más abajo, en la base de la úlcera existe una zona activa de tejido de granulación y por último una zona que presenta el mismo tipo de tejido, está sobre una cicatriz fibrosa o de colágeno.

A diferencia de la úlcera péptica, la ulceración gástrica aguda o úlcera por estrés puede localizarse en cualquier parte de la mucosa

gástrica. Generalmente se trata de lesiones múltiples cuya profundidad va, desde una simple erosión que consiste en la descamación del epitelio superficial, hasta lesiones más profundas que interesan todo el espesor de la mucosa constituyendo una ulceración.

Las lesiones más superficiales son en esencia una extensión de la gastritis aguda erosiva, mientras que las más profundas son úlceras bien definidas, aunque no se trata de precursores de úlceras pépticas pues tienen una biopatología totalmente diferente.

Estas úlceras pueden formarse ante cualquier situación que provoque estrés, por ejemplo, en pacientes con shock, quemaduras extensas, aumento de la presión intracraneana, luego de un trauma quirúrgico o ante situaciones climáticas o de peligro extremo. Además, las úlceras agudas pueden provocarse por medio de agentes farmacéuticos como los analgésicos no esteroideos.

El término estrés involucra a una serie de estímulos nocivos que determinan un aumento de la hormona adenocorticotrófica (ACTH) circulante. Aún permanece desconocida en gran parte la razón por la cual es necesario que estén elevados los glucocorticoides para resistir el estrés.

La mayor parte de los estímulos que determinan un aumento de ACTH también activan al sistema nervioso simpático que disminuye la motilidad y el flujo sanguíneo gástrico y podrían por otra parte mantener una reactividad vascular a las catecolaminas provocando una disminución del flujo sanguíneo mucosal como una respuesta a la tensión.

Las distintas emociones que provocan situaciones de estrés pueden determinar tanto un aumento como una disminución de la motilidad gastrointestinal. Según el sujeto sometido al experimento interprete el factor de variación del experimento como una sensación de ira o temor pueden encontrarse distintas respuestas (Musial y Ench, 1993).

Hoy en día, se sostiene que el estrés produce aumentos de la concentración de los glucocorticoides a concentraciones farmacológicas que a corto plazo pueden salvar la vida, pero a largo plazo son

definitivamente dañinas y desequilibrantes (Ganong, 1998).

El mecanismo hipofisopararrenal de la secreción gástrica explica en parte los efectos de la formación de úlceras por estrés ya que la estimulación de la corteza suprarrenal aumenta la secreción de jugo gástrico. Cuando un sujeto es sometido a estrés o a la administración de ACTH o corticoides aumenta la cantidad de pepsina en el jugo gástrico a la vez que aumenta la concentración de pepsinógeno en plasma y uropepsina en orina. Sin embargo, el contenido de HCl puede aumentar moderadamente (Jerzy Glass, 1978b).

El aumento de pepsina actuaría digiriendo la mucosa gástrica que se halla debilitada por otros factores tales como la disminución del flujo sanguíneo. El estrés emocional produce cambios circulatorios similares a los que ocurren cuando el organismo está en condiciones de ejercicio, pero sin estarlo. Estos cambios están representados por un aumento del gasto cardíaco y un aumento de la presión sanguínea acompañados por un aumento del flujo sanguíneo muscular y estarían producidos por una influencia del área motora cortical que actuaría a través del hipotálamo para activar el patrón integrado del control cardiovascular durante el ejercicio (Detweiler, 1999a).

La descarga noradrenérgica en situaciones de estrés implica, como se dijo anteriormente, un aumento de la presión sanguínea por la vasoconstricción de las arteriolas, hecho que permite mantener la presión arterial y está producido por la descarga tónica de noradrenalina. La circulación esplánica está reducida y también la de órganos como el riñón y el hígado.

La acidosis sistémica que suele acompañar a estos procesos clínicos podría contribuir a la alteración de la mucosa gástrica, como consecuencia de la disminución del pH intracelular de las células de la mucosa que se encuentran hipóxicas debido a la vasoconstricción esplánica producida por el estrés (Crawford, 1998).

Todos los mecanismos citoprotectores mencionados en el punto

3.3.4. de esta sección, que contribuyen a mantener la integridad de la barrera mucosa gástrica, requieren de un flujo sanguíneo asegurado por una microcirculación eficiente que mantenga el equilibrio ácido-base y la capacidad secretoria.

Se han hallado algunas sustancias vasoactivas derivadas del endotelio vascular que tendrían particular importancia en los trastornos circulatorios de la mucosa gástrica que determinan un debilitamiento de la barrera gástrica. Entre estos factores relajantes derivados del endotelio se encuentra el óxido nitroso (NO).

El NO es uno de los principales mediadores de la relajación dependiente del endotelio y actúa a través de la vía de la L-arginina-óxido nitroso, reacción catalizada por la óxido nitroso sintasa. El NO activa el GMPc, que a través de un mecanismo aún incierto provoca relajación de los músculos lisos vasculares a la vez que inhibe la agregación y adhesión plaquetaria.

Otro factor relajante del endotelio es la prostaciclina, sustancia que se forma a partir de las PGs a través de la enzima prostaciclina sintasa y también puede formarse a partir de endoperóxidos derivados de las plaquetas. Estos compuestos producen relajación vascular mediante el AMPc y su producción aumenta en la hipoxia (Detweiler, 1999b).

Cuando procesos inflamatorios de distinta índole provocan isquemia celular, a través de las citoquinas y la adherencia de neutrófilos en el endotelio vascular, se produce la formación de radicales libres con capacidad de dañar la mucosa gástrica.

Existe un verdadero equilibrio entre la óxido nitroso sintasa, las PGs y las enzimas ciclooxigenasas en el mantenimiento de la integridad de la mucosa relacionado con la capacidad que poseen los tejidos de barrer o rescatar los radicales O_2 libres. Cuando se produce un desbalance se desencadena daño tisular.

La disminución de la circulación sanguínea produce una disminución en la producción de mucina que conduce a un debilitamiento de la barrera

mucosa quedando ahora el epitelio gástrico expuesto a la acción del ácido y la pepsina que provocan la digestión de la mucosa. Según el grado de profundidad, la lesión de la mucosa se caracteriza desde un punto de vista histopatológico como una erosión o una úlcera por estrés.

Morfológicamente estas úlceras son pequeñas y de forma circular. Raramente penetran más allá de la mucosa. El fondo de las mismas tiene un color rojo pardo oscuro, debido a la digestión ácida de la hemorragia acompañante. Pueden ser únicas, pero más frecuente es que sean múltiples y se encuentren diseminadas por toda la mucosa gástrica y el duodeno. El patrón de pliegues gástricos es, a diferencia de la úlcera péptica, normal. Microscópicamente, son lesiones abruptas, sin lesiones significativas en la mucosa adyacente. Dependiendo de la duración de la ulceración puede haber infiltración de sangre en la mucosa y submucosa y cierta reacción inflamatoria. Es destacable la ausencia de cicatrización y engrosamiento de los vasos sanguíneos. Cuando desaparecen los factores causantes ocurre la epitelización completa, la cual puede durar desde algunos días a varias semanas.

Los mecanismos de citoprotección también son llamados de vasoprotección debido a la importancia que posee el mantenimiento de la integridad del flujo vascular tanto en la prevención como en el tratamiento de la úlcera gástrica.

5.0. TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO DE LA ÚLCERA GÁSTRICA

Los avances en la comprensión de los procesos fisiológicos de las funciones del estómago han introducido cambios en el tratamiento de las úlceras gástricas logrando métodos más racionales y también más potentes a través de drogas selectivas.

La importancia de la dieta, tanto en calidad, como cantidad y frecuencia está referida a evitar la hipersecreción gástrica. Sin embargo, en la mayoría de los casos indicar una dieta sin medicación, no es suficiente para evitar las recidivas.

Medidas como aquellas que proponían realizar varias comidas al día para que el estómago siempre posea contenido sobre el cual pueda actuar el jugo gástrico, han sido dejadas de lado, ya que cada vez que se ingiere alimentos se produce una descarga. Por otro lado la ingesta de leche parecería tener un efecto adverso, tal vez por el contenido de Ca^{++} .

Siendo el factor emocional la causa de la formación de úlceras gástricas en las llamadas enfermedades psicósomáticas, los factores emocionales deben ser atendidos al mismo tiempo que la patología en sí. La administración de drogas ansiolíticas determina una mejor predisposición a la adaptación psicobiológica que ha quedado demostrada por la notable reducción a los efectos supresivos del castigo por el uso de los compuestos benzodiazepínicos en animales de experimentación. El riesgo potencial de incremento gradual de la dosis, dependencia física y sobredosis limita el uso de estas drogas, las que, por lo general, se evitan de prescribir o se lo hace por cortos períodos de tiempo (Baldessarini, 1985).

La utilización de simples sustancias que neutralizan químicamente el ácido estomacal, conocidas como antiácidos, producen un alivio pasajero al dolor y malestar que acompañan a la úlcera. Sin embargo, el pH gástrico puede aumentar definitivamente a los pocos minutos de ingerido el antiácido.

Las PGs al inhibir la actividad de la adenil ciclasa también reducen la producción de ácido, mientras que por otro lado aumentan la secreción de moco y bicarbonato por parte de las células epiteliales superficiales, contribuyendo a los efectos citoprotectores. Sustancias análogas a las PGs tales como 16,16-dimetil PGE_2 y el misoprostol reproducen los efectos de las PGs endógenas cuya importancia se puso de manifiesto con la utilización de los analgésicos antiinflamatorios no esteroides (AINES).

5.1. Drogas antagonistas del receptor de la H2

Químicamente estos antagonistas son congéneres de la histamina. La cimetidina, primer compuesto que se lanzó al mercado, conserva el anillo imidazol de la histamina. En años recientes se sintetizaron otros compuestos como la ranitidina que posee un anillo furano y la famotidina y la nizatidina que poseen un anillo tiazol. El desarrollo farmacológico de nuevos compuestos tales como la zolentidina está limitado debido a su alta liposolubilidad que evidencia una potencial capacidad para bloquear los receptores H2 en el SNC.

El hecho que los bloqueantes H2 protejan a los animales de experimentación contra la ulceración gástrica provocada por ligadura del píloro, estrés, salicilatos, agonistas de los receptores H2 y colinomiméticos sugiere que es la indicación adecuada para el tratamiento de las úlceras por estrés, aunque también contrarrestan la ulceración peptídica en los humanos promoviendo la cicatrización en unas ocho semanas de tratamiento.

Estas drogas poseen efectos adversos. La cimetidina produce reacciones en cerca del 3 % de los pacientes tratados, las cuales pueden presentarse como trastornos de la lactación, cefalalgia, mareos, náuseas, mialgias, erupciones cutáneas y prurito. La absorción a través de la barrera hematoencefálica produce sintomatología relacionada con el SNC tales como somnolencia y confusión. Finalmente suelen detectarse pérdida de la libido, impotencia y ginecomastia.

5.2. Inhibidores de la H⁺,K⁺-ATPasa

Siendo la bomba de protones el mediador final de la secreción de ácido, la inhibición de la misma resulta en el más efectivo método para controlar la acidez estomacal. Dos compuestos benzimidazoles son utilizados farmacológicamente con este fin, el lansoprazol y el omeprazol.

Los efectos colaterales observados están representados por trastornos gastrointestinales como diarreas, vómitos, náuseas y del SNC

que incluyen somnolencia, mareos y cefalalgias. Otros síntomas como erupciones cutáneas y un incremento de la aminotransferasa hepática también son descriptos. Existe también un riesgo potencial que no ha sido perfectamente demostrado provocado por el aumento del pH gástrico y la consecuente inhibición del poder bactericida del mismo. Esto podría provocar proliferación bacteriana excesiva en el tubo digestivo y aparición de neumonía nosocomial.

Actualmente se están desarrollando nuevos tipos de inhibidores de la H^+,K^+ -ATPasa que no se unan en forma covalente a la enzima.

5.3. Antiácidos

La neutralización intragástrica rápida con alcalinos absorbibles como el bicarbonato o carbonato de sodio fueron utilizados durante muchos años. Estos compuestos son de uso frecuente ya que proporcionan un efecto citoprotector sobre la mucosa gástrica y un alivio inmediato, aunque transitorio, a la sintomatología de la úlcera gástrica, sin embargo, poseen efectos adversos de consideración. El bicarbonato de sodio es muy hidrosoluble y es rápidamente eliminado del estómago, pero constituye una carga alcalina y de sodio para el organismo que debe eliminar, mientras que el bicarbonato de calcio puede estimular la secreción de gastrina y HCl por la sobrecarga del ion Ca^{++} . Estos compuestos producen liberación de CO_2 que suele distender el abdomen y producir eructos con reflujo de ácido.

El uso inadecuado de estos antiácidos que provocan una neutralización parcial actúan en forma negativa ya que a un pH de 2,0 la pepsina sufre una mayor actividad enzimática que a un pH 1,3. Otro de los inconvenientes de la administración de los antiácidos es el efecto rebote producido por la secreción persistente de gastrina luego de la administración, aún cuando el pH luminal haya regresado al valor de iones H^+ que inhiben su liberación.

Finalmente puede mencionarse que la ingestión prolongada de antiácidos predispone a las nefrolitiasis.

5.4. Drogas con acción citoprotectora

La acción benéfica del subcitrato de bismuto se debe más a sus efectos citoprotectores que antiácidos. Este compuesto es una sal compleja de bismuto del ácido cítrico, que a pH ácido produce quelación con proteínas de la base de las úlceras formando una barrera que promueve la cicatrización. Por otra parte, incrementa la secreción de moco e inhibe la acción de la pepsina. Este compuesto disminuye la absorción de otros fármacos y cuando se administra en forma excesiva el aumento de bismuto produce ataxia, encefalopatía y osteodistrofia.

El sucralfato, formado por el octasulfato de sacarosa y el hidróxido de polialuminio, sufre a pH menores de 4,0 una polimerización extensa formando un gel color blanco amarillento muy pegajoso que se adhiere fuertemente en la base de los cráteres de las úlceras por espacio de unas 6 horas. Este mecanismo es muy efectivo y promueve la curación, tal vez estimulando la secreción de PGs, adsorbiendo la pepsina y provocando estimulación local del factor de crecimiento epidérmico.

Los efectos adversos provocados por el sucralfato están localizados en trastornos del tracto intestinal debidos al Al^{3+} , sin embargo, posee poca toxicidad y su eficacia es comparable a la de los bloqueantes H₂ (Brunton, 1996).

En Argentina se analizó la diferencia entre los inhibidores de la bomba de protones y de los antihistamínicos H₂. El estudio consistió en evaluar la farmacocinética, usos en distintas patologías, dosis pediátricas y geriátricas, efectos adversos, contraindicaciones e interacciones, incluyendo un estudio farmacoeconómico. Se concluyó que los bloqueantes H₂ presentan mejores parámetros farmacocinéticos, menor costo y mayores aplicaciones terapéuticas que las restantes drogas, pero también presentan una mayor incidencia de efectos colaterales. Además, se

determinó que la ranitidina es la droga de mayor uso. El lansoprazol tiene mayor disponibilidad biológica que otros inhibidores de la bomba de protones, pero sus efectos adversos son mayores (Breggia et al., 2000).

Los análogos de las PGs endógenas como el misoprostol y el 16,16-dimetil PGE₂ actúan reforzando la barrera mucosa gástrica a través de distintos mecanismos.

Los eicosanoides, compuestos de cadenas hidrocarbonadas de C20 son derivados de ácidos grasos que desarrollan una variedad de acciones en los tejidos de los vertebrados. Estos compuestos cumplen un importante papel en los procesos inflamatorios. La utilización de diversos fármacos para inhibir enzimas específicas, logran mejorar notablemente la evolución de los procesos inflamatorios. Dentro de estos compuestos se encuentran los antiinflamatorios no esteroides (AINES). La utilización masiva de estos fármacos ha puesto de manifiesto, por un lado su efectividad y por otro sus efectos colaterales. Estudios sobre la toxicidad de los AINES exigió un amplio conocimiento de la biosíntesis y acciones de las PGs.

Los eicosanoides son compuestos fisiológica y farmacológicamente activos. Desde un punto de vista fisiológico actúan en forma local ya que funcionan a través de receptores enlazados a proteína G para estimular sus efectos bioquímicos. A diferencia de las hormonas, estos compuestos no son transportados al torrente sanguíneo, sino que actúan en el lugar donde se producen. Las vías metabólicas de estos compuestos son diferentes, compitiendo por la síntesis de las series llamadas de los prostanoïdes, que son las PGs y tromboxanos, con la de leucotrienos y lipoxinas, por el sustrato araquidonato. Estas vías se conocen como la vía de la ciclooxigenasa y la vía de la lipoxigenasa respectivamente.

En la figura 9 se esquematiza la conversión del ácido araquidónico en prostaglandinas y tromboxanos por la vía de la ciclooxigenasa y leucotrienos y lipoxinas por la vía de la lipoxigenasa. El esquema indica por qué los esteroides que inhiben la producción de los eicosanoides son mejores agentes antiinflamatorios que los medicamentos análogos de la

aspirina, los cuales inhiben a la ciclooxygenasa.

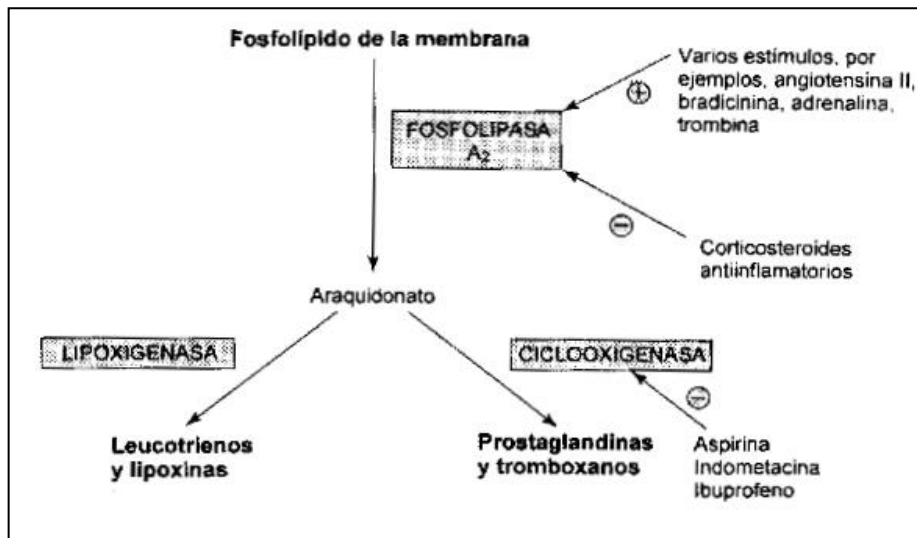


Fig. 9: Conversión del ácido araquidónico en eicosanoides.

Productos de la vía de la ciclooxygenasa tales como la PGE y la PGI₂ o sus análogos misoprostol y 16,16-dimetil PGE₂ protegen la mucosa gastrointestinal contra agentes nocivos, mientras que productos de las lipoxigenasas tales como los leucotrienos y el factor activador plaquetario inducen ulceración de la mucosa gástrica y colónica (Goel et al., 1996).

Hay tres grupos de eicosanoides, cada uno conteniendo PGs, tromboxanos, leucotrienos y posiblemente lipoxinas que son sintetizados a partir de ácidos eicosanoicos (C₂₀) derivados de los ácidos grasos esenciales como el linoleico y el α -linoleico o directamente del araquidonato y eicosapentaenoato de la dieta. Según el ácido graso que le de origen, son clasificadas en tres series y los subíndices 1, 2 y 3, por ejemplo PGI₂, indican a que serie corresponden. La serie 1 corresponde a los derivados del ácido 5,8,11,14-eicosatrienólico, la serie 2 al ácido araquidónico y la serie 3 al ácido α -linoleico.

El sustrato para la síntesis de las PGs es el araquidonato que

habitualmente se forma como resultado de la actividad de la enzima fosfolipasa A_2 a partir de los fosfolípidos de la membrana plasmática. La fosfolipasa A_2 se encuentra presente en la mayoría de las células de los mamíferos. Las enzimas del retículo endoplásmico liso transforman el araquidonato en las distintas prostaglandinas.

Un aspecto importante en la síntesis de PGs es que los mamíferos no pueden sintetizar algunos ácidos grasos insaturados y éstos deben ser ingeridos con la dieta. Dentro de estos ácidos grasos se encuentran los ácidos linoleico y α -linoleico, los que son esenciales tanto para el ser humano, como para un importante número de especies animales. El aumento en el consumo de estos ácidos grasos puede determinar un aumento de PGs debido a un aumento del sustrato (Schepp et al., 1988). La síntesis de PGs ocurre en forma gradual por un complejo de enzimas microsómicas de amplia distribución. En esta vía de síntesis la primera enzima es la prostaglandina-endoperoxidasa sintasa, llamada ciclooxigenasa. Existen dos isoformas de esta enzima que son reconocidas por sus iniciales como COX1 y COX2. La primera se encuentra en prácticamente todas las células, mientras que la segunda no aparece en forma constitutiva en las células, pero puede ser inducida por citocinas, factores de crecimiento y endotoxinas, efecto que es bloqueado por acción de los corticoides.

La ciclooxigenasa posee dos actividades enzimáticas separadas. La actividad ciclooxigenasa propiamente dicha que actúa sobre el ácido araquidónico produciendo una estructura en anillo para formar el endoperoxido cíclico PGG_2 y la actividad peroxidasa que transforma el PGG_2 en PGH_2 . Los endoperoxidos G y H son muy inestables y se transforman rápidamente en diversos productos que incluyen a las prostaglandinas PGE_2 , PGD_2 y PGF_2 o a prostaciclina PGI_2 y tromboxanos TXA_2 .

Casi todos los tejidos pueden sintetizar los productos intermedios endoperoxidos cíclicos a partir del ácido araquidónico, sin embargo, una vez libre su biotransformación varía de acuerdo a cada tejido. Cada tipo

celular produce una sola clase de prostanoides.

La activación de la COX1, enzima constitutiva, origina los prostanoides prostaglandinas y tromboxanos que presentan un efecto antitrombogénico y una acción citoprotectora gástrica, mientras que la COX2 es inducida por estímulos proinflamatorios mediados por citocinas.

La inflamación es un proceso dinámico, que responde a lesión tisular o infección. La fase temprana de la inflamación se caracteriza por la liberación secuencial de mediadores que incluyen la histamina, serotonina, cininas, prostanoides, sustancia P y óxido nítrico (Olarde, 1996).

El significado clínico de la acción diferencial de la COX1 y la COX2 debe ser tenido en cuenta ya que la primera, de amplia distribución y acciones múltiples, cuando es bloqueada por fármacos para tratar los procesos inflamatorios, presenta efectos indeseables tales como lesión de la mucosa gástrica, toxicidad renal y tendencia al sangrado. Por otro lado, la COX2, presente en neutrófilos, macrófagos, células endoteliales y fibroblastos, muestra poca o ninguna actividad en condiciones normales no existiendo de esta forma producción de PGs. Ante estímulos proinflamatorios, se activa la COX2.

La aspirina, la indometacina y el ibuprofeno inhiben a la ciclooxigenasa. Esta acción es utilizada para controlar los síntomas de la flogosis, edema, dolor, eritema y pirexia, sin embargo, estos compuestos inhiben tanto la COX1 como la COX2 produciendo los síntomas mencionados entre los cuales son de interés en el presente trabajo las lesiones gástricas.

La COX2 interviene produciendo una respuesta de crecimiento del endotelio vascular. Esto podría deberse a que el factor de crecimiento derivado de las plaquetas, el factor de crecimiento epidérmico y la trombina son fuertes inductores en la producción del ARNm COX2.

Los antiinflamatorios no esteroideos causan toxicidad gastrointestinal variable expresada por úlceras pépticas sangrantes, por ejemplo, la azapropazona y el ketoprofeno determinaron un riesgo altísimo, mientras

que para indometacina, naproxeno y piroxicam el riesgo fue intermedio y bajo para el ibuprofeno y el diclofenac. Esto se debe a que la selectividad de estos compuestos frente a las isoenzimas de la COX es diferencial. Aquellas que poseen mayor preferencia por la COX1 tendrán mayor riesgo de sangrado.

En la actualidad se están investigando compuestos que posean una amplia selectividad por la COX2.

La indometacina, por su actividad inhibitoria de la COX es utilizada en distintos modelos experimentales para determinar el rol de las prostaglandinas en los mecanismos protectores de la mucosa gastrointestinal (Waisman et al., 1985; Shah y Khan, 1997).

5.4.1. Relación entre la actividad de los ácidos grasos esenciales y la producción de PGs

Para lograr aumentar los niveles de PGs se han realizado experiencias aumentando la ingesta de ácidos grasos. Existe una correlación entre la actividad de los ácidos grasos esenciales y la producción de PGs. Además de contribuir en la formación de PGs están involucrados en la formación de membranas, sin embargo, estas dos actividades no se relacionan ya que las PGs por sí mismas, no alivian los síntomas de deficiencia de los ácidos grasos esenciales. El aumento de ácidos grasos esenciales estaría relacionado con el aumento de las PGs y manifiestan una correlación positiva con el efecto citoprotector. En ratas alimentadas con dietas ricas en ácido linoleico se incrementó la liberación de PGE₂ en el lumen gástrico y se redujo la secreción ácida estimulada con pentagastrina. También se logró prevenir la formación de úlceras inducidas por inmovilización y frío. Cuando los animales fueron tratados previamente con indometacina, los efectos del ácido linoleico sobre la formación de PGs, la liberación de ácido gástrico y las lesiones mucosales fueron reducidos en un 10 % (Schepp et al., 1988).

Sujetos humanos normales fueron sometidos a una dieta durante 14

- 20 días suplementada con ácido linoleico. Se encontró una reducción de la secreción de ácido gástrico, un aumento de la gastrina sérica, posiblemente en respuesta a la disminución de la secreción ácida, y un aumento de la PGE y su mayor metabolito la 13,14-dihidro-15-keto prostaglandina E₂ (Grant et al., 1988).

La ingestión de grandes cantidades de aceites de pescado que contienen ácido eicosapentaenoico se ha considerado como el factor que predispone a los esquimales de Groenlandia a tener una escasa incidencia de enfermedades cardiovasculares, una agregación plaquetaria disminuída y tiempos prolongados de coagulación. Las PGs de la serie 3 y los tromboxanos inhiben la liberación de araquidonato de los fosfolípidos y la conformación de las PGs y tromboxanos de la serie 2. La PGI₂ y PGI₃ son antiagregadores plaquetarios con actividad similar, mientras que los tromboxanos TXA₃ poseen menor efecto agregador que los TXA₂, por lo tanto, el equilibrio estaría desplazado contra la agregación. Esto explicaría la disminución de la agregación plaquetaria de los esquimales. Por otra parte, una mayor cantidad de lipoproteínas de baja densidad como el colesterol y el triacilglicerol se encuentran en baja cantidad en contraste con las de alta densidad, lo que explicaría la escasa frecuencia de arteriosclerosis e infarto de miocardio (Mayes, 1997).

El ensayo realizado por Auguste et al. (1990), determinó que la administración parenteral de ácido araquidónico reduce, pero no inhibe totalmente, la formación de úlceras gástricas inducidas por estrés en ratas. En este trabajo se sugiere que es probable que la disponibilidad de ácido araquidónico en la mucosa gástrica esté reducida por el espasmo vascular producido por el estrés.

5.4.2. Inhibición de síntesis de eicosanoides

La liberación inicial de precursores de ácidos grasos a partir de fosfolípidos de la membrana plasmática se inhibe por AMPc, el cual evita la acción de la fosfolipasa A₂ en la estructura de la membrana plasmática y la

subsecuente liberación de ácido araquidónico libre en las células.

El cortisol induce la producción intracelular de un polipéptido llamado lipocortina el cual inhibe a la fosfolipasa A₂ y la producción de ácido araquidónico (Mayes, 1997).

5.4.3. Mecanismo de acción de la indometacina

La ciclooxigenasa es una enzima capaz de catabolizar su propia destrucción. Por esta razón suele llamársele “enzima suicida”. La inactivación de las PGs es rápida y se logra por la presencia en los tejidos de la enzima 15-hidroxi prostaglandina dehidrogenasa. Esta enzima es inhibida por la indometacina con lo que puede lograrse aumentar la vida media de las PGs en el cuerpo. La indometacina bloquea de manera específica la actividad de la enzima ciclooxigenasa y la síntesis de PGs, pero no afecta las vías de lipoxigenasas para la síntesis de leucotrienos y lipoxinas.

Se ha determinado un aumento de la secreción ácida basal y de la secreción estimulada por histamina con la administración de indometacina en sujetos normales, efectos que se atribuyen a la disminución de los niveles de las PGs endógenas (Levine y Schwartzel, 1984; Feldman y Colturi, 1984).

La inhibición de la síntesis de PGs en el estómago y su importancia relacionada con el efecto citoprotector estaría dada en particular por la inhibición de la PGI₂ (Robert, 1979) y PGE₂ (Robert et al., 1976; Tepperman et al., 1978).

Estos eicosanoides inhiben la secreción ácida del estómago, intensifican la corriente sanguínea por la mucosa y estimulan la secreción de moco. Al suprimirse estas funciones el estómago se tornaría más sensible a sufrir daños (Mayes, 1997).

Por otro lado, la indometacina, a semejanza de otros AINES, desacopla la fosforilación oxidativa a concentraciones supratrapéuticas y deprime la biosíntesis de los mucopolisacáridos (Flower et al., 1985).

La indometacina y otros agentes AINES tales como ibuprofeno, ácido acetil salicílico y fenilbutazona son utilizados frecuentemente en modelos experimentales para inducir úlceras debido a sus propiedades que les confieren, por un lado un notable efecto antiinflamatorio y por otro efectos secundarios indeseables de importancia particularmente en todas las vías gastrointestinales superiores. Estas lesiones, que se caracterizan por úlceras sangrantes, a veces con hemorragias y perforaciones determinan condiciones ideales para el ensayo de drogas citoprotectoras (Miller y Jacobson, 1979).

5.4.4. Propiedades químicas y farmacológicas de los flavonoides

Los flavonoides son difenilpropanos con esqueletos de 15 C que provienen biogenéticamente de tres unidades de acetato (C6) y una unidad de fenilpropano (C6-C3). El anillo B proveniente de la condensación de las unidades acetato, está unido al C α de la unidad fenilpropano formando así los flavonoides propiamente dichos o flavanos. Estos compuestos polifenólicos, son fenilbenzopironas de bajo peso molecular derivados de la unión de tres anillos A, B y C, dos de ellos aromáticos. Presentan una gran variedad de estructuras básicas que dan lugar a una serie de compuestos que difieren en su grado de oxidación y sustituyentes (Fig. 10).

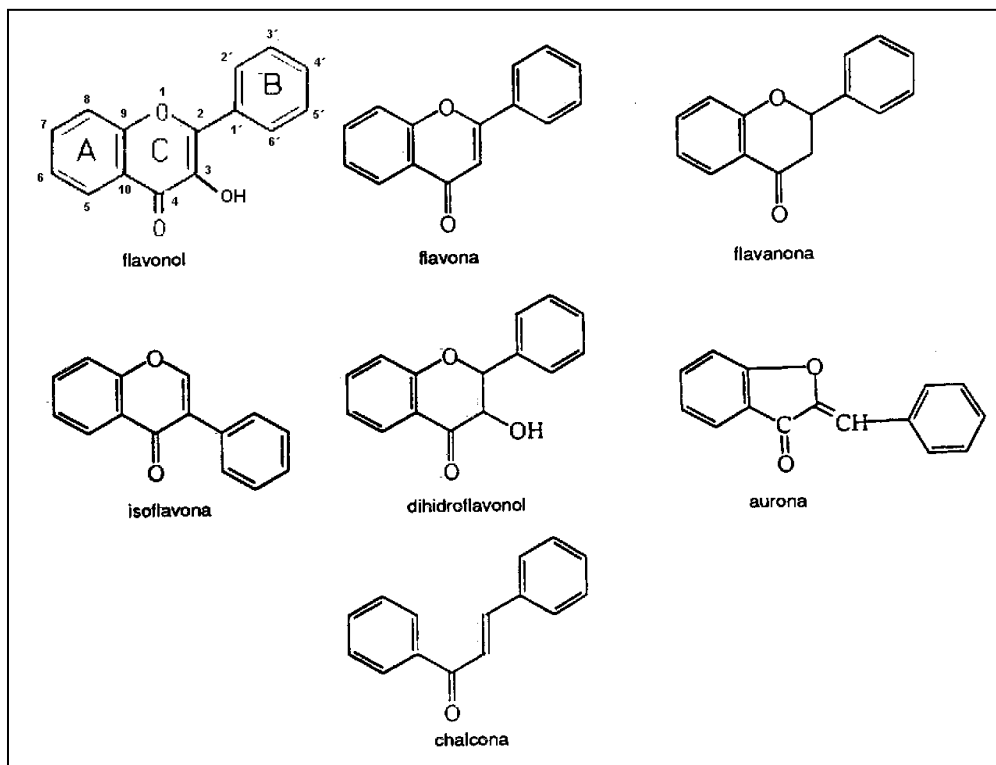


Fig. 10: Principales estructuras básicas de los flavonoides.

Estos compuestos incluyen sustancias coloreadas como las antocianinas, presentes en gran cantidad en frutos, flores y brácteas donde dan colores azules, violetas y rojos. Las chalconas tienen color anaranjado, los flavonoles y flavonas amarillo y las leucoantocianidinas incoloras.

Considerando la acción farmacológica de los flavonoides, los más importantes son aquellos que derivan del difenil-1,3-propeno o 2-fenilbenzopirano pues poseen un grupo carbonilo en C4, como por ejemplo las flavonas (Gros et al., 1985). Estos compuestos se encuentran generalmente unidos a azúcares en forma de glicósidos.

Los flavonoles son importantes constituyentes de la dieta humana, son de baja toxicidad y presentan numerosas actividades biológicas entre las que podemos mencionar efectos antibacterianos, antifúngicos, antivirales, mutagénicos demostrados in vitro, antiagregante plaquetario, antiespasmódico, inmunomodulador, hepatoprotector y ansiolítico.

Recientemente han sido investigados por sus efectos antiproliferativos, antioxidantes y antiinflamatorios (Martino, 2000).

Algunos flavonoides previenen la formación de úlceras en modelos experimentales. Entre ellos el canferol y la quercetina (Fig. 11).

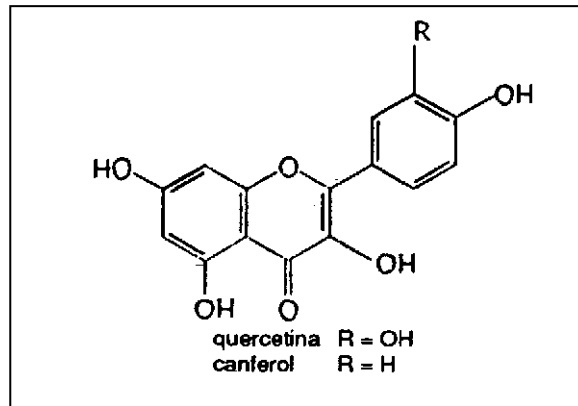


Fig. 11: Estructura química de quercetina y canferol.

El canferol, cuando es administrado intraperitonealmente posee efecto protector dosis-dependiente en ratas, previniendo la formación de úlceras gástricas en ratas inducidas por etanol e inmovilización y frío. Estudios sobre la liberación de eicosanoides en mucosa gástrica y colónica humana incubada, demuestran que el canferol aumenta la liberación de prostaglandinas por parte de la mucosa gástrica, mientras que en altas dosis inhibe prostanoides y leucotrienos C₄ liberados por ambas mucosas, gástrica y colónica. El efecto antiulcerogénico puede explicarse, como se verá más adelante, a través del papel de las PGs en los mecanismos de citoprotección. El posible mecanismo incluye inhibición de la secreción de ácido gástrico, estimulación de la secreción de bicarbonato, reducción de la exfoliación celular e incremento del flujo sanguíneo mucosal (Goel et al., 1996). Todas estas acciones contribuyen a preservar la barrera mucosa gástrica.

La quercetina es otro flavonoide que posee efecto antioxidante y actividad miolítica sobre la musculatura lisa gastrointestinal.

El estrés oxidativo ha sido propuesto como un importante factor etiopatogénico en la génesis de la úlcera gástrica debido a la lesión celular que produce. Estos efectos han sido estudiados luego de la administración de HCl y etanol, ya que producen un aumento de la peroxidación lipídica en la mucosa gástrica (Anandan et al., 1999). Los radicales libres son especies químicas que tienen un único electrón no paralelo en una órbita externa.

Uno de los productos finales de la respiración celular, la cual tiene lugar en las mitocondrias, es el radical superóxido. En el proceso de respiración celular la mayor parte de O_2 que llega a las mitocondrias es completamente reducido, es decir, adquiere electrones y se transforma en agua. Sin embargo, aproximadamente un 5 % se reduce sólo parcialmente, con la consecuente formación del radical superóxido.

El organismo cuenta con antioxidantes endógenos para controlar los procesos oxidativos, pero resultan insuficientes frente a ciertas agresiones. El estrés, la dieta inadecuada y la administración continua de medicamentos, provocan el aumento en forma descontrolada de reacciones de este tipo, lo que suele denominarse estrés oxidativo.

Un desbalance entre la formación y la terminación de radicales libres induce daño celular. El organismo utiliza antioxidantes endógenos y exógenos como la vitamina E, compuestos que contienen grupos sulfhidrilos como la cisteína y el glutatión y proteínas séricas como la albúmina, ceruloplasmina y transferrina. A la vez, existen sistemas enzimáticos como las enzimas superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa que ayudan a eliminar los excesos de radicales libres. Las plantas y productos obtenidos a partir de éstas son consideradas como una importante fuente de sustancias antioxidantes exógenas (Larson, 1988; Desmarchelier y Ciccía, 1998; Güntner et al., 1999; Nieva Moreno et al., 2000).

La quercetina y el canferol, por sus propiedades antioxidantes previenen las enfermedades cardíacas. Con el objeto de utilizar estos compuestos con fines preventivos se han realizado estudios para

determinar las fuentes naturales y su biodisponibilidad (de Vries et al., 1998; DuPont et al., 2000). Se ha encontrado que la cantidad, posición de la sustitución y naturaleza del azúcar es importante para determinar la potencial biodisponibilidad y actividad biológica de estos compuestos (Hollman y Katan, 1999).

La motilidad del estómago y su relación con la formación de úlceras gástricas ha sido motivo de estudio desde hace muchos años. Experiencias utilizando estimulación eléctrica vagal y drogas como la pilocarpina evidenciaron que la contracción de la mucosa producía trastornos circulatorios que desencadenaban desde erosiones de la mucosa de distinta intensidad hasta úlceras y perforaciones en conejos, gatos, perros y cobayos (Ivy et al., 1954). Durante estos estudios se desconocía aún gran parte de la acción del sistema nervioso central y entérico sobre la actividad gástrica y el papel de la barrera mucosa gástrica. Sin embargo, estas experiencias pusieron en evidencia la importancia de la motilidad gástrica y su relación con la génesis de las lesiones de la mucosa. Otros autores estudiaron en ratas el rol de la relajación de la musculatura gástrica en la citoprotección de una droga preparada a partir de tres plantas, encontrando que la motilidad gástrica juega un importante papel en la gastroprotección inducida por etanol (Lin y Tan, 1994).

Diferentes flavonoides han sido mencionados por sus efectos miolíticos sobre las contracciones espontáneas o provocadas por estímulos eléctricos y drogas agonistas del íleon aislado. Hammad y Abdalla (1997) mostraron los efectos inhibitorios sobre la motilidad en íleon aislado de rata de once flavonoides, determinando el siguiente orden de potencia de mayor a menor: galangina, quercetina, crisina, xantomicrool, flavona, naringenina, fisetina, morina y flavonona. Los flavonoides rutina y 3',5,7-trihidroxi-4'-metoxiflavona-7-rutosido no presentaron actividad significativa, concluyendo que la quercetina posee una importante acción miolítica en relación a los otros flavonoides y que aquellos compuestos que se encuentran conjugados con azúcares en su estructura no poseen actividad

importante sobre la motilidad. Las conclusiones de estos autores respecto a la rutina no coinciden con los resultados encontrados en experimentos in vivo en ratones por Di Carlo et al. (1993) quienes determinaron que este compuesto tiene efecto inhibitorio sobre la motilidad intestinal. Estos autores ensayaron además otros flavonoides tales como apigenina, flavona, canferol, morina, miricetina y naringenina, los cuales exhibieron un importante efecto inhibitorio cuando se administraron intraperitonealmente en dosis de 12,5 a 50 mg/kg en ratones. Otros compuestos tales como la silibina, naringenina y taxifolina necesitaron dosis intraperitoneales de 100 a 200 mg/kg de peso para producir una moderada acción inhibitoria sobre el tránsito intestinal. Es probable que las similitudes estructurales entre estos compuestos estén relacionadas con su actividad sobre la motilidad gastrointestinal y que la diferencia entre sus acciones se deba a la presencia o ausencia de determinados grupos químicos. El o los mecanismos de acción de estos compuestos estarían influenciados por la estructura de sus moléculas y mediados por receptores α_2 -adrenérgicos y calcio.

Distintas investigaciones han sido orientadas a elucidar el mecanismo de acción que actúa inhibiendo la musculatura lisa del tracto gastrointestinal. Algunos autores han concluido que este mecanismo está relacionado con el incremento de los niveles de nucleótidos cíclicos inducidos por la fosfodiesterasa, enzima inhibida por estos flavonoides (Beretz et al., 1980; Petkov et al., 1983). Otros estudios indican que su mecanismo de acción estaría relacionado con la movilización del calcio (Morales y Lazoya, 1994).

Estudios realizados administrando indometacina y rutina a ratas a las cuales se les indujo daño gástrico con etanol, determinaron que las prostaglandinas no están involucradas en el efecto gastroprotector observado (Pérez Guerrero et al., 1994).

La miricetina conjugada protegió el daño de la mucosa gástrica de ratones sometidos a estrés por frío e inmovilización y por etanol, sin que se

produzca un aumento de proteínas y hexosaminas. Estos resultados, llevados a cabo en ratas, sugieren que el mecanismo de acción de la miricetina no está relacionado con cambios secretorios que aumenten el contenido de glicoproteínas contenidas en el mucus gástrico (Reyes et al., 1996).

En modelos experimentales donde se utilizó etanol e indometacina como agente inductor de úlceras, se postuló que el mecanismo fisiopatológico de la lesión estaría relacionado con la peroxidación lipídica provocada por radicales O_2 libres. Otros agentes implicados en moderar las reacciones oxidativas serían el glutatión y los compuestos que contienen grupos sulfhidrilos. La enzima superóxido dismutasa, una importante atrapadora de radicales superóxidos y la glutatión peroxidasa, que elimina los peróxidos de hidrógeno y los lípidos hidroperóxidos, contribuyen a la protección celular. La quercetina ha sido reportada como un compuesto con fuerte acción antiperoxidante que contribuye a estas acciones (Martín et al., 1998).

5.4.5. Otros compuestos con acción citoprotectora

Las lactonas sesquiterpénicas son compuestos que poseen un esqueleto de 15 C que derivan de la unión de tres fragmentos de isopreno. Parte del esqueleto es un anillo metilbutenólido. Por deshidratación pueden formar derivados del naftaleno y del azuleno. Los derivados del naftaleno son los del tipo eudesmanólido o selenanólido, germacrenólido, eremofilanólido y drimanólido. Los derivados del azuleno son los del tipo guaianólido y pseudoguaianólido (Domínguez, 1979).

Estas sustancias amargas han sido identificadas en muchas plantas pertenecientes a Compositae como la *Arnica acaulis* (Herz y Sosa, 1998), *Blumea balsamifera* (Fujimoto et al., 1988), *Artemisia pontica* (Todorova et al., 1995) entre otras y también en otras especies de *Centaurea* (Jakupovic, 1986). Estos compuestos han sido asociados a efectos antitumorales, citotóxicos, antimicrobianos, fitotóxicos, insecticidas repelentes y por

producir toxicidad en el ganado (Lee et al., 1971; Rodríguez et al., 1976). Además, Rodríguez et al. (1976) mencionan el efecto antihelmíntico y ascaricida de las lactonas sesquiterpénicas y realizaron un estudio sobre la actividad antitumoral en tres líneas celulares, concluyendo que la presencia en la estructura de un grupo α -metileno- γ -butirolactona estaría relacionada con la actividad citotóxica.

La presencia de lactonas sesquiterpénicas aisladas de Cs (Binder et al., 1990a; Binder et al., 1990b; Bruno et al., 1991; Hamburger et al., 1993) (Fig. 12) fueron investigadas con el objeto de identificar el o los principios neurotóxicos de la planta. Los trabajos de Robles et al. (1995) indican como responsable de los efectos a la repina.

Los trabajos realizados por Giordano et al. (1997) sobre la *Artemisia douglasiana*, una planta que es utilizada por la medicina popular como antiulcerogénica, evidenciaron la presencia de un componente mayoritario, la dehidroleucodina (Fig. 13). Este compuesto posee la capacidad de prevenir la formación de úlceras gástricas y duodenales (Piezzi et al., 1995; Penissi et al., 1998) provocadas por varios agentes injuriantes.

Estudios teóricos y experimentales sobre 16 compuestos de estructura lactona sesquiterpénica determinaron que la presencia de los grupos α -metileno- γ -butirolactona y 2-cyclopenteno-1-ona serían los responsables de la acción citoprotectora y que ésta se realiza, en parte, por una reacción de Michael donde participarían grupos sulfhidrilos de péptidos propios de la mucosa gástrica (Enriz et al., 1994; Maria et al., 1995).

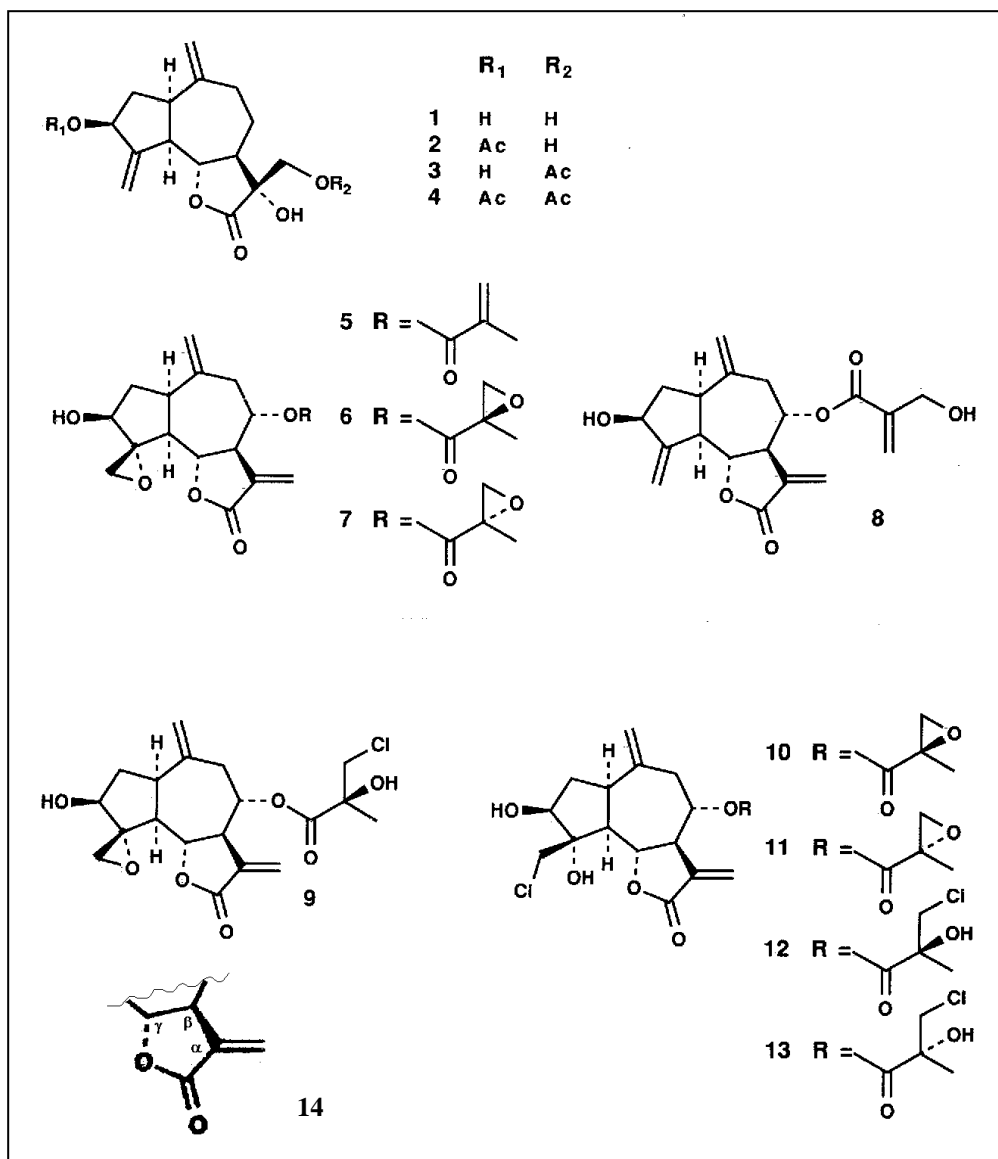


Fig. 12: Estructuras químicas de solstitialina (1), solstitialina 3-acetato (2), solstitialina 13-acetato (3), solstitialina 3,13-diacetato (4), epoxirepdiolido (5), repina (6), subteolido (7), cinaropicrina (8), acroptilina (9), solstitiolido (10), epsolstitiolido (11), centaurepentina (12) y epicentaurepentina (13). Grupo α -metileno- γ -butirolactona, biológicamente activo en diversos compuestos (14).

La dehidroleucodina posee un grupo α -metileno- γ -butirolactona (Fig. 12) y su mecanismo de acción estaría mediado por grupos sulfhidrilos y también por PGs ya que, cuando se bloqueó la síntesis de PGs con indometacina y los grupos sulfhidrilos con N-etilmaleimida, el efecto citoprotector se vio disminuido (Giordano et al., 1997; Penissi et al., 1998).

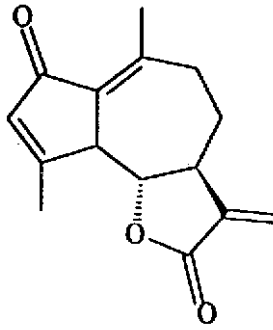


Fig. 13: Estructura química de la dehidroleucodina.

OBJETIVOS

Las finalidades del trabajo de tesis estuvieron dirigidas a evaluar las propiedades antiulcerosas de la *Centaurea solstitialis*, adaptando un modelo de inducción de úlceras provocadas por hipotermia e inmovilización. Se realizó una combinación de estudios fitoquímicos y farmacológicos que pusieron en evidencia los principales mecanismos de acción que previenen el daño gástrico. Para lograr estas finalidades fueron propuestos los siguientes objetivos:

- Determinar las propiedades antiulcerosas de extractos acuosos, metanólicos y clorofórmicos provenientes de capítulos de *Centaurea solstitialis* que se desarrolla en el departamento Maracó de la Provincia de La Pampa, Argentina.
- Evaluar la posible presentación de síntomas neurotóxicos o cambios fisiológicos que puedan interferir con los ensayos o el modelo experimental.
- Estudiar las acciones farmacológicas a través de las cuales los extractos acuoso, metanólico y clorofórmico de *Centaurea solstitialis* previenen el daño de la mucosa gástrica inducido por estrés.
- Investigar los cambios fisiológicos que produce la prueba de estrés sobre la temperatura corporal y el pH gástrico en ratones.
- Estudiar fitoquímicamente la fracción metanólica y clorofórmica en busca de compuestos con acción antiulcerosa.
- Evaluar los efectos de la administración de extractos metanólico y clorofórmico sobre la motilidad gastrointestinal.

- Determinar la relación entre las alteraciones de la motilidad gástrica y la formación de úlceras.
- Evaluar los efectos del o de los principio/s activo/s, aislados de la fracción metanólica de *Centaurea solstitialis*, sobre la actividad antiulcerosa y la motilidad gastrointestinal.
- Evaluar el efecto antioxidante de la fracción metanólica de *Centaurea solstitialis*.
- Investigar el posible efecto sedante del extracto acuoso de *Centaurea solstitialis*.
- Determinar la variación de los niveles plasmáticos de corticoides en ratones sometidos a estrés y los efectos de la administración de los extractos metanólico y clorofórmico.
- Estudiar el efecto de compuestos relacionados estructuralmente con flavonoides y lactonas sesquiterpénicas presentes en la *Centaurea solstitialis* sobre la actividad gastroprotectora y la motilidad gastrointestinal.

MATERIALES Y MÉTODOS

1.0. DETERMINACIÓN DEL EFECTO ANTIULCEROSO DE EXTRACTOS DE *CENTAUREA SOLSTITIALIS* EN RATAS

1.1. Material vegetal

Los capítulos de *Centaurea solstitialis* L. (Cs) fueron recolectados en la zona rural de General Pico, Departamento Maracó, Provincia de La Pampa durante los meses de enero y febrero. Un ejemplar fue depositado en el Herbario de la Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional de La Pampa, Argentina, R. Toso N° 1, (SRFA).

Los capítulos fueron cortados de la planta y secados al abrigo de la luz a temperatura ambiente.

1.2. Animales y vías de administración

Se utilizaron ratas Wistar hembras de 200 - 250 g de peso provistas por el Bioterio del Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia de la Universidad Nacional del Sur, Argentina. Los animales fueron privados del consumo de alimentos y agua durante 24 h previas al ensayo. La administración *per os* se realizó inmediatamente antes de inducir las úlceras.

1.3. Administración y dosis

La cantidad de extracto obtenido de 5 g de capítulos secos de Cs por animal, fue administrada por sonda gástrica suspendida en una solución de Carboximetilcelulosa (CMC) y Tween 80 (T80).

El ensayo se llevó a cabo administrando a un grupo de cinco ratas T80 + CMC como control. Otros cuatro grupos, de igual número de animales, fueron tratados con extractos acuoso, metanólico, metanólico-clorofórmico (1:1, v/v) y clorofórmico, todos ellos resuspendidos en una mezcla de T80 + CMC.

1.4. Preparación de extractos

Excipiente: para diluir los extractos se utilizó una solución de CMC al 0,5% y T80 al 0,05% en partes iguales (Ex).

Extracto acuoso: se colocaron 25 g de capítulos secos de Cs en 250 ml de agua destilada en ebullición durante 20 minutos (2x). Se juntaron los extractos, se filtraron con papel de filtro y se llevaron a sequedad a presión reducida (**rendimiento 23,75 %**). El residuo se resuspendió con 15 ml de Ex, obteniéndose 5 dosis de 3 ml cada una. Utilizando el mismo esquema de extracción, una alícuota de extracto acuoso fue llevado a sequedad y resuspendido con metanol para realizar las reacciones de caracterización de Shinoda (Shinoda, 1928) y cloruro férrico (Geissman, 1962).

Extracto clorofórmico: se colocaron 75 g de capítulos secos en 750 ml de agua destilada en ebullición durante 20 minutos (2x). Se juntaron los extractos, se filtraron y se llevaron a sequedad hasta consistencia butirosa. Se resuspendió el residuo con cloroformo, agitando durante 3 h (3x). Se filtró, dejando el residuo para obtener el extracto metanólico, mientras que la fracción clorofórmica se llevó a sequedad (**rendimiento 1,17 %**) y se retomó con 15 ml de T80. A 7,5 ml del extracto se le agregó 7,5 ml de CMC obteniéndose 5 dosis de 3 ml cada una. Utilizando el mismo esquema de extracción, una alícuota de extracto clorofórmico fue llevado a sequedad y resuspendido con metanol para realizar las reacciones de caracterización de Shinoda y cloruro férrico.

Extracto metanólico: Al residuo obtenido luego de la extracción clorofórmica se le agregó metanol y se lo agitó durante 3 h (2x), se juntaron los extractos, se llevaron a sequedad a presión reducida (**rendimiento 12,72 %**) y se retomaron con 15 ml de CMC. A 7,5 ml del extracto se le agregó 7,5 ml de T80 obteniéndose 5 dosis de 3 ml cada una. Utilizando el mismo

esquema de extracción, una alícuota de extracto metanólico fue utilizado para realizar las reacciones de caracterización de Shinoda y cloruro férrico. Extracto metanólico–clorofórmico: los 7,5 ml restantes de la fracción clorofórmico diluida con T80 y los 7,5 ml restantes de la fracción metanólica diluida con CMC se mezclaron (1:1, v/v) obteniéndose 5 dosis de 3 ml cada una.

En la figura 14 se observa un esquema de obtención y administración de los extractos.

1.5. Método de producción de úlceras

Los animales fueron sometidos a estrés por hipotermia e inmovilización en jaulas con celdas individuales de 5 x 5 x 18 cm y sumergidos hasta el cartílago xifoides en agua a 22 – 24 °C durante 5 h.

1.6. Recuento de úlceras

Las ratas fueron sacrificadas con una sobredosis de éter y se les extrajeron los estómagos. Estos fueron insuflados con solución fisiológica, se fijaron durante 6 h en formol al 10%, se los abrió por la curvatura mayor y se fotografiaron. Se determinó el área ulcerada por medio de un analizador de imágenes utilizando como índice de úlcera (IU) el total de superficie dañada expresada en mm², calculando el porcentaje de inhibición producido por los extractos en los distintos grupos tratados en relación al Grupo control utilizando la fórmula $[(IU_{\text{Grupo control}} - IU_{\text{Grupo tratado}} / IU_{\text{Grupo control}}) \times 100]$.

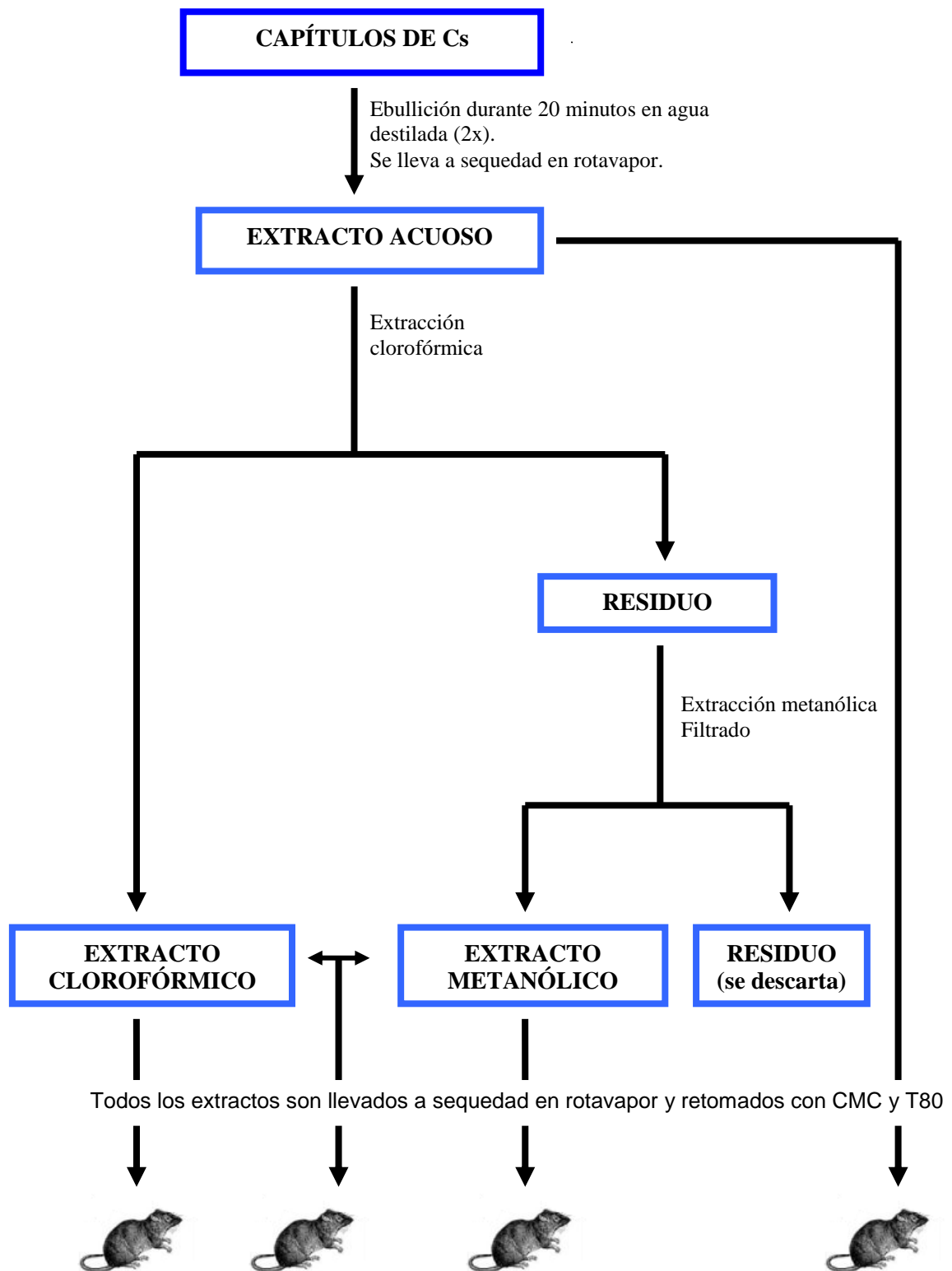


Fig. 14: Esquema de extracción y administración de extractos acuoso, metanólico, clorofórmico y metanólico-clorofórmico en ratas.

2.0. EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN CRÓNICA DE EXTRACTO ACUOSO DE *CENTAUREA SOLSTITIALIS* EN RATAS

2.1. Material vegetal

El material vegetal fue recogido como se indicó en el punto 1.1. de esta sección.

2.2. Animales y vía de administración

Se utilizaron 8 ratas Wistar hembras de 200 - 250 g de peso provistas por el Bioterio de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad de Buenos Aires, Argentina. Los animales fueron divididos en dos grupos al azar y colocados en dos jaulas. El grupo control no recibió tratamiento alguno, el grupo restante recibió una dosis diaria durante 32 días de extracto acuoso diluida en el agua de bebida la cual se administró *ad libitum*. Todos los animales fueron alimentados con ración estándar y agua *ad libitum*.

2.3. Administración y dosis

Los animales fueron administrados con extractos acuosos durante 32 días. La dosis diaria de extracto seco de Cs por animal fue de 5,5 g.

2.4. Preparación de extractos

Se colocaron 22 g de capítulos secos de Cs en 220 ml de agua destilada en ebullición durante 20 minutos (2x). Se juntaron los extractos y se llevaron a sequedad a presión reducida. El residuo se resuspendió con agua de bebida hasta un volúmen de 80 ml, cantidad calculada para ser consumida diariamente por cada grupo de animales.

2.5. Registro de la temperatura corporal y la ganancia de peso

La temperatura corporal y el peso de los animales fueron registrados al comienzo del ensayo y cada cuatro días, habiendo normalizado el horario del registro entre las 10 y 11 h de cada día.

3.0. DETERMINACIÓN DEL EFECTO ANTIULCEROSO DE *CENTAUREA SOLSTITIALIS* EN RATONES

3.1. *Animales, vías de administración y dosis*

Se utilizaron ratones hembras *Mus musculus* Cepa CF1 de 25 - 30 g de peso provistos por el Bioterio de la Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Pampa, Argentina. Los ratones fueron alimentados *ad libitum* con una ración balanceada (Cooperación, Asociación Cooperativas Argentinas, San vicente, Buenos Aires, Argentina) cuya composición centesimal es: 23 % proteína bruta, 5 % extracto etéreo, 6 % fibra cruda, 10 % minerales totales, 1,3 % calcio, 0,8 % fósforo y 12 % tenor máximo de humedad. Los animales fueron privados del consumo de alimentos y agua durante 24 h previas al ensayo. La cantidad de extracto obtenido de 0,75 g de capítulos secos de *Centaurea solstitialis* (Cs) fue resuspendido hasta completar un volumen de 0,5 ml en una solución de Carboximetilcelulosa (CMC) y Tween 80 (T80) y administrado *per os* por medio de una sonda gástrica inmediatamente antes del ensayo.

El bioensayo se llevó a cabo utilizando el mismo diseño experimental empleado en ratas, administrando a un grupo de cinco ratones T80 + CMC como Grupo control. Otros cuatro grupos, de igual número de animales, fueron tratados con extractos: acuoso, metanólico, clorofórmico y metanólico-clorofórmico (1:1, v/v), todos ellos resuspendidos en una mezcla de T80 + CMC.

3.2. *Preparación de extractos*

Excipiente: para diluir los extractos se utilizó una solución de CMC al 0,5% y T80 al 0,05% en partes iguales (Ex).

Extracto acuoso: se colocaron 3,75 g de capítulos secos de Cs en 50 ml de agua destilada en ebullición durante 20 minutos (2x). Se juntaron los extractos, se filtraron con papel de filtro y se llevaron a sequedad a presión

reducida (rendimiento 22,8 %). El residuo se resuspendió con Ex hasta un volumen de 2,5 ml, obteniéndose 5 dosis de 0,5 ml cada una.

Extracto clorofórmico: se colocaron 7,5 g de capítulos secos en 100 ml de agua destilada en ebullición durante 20 minutos (2x). Se juntaron los extractos, se filtraron y se concentraron en rotavapor hasta consistencia butirosa. Se resuspendió el residuo con 50 ml de cloroformo (3x), agitando durante 3 h. Se filtró, dejando el residuo para obtener el extracto metanólico, la fracción clorofórmica se llevó a sequedad (rendimiento 1,13 %) y se retomó con 2,5 ml de T80. 1,25 ml del extracto clorofórmico fue llevado a un volumen de 2,5 ml agregando 1,25 ml de CMC obteniéndose 5 dosis de 0,5 ml cada una.

Extracto metanólico: se colocaron 7,5 g de capítulos secos en 100 ml de agua destilada en ebullición durante 20 minutos (2x). Se juntaron los extractos, se filtraron y se concentraron en rotavapor hasta sequedad. El residuo se resuspendió con metanol (3x) y se agitó durante 3 h (2x), se juntaron los extractos y se llevaron a sequedad a presión reducida (rendimiento 12,22 %). Se retomó con 2,5 ml de CMC. Un volumen de 1,25 ml fue llevado a 2,5 ml agregando 1,25 ml de T80 obteniéndose 5 dosis de 0,5 ml cada una.

Extracto metanólico-clorofórmico: los 1,25 ml restantes del extracto clorofórmico y los 1,25 ml restantes del extracto metanólico se mezclaron (1:1, v/v) obteniéndose 5 dosis de 0,5 ml cada una.

A las fracciones acuosa, metanólica y clorofórmica se les realizaron las reacciones de caracterización de Shinoda y cloruro férrico.

En la figura 15 se observa un esquema de obtención y administración de los extractos.

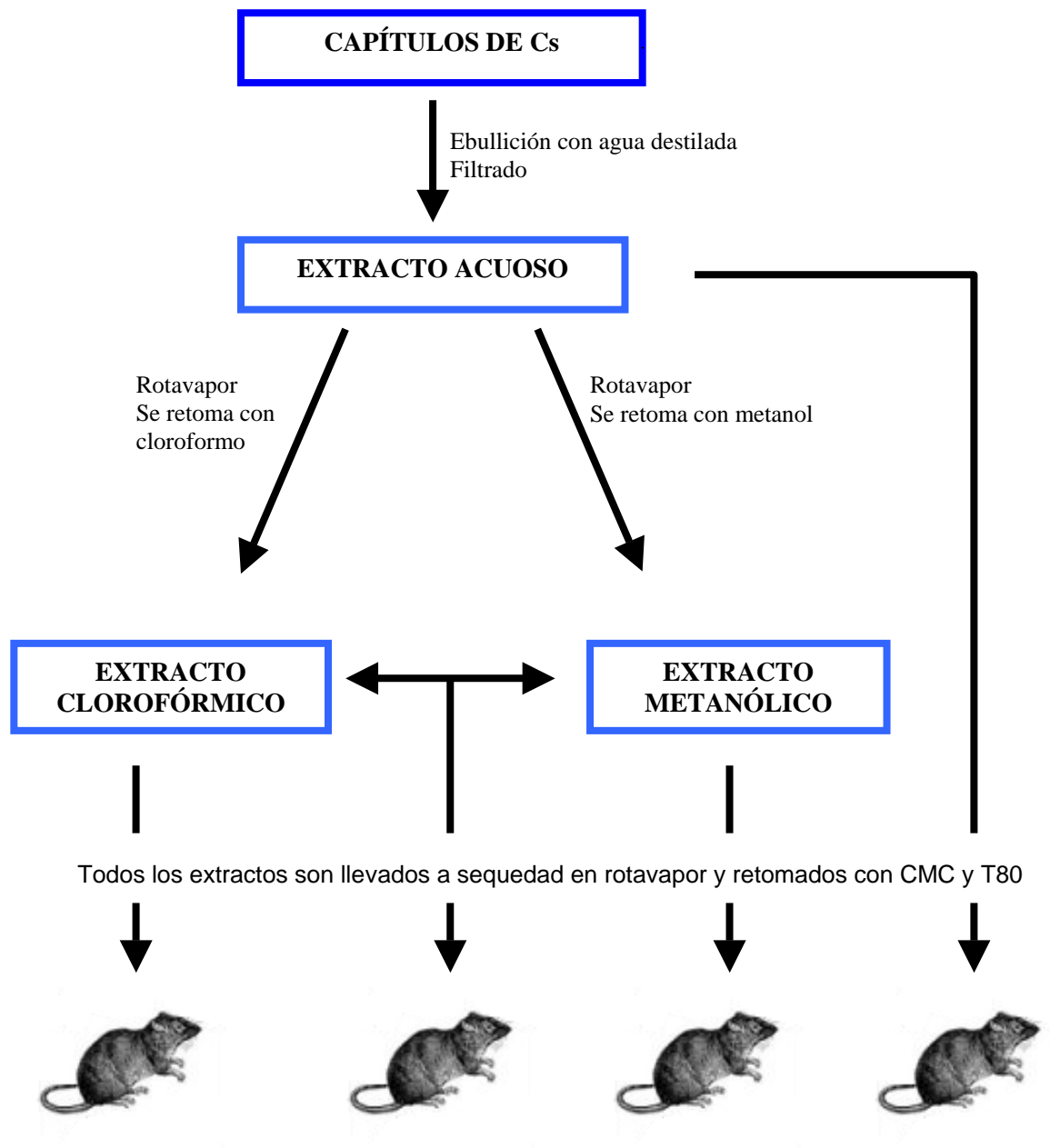


Fig. 15: Esquema de extracción y administración de extractos acuoso, metanólico, clorofórmico y metanólico-clorofórmico en ratones.

3.3. Método de inducción de úlceras

Los ratones fueron inmovilizados en jaulas con celdas individuales de 2,2 cm de diámetro por 10 cm de largo (Fig. 16) y sumergidos hasta el cartílago xifoides en agua a 22 °C durante 4,5 h (Fig. 17).



Fig. 16: Ratones colocados en jaulas de inmovilización.



Fig. 17: Ratones inmovilizados y sumergidos en agua a 22 °C.

3.4. Evaluación del daño gástrico

Al finalizar el ensayo los animales se sacrificaron por sobredosis de éter, se les colocó una sonda gástrica y luego se abrió la cavidad abdominal por la línea media. Se expuso el estómago y se inyectaron por la

sonda gástrica 2,5 ml de solución fisiológica, se ligaron en forma conjunta el esófago y estómago (Fig. 18) se seccionaron y se retiró el estómago.



Fig. 18: Se muestra el estómago insuflado con ayuda de una cánula esofágica y la posición de la ligadura del esófago y duodeno.

Los estómagos extraídos e insuflados fueron fijados sumergiéndolos en una solución de formol al 10% (Fig. 19). Luego de 6 h se abrieron por la curvatura mayor (Fig. 20) y se fotografiaron junto a una escala graduada en mm como referencia. Las fotografías fueron digitalizadas y por medio de un analizador de imágenes que permite circunscribir las lesiones se obtuvo el área ulcerada de cada estómago. Utilizando como índice de úlcera (IU) el total de superficie dañada expresada en mm^2 , se calculó el porcentaje de inhibición producido por los extractos en los distintos grupos tratados con relación al Grupo control utilizando la fórmula $[(IU_{\text{Grupo control}} - IU_{\text{Grupo tratado}} / IU_{\text{Grupo control}}) \times 100]$.



Fig. 19: Estómago de ratón insuflado sumergido en una solución de formol. Puede notarse que la pared del estómago se encuentra totalmente distendida, procedimiento que facilita, una vez fijado el órgano, la medición de las lesiones ulcerosas.

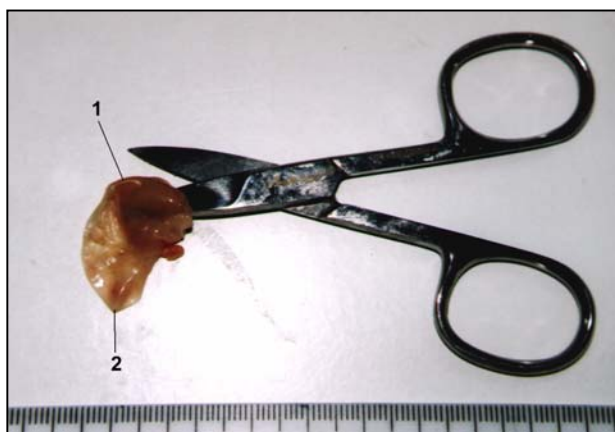


Fig. 20: Apertura del estómago por la curvatura mayor. Puede observarse la porción glandular (1) y aglandular (2) del estómago.

En la figura 21 se observa un estómago normal abierto por la curvatura mayor luego de 10 minutos de ser insuflado parcialmente con solución fisiológica y sin ser fijado en formol. Puede notarse la presencia y disposición de los pliegues de la mucosa gástrica. La técnica descrita para preparar los estómagos y observar posteriormente las lesiones en la mucosa gástrica, permite la observación de una superficie lisa, en la cual han desaparecido los pliegues gástricos facilitando la observación y evaluación de las mismas.



Fig. 21: Estómago abierto por la curvatura mayor de un ratón normal. Pueden observarse los pliegues de la mucosa gástrica y la coloración típica de la mucosa gástrica de la porción glandular (inferior).

En la figura 22 se observa un estómago perteneciente a un animal sometido a estrés por hipotermia e inmovilización abierto por la curvatura mayor inmediatamente luego de ser sacrificado. Puede observarse la mucosa hiperémica y la presencia de úlceras hemorrágicas en distintas partes de la superficie. Si se compara con la figura 21 podrá notarse la importante retracción del tejido que dificulta la observación

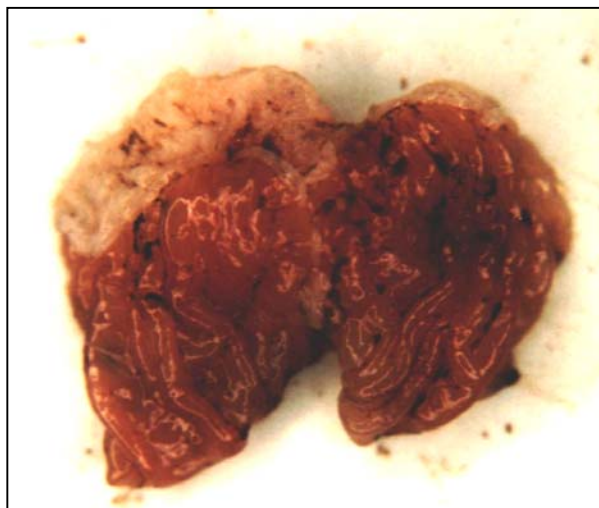


Fig. 22: Estómago abierto por la curvatura mayor de un animal sometido a estrés por hipotermia e inmovilización. La mucosa se encuentra hiperémica y con úlceras hemorrágicas.

4.0. DETERMINACIÓN DEL EFECTO CITOPROTECTOR DE EXTRACTOS DE *CENTAUREA SOLSTITIALIS* EN RATONES

4.1. EVALUACIÓN DEL EFECTO CITOPROTECTOR DE EXTRACTOS DE *CENTAUREA SOLSTITIALIS* UTILIZANDO INDOMETACINA

4.1.1. *Animales, vías de administración y dosis*

Se utilizaron seis grupos de ratones de cinco animales cada uno que fueron provistos y preparados para el ensayo como se indicó en el punto 3.1. de esta sección. Inmediatamente antes del ensayo, un grupo recibió una dosis oral de extracto metanólico de *Centaurea solstitialis* y otro de extracto clorofórmico, el tercer grupo fue administrado con 0,5 ml del excipiente compuesto por T80 + CMC y fue empleado como grupo control para calcular el índice de úlceras respecto a los tratados. Los tres grupos restantes recibieron el mismo tratamiento administrando 1 h antes del ensayo una dosis de 5 mg/kg de indometacina por vía subcutánea. El grupo tratado con indometacina y excipientes fue utilizado como control para calcular el índice de úlceras respecto a los tratados con indometacina y los extractos.

4.1.2. *Preparación de extractos*

Excipientes: para diluir los extractos de Cs se utilizó una solución de CMC al 0,5% y T80 al 0,05% (1:1, v/v), (Ex). La indometacina fue disuelta en una solución de T80 al 0,05%.

Extracto acuoso: se colocaron 7,5 g de capítulos secos de Cs en 100 ml de agua destilada en ebullición durante 20 minutos (2x). Se juntaron los extractos, se filtraron con papel de filtro y luego se llevó a sequedad a presión reducida. El residuo se resuspendió con Ex hasta un volumen de 5,0 ml, obteniéndose 10 dosis de 0,5 ml cada una que fueron administradas a ratones de los grupos tratados con extractos acuosos.

Extracto clorofórmico: se colocaron 7,5 g de capítulos secos en 100 ml de agua destilada en ebullición durante 20 minutos (2x). Se juntaron los extractos, se filtraron y se redujeron hasta consistencia butirosa. Se resuspendió el residuo con 100 ml de cloroformo (3x), agitando durante 3 h. Se juntaron los extractos, se filtraron y llevaron a sequedad en rotavapor. El residuo se retomó con Ex hasta un volumen de 5 ml obteniéndose 10 dosis de 0,5 ml cada una.

Extracto metanólico: se colocaron 7,5 g de capítulos secos en 100 ml de agua destilada en ebullición durante 20 minutos (2x). Se juntaron los extractos, se filtraron y se redujeron hasta sequedad. Se resuspendió el residuo con 100 ml de metanol (3x), agitando durante 3 h. Se juntaron los extractos, se filtraron y llevaron a sequedad en rotavapor. El residuo se retomó con Ex hasta un volumen de 5 ml obteniéndose 10 dosis de 0,5 ml cada una.

4.1.3. Administración de Indometacina

Preparación de la solución inyectable: 2,5 mg de indometacina es solubilizada con 0,3 ml de etanol y llevada a un volumen de 5 ml con T80 obteniéndose 15 dosis de 0,33 ml que fueron administradas por vía subcutánea.

4.1.4. Método de inducción y evaluación del daño gástrico

Se utilizaron los mismos procedimientos indicados en el punto 3.3. y 3.4. de esta sección.

Para determinar si los extractos previenen las lesiones ulcerosas provocadas por el efecto de la indometacina, se calculó el porcentaje de inhibición. Este porcentaje, en los grupos que no recibieron una dosis previa de indometacina, se calculó comparando los grupos tratados con extractos metanólico y clorofórmico respecto al control. De la misma forma se calculó el porcentaje de inhibición para los animales tratados previamente con indometacina comparando respecto al tratado con

excipientes.

En la figura 23 se observa un esquema de obtención y administración de extractos en ratones.

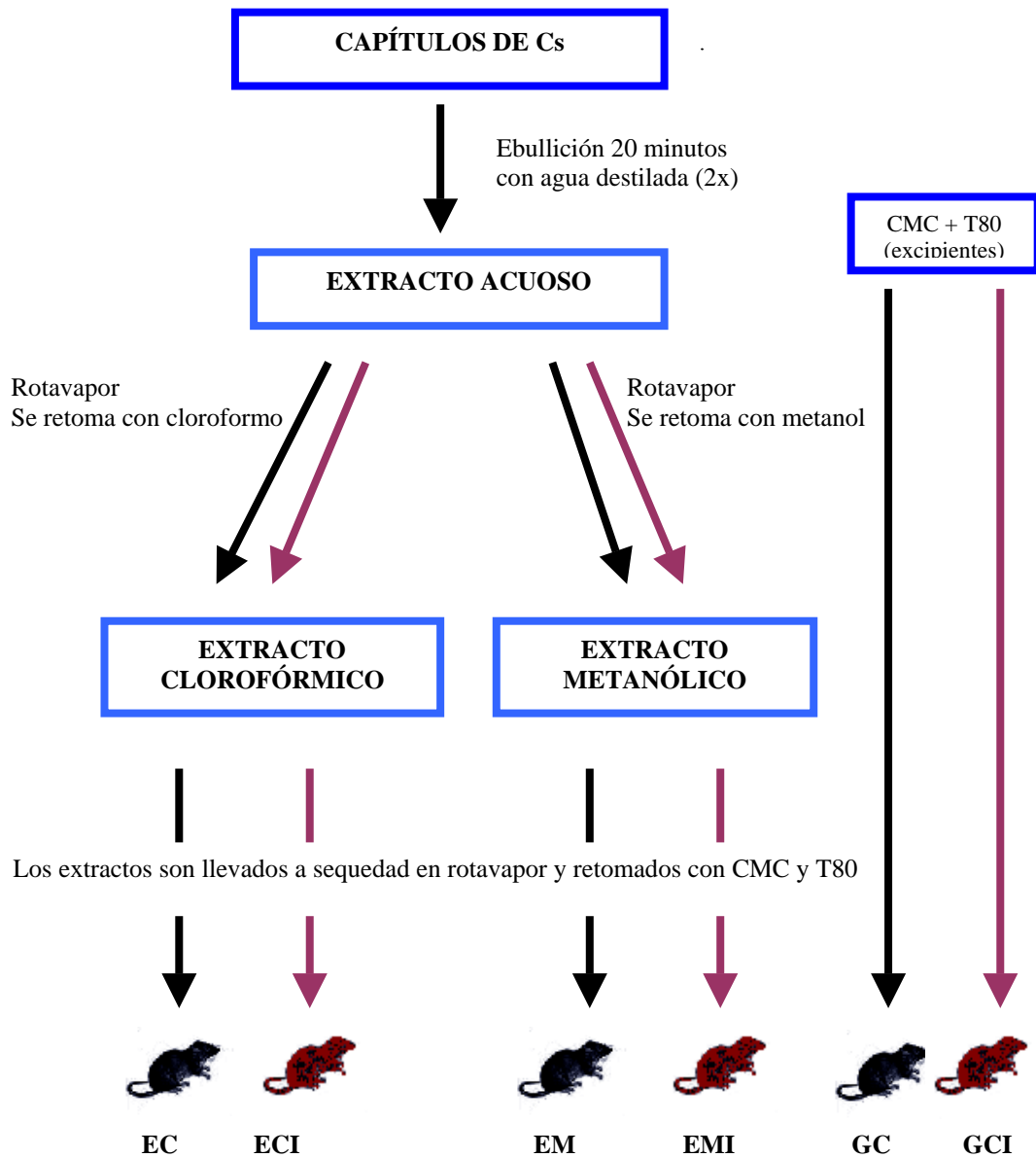


Fig. 23: Esquema de obtención y administración de extractos metanólicos y clorofórmicos en ratones.

- Grupos administrados con extracto clorofórmico (EC), metanólico (EM) y excipientes (GC).
- Grupos tratados previamente con indometacina y luego administrados con extracto clorofórmico (ECI), metanólico (EMI) y excipientes (GCI).

4.2. DETERMINACIÓN DEL EFECTO CITOPROTECTOR DE EXTRACTOS DE *CENTAUREA SOLSTITIALIS* EVALUANDO LA PRODUCCIÓN DE MUCUS A TRAVÉS DE ESTUDIOS HISTOLÓGICOS.

4.2.1. Animales, vías de administración y dosis

El ensayo se llevó a cabo utilizando 4 grupos de ratones de 5 animales cada uno que fueron provistos y preparados para el ensayo como se indicó en el punto 3.1. de esta sección. Uno de los grupos fue sacrificado y sus estómagos fueron utilizados para observar el aspecto de la mucosa normal. Los 3 restantes fueron administrados *per os* con excipientes, extractos metanólico y clorofórmico respectivamente y fueron sometidos a estrés por hipotermia e inmovilización como se indicó en el punto 3.3. de esta sección.

4.2.2. Preparación de extractos

Excipiente: para diluir los extractos se utilizó una solución de CMC al 0,5% y T80 al 0,05% (1:1, v/v), (Ex).

Extracto clorofórmico: se colocaron 3,75 g de capítulos secos en 50 ml de agua destilada en ebullición durante 20 minutos (2x). Se juntaron los extractos, se filtraron y se concentraron en rotavapor hasta consistencia butirosa. Se resuspendió el residuo con 50 ml de cloroformo agitando durante 3 h (3x). Se juntaron los extractos y se llevaron a sequedad a presión reducida. El extracto seco se resuspendió con Ex hasta un volumen de 2,5 ml obteniendo 5 dosis de extracto clorofórmico de 0,5 ml.

Extracto metanólico: se repitió el mismo esquema utilizado para obtener el extracto clorofórmico, empleando metanol como solvente de extracción.

4.2.3. Método de inducción de úlceras

Se utilizó el mismo procedimiento explicado en el punto 3.3. de esta sección.

4.2.4. Obtención de las muestras de estómagos para el examen histológico

Los animales fueron sacrificados por sobredosis de éter y los estómagos extraídos se colocaron en solución de formol al 10 %. Después de 24 h fueron procesados y coloreados con ácido periódico-Schiff (PAS).

4.3. DETERMINACIÓN DEL EFECTO CITOPROTECTOR DE EXTRACTOS DE *CENTAUREA SOLSTITIALIS* EVALUANDO LA PRODUCCIÓN DE MUCUS A TRAVÉS DE ESTUDIOS DE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA

4.3.1. *Animales, vías de administración y dosis*

Se utilizaron 4 grupos de 5 ratones cada uno que fueron provistos, preparados para el ensayo y tratados como se indicó en los puntos 4.2.1., 4.2.2. y 4.2.3. de esta sección.

4.3.2. *Obtención y preparación de las muestras de estómagos para la observación con el microscopio electrónico de barrido.*

Los animales fueron sacrificados por sobredosis de éter y los estómagos extraídos y abiertos por la curvatura mayor. Se cortaron muestras de la porción glandular de 1 mm² y se sumergieron en una solución salina de glutaraldehído (C₅H₈O₂) al 2,5 % a temperatura ambiente. Los especímenes fueron lavados con una solución tampón de cacodilato de sodio al 0,05 M durante 20 minutos (4x). A continuación se utilizó acetona como reactivo de deshidratación e infiltración en series crecientes del 10 – 80 %, las piezas fueron colocadas en el aparato de punto crítico y se les realizó el metalizado con oro.

5.0. EFECTO DEL ESTRÉS PROVOCADO POR HIPOTERMIA E INMOVILIZACIÓN SOBRE LA TEMPERATURA CORPORAL Y EL pH GÁSTRICO EN RATONES TRATADOS CON EXTRACTOS DE *CENTAUREA SOLSTITIALIS*

5.1. Animales utilizados, vías de administración y dosis

Se utilizaron 4 grupos de 5 ratones cada uno que fueron provistos y preparados para el ensayo como se describió en el punto 3.1. de esta sección. Tres grupos fueron administrados *per os* con 0,5 ml del excipiente, extracto metanólico y extracto clorofórmico respectivamente 30 minutos antes de ser sometidos a estrés utilizando el test de inmersión tal como fue explicado en el punto 3.3. de esta sección. El grupo restante, utilizado para obtener los valores normales de temperatura corporal y pH gástrico, recibió una dosis del excipiente y no fue sometido a estrés.

5.2. Preparación de extractos

El excipiente, el extracto metanólico y el clorofórmico fueron preparados como se indicó en el punto 4.1.2. de esta sección. Se midió el pH del excipiente y de los extractos resuspendidos en el excipiente.

5.3. Determinación de la temperatura corporal

La temperatura rectal se registró con un termómetro digital inmediatamente luego de ser retirados del baño termostático. Al mismo tiempo se registró la temperatura de los animales pertenecientes al grupo que no fue sometido a estrés. Los datos obtenidos fueron comparados por medio del test "t" de Student (Snedecor y Cochran, 1967). La temperatura corporal se analizó comparando los grupos sometidos a estrés y tratados con excipientes, extracto metanólico y clorofórmico respecto al grupo tratado con excipientes que no fue sometido a estrés.

5.4. Determinación del pH sobre la superficie de la mucosa gástrica

La determinación se realizó de acuerdo con el método descrito por Murakami et al. (1985). Los animales inmediatamente de ser retirados del baño termostático fueron sacrificados por sobredosis de éter etílico. Se extrajeron los estómagos, se abrieron por la curvatura mayor y colocando una tira de papel indicador de pH sobre la porción glandular de la mucosa gástrica se tomaron los registros. Los datos obtenidos fueron comparados por medio del test "t" de Student. El aumento del pH gástrico de los grupos metanólico y clorofórmico se comparó respecto al grupo tratado con excipientes y sometido a estrés. El pH gástrico de los ratones que fueron administrados con el excipiente y sometidos a estrés se comparó con los animales que no fueron sometidos a estrés.

6.0. ESTUDIOS FITOQUÍMICOS DE EXTRACTOS METANÓLICO Y CLOROFÓRMICO DE *CENTAUREA SOLSTITIALIS*

6.1. AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS PRESENTES EN LA FRACCIÓN METANÓLICA DE *CENTAUREA SOLSTITIALIS*

6.1.1. Materiales

Para el aislamiento se utilizaron solventes de alta calidad (HPLC), (J. T. Baker, Phillipsburg, NJ, EE.UU.). Los cromatofolios fueron provistos por Whatman Inc. (Clifton, NJ, EE.UU.). Los cartuchos LiChroCART y los guardacolumnas LiChrospher 100 RP-18 (5 μm) para los análisis por HPLC fueron provistos por Merck (Darmstadt, Alemania). Todos los reactivos utilizados fueron de grado analítico. Los estándares auténticos de apigenina, rutina, canferol y quercetina fueron provistos por Sigma (St. Louis, EE.UU.).

6.1.2. Extracción

Se mantuvo en ebullición 20 g de capítulos secos de Cs con 200 ml de agua destilada durante 20 minutos (2x). Los extractos se redujeron a presión reducida hasta consistencia butirosa obteniéndose un rendimiento de 36,74 % de extracto acuoso seco. El residuo fue resuspendido con metanol (3 x 10 ml). Los extractos fueron llevados a sequedad a presión reducida obteniéndose un rendimiento de 15,95 % de extracto metanólico seco. Este extracto fue resuspendido con 10 ml de agua destilada y 25 ml de HCl 2 N y colocado en baño maría durante 20 minutos para hidrolizar los glicósidos de los flavonoides. La fracción fue colectada, filtrada y extraída con 10 ml de acetato de etilo (3x). La fracción acetato de etilo fue llevada a sequedad en rotavapor dando un rendimiento de 0,44 %. Esta fracción fue utilizada para sembrar en placas de capa fina; las bandas correspondientes a Rf equivalentes a 0,80 y 0,89 fueron recuperadas, eluidas con metanol y evaporadas bajo corriente de nitrógeno. Cada

fracción fue resuelta por HPLC y luego identificada por espectrometría de masas. Una alícuota del extracto metanólico seco fue resuspendido con metanol y cromatografiado en capa fina junto a estándares auténticos de canferol, quercetina, apigenina y rutina.

6.1.3. Cromatografía en capa fina (CCF)

La fracción acetato de etilo fue concentrada en rotavapor y se aplicó en forma de banda sobre placas de sílica gel 60 A^o K6F de 250 µm de espesor (5 x 20 cm). El cromatograma se desarrolló utilizando un sistema de solventes compuesto por acetato de etilo-metanol (100:10, v/v). Las bandas con similar R_f a los estándares auténticos de quercetina y canferol fueron recuperadas, eluidas con 1 ml de metanol (3 x) y evaporadas bajo una corriente de nitrógeno. Una alícuota de extracto metanólico seco resuspendido con metanol se cromatografió utilizando placas de sílica gel 60 A^o K6F de 250 µm de espesor (5 x 10 cm) en forma conjunta con estándares auténticos de quercetina, canferol, rutina y apigenina. Se desarrollaron dos cromatogramas diferentes utilizando como sistema de solvente acetato de etilo-metanol (10:1, v/v) para uno de ellos y para el otro tolueno-cloroformo-acetona (40:25:35, v/v/v).

6.1.4. Cromatografía líquida de alta eficacia

Cada fracción fue resuelta por HPLC con un equipo Isco Model 2360 de gradiente programable, equipado con un detector Model Isco V⁴ de longitud de onda multivariable y una bomba Isco Model 2350 (Isco, Lincoln, EE.UU.). Se utilizó un cartucho de fase reversa LiChroCART (4 x 250 mm) con guarda columna fase reversa LiChrospher 100 RP-18. Ambos compuestos fueron eluidos con 15-100 % metanol en agua durante 35 minutos.

En la figura 24 se esquematiza la obtención de la fracción acetato de etilo utilizada para el aislamiento de canferol y quercetina por medio de cromatografía en capa fina, HPLC y posterior identificación por espectrometría de masas.

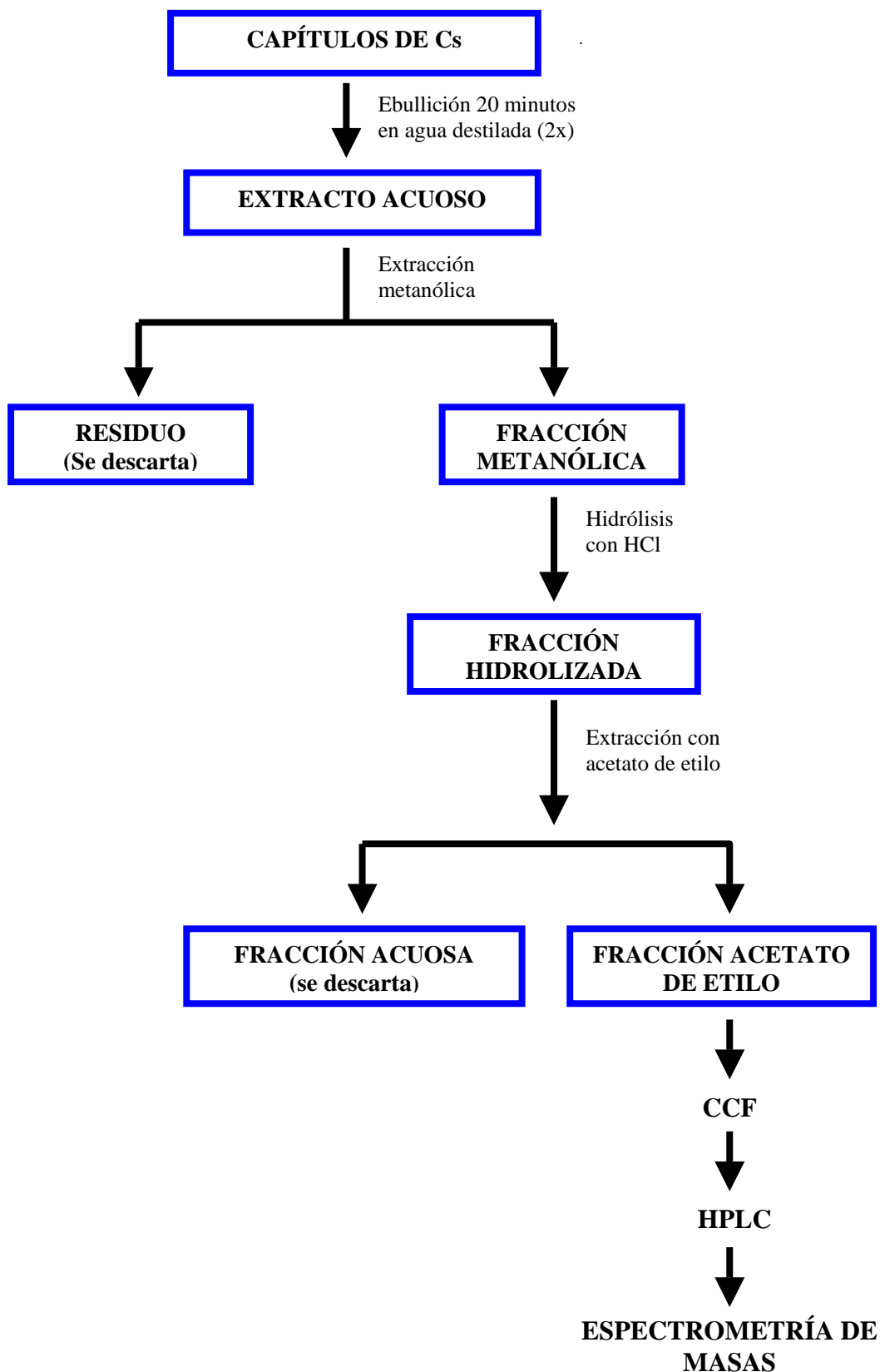


Fig. 24: Esquema de extracción e identificación de compuestos presentes en la fracción metanólica.

6.2. CUANTIFICACIÓN DE QUERCETINA Y CANFEROL EN CAPÍTULOS DE *CENTAUREA SOLSTITIALIS*

6.2.1. *Obtención del extracto metanólico*

Se utilizaron 10 g de capítulos secos de Cs los cuales fueron extraídos en un soxhlet durante 6 h utilizando como solvente de extracción 300 ml de metanol. El extracto fue llevado a sequedad a presión reducida en rotavapor obteniéndose un rendimiento de 16,25 % de residuo metanólico seco.

6.2.2. *Obtención de la fracción acetato de etilo*

El residuo metanólico se resuspende con 50 ml de agua destilada y se agregan 50 ml de HCl 2 N. Luego de mantener en ebullición en baño maría durante 1 h se deja enfriar y se extrae con 50 ml de acetato de etilo (3x). Los extractos se juntan y filtran con papel de filtro y se llevan a sequedad en rotavapor obteniéndose un rendimiento de 2,8 %.

6.2.3. *Cromatografía en capa fina*

Se diluyen 70 mg del extracto acetato de etilo en 1 ml de metanol. Se siembran 25 μ l en placas de sílica gel G 60 F₂₅₄ Merck de 5 x 10 cm. Las placas fueron desarrolladas en acetato de etilo-metanol (10:1, v/v). Luego de secadas al aire se observaron bajo luz UV a 366 nm, las bandas, con similar R_f a los estándares auténticos sintéticos de canferol y quercetina, fueron removidas y eluidas con metanol colocando el solvente de extracción en tubos de ensayo. Los extractos de cada fracción fueron evaporados bajo una corriente de nitrógeno.

6.2.4. *Cromatografía líquida de alta eficacia*

Cada fracción fue resuelta por HPLC en las mismas condiciones que las detalladas en el punto 6.1.4. de esta sección.

En la figura 25 se esquematiza la obtención de la fracción acetato de etilo utilizada para el aislamiento de canferol y quercetina en capa fina y posterior cuantificación por cromatografía líquida de alta eficacia.

6.2.5. Espectrometría de Masas

Los compuestos obtenidos por HPLC fueron identificados por espectrometría de masas utilizando un espectrómetro de masas magnético Micromass Model Autospec y un impacto electrónico de 70 eV (Micromass, Reino Unido).

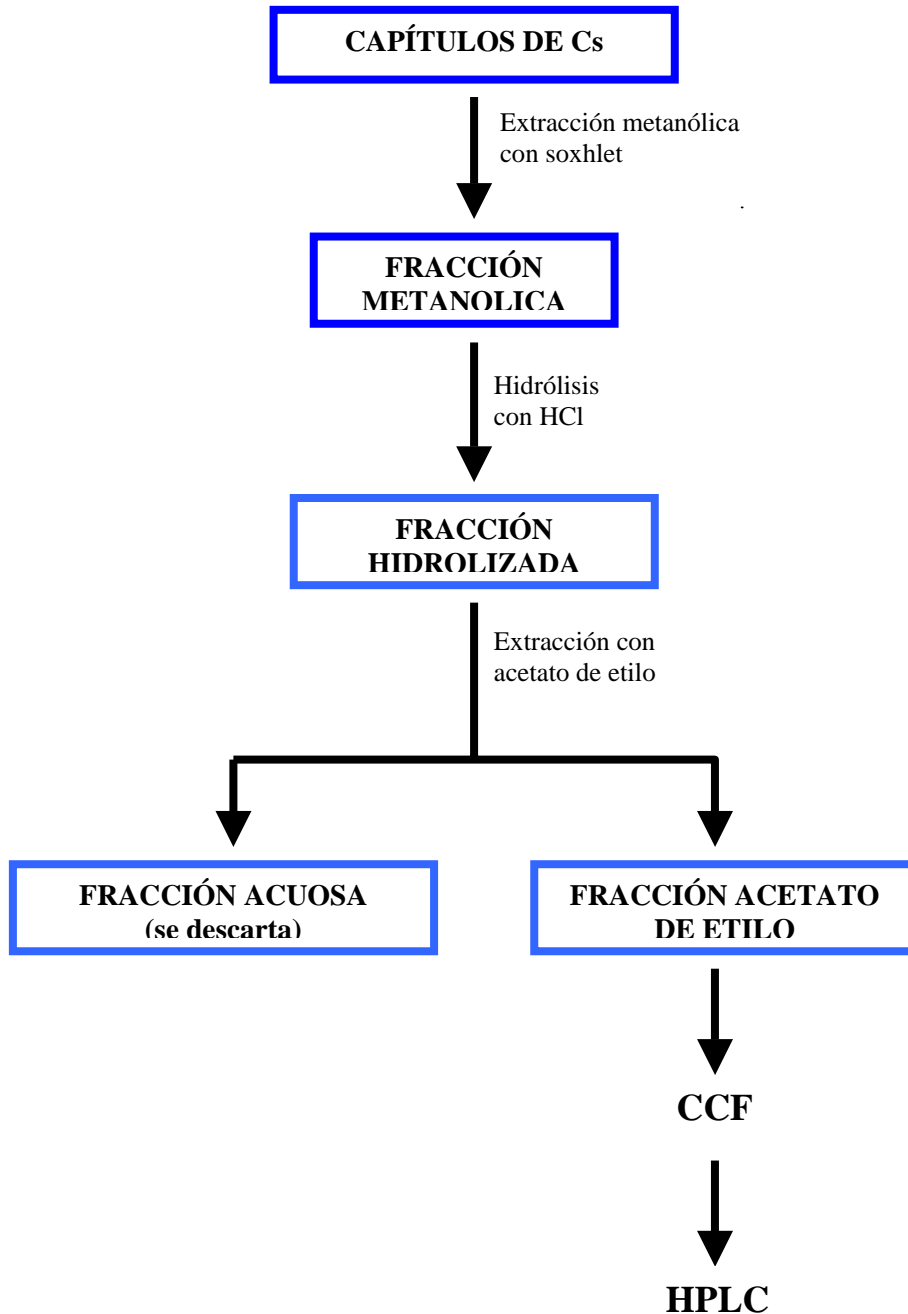


Fig. 25: Esquema de obtención de la fracción acetato de etilo para cuantificación de quercetina y canferol.

6.3. CARACTERIZACIÓN DE COMPUESTOS PRESENTES EN LA FRACCIÓN CLOROFÓRMICA DE *CENTAUREA SOLSTITIALIS*

6.3.1. *Materiales*

Se utilizaron solventes de alta calidad (HPLC), (J. T. Baker, Phillipsburg, NJ, EE.UU.). Los cromatofolios y la sílica gel G 60 fueron provistos por Whatman Inc. (Clifton, NJ, EE.UU.).

6.3.2. *Extracción*

Se mantuvo en ebullición 100 g de capítulos secos de Cs con 2000 ml de agua destilada durante 20 minutos (2x). Los extractos se redujeron a presión reducida hasta consistencia butirosa obteniéndose un rendimiento de 37 % de extracto acuoso seco. El residuo fue resuspendido con cloroformo (3 x 10 ml). Los extractos fueron llevados a sequedad a presión reducida obteniéndose un rendimiento de 0,4 % de extracto clorofórmico seco. El extracto seco se retomó con cloroformo y se cromatografió en una columna de 75 x 2,5 cm a la que se agregó 60 g de Sílica Gel G 60. La elución se comenzó con éter etílico colectándose 33 fracciones de 25 ml. A continuación, utilizando como eluyente éter etílico-etanol (9:0,5, v/v), se obtuvieron 5 fracciones de 25 ml cada una y por último se eluyó con éter etílico-etanol (10:1, v/v) obteniéndose 10 fracciones de 25 ml cada una. Las distintas fracciones fueron cromatografiadas en cromatofolios de 4 x 8 cm de Sílica Gel G 60 de 250 μm de espesor utilizando como sistema de solventes benceno-dioxano-ácido acético (120:20:4, v/v/v) y fueron reveladas con luz UV a 366 nm. Las fracciones que mostraron cromatogramas similares, conteniendo bandas de color violáceo características de lactonas sesquiterpénicas, fueron juntadas descartando las restantes. Las fracciones se concentraron en rotavapor y luego se cromatografiaron en placas preparativas de 20 x 20 cm de sílica gel G 60 de 500 μm de espesor, utilizando como sistema de solventes benceno-dioxano-ácido acético (120:20:4, v/v/v). Se recuperaron las bandas que

dieron color violáceo y se eluyeron con éter etílico. Las fracciones obtenidas se analizaron por ^1H RMN utilizando un equipo Bruker AC 200 con 200.1 MHz en protones.

7.0. EFECTO DE EXTRACTOS DE *CENTAUREA SOLSTITIALIS* SOBRE EL TRÁNSITO GASTROINTESTINAL EN RATONES

7.1. Animales, vías de administración y dosis

Se utilizaron 16 ratones provistos y preparados para el ensayo como se indicó en el punto 3.1. Fueron divididos en cuatro grupos al azar, grupo control (GC), grupo tratado con extracto acuoso (EA), grupo tratado con extracto metanólico (EM) y grupo tratado con extracto clorofórmico (EC). Una hora antes del ensayo cada animal recibió una dosis de 0,5 ml de los correspondientes tratamientos y fueron sometidos a estrés por hipotermia e inmovilización. Inmediatamente antes de comenzar el ensayo los animales recibieron una dosis de 0,8 ml de la solución de contraste (ver punto 7.5. de esta sección) vía oral por medio de una sonda gástrica. Durante todo el ensayo los animales permanecieron en jaulas individuales de inmovilización.

7.2. Obtención del extracto acuoso

Se colocaron 3 g de capítulos secos de Cs en ebullición con 30 ml de agua destilada durante 20 minutos (2x). El extracto acuoso fue llevado a sequedad a presión reducida y luego retomado y llevado a un volumen de 2 ml con una solución de carboximetilcelulosa al 0,05 % y Tween 80 al 0,05 % (1:1, v/v) como excipiente (Ex).

7.3. Obtención del extracto metanólico

A 3 g de capítulos secos de Cs en ebullición se les agregó 30 ml de agua destilada durante 20 minutos (2x). El extracto acuoso fue llevado a sequedad a presión reducida y luego retomado con 20 ml de metanol (3x). El extracto metanólico se llevó a sequedad y luego a un volumen de 2 ml con Ex. Se administró una dosis de 0,5 ml a cada animal del grupo EM.

7.4. Obtención del extracto clorofórmico

Se empleó el mismo esquema de extracción utilizado para obtener el extracto metanólico arriba explicado, pero retomando el extracto acuoso con cloroformo. Se administró una dosis del extracto clorofórmico de 0,5 ml a cada animal del grupo EC.

7.5. Solución de contraste

Se preparó una solución disolviendo 13 g de sulfato de bario (Gastropaque 'S', Lab. Temis - Lotalo S. A. Buenos Aires, Argentina) en 20 ml de agua destilada.

7.6. Rayos X

Se utilizó un equipo portátil MGF, Argentina, utilizando una potencia de 80 Kw, una penetración 15 mA y un tiempo de exposición de 0,01 segundos. Se tomó una placa al comenzar el ensayo y luego a los 30, 60, 90, 120 y 300 minutos.

8.0. EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE DROGAS RELACIONADAS CON LA MOTILIDAD GÁSTRICA SOBRE LA FORMACIÓN DE ÚLCERAS

8.1. Animales, drogas y vías de administración

Se utilizaron ratones provistos y preparados para el ensayo como se indicó en el punto 3.1. Los animales se dividieron en 5 grupos de 5 ratones cada uno que fueron tratados con atropina, pilocarpina, extracto metanólico y pilocarpina-extracto metanólico respectivamente. Los animales del grupo control no recibieron tratamiento alguno. Los del grupo tratado con atropina recibieron una dosis intraperitoneal de 1,5 mg/kg de peso de sulfato de atropina y los tratados con pilocarpina de 1 mg/kg de peso de clorhidrato de pilocarpina 20 minutos antes de ser sometidos al test de estrés como se indicó en el punto 3.3. de esta sección.

Las dosis de atropina y pilocarpina fueron llevadas a un volumen de 0,5 ml con agua destilada. El extracto metanólico fue administrado *per os* inmediatamente antes de someter los animales a estrés.

Las lesiones ulcerosas fueron evaluadas como se indicó en el punto 3.4. de esta sección.

8.2. Preparación de extractos

El excipiente y la preparación del extracto metanólico se realizó como se indicó en el punto 3.2. de esta sección.

9.0. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIULCEROSA DE FLAVONOIDES AISLADOS DE *CENTAUREA SOLSTITIALIS*

9.1. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIULCEROSA DE QUERCETINA EN RATONES

9.1.1. Animales, vías de administración y dosis

Los ratones fueron provistos y preparados para el ensayo como se indicó en el punto 3.1. de esta sección, fueron divididos en 2 grupos de 5 animales cada uno. Los animales del grupo tratado con quercetina recibieron una dosis de 200 mg/kg por vía oral inmediatamente antes de ser sometidos a estrés. Los del grupo control fueron administrados por la misma vía con el excipiente.

9.1.2. Drogas y excipientes

La quercetina fue provista por Sigma (St. Louis, EE.UU.). Como excipiente se utilizó una solución de T80 al 0,05%. El volumen total de cada dosis fue de 0,5 ml.

9.1.3. Método de inducción de úlceras y evaluación de las lesiones

Se utilizaron los mismos métodos y técnicas indicadas en los puntos 3.3. y 3.4. de esta sección.

9.2. EFECTOS ANTIULCEROSOS DE LOS FLAVONOIDES QUERCETINA Y CANFEROL LIBRES Y CONJUGADOS.

9.2.1. *Animales, vías de administración y dosis*

Los ratones provistos y preparados para el ensayo como se indicó en el punto 3.1. de esta sección, fueron divididos en 6 grupos de 5 animales cada uno. Un grupo se utilizó como control y cada animal recibió una dosis vía oral de 0,5 ml de excipiente. Los animales de otros dos grupos fueron administrados intraperitonealmente con una dosis de 100 mg/kg de quercetina y canferol respectivamente. Los ratones de los tres grupos restantes fueron administrados con una dosis oral de 37 mg/kg de canferol conjugado, 16 mg/kg de quercetina conjugada y una combinación de ambas respectivamente. Todos los tratamientos fueron administrados 30 minutos antes de someter los animales a estrés.

9.2.2. *Materiales*

Para el aislamiento se utilizaron solventes de alta calidad (HPLC), (J. T. Baker, Phillipsburg, NJ, EE.UU.). Los cromatofolios fueron provistos por Whatman Inc. (Clifton, NJ, EE.UU.). Todos los reactivos utilizados fueron de grado analítico. Los estándares auténticos de canferol y quercetina fueron provistos por Sigma (St. Louis, EE.UU.).

9.2.3. *Drogas y excipientes*

Excipiente: todas las drogas se suspendieron en una solución de T80 al 0,05% hasta un volumen de 0,5 ml.

Quercetina: fue provista por Sigma (St. Louis, EE.UU.)

Quercetina y canferol conjugados: se mantuvo en ebullición 200 g de capítulos secos de Cs con 2.000 ml de agua destilada durante 20 minutos (2x). Los extractos se redujeron a presión reducida hasta consistencia butirosa. El residuo fue resuspendido con metanol (3 x 100 ml). El extracto metanólico fue extraído con acetato de etilo (3 x 50 ml) y llevados a

sequedad a presión reducida. El extracto seco se guardó en heladera a 5 °C durante 12 h y luego fue resuspendido con 50 ml de acetato de etilo. Se filtró con papel de filtro y el residuo se descartó. La fracción acetato de etilo se concentró en rotavapor y fue cromatografiada en placas de sílica gel G 60 de 20 x 20 cm utilizando tolueno-cloroformo-acetona (40:25:35, v/v/v) como sistema de solventes. Las bandas con Rf de 0,39 y 0,62 fueron identificadas como Fracción 1 y Fracción 2 respectivamente. Se recuperaron y eluyeron por separado con acetato de etilo. Para determinar cual de las eluciones contenía a la quercetina y canferol conjugados, se hidrolizó una alícuota de cada una con ácido clorhídrico manteniéndolas en ebullición durante 30 minutos en baño maría. Se les agregó 0,5 ml de acetato de etilo y se agitó durante 3 minutos. Se recuperó la fracción acetato de etilo y se cromatografiaron en placas de sílica gel G 60 de 5 x 10 cm con estándares auténticos de canferol y quercetina utilizando acetato de etilo-metanol (10:1, v/v) como sistema de solventes. Las bandas que comigraron con la quercetina (Rf 0,96) y el canferol (Rf de 0,95) se identificaron como Fracción 1 y Fracción 2 respectivamente. Este procedimiento determinó que la Fracción 1 contenía el canferol conjugado y la Fracción 2 la quercetina conjugada.

Las fracciones eluídas se llevaron a sequedad, se pesaron y luego se suspendieron en T80 al 0,05 % para ser administradas a los animales.

9.2.4. Método de inducción y evaluación del daño gástrico

Se utilizaron los mismos procedimientos indicados en el punto 3.3. y 3.4. Los porcentaje de inhibición y el test "t" de Student se realizaron comparando los grupos tratados con el grupo control.

En la figura 27 se esquematiza el método de obtención de las Fracciones 1 y 2. Se indica además el método utilizado para corroborar la presencia de los compuestos canferol-glicósido en la Fracción 1 y de quercetina-glicósido en la Fracción 2.

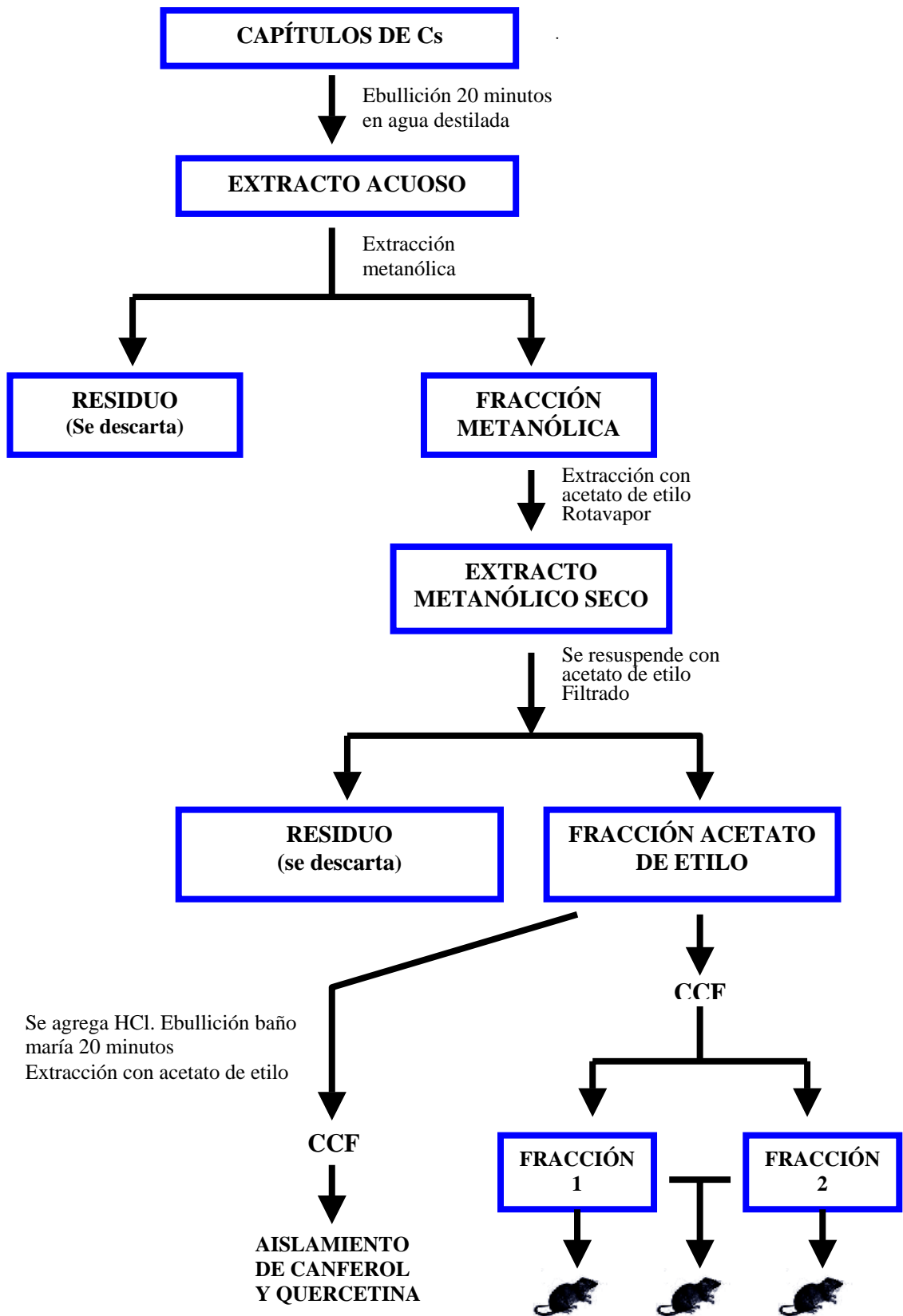


Fig. 26: Esquema de obtención y administración de quercetina y canferol en estado de glicósidos. Se indica el método de aislamiento de quercetina y canferol para comprobar la correlación con la presencia de dichos compuestos en las Fracciones 1 y 2 respectivamente.

10.0. EFECTO DE LA QUERCETINA Y EL CANFEROL SOBRE EL TIEMPO DE VACIADO GASTROINTESTINAL EN RATONES

10.1. Animales, vías de administración y dosis

Se utilizaron 20 ratones provistos y preparados para el ensayo como se indicó en el punto 3.1. de esta sección que fueron divididos en 5 grupos de 4 animales cada uno. Un grupo se utilizó como control y cada uno de sus animales recibió una dosis vía oral de 0,5 ml de excipiente. Los ratones de los otros dos grupos fueron administrados con quercetina, uno por vía oral y otro por vía intraperitoneal con una dosis de 200 mg/kg y 100 mg/kg respectivamente. Los animales de los dos grupos restantes fueron administrados con una dosis oral de 37 mg/kg de canferol-glicósido y 16 mg/kg quercetina-glicósido respectivamente. Una hora antes del ensayo los animales de cada grupo recibieron una dosis de los correspondientes tratamientos y fueron sometidos a estrés por hipotermia e inmovilización. Inmediatamente antes de comenzar el ensayo los animales recibieron una dosis de 0,8 ml de la solución de contraste vía oral por medio de una sonda gástrica. Durante todo el ensayo los animales permanecieron en jaulas individuales de inmovilización.

10.2. Materiales, drogas y excipientes

La quercetina fue adquirida y administrada como se indicó en los puntos 9.1.1. y 9.1.2. de esta sección. Se utilizaron los mismos materiales, drogas y procedimientos de obtención de quercetina-glicósido y canferol-glicósido indicados en los puntos 9.2.2. y 9.2.3. de esta sección.

10.3. Solución de contraste

Se preparó una solución disolviendo 13 g de sulfato de bario (Gastropaque 'S', Lab. Temis - Lostalo S. A., Buenos Aires, Argentina) en 20 ml de agua destilada.

10.4. Rayos X

Se utilizó un equipo portátil MGF, Argentina, utilizando una potencia de 80 Kw, una penetración 15 mA y un tiempo de exposición de 0,01 segundos. Se tomó una placa al comenzar el ensayo y luego a los 0, 30, 60, 90, 120 y 300 minutos.

10. 5. Evaluación de los resultados

Se realizó una evaluación comparativa del desplazamiento del contenido gastrointestinal a través de las imágenes obtenidas por Rayos X. Los resultados se utilizaron para confirmar si las respuestas obtenidas con la administración de quercetina vía oral e intraperitoneal y de las Fracciones 1 y 2 (punto 9.2. de la sección Resultados) se correlacionan con la motilidad gastrointestinal.

11.0. PARTICIPACIÓN DE LAS PROSTAGLANDINAS EN EL EFECTO ANTIULCEROSO DE LA QUERCETINA Y EL CANFEROL

11.1. Animales, vías de administración y dosis

Se utilizaron ratones provistos y preparados para el ensayo como se indicó en el punto 3.1. Los animales se dividieron en 3 grupos de 5 ratones y 1 h antes de ser sometidos al test de estrés, como se indicó en el punto 3.3. de esta sección, fueron administrados vía subcutánea con una dosis de 5 mg/kg de peso de indometacina. El grupo control recibió una dosis intraperitoneal de 0,5 ml del excipiente Tween 80 al 0,05 %. Después de 30 minutos los dos grupos restantes fueron tratados con una dosis de 100 mg/kg de peso de quercetina y canferol por vía intraperitoneal respectivamente, 30 minutos más tarde los animales fueron sometidos al test de estrés.

Las lesiones ulcerosas fueron evaluadas como se indicó en el punto 3.4. de esta sección.

11. 2. Drogas y excipientes

Los estándares auténticos de canferol y quercetina fueron provistos por Sigma (St. Louis, EE.UU.).

Se utilizó como excipiente una solución de Tween 80 al 0,05 %. Las dosis de indometacina, quercetina y canferol calculadas para cada animal fueron suspendidas en 0,5 ml del excipiente.

12.0. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DEL EXTRACTO METANÓLICO DE *CENTAUREA SOLSTITIALIS*

12.1. Material vegetal

Los capítulos de *Centaurea solstitialis* fueron recolectados como se indicó en el punto 1.1. de esta sección.

12.2. Materiales y drogas

Los compuestos quercetina, canferol, hidroxitolueno butilado (BHT), peróxido de hidrógeno y β -caroteno fueron provistos por Sigma, (St. Louis, EE.UU.).

Se utilizaron solventes de alta calidad (HPLC), (J. T. Baker, Phillipsburg, NJ, EE.UU.).

12.3. Obtención del extracto metanólico

Se colocaron 5 g de capítulos secos de Cs en ebullición con 50 ml de agua destilada durante 20 minutos (2x). El extracto acuoso (rendimiento 22 %) fue llevado a sequedad a presión reducida y luego retomado con 20 ml de metanol (3x). El extracto metanólico se llevó a sequedad (rendimiento 12,8 %). Se retomó con 20 ml de agua destilada y se extrajo con 20 ml de acetato de etilo (3x). Se juntaron las fracciones de acetato de etilo y se llevaron a sequedad obteniéndose una fracción del extracto metanólico soluble en acetato de etilo (rendimiento 2,83 %).

12.4. Determinación de la actividad antioxidante

Se utilizó el método descrito por Güntner et al. (1999). Cada ensayo se realizó mezclando 1 ml de una solución de 7 mg/l de β -caroteno en acetato de etilo con 200 μ l de acetato de etilo como control o 200 μ l de cada solución a ensayar: BHT, quercetina, canferol o extracto metanólico, a una concentración de 40 mg/l en acetato de etilo.

A cada solución se le agregaron 3 gotas de una solución de 1 volumen de peróxido de hidrógeno en dioxano. Se midió la absorbancia inicial (A_0) a 480 nm y a continuación se registró la absorbancia cada 5 minutos (A_t). El porcentaje de oxidación del β -caroteno es informado como $(A_0 - A_t)/A_0 \times 100$.

13.0. DETERMINACIÓN DEL EFECTO SEDANTE DEL EXTRACTO ACUOSO DE *CENTAUREA SOLSTITIALIS* EN RATONES.

13.1. Material vegetal

Los capítulos de Cs fueron recolectados como se indicó en el punto 1.1. de esta sección.

13.2. Animales y vías de administración

Se utilizaron ratones provistos y acondicionados para el ensayo como se indicó en el punto 3.1. de esta sección. Los animales fueron divididos en cuatro grupos al azar y colocados en jaulas separadas.

Un grupo fue administrado *per os* con extracto acuoso y otro, utilizado como control, con carboximetilcelulosa al 0,5 %. Treinta minutos después, ambos grupos recibieron una dosis subhipnótica de tiopental sódico vía intraperitoneal. Los dos grupos restantes recibieron el mismo tratamiento explicado arriba, pero utilizando una dosis hipnótica del tiopental sódico.

13.3. Administración y dosis

Los animales del grupo control fueron administrados con 0,5 ml de CMC al 0,5%. Los tratados con extractos acuosos recibieron una dosis del extracto proveniente de 0,75 g de capítulos secos de Cs diluidos en un volumen de 0,5 ml de CMC al 0,5 %. En ambos casos la administración se realizó utilizando una sonda gástrica.

El tiopental sódico fue administrado intraperitonealmente. La dosis hipnótica fue de 85 mg/kg y la subhipnótica de 37,5 mg/kg.

El tiopental sódico fue provisto por Richmond División Veterinaria S.A. (Buenos Aires, Argentina).

13.4. Preparación de extractos

Se colocaron 15 g de capítulos secos de Cs en 150 ml de agua destilada en ebullición durante 20 minutos (2x). Se juntaron los extractos y

se llevaron a sequedad a presión reducida. El residuo se resuspendió con CMC al 0,5 % en agua destilada hasta un volumen de 10 ml.

13.5. Registro del período de inducción y duración del efecto hipnótico

El período de inducción se registró midiendo el tiempo desde el momento de la administración intraperitoneal de tiopental sódico hasta que los animales pierden el reflejo postural por tercera vez.

La duración del efecto hipnótico se evaluó midiendo el período de sueño, considerando como el inicio el momento en que los animales perdieron el reflejo postural por tercera vez y la finalización cuando lo recuperaron por tercera vez.

14.0. EFECTO DEL ESTRÉS PROVOCADO POR HIPOTERMIA E INMOVILIZACIÓN SOBRE LOS NIVELES PLASMÁTICOS DE CORTICOIDES EN RATONES TRATADOS CON EXTRACTOS DE *CENTAUREA SOLSTITIALIS*

14.1. Animales, vías de administración y dosis

Se utilizaron ratones provistos y preparados para el ensayo como se indicó en el punto 3.1. de esta sección. Los animales se dividieron en 4 grupos de 5 ratones cada uno. Tres grupos fueron administrados *per os* con 0,5 ml del excipiente (grupo control), extracto metanólico y extracto clorofórmico respectivamente 30 minutos antes de ser sometidos a estrés utilizando el test de inmersión tal como fue explicado en el punto 3.3. de esta sección. El grupo restante utilizado para obtener los valores plasmáticos basales de corticoides (grupo normal), recibió una dosis del excipiente y no fue sometido a estrés.

14.2. Preparación de extractos

El excipiente, extracto metanólico y clorofórmico fueron preparados como se indicó en el punto 4.1.2. de esta sección.

14.3. Obtención de las muestras de sangre y método de determinación de corticoides

Al no disponer de un método para la determinación de corticosterona, principal glucocorticoide de los roedores, se utilizaron los valores obtenidos con un equipo para determinación de cortisol como indicadores del status del funcionamiento adrenal. Teniendo en cuenta que en roedores no se detecta cortisol plasmático, y que el método empleado para las determinaciones tiene reacción cruzada con la corticosterona, los valores obtenidos fueron considerados como indicadores de los niveles de corticoides y no como sus valores reales ya que representan un porcentaje

de éstos estimados en un 0,45 % por el fabricante del kit (DPC[®], Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, EE.UU.).

. Los animales pertenecientes al grupo utilizado para obtener los valores plasmáticos basales del corticoide, permanecieron en la misma habitación y jaula de encierro en la cual fueron sometidos al ayuno para evitar producir estrés adicional. Los animales de los grupos expuestos a estrés fueron colocados en jaulas individuales de inmovilización y sometidos a estrés por inmersión en un baño termostático a 22 °C durante 4,5 h. Todos los animales fueron retirados de las jaulas de a uno por vez y llevados a una habitación contigua donde fueron inmediatamente sacrificados por decapitación para recoger la sangre. Este procedimiento se llevó a cabo para evitar que los animales perciban la presencia de sangre, lo que produciría una respuesta de alerta aumentando los valores de corticoides. Las muestras fueron analizadas por quimioluminiscencia utilizando un analizador automático INMULITE[®] *Cortisol* y las diferencias entre los grupos fueron evaluadas estadísticamente por medio del test "t" de Student. Se compararon los valores plasmáticos obtenidos de los grupos que recibieron una dosis de excipientes, extracto metanólico y extracto clorofórmico y fueron sometidos a estrés, respecto a los que fueron administrados con excipientes y no fueron sometidos a estrés. Para evaluar si los extractos de *Centaurea solstitialis* influyen sobre los niveles plasmáticos de corticoides se compararon los grupos tratados con extracto metanólico y extracto clorofórmico respecto al grupo tratado con excipiente y sometido a estrés.

15.0. EFECTOS PRODUCIDOS POR COMPUESTOS RELACIONADOS ESTRUCTURALMENTE CON FLAVONOIDES Y LACTONAS SESQUITERPÉNICAS PRESENTES EN *CENTAUREA SOLSTITIALIS* SOBRE LA ACTIVIDAD GASTROPROTECTORA Y LA MOTILIDAD GASTROINTESTINAL

15.1. DETERMINACIÓN DEL EFECTO GASTROPROTECTOR DE COMPUESTOS RELACIONADOS ESTRUCTURALMENTE CON FLAVONOIDES Y LACTONAS SESQUITERPÉNICAS PRESENTES EN *CENTAUREA SOLSTITIALIS*

15.1.1. Animales, vías de administración y dosis

Se utilizaron ratones provistos y preparados para el ensayo como se indicó en el punto 3.1. de esta sección. Los animales se dividieron en 6 grupos de 5 ratones cada uno y fueron administrados intraperitonealmente, 30 minutos antes de ser sometidos al test de estrés, con apigenina, miricetina, silibina, rutina y α -metileno- γ -butirolactona respectivamente. El grupo control recibió una dosis de 0,5 ml de Tween 80 al 0,05 %. Los grupos tratados con apigenina, miricetina, silibina y rutina recibieron una dosis de 50 mg/kg de peso respectivamente y de 40 mg/kg de peso los tratados con α -metileno- γ -butirolactona. Todas las dosis fueron suspendidas en 0,5 ml de Tween 80 al 0,05 %.

15.1.2. Método de inducción de úlceras y evaluación del daño gástrico

Las úlceras fueron inducidas por estrés como se indicó en el punto 3.3. de esta sección. Las lesiones ulcerosas fueron evaluadas como se indicó en el punto 3.4. de esta sección.

15.2. DETERMINACIÓN DEL EFECTO SOBRE LA MOTILIDAD GASTROINTESTINAL DE COMPUESTOS RELACIONADOS ESTRUCTURALMENTE CON FLAVONOIDES Y LACTONAS SESQUITERPÉNICAS PRESENTES EN *CENTAUREA SOLSTITIALIS*

15.2.1. *Animales, vías de administración y dosis*

Se utilizaron ratones provistos y preparados para el ensayo como se indicó en el punto 3.1. de esta sección. Los animales se dividieron en 7 grupos de 4 ratones cada uno y fueron administrados intraperitonealmente 30 minutos antes de ser sometidos a estrés con apigenina, miricetina, silibina, rutina, canferol y α -metileno- γ -butirolactona respectivamente. El grupo control recibió una dosis de 0,5 ml de Tween 80 al 0,05 %. Los grupos tratados con apigenina, miricetina, silibina, y rutina recibieron una dosis de 50 mg/kg de peso y los tratados con canferol y α -metileno-butiro lactona fueron administrados con una dosis de 100 y 40 mg/kg de peso respectivamente. Todas las dosis fueron suspendidas en 0,5 ml de Tween 80 al 0,05 %.

15.2.2. *Rayos X y solución de contraste*

Para evaluar comparativamente el tiempo de vaciado gástrico entre los distintos compuestos ensayados y el grupo control se utilizó el método descrito en el punto 7.0. de esta sección. La solución radiopaca se preparó como se indicó en el punto 7.5. de esta sección. Se tomó una placa a los 0, 30, 60, 90, 150, 210, 270 y 310 minutos.

RESULTADOS

1.0. DETERMINACIÓN DEL EFECTO ANTIULCEROSO DE EXTRACTOS DE *CENTAUREA SOLSTITIALIS* EN RATAS

Teniendo como único dato etnobotánico el uso medicinal de capítulos para el tratamiento de úlceras gástricas en Turquía, se llevaron a cabo investigaciones dirigidas a estudios fitoquímicos de la *Centaurea solstitialis* (Cs) y a las acciones farmacológicas que su o sus principio/s activo/s provocaban.

Considerando que la expresión genética de las plantas depende de las características del medio ambiente y que en ocasiones las mutaciones genéticas producen líneas filogenéticas sólo diferenciables por análisis quimiotaconómicos, es posible esperar composiciones químicas distintas que se traducen en los resultados de los efectos farmacológicos. De acuerdo con esta posibilidad, en una primera instancia, se procedió a comprobar si las flores de Cs de la planta que se desarrolla en el Departamento Maracó de la Provincia de La Pampa, Argentina, al igual que la originaria de Turquía, poseía la mismas propiedades antiulcerosas.

Datos bibliográficos señalan que los flavonoides y las lactonas sesquiterpénicas, extraíbles con metanol y cloroformo respectivamente, son responsables de inhibir la formación de úlceras en ratas, por lo tanto, para la extracción se utilizaron estos solventes, como se indicó en Materiales y Métodos punto 1.4.

Por otro lado, para determinar si los extractos metanólicos y clorofórmicos contienen componentes que actúan en forma conjunta modificando el efecto farmacológico, se administraron juntos en el mismo ensayo.

Los extractos acuoso y metanólico dieron positivos a las reacciones de caracterización de Shinoda y cloruro férrico, revelando la presencia de grupos fenólicos característicos de los flavonoides. No se comprobó la presencia de estos compuestos cuando ambas reacciones dieron negativas con el extracto clorofórmico.

La porción glandular de los estómagos extraídos de las ratas, como se indica en Materiales y Métodos punto 1.6., fue separada de la porción aglandular y fotografiada como se presentan en la Fig. 27(A-E), para evaluar los resultados. La superficie del estómago no presenta pliegues gástricos ya que han desaparecido debido a que fueron insuflados con solución fisiológica y posteriormente fijados en formol para facilitar su observación.

El estrés causado por hipotermia e inmovilización produjo severas lesiones en la mucosa gástrica de todos los animales del grupo control que fueron administrados con los excipientes (Fig. 27A).



Fig. 27A: Porción glandular de estómago de rata perteneciente al grupo control. La flecha señala una de las lesiones ulcerosas inducidas por estrés provocado por hipotermia e inmovilización.

En la figura 27A se observa la presencia de úlceras pequeñas diseminadas en toda la mucosa, lesiones típicas de la úlcera gástrica aguda. Las lesiones presentan a la observación macroscópica forma de cráter, sin reacción inflamatoria organizada en sus bordes, con pérdida del

tejido mucoso y aspecto característico de las úlceras sangrantes. Observando las lesiones con lupa se advierte la presencia de lesiones con distinto grado de gravedad y regiones erosionadas en las cuales aún no se ha producido pérdida de tejido mucoso.

La mucosa gástrica de los animales tratados con extracto acuoso, presentaron un aspecto macroscópico normal, sin formación de úlceras en ninguno de los casos (Fig. 27B).



Fig. 27B: Porción glandular de estómago de rata tratado con extracto acuoso. La mucosa presenta un aspecto normal.

La figura 27C muestra los efectos del estrés sobre la mucosa gástrica de los estómagos de ratas tratadas con extracto metanólico. Se observa una congestión generalizada de la mucosa, interrumpida por manchas blanquecinas correspondientes a zonas donde ha comenzado el efecto erosivo que precede a la formación de lesiones gástricas. Esta característica se observó en 3 de los 5 animales, en tanto que los restantes presentaron un aspecto normal.



Fig. 27C: Porción glandular de estómago de rata tratado con extracto metanólico. La flecha indica una zona blanquecina que posee en el centro una lesión ulcerosa. El aspecto congestionado de la mucosa y las zonas blanquecinas indican que el extracto no logró una completa protección de la mucosa.

Los extractos clorofórmico y metanólico-clorofórmico (Fig. 27D y E) previnieron totalmente la formación de úlceras. Puede notarse en los estómagos de ambas figuras una coloración más blanquecina de la mucosa gástrica en contraste con los otros grupos, incluido el control. Estos cambios en la coloración se deben a que los extractos acuoso y metanólico tiñen la mucosa, en tanto que el extracto clorofórmico es prácticamente incoloro. Por otra parte, se observó un aumento de la capa de mucus que cubre la superficie del estómago de los animales tratados con extracto clorofórmico.



Fig. 27D: Porción glandular de estómago de rata tratado con extracto clorofórmico. La mucosa presenta aspecto normal.



Fig. 27E: Porción glandular de estómago de rata tratado con extracto metanólico-clorofórmico. La mucosa presenta aspecto normal.

En la Tabla 1 se muestran los efectos de los extractos de Cs sobre las úlceras producidas por estrés en ratas. Los datos registrados permiten comparar el área ulcerada entre grupos, el número de animales en los

cuales se previno totalmente la formación de úlceras respecto al total de cada grupo y el porcentaje de inhibición logrado con cada uno de los extractos.

Tabla 1

Efecto antiulceroso de extractos de *Centaurea solstitialis* sobre úlceras inducidas por estrés en ratas.

Grupos	Dosis oral ^a (mg/kg)	Area ulcerada ^d (8 ± S.D.)	Tasa de prevención de úlcera ^e	Inhibición (%)
Control	–	15,27 ± 8,80	0/5	–
Extracto Acuoso	4750	0,0 ± 0,0	5/5	100
Extracto Metanólico	2545	1,40 ± 1,02 *	2/5	91
Extracto Metanólico-Clorofórmico	2545 ^b + 235 ^c	0,0 ± 0,0	5/5	100
Extracto Clorofórmico	235	0,0 ± 0,0	5/5	100

^a Cantidad de extracto seco proveniente de 5 g de capítulos secos de Cs obtenidos como se indicó en Materiales y Métodos punto 1.4. que se administró a cada animal. Las dosis expresadas en mg/kg se calcularon a partir del rendimiento del extracto seco que para los extractos acuoso, metanólico y clorofórmico fueron de 23,75, 12,72 y 1,17 % respectivamente.

^b Corresponde a la cantidad de extracto metanólico seco administrado por kg de peso corporal.

^c Corresponde a la cantidad de extracto clorofórmico seco administrado por kg de peso corporal.

^d Area ulcerada: total de la superficie ulcerada de la mucosa gástrica expresada en mm².

^e Número de animales en los cuales el extracto inhibió totalmente la formación de úlceras respecto al total.

* Test “t” de Student P<0,05, n=5. Comparación del grupo tratado con extracto metanólico respecto al grupo control.

El extracto metanólico produjo una inhibición significativa de la formación de úlceras en un 91 % respecto al grupo control. Las lesiones

erosivas, alguna de las cuales llegaron a formar úlceras, fueron observadas en tres de los animales tratados con el extracto.

Los extractos acuoso, clorofórmico y metanólico-clorofórmico (1:1, v/v) previnieron la formación de úlceras en la totalidad de los animales.

2.0. EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN CRÓNICA DE EXTRACTO ACUOSO DE *CENTAUREA SOLSTITIALIS* EN RATAS

Considerando que el modelo experimental empleado provoca estrés por hipotermia y que es necesario como factor adicional la inmovilización, se decidió comprobar que los extractos de Cs no provoquen efectos secundarios que invaliden el método.

La ingestión por lo equinos de las partes aéreas de la planta, en mayor medida cuando ésta se encuentra en período de crecimiento con hojas tiernas e inflorescencias inmaduras, poco espinosas, les provocan una intoxicación conocida con el nombre de encefalomalacia nigropálida. Los síntomas de esta enfermedad no han logrado reproducirse en animales de laboratorio, sin embargo, se ha informado que la administración de repina, una lactona sesquiterpénica aislada de la Cs produce hipotermia en ratones. Teniendo como objetivo determinar la posible presencia de efectos secundarios que pudieran interferir con el modelo experimental, se administró una dosis terapéutica de extracto acuoso de capítulos de Cs a ratas durante un período de 32 días. Se midió la temperatura corporal y se calculó la ganancia de peso corporal para verificar si, al igual que en la sintomatología que se presenta en equinos, hay pérdida de peso debido a las dificultades en la prehensión, masticación y deglución de los alimentos que pudieran pasar desapercibidas durante la observación de los hábitos de los animales.

La observación continua de los hábitos de los animales durante el experimento, permitió determinar que la actividad de los animales tratados con el extracto acuoso, era sugestivamente menor que la del grupo control.

En la Tabla 2 se observan los registros de la temperatura corporal y la ganancia de peso promedio durante 32 días. Los registros se tomaron cada cuatro días. Se registró un leve aumento en la ganancia de peso diario que no llegó a ser estadísticamente significativo, mientras que no se encontró ninguna variación de la temperatura corporal.

Tabla 2

Efecto de la administración crónica de extractos de *Centaurea solstitialis* sobre la temperatura corporal y la ganancia de peso.

Grupos	Temperatura corporal (°C) (8± S.D.)	Ganancia de peso (g) (8 ± S.D.)
Grupo Control	37,24 ± 0,49	15,84 ± 2,06
Grupo Extracto Acuoso^a	37,45 ± 0,24 n.s.	18,59 ± 1,48 n.s.

^a Los animales recibieron una dosis diaria de extracto acuoso de capítulos de Cs como se indica en Materiales y Métodos punto 2.3. y 2.4. La diferencia de la temperatura corporal del grupo tratado respecto al grupo control no fue significativa.

n.s. No significativo, Test "t" de Student (P<0,05), n=4.

El peso y la temperatura corporal se registraron cada cuatro días.

Para calcular la dosis diaria a administrar de extracto acuoso de Cs se registró el consumo de agua diario. Como se observa en la Tabla 3, la cantidad de agua consumida por el grupo tratado fue significativamente menor a la del grupo control (P<0,01), n=4.

Tabla 3

Variación del consumo de agua diario en ratas administradas con extractos acuosos disueltos en el agua de bebida.

Grupos	Consumo de agua diario por grupo (ml) (8 ± S.D.)
Grupo Control	96,84 ± 4,76
Grupo Extracto Acuoso^a	84,74 ± 6,11*

^a Los animales recibieron una dosis diaria de extracto acuoso de capítulos de Cs como se indica en Materiales y Métodos punto 2.3 y 2.4.

* La diferencia entre el consumo de agua entre los grupos control y tratado fue significativa, Test "t" de Student (P<0,01), n=4.

3.0. DETERMINACIÓN DEL EFECTO ANTIULCEROSO DE *CENTAUREA SOLSTITIALIS* EN RATONES

Demostrado el efecto antiulceroso en ratas de los distintos extractos de la Cs que se desarrolla en nuestro país, se procedió a buscar un método que permitiera manejar en forma práctica un mayor número de animales. Las variaciones de temperatura propias entre experimentos o entre distintos baños termostáticos, mostraron influir en forma significativa en el tiempo de inducción de úlceras, obteniendo una variación en los resultados entre experimentos que no permitió compararlos. Para evitar este inconveniente, se adaptó el método empleado en ratas utilizando como animales de experimentación ratones *Mus musculus*. El menor tamaño de esta especie permitió someter al test de estrés a varios grupos de ratones en el mismo baño termostático. La Cepa CF1 se mostró sensible al método de inducción de úlceras por hipotermia e inmovilización, lo que determinó que se la utilizara como animal de experimentación para los estudios farmacológicos.

Las técnicas de necropsia y acondicionamiento de los estómagos para su posterior observación debieron ser modificados debido al tamaño de los ratones. Se estandarizó un método de necropsia y preparación de los estómagos para proceder luego a la evaluación de los resultados como se describió en Materiales y Métodos punto 3.4. Debido a que los calibres del esófago y del duodeno de ratones son muy pequeños, es difícil aplicar el método utilizado en ratas, cuyos estómagos pueden ser insuflados luego de extraídos. En ratones resultó más práctico colocar una sonda gástrica e insuflar el estómago *in situ* con solución fisiológica, luego ligar duodeno y esófago en forma conjunta, retirando el estómago para fijarlo en formol.

El test de hipotermia e inmovilización produjo en los estómagos de los ratones la formación de un gran número de úlceras diseminadas por toda la superficie mucosa (Fig. 28A). La ubicación de las lesiones responden a una presentación típica de las úlceras provocadas por estrés por hipotermia e inmovilización en ratones, las cuales, se localizan sobre la

superficie mucosa respondiendo a un patrón que concuerda con la ubicación de los pliegues gástricos marcados en la figura con líneas blancas cuya presentación en el órgano fresco puede observarse en la figura 21.



Fig. 28A: Estómago perteneciente al grupo control. Se observan úlceras provocadas por estrés que responden a un patrón que concuerda con los pliegues gástricos marcados con líneas blancas en la porción glandular que se encuentra a la derecha de la figura.

Los estómagos de los animales tratados con extracto acuoso presentaron un aspecto de la mucosa normal. La coloración marrón oscura se debe a que la mucosa se encuentra teñida por el extracto (Fig. 28B).



Fig. 28B: Estómago de ratón perteneciente al grupo tratado con extracto acuoso. La mucosa presenta un aspecto normal.

El extracto metanólico inhibió totalmente la formación de úlceras en los estómagos, observándose también una tinción de la mucosa, al igual que la producida con el extracto acuoso, pero de menor intensidad (Fig. 28C).

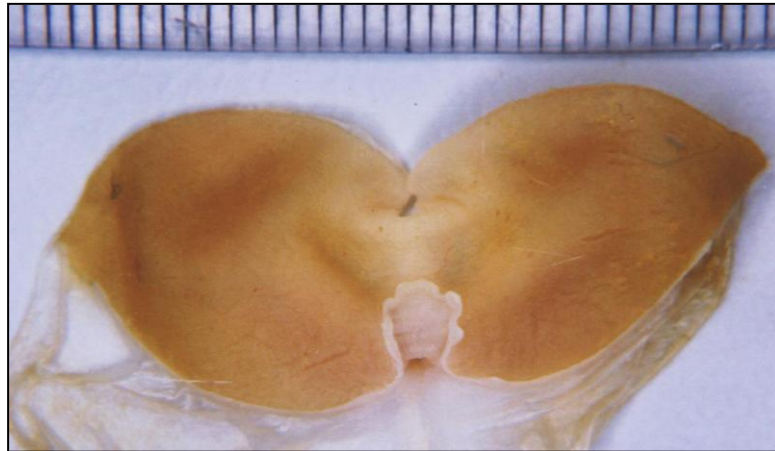


Fig. 28C: Estómago de ratón tratado con extracto metanólico. La mucosa presenta un aspecto normal.

Los estómagos de los animales tratados con extracto clorofórmico presentaron un aspecto normal, en ocasiones con restos de mucus adheridos a la superficie. No se observa tinción de la mucosa ya que el extracto es incoloro (Fig. 28D). Sólo uno de los estómagos presentó lesiones ulcerosas leves.



Fig. 28D: Estómago de ratón tratado con extracto clorofórmico. La mucosa presenta aspecto normal con restos de mucus adheridos sobre la superficie.

Los estómagos de los animales tratados con una combinación de extractos metanólico y clorofórmico (1:1, v/v) no presentaron úlceras. Se observaron restos de mucus adheridos sobre la superficie de la mucosa (Fig. 28E).



Fig. 28E: Estómago de ratón tratado con una combinación de extractos metanólico y clorofórmico (1:1, v/v). La mucosa presenta aspecto normal con restos de mucus adheridos sobre la superficie.

La escala que se visualiza en la parte superior de las figuras 28 (A-E) está graduada en milímetros.

En los animales pertenecientes a los grupos tratados con extractos acuoso, metanólico y metanólico-clorofórmico se logró un porcentaje de inhibición del 100% (Tabla 4).

El extracto clorofórmico inhibió la formación de úlceras en 4 de 5 animales, presentando el estómago afectado una lesión muy pequeña como lo indica el área de la superficie dañada en la Tabla 4.

Tabla 4

Efecto antiulceroso de extractos de *Centaurea solstitialis* sobre úlceras inducidas por estrés en ratones.

Grupos	Dosis oral ^a (mg/kg)	Area ulcerada ^d (8 ± S.D.)	Tasa de prevención de úlcera ^e	Inhibición (%)
Control	–	4,4 ± 1,9	0/5	–
Extracto Acuoso	5700	0,0 ± 0,0	5/5	100
Extracto Metanólico	3054	0,0 ± 0,0	5/5	100
Extracto Metanólico- Clorofórmico	3054 ^b + 282 ^c	0,0 ± 0,0	5/5	100
Extracto Clorofórmico	282	0,04 ± 0,03 *	4/5	99

^a Cantidad de extracto seco proveniente de 0,75 g de capítulos secos de Cs obtenidos como se indica en Materiales y Métodos punto 3.2. que fue administrada a cada animal. Las dosis expresadas en mg/kg se calcularon a partir del rendimiento del extracto seco que para los extractos acuoso, metanólico y clorofórmico fueron de 22,8, 12,22 y 1,13 % respectivamente.

^b Cantidad de extracto metanólico seco administrado por kg de peso corporal.

^c Cantidad de extracto seco clorofórmico administrado por kg de peso corporal.

^d Total de la superficie ulcerada de la mucosa gástrica expresada en mm².

^e Número de animales en los cuales el extracto inhibió totalmente la formación de úlceras respecto al total.

* Test “t” de Student P<0,05, n=5. Comparación del grupo tratado con extracto clorofórmico respecto al grupo control.

4.0. DETERMINACIÓN DEL EFECTO CITOPROTECTOR DE EXTRACTOS DE *CENTAUREA SOLSTITIALIS* EN RATONES

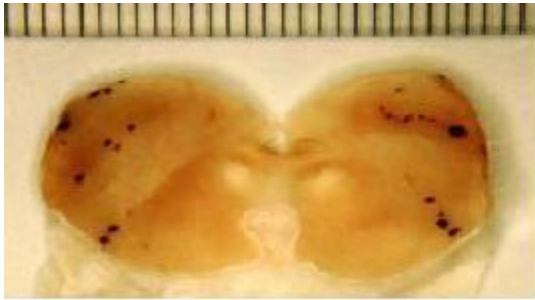
4.1. EVALUACIÓN DEL EFECTO CITOPROTECTOR DE EXTRACTOS DE *CENTAUREA SOLSTITIALIS* UTILIZANDO INDOMETACINA

Los resultados obtenidos tanto en ratas como en ratones determinaron que los extractos metanólico y clorofómico de *Centaurea solstitialis* inhiben la formación de úlceras inducidas por hipotermia e inmovilización.

Para determinar si los mecanismos que inhiben la formación de úlceras en los distintos extractos utilizados se deben a una acción citoprotectora que conduce al fortalecimiento de la barrera mucosa gástrica, se utilizó indometacina como bloqueante de la síntesis de prostaglandinas.

La indometacina por sí misma induce la formación de úlceras al inhibir la síntesis de prostaglandinas. Este efecto inhibitorio produce una disminución de la secreción de mucus, lo que ocasiona un debilitamiento de la barrera mucosa gástrica permitiendo que el ácido clorhídrico y la pepsina ataquen la mucosa del estómago. Por lo expuesto, la evaluación de la secreción de mucus será un dato relevante para determinar si el efecto antiulceroso encontrado en extractos metanólico y clorofómico está producido por un mecanismo citoprotector.

Los resultados mostrados en la Fig. 29 (A-F) evidencian que las lesiones ulcerosas inducidas por hipotermia e inmovilización se agravan sensiblemente con la administración previa de indometacina. Este efecto es notorio si se comparan las lesiones de las figuras 29 (B,D,F) correspondientes a animales tratados con indometacina, respecto a las figuras 29 (A,C,E) que muestran las lesiones de los estómagos de ratones que no fueron administrados con el agente inhibidor de la síntesis de prostaglandinas.



A



B



C



D



E



F

Fig. 29 A-F: Estómagos de ratones pertenecientes a los grupos control (A), control + indometacina (B), extracto metanólico (C), extracto metanólico + indometacina (D), extracto clorofórmico (E), extracto clorofórmico + indometacina (F). La escala que se visualiza en la parte superior de las fotografías está graduada en milímetros.

La inyección subcutánea de indometacina al grupo control + indometacina 1 hora antes del ensayo (Fig. 29B), produjo severas lesiones ulcerosas. Nótese en la figura 29B el aumento y disposición de las úlceras acompañando los pliegues mucosos, respecto al grupo control (Fig. 29A) que no fue tratado con el inhibidor de las prostaglandinas.

Los estómagos de ratones del grupo tratado con extracto metanólico (Fig. 29C) presentaron un aspecto normal. Los del grupo tratado con metanol + indometacina (Fig. 29D) poseen lesiones erosivas acompañando los pliegues mucosos. En ocasiones las lesiones erosivas son interrumpidas por úlceras y otras veces, como se presentan en la figura D, aparecen en la región pilórica.

Sólo uno de los animales tratado con extracto clorofórmico (Fig. 29E) presentó algunas úlceras con bordes bien definidos sobre una mucosa de aspecto normal. El grupo tratado con extracto clorofórmico + indometacina (Fig. 29F) muestra las mismas erosiones descritas para la figura D, pero en este caso se presenta un mayor número de lesiones ulcerosas.

El tratamiento con extractos metanólico y clorofórmico disminuyó la formación de úlceras respecto al grupo control en los ratones previamente administrados con indometacina (Tabla 5).

La administración previa de indometacina en el grupo control + indometacina produjo un aumento notorio del área ulcerada respecto al grupo control poniendo en evidencia el efecto ulcerogénico de la indometacina.

En el grupo tratado con extracto metanólico se inhibió totalmente la formación de úlceras, mientras que en el tratado con extracto clorofórmico el porcentaje de inhibición fue del 91 %.

En los animales que fueron expuestos a los efectos previos de la indometacina, se inhibió la formación de úlceras en un 92 % con la administración de extracto metanólico y en un 50 % con el extracto clorofórmico respecto al grupo control + indometacina.

Tabla 5

Evaluación del efecto de la administración previa de indometacina en ratones tratados con extractos metanólico y clorofórmico.

Grupos	Area ulcerada^a (8 ± S.D.)	Tasa de prevención de úlcera^b	Inhibición (%)
Control	2,99 ± 1,86	0/5	–
Control + Indometacina	14,88 ± 4,19	0/5	–
Extracto Metanólico	0,0 ± 0,0	5/5	100
Extracto Metanólico + Indometacina	1,17 ± 1,07 *	2/5	92
Extracto Clorofórmico	0,27 ± 0,20 *	4/5	91
Extracto Clorofórmico + Indometacina	7,41 ± 2,40 **	0/5	49

^a Total de la superficie ulcerada de la mucosa gástrica expresada en mm².

^b Número de animales en los cuales el extracto inhibió totalmente la formación de úlceras respecto al total.

Se compararon estadísticamente los grupos tratados con extractos metanólico y clorofórmico respecto al grupo control.

Se compararon estadísticamente los grupos tratados con extractos metanólico + indometacina y clorofórmico + indometacina con el grupo control + indometacina.

* Test “t” de Student P < 0,01, n=5.

** Test “t” de Student P < 0,05, n=5.

4.2. DETERMINACIÓN DEL EFECTO CITOPROTECTOR DE EXTRACTOS DE *CENTAUREA SOLSTITIALIS* EVALUANDO LA PRODUCCIÓN DE MUCUS A TRAVÉS DE ESTUDIOS HISTOLÓGICOS

La administración de indometacina evidenció que las prostaglandinas están comprometidas en la respuesta gastroprotectora exhibida por los extractos metanólico y clorofórmico de Cs. Para confirmar la acción citoprotectora de los extractos se evaluó el efecto de éstos sobre la producción de mucus.

Se conocen distintos métodos para medir la producción de mucus de la mucosa gástrica. Un método directo consiste en abordar la cavidad abdominal y ligar el píloro y el cardias en una operación previa, para luego recuperar el contenido. Esta técnica se descartó debido al escaso volumen que se recupera de animales tan pequeños como los ratones. Se empleó como técnica alternativa la observación por microscopía óptica, utilizando la coloración con ácido periódico-Schiff (PAS) que permite la localización de moléculas ricas en hidratos de carbono como las glucoproteínas, compuestos fundamentales del mucus. Mediante esta técnica se pone en evidencia la localización del mucus secretado por la mucosa gástrica, lo que hace posible realizar comparaciones entre distintos tratamientos de acuerdo a la positividad de la reacción.

La reacción PAS positiva se observó en el tercio superior de las glándulas gástricas perteneciente a los estómagos normales. La superficie del epitelio se encontró cubierta por una capa de mucus (Fig 30A).

El estrés producido por hipotermia e inmovilización produjo, en los estómagos de los animales que fueron administrados con excipientes, cambios notorios respecto a la mucosa normal. En la figura 30B, se observa una reacción de PAS menos intensa con interrupción del epitelio. La capa de mucus que se observó sobre la superficie mucosa de estómagos normales no está presente, característica que concuerda con una acción erosiva en progreso.

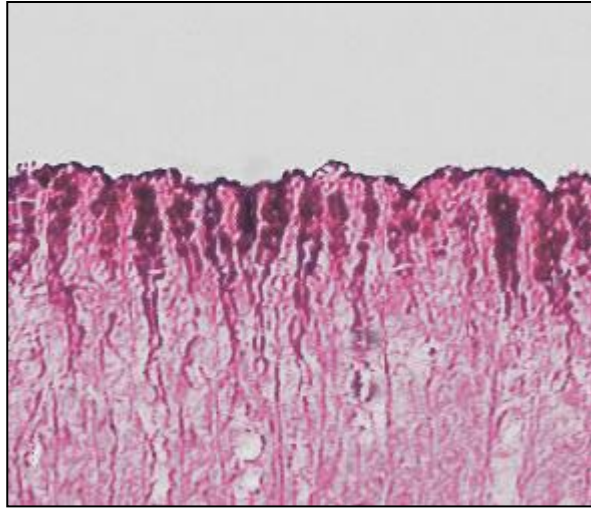


Fig. 30A: Corte histológico de mucosa gástrica normal de ratón teñido con PAS. 150X.

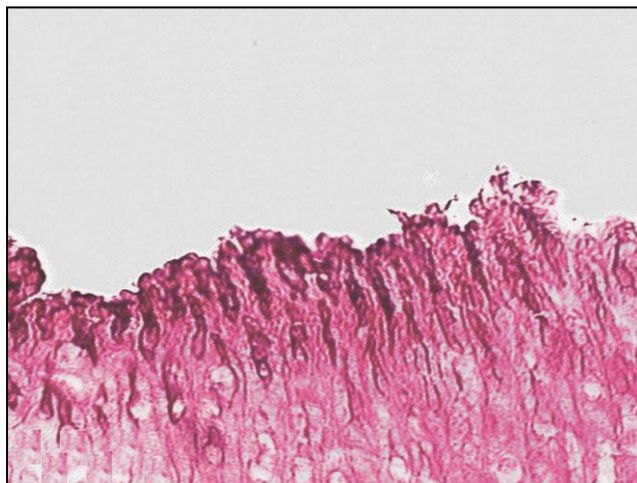


Fig. 30B: Corte histológico de mucosa gástrica de ratón sometido a estrés teñido con PAS. 150X.

Los estómagos de los animales tratados con extracto metanólico presentaron la reacción de PAS desplazada hacia la región apical de las glándulas gástricas y la superficie de la mucosa se encontraba cubierta por mucus (Fig. 30C).

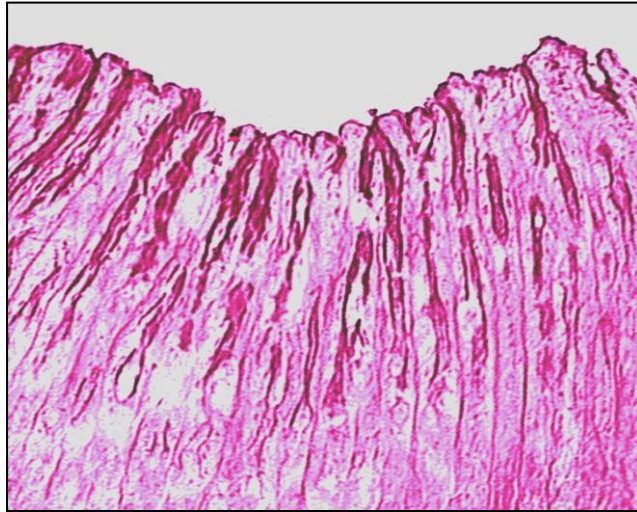


Fig. 30C: Corte histológico de mucosa gástrica de ratón tratado con extracto metanólico teñido con PAS. 150X.

En comparación con el aspecto que presentaron estos estómagos (Fig. 30C), los pertenecientes a los animales tratados con extracto clorofórmico evidenciaron una reacción de PAS positiva más intensa y completando casi totalmente la mitad superior de las glándulas gástricas (Fig. 30D).



Fig. 30D: Corte histológico de mucosa gástrica de ratón tratado con extracto clorofórmico teñido con PAS. 150X.

Comparando el aspecto de los cortes histológicos puede notarse que los animales que fueron sometidos a estrés y administrados solamente con los excipientes, presentaron daños evidentes y una reacción de PAS menos intensa que la presente en los estómagos de animales normales. Los estómagos de los animales sometidos a estrés y tratados con extractos metanólico y clorofórmico presentaron una reacción de PAS más intensa que los estómagos normales. La intensidad de la reacción en los estómagos de los animales tratados con extracto clorofórmico fue mayor que en los tratados con extracto metanólico.

4.3. DETERMINACIÓN DEL EFECTO CITOPROTECTOR DE EXTRACTOS DE *CENTAUREA SOLSTITIALIS* EVALUANDO LA PRODUCCIÓN DE MUCUS A TRAVÉS DE ESTUDIOS DE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA

Los estudios llevados a cabo con microscopía óptica se complementaron utilizando microscopía electrónica de barrido. La observación de la superficie mucosa a través de imágenes obtenidas por el microscopio electrónico de barrido permitieron visualizar y evaluar la producción de mucus en respuesta a diferentes tratamientos.

En la figura 31A puede observarse la superficie de un estómago de ratón normal.

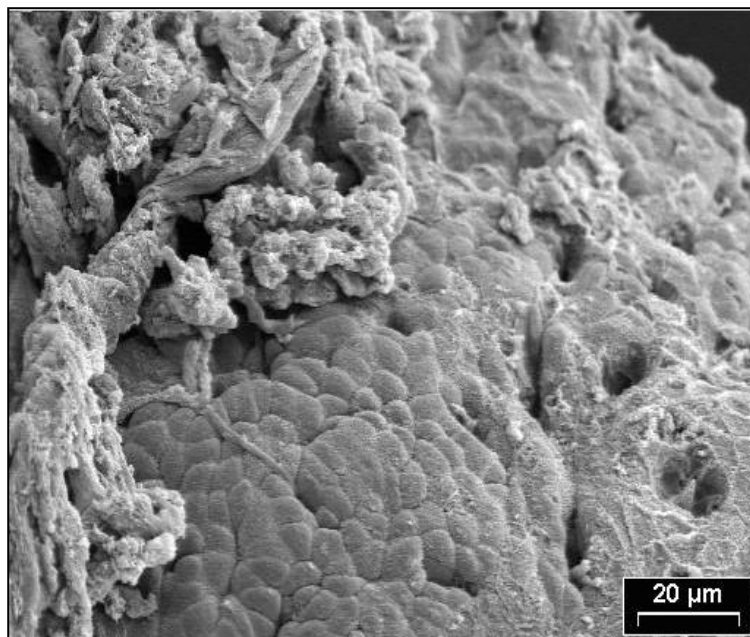


Fig. 31A: Micrografía electrónica de barrido mostrando mucosa gástrica normal de ratón.

Las células epiteliales de la superficie mucosa tienen una apariencia de empedrado que se hace en partes difusa al quedar bajo una capa de mucus. A la izquierda de la figura puede observarse la presencia de filamentos de mucus.

Los estómagos de los animales que fueron administrados solamente con los excipientes y luego sometidos a estrés, mostraron muy pocos restos de filamentos de mucus en la superficie y las células epiteliales de la mucosa se observaron con mayor claridad denotando un menor depósito de mucus sobre la superficie (Fig. 31B).

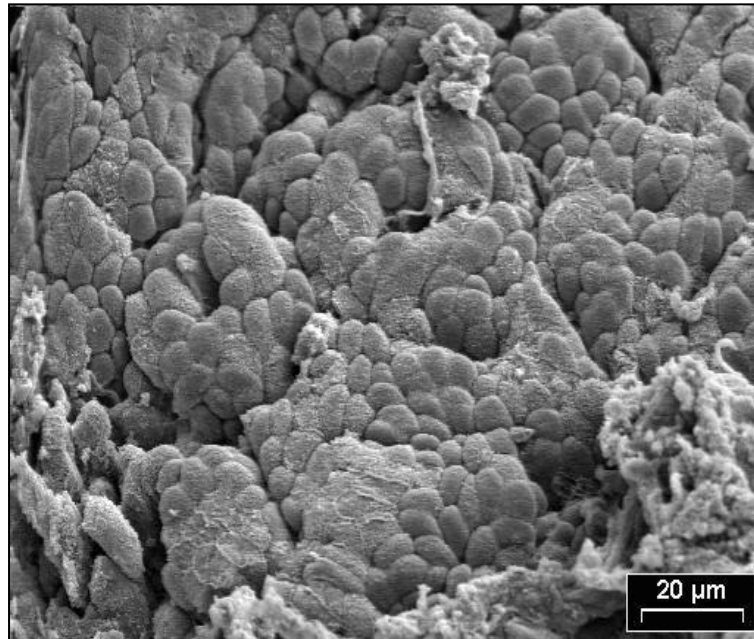


Fig. 31B: Micrografía electrónica de barrido mostrando mucosa gástrica de ratón sometido a estrés por hipotermia e inmovilización.

Los estómagos de los animales del grupo tratado con extracto metanólico (Fig. 31C) mostraron una cantidad mayor de depósitos de filamentos de mucus adheridos sobre la superficie de la mucosa gástrica

con relación a los que fueron administrados solamente con los excipientes (Fig. 31B).

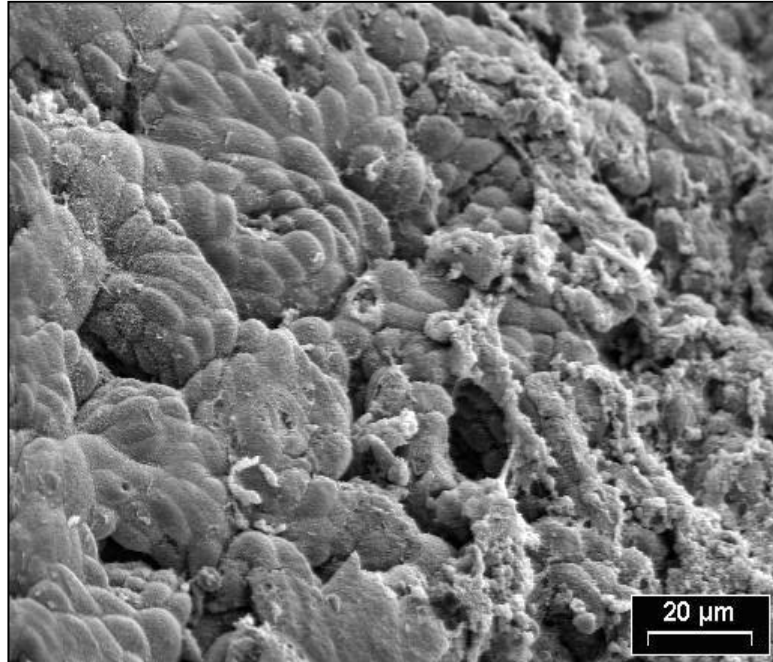


Fig. 31C: Micrografía electrónica de barrido mostrando mucosa gástrica de ratón tratado con extracto metanólico y sometido a estrés por hipotermia e inmovilización.

El extracto clorofórmico produjo un aumento de la secreción mucosa que se hizo evidente por la presencia de restos de filamentos mucosos que cubrían en parte el epitelio de la superficie de los estómagos (Fig 31D). La presencia de restos mucosos fue mayor que la que se presentó en los estómagos de los animales tratados con extracto metanólico.

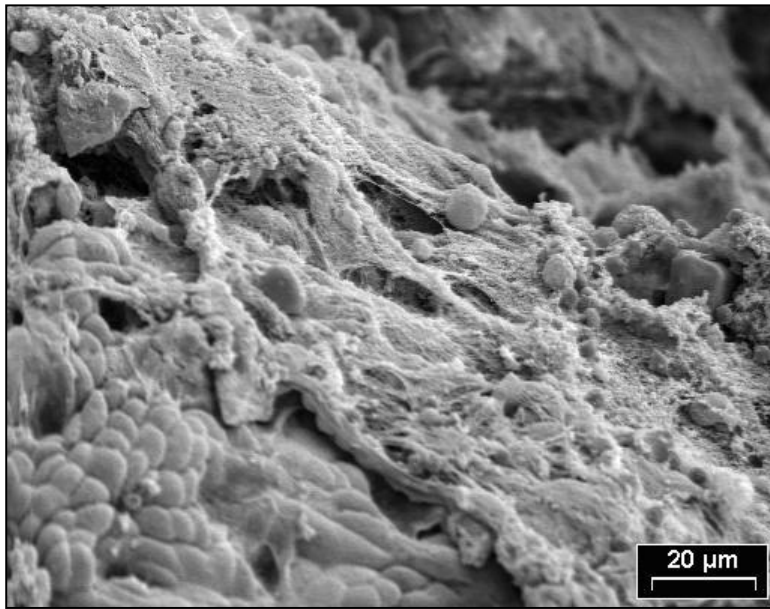


Fig. 31D: Micrografía electrónica de barrido mostrando mucosa gástrica de ratón tratado con extracto clorofórmico y sometido a estrés por hipotermia e inmovilización.

A mayor aumento se observan las células de la superficie mucosa de un estómago normal que posee gran cantidad de filamentos mucosos sobre su superficie (Fig. 32A).

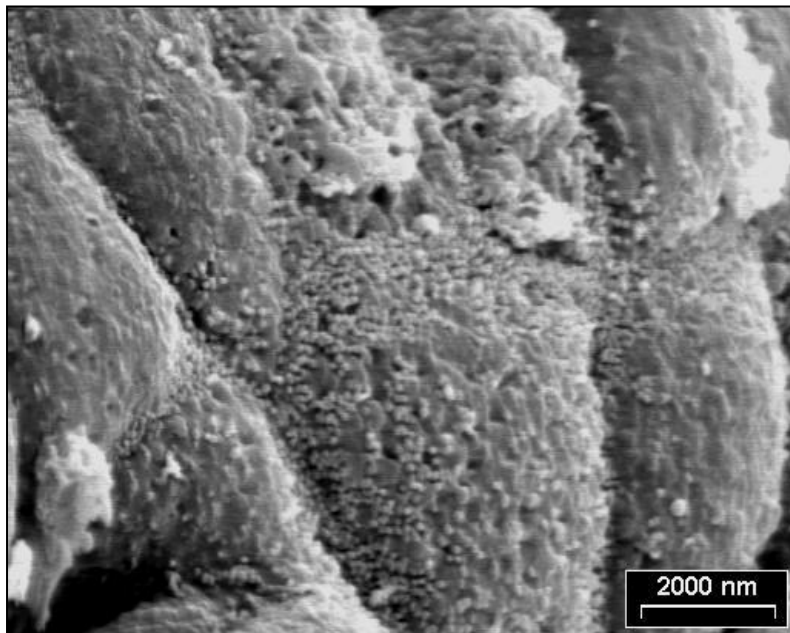


Fig. 32A: Micrografía electrónica de barrido mostrando las células epiteliales de mucosa gástrica normal de ratón.

El aspecto de las células de la superficie mucosa de los estómagos de ratones tratados con los excipientes y sometidos a estrés presentaron una superficie menos definida y menor cantidad de restos de mucus sobre su superficie respecto a los estómagos de los animales que no fueron expuestos a la prueba de estrés (Fig. 32B).

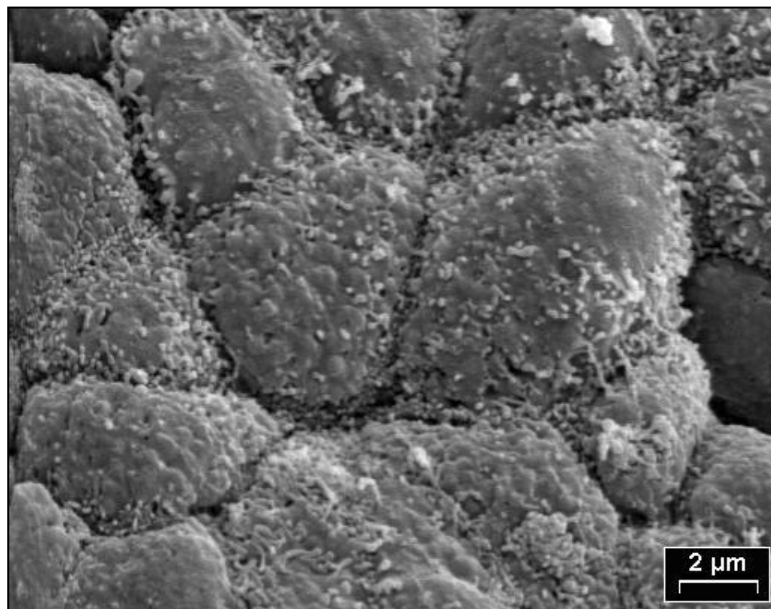


Fig. 32B: Micrografía electrónica de barrido mostrando las células epiteliales de mucosa gástrica de ratón sometido a estrés por hipotermia e inmovilización.

La superficie de las células epiteliales de la mucosa de los ratones tratados con extracto metanólico mostraron un aspecto similar a la mucosa normal (Fig. 32C).

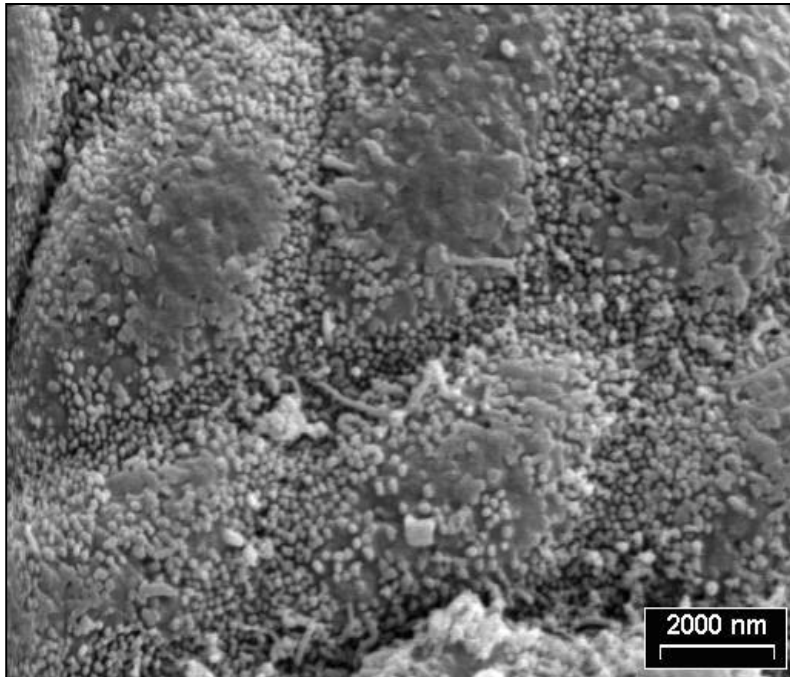


Fig. 32C: Micrografía electrónica de barrido mostrando células epiteliales de mucosa gástrica de ratón tratado con extracto metanólico y sometido a estrés por hipotermia e inmovilización.

El extracto clorofórmico produjo un cambio notorio en la superficie de las células epiteliales de la mucosa gástrica respecto a los otros grupos. Las vellosidades, de las cuales se desprenden algunos filamentos de mucus que han permanecido adheridos a la superficie, se mostraron más amplias y definidas (Fig. 32D).

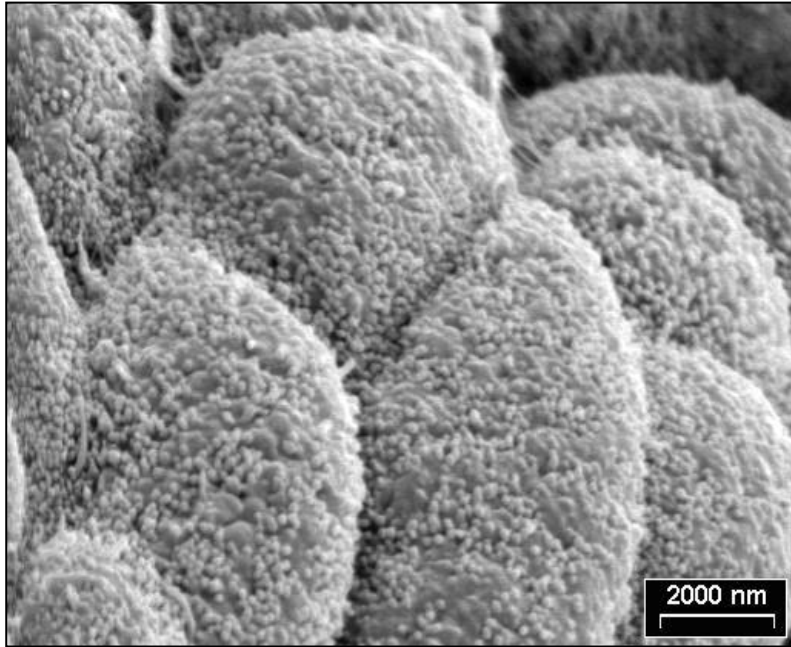


Fig. 32D: Micrografía electrónica de barrido mostrando células epiteliales de mucosa gástrica de ratón tratado con extracto clorofórmico y sometido a estrés por hipotermia e inmovilización.

5.0. EFECTO DEL ESTRÉS PROVOCADO POR HIPOTERMIA E INMOVILIZACIÓN SOBRE LA TEMPERATURA CORPORAL Y EL pH GÁSTRICO EN RATONES TRATADOS CON EXTRACTOS DE *CENTAUREA SOLSTITIALIS*

El ensayo de inducción de úlceras por hipotermia e inmovilización produce una serie de cambios que favorecen la presentación de lesiones erosivas y úlceras en la mucosa gástrica. Entre otras alteraciones, los trastornos circulatorios de la mucosa gástrica provocadas por la disminución de la temperatura corporal y un aumento de la secreción de ácido clorhídrico son factores determinantes en el debilitamiento de la barrera mucosa gástrica.

Teniendo como objetivo elucidar los mecanismos de acción relacionados con la acción gastroprotectora exhibida por los extractos metanólico y clorofórmico, se midió la temperatura corporal y el pH de la superficie gástrica a ratones que permanecieron en condiciones de cría en el bioterio respecto a animales sometidos a estrés. Además, se midieron estos parámetros en ratones tratados con extractos metanólico y clorofórmico y sometidos a estrés.

Considerando que el pH de los extractos puede influir en los resultados, se midió este parámetro en los extractos resuspendidos en el excipiente y también en el excipiente.

Los animales pertenecientes al grupo utilizado como control, tratados con excipientes y sometidos a estrés, no mostraron diferencias en los valores de pH gástrico respecto a los animales del grupo utilizado para obtener los valores normales y que no fueron sometidos a estrés. Los tratados con extractos metanólico y clorofórmico mostraron valores significativamente más elevados de pH gástrico respecto al grupo control, pero no hubo diferencias significativas entre los valores de pH obtenidos entre ellos (Tabla 6).

La temperatura corporal descendió en forma significativa en todos los grupos obteniéndose valores similares al de la temperatura del agua del baño termostático.

Los valores de pH obtenidos al medir el excipiente, extracto metanólico y extracto clorofórmico fueron de 7,43; 4,29 y 6,23 respectivamente.

Tabla 6

Evaluación del efecto de la administración de extractos metanólico y clorofórmico de *Centaurea solstitialis* sobre el pH medido en la superficie de la mucosa gástrica y la temperatura corporal en ratones normales y luego de ser sometidos a estrés por hipotermia e inmovilización.

GRUPOS	TEMPERATURA CORPORAL (°C)	pH DE LA SUPERFICIE MUCOSA GÁSTRICA (8 ± S.D.)
NORMAL	38,4 ± 0,3	1,5 ± 0,3
CONTROL	22,0 ± 0,2 *	1,1 ± 0,4 n.s.
EXTRACTO METANÓLICO	22,0 ± 0,3 *	3,5 ± 0,8 *
EXTRACTO CLOROFÓRMICO	22,0 ± 0,2 *	4,2 ± 1,4 *

Los animales pertenecientes al Grupo Normal recibieron una dosis del excipiente. Los grupos Control, Extracto Metanólico y Extracto Clorofórmico fueron administrados con excipiente, extractos metanólico y clorofórmico respectivamente y posteriormente sometidos a estrés por hipotermia e inmovilización durante 4,5 h. La temperatura corporal y el pH de la mucosa gástrica de los animales fueron medidos luego de 4,5 h de ser sometidos a estrés por hipotermia e inmovilización.

* Test "t" de Student P<0,01, n=5. El aumento de pH de los grupos metanólico y clorofórmico se comparó respecto al grupo control. La temperatura corporal se analizó comparando el Grupo Control, Extracto Metanólico y Clorofórmico respecto al Grupo Normal.

n.s. No se encontraron diferencias significativas entre el pH de la superficie de la mucosa gástrica de los Grupos Normal y Control.

6.0. ESTUDIOS FITOQUÍMICOS DE EXTRACTOS METANÓLICO Y CLOROFÓRMICO DE *CENTAUREA SOLSTITIALIS*

Los ensayos realizados utilizando indometacina como inhibidor de la síntesis de prostaglandinas y los estudios histológicos por medio de la reacción de PAS y de microscopía electrónica de barrido, revelaron la presencia de compuestos que produjeron efectos citoprotectores en los extractos metanólico y clorofórmico. Estas técnicas complementarias que evidenciaron los efectos de los extractos ensayados sobre la producción de mucus, aportaron datos que orientaron en la búsqueda de compuestos con acción citoprotectora a través de métodos fitoquímicos.

En el presente trabajo se realizaron procedimientos de aislamiento y bioensayos en forma combinada para determinar la acción farmacológica de las fracciones metanólica y clorofórmica con relación a su propiedad inhibitoria sobre la formación de úlceras inducidas por hipotermia e inmovilización.

Considerando que la fracción metanólica dio positiva a las reacciones de caracterización de Shinoda y cloruro férrico y que algunos flavonoides poseen acción gastroprotectora, se realizaron estudios fitoquímicos de esta fracción con el fin de determinar la presencia de rutina, canferol, apigenina y quercetina, compuestos con reconocida actividad antiulcerosa. Se detectaron dos flavonas, la quercetina y el canferol.

Habiéndose identificado dos compuestos con acción farmacológica reconocida sobre las úlceras gástricas en la fracción metanólica y sólo caracterizado lactonas sesquiterpénicas en la fracción clorofórmica, se decidió centrar los estudios siguientes en los flavonoides hallados con el fin de determinar su efectiva participación en la acción antiulcerosa. En forma simultánea se realizaron algunos bioensayos con la fracción clorofórmica que hicieron posible avanzar en el conocimiento de algunos aspectos de la acción inhibitoria sobre la formación de úlceras gástricas exhibida por esta fracción.

6.1. AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS PRESENTES EN LA FRACCIÓN METANÓLICA DE *CENTAUREA SOLSTITIALIS*

Durante los procedimientos de extracción, a los distintos extractos se les realizaron las reacciones de caracterización de Shinoda y cloruro férrico. Los extractos acuoso, metanólico y la fracción acetato de etilo dieron positivos a estas reacciones. Los cromatogramas obtenidos de la CCF con la fracción metanólica no presentaron bandas que comigraran con los estándares auténticos de canferol, quercetina, rutina ni apigenina en ninguno de los dos sistemas de solventes utilizados. De la fracción acetato de etilo se resolvieron dos bandas de Rf 0,80 y 0,89 similares a las de los estándares auténticos de quercetina y canferol respectivamente.

Los compuestos fueron recuperados con metanol y purificados en HPLC revelando la presencia de dos picos con tiempos de elución similares a aquellos de los estándares auténticos de quercetina (29,42 minutos) y canferol (33,12 minutos) (Fig. 33 A,B).

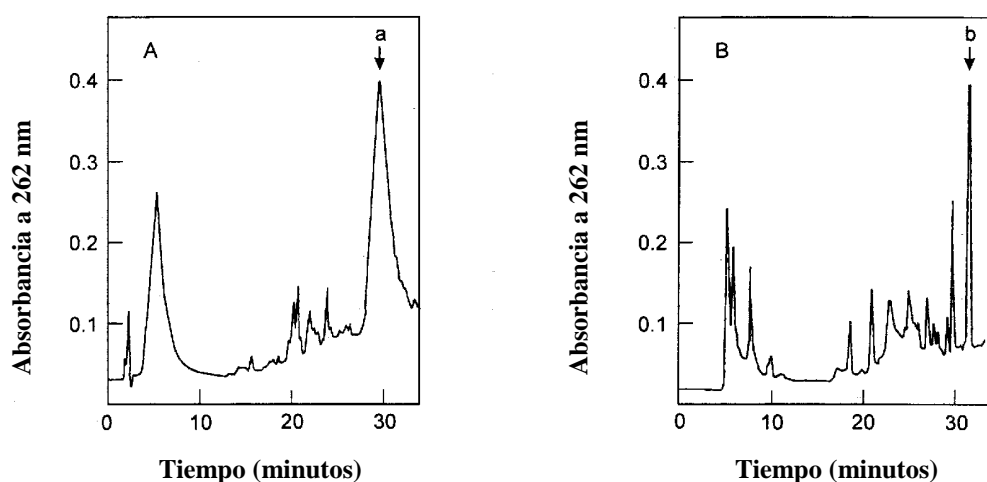


Fig. 33A,B: Aislamiento de quercetina y canferol provenientes de capítulos de *Centaurea solstitialis* por HPLC. A los extractos de la fracción acetato de etilo se los cromatografió en capa fina como se indicó en la sección 6.2. de Materiales y Métodos. Cada fracción de CCF fue posteriormente resuelta por HPLC usando un cartucho de fase reversa LiChroCART (4 x 250 mm). (A) quercetina y (B) canferol, eluidas con un gradiente de metanol-agua (15:85 a 100:0) en 35 minutos, $\lambda = 262$ y flujo 1ml/min. Las flechas indican la elución de muestras auténticas de (a) quercetina y (b) canferol.

La espectrometría de masas de los probables picos de quercetina y canferol provenientes de HPLC, se llevó a cabo con el objeto de elucidar sus estructuras químicas (Fig. 34A y 35A).

En la figura 34A se muestra el espectro de masas por impacto electrónico del pico de HPLC con un ion molecular (M^+) a m/z 302. La supuesta molécula de quercetina produce una señal intensa de masa 302 y otra más débil de masa 303 ($M^+ + 1$), debido a la tendencia a la protonación que poseen este tipo de compuestos (Seibl, 1973). La pérdida de un radical oxhidrilo del ion $M^+ + 1$ luego de la apertura de la molécula por ruptura entre los carbonos 2 y 3 del anillo C, da un pico a m/z 286. A partir de éste, se origina el pico a m/z 257 por pérdida de CHO. El pico a m/z 229 fue causado por la pérdida de CO del pico a m/z 257. De este último pico formado, se obtiene una señal a m/z 128 por pérdida de 101 unidades de masa. La pérdida de 150 unidades de masa a partir del pico a m/z 303 dio como resultado el pico a m/z 153. La señal a m/z 273 resultó de la ruptura del ion molecular entre los carbonos 2 y 3 y posterior pérdida de CHO. El pico a m/z 245 se originó por la pérdida de CO a partir del pico con m/z 273 y el pico a m/z 142 se obtuvo por pérdida de 4 moléculas de agua y de CH_3O del pico a m/z 245. La pérdida de 165 unidades de masa del ion molecular, debido a la ruptura del mismo entre los carbonos 2-3 y las posiciones 1-9 del anillo C, produjo el pico a m/z 137. De esa señal de masa 137 por pérdida de O y de CO se obtuvieron los picos a m/z 121 y 109 respectivamente. En la figura 34B se muestra un esquema de la formación de los distintos picos a partir del ion molecular.

La figura 35A muestra el espectro de masas por impacto electrónico del pico proveniente de HPLC cuyo ion molecular es m/z 286. Por lo dicho anteriormente, este tipo de moléculas tiene tendencia a la protonación y además a la dehidrogenación a partir del ion molecular, otra de las características de estos compuestos (Seibl, 1973). Debido a ello, se aprecian los picos a m/z 287 ($M^+ + 1$) y 285 ($M^+ - 1$) con señales más débiles que el M^+ . La ruptura de la molécula de $M^+ - 1$ entre los carbonos 2

y 3 del anillo C y la pérdida de 4 moléculas de agua da el pico a m/z 213 y de éste, por pérdida de CHO, se obtiene la señal a m/z 184. La pérdida de C_3H_3O da como resultado el pico a m/z 129. El pico a m/z 121 resulta de la ruptura del ion molecular entre los carbonos 2-3 y 1-9 del anillo C lo que produce una pérdida de 165 unidades de masa. El pico a m/z 257 se obtiene por pérdida de CHO del ion molecular previa ruptura del mismo entre los carbonos 2 y 3. La pérdida de CO de la señal a m/z 257 origina el pico a m/z 229. La pérdida de OH y CHO del pico a m/z 287, que sufrió la apertura del anillo por ruptura entre los carbonos 2 y 3, originó el pico a m/z 241. De éste, por pérdida de 4 moléculas de agua y C_2H_2 se obtiene el pico a m/z 143. La ruptura entre los carbonos 2 y 3 de la molécula del ion a m/z 287 y posterior pérdida de CHO da el pico a m/z 258. La señal a m/z 153 se produce por ruptura del $M^+ + 1$ entre las posiciones 1-2 y los carbonos 3-4 del anillo C, lo que provoca una pérdida de 134 unidades de masa. A su vez, el pico a m/z 136 es originado por la pérdida de OH a partir de la señal a m/z 153, mientras que el m/z 93 se forma por pérdida de CH_3CO del pico a m/z 136. La misma señal a m/z 153 produce el pico a m/z 108 por pérdida de CO y OH, mientras que de este último se origina el pico a m/z 77 por pérdida de 31 unidades de masa. En la figura 35B se muestra un esquema de la formación de los distintos picos a partir del ion molecular.

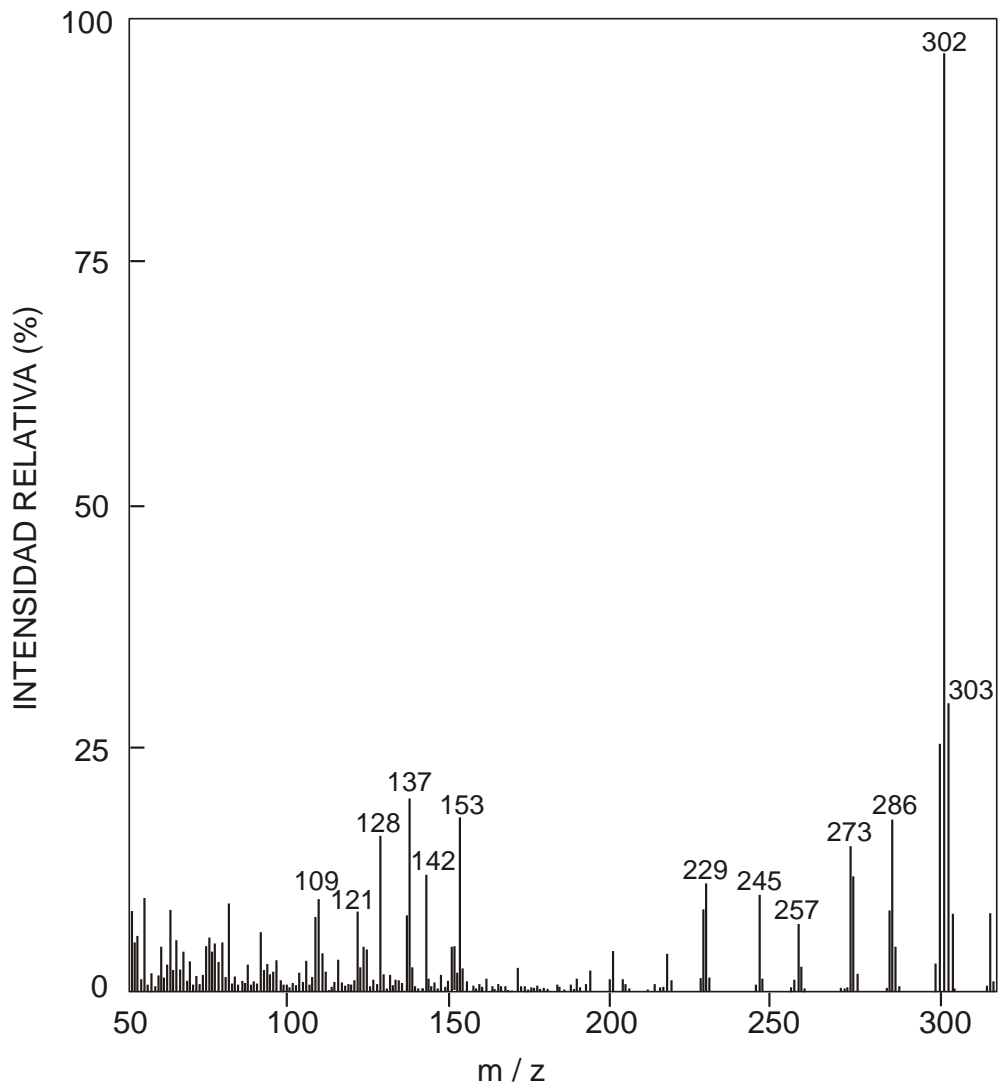


Fig. 34A: Espectro de masas de la fracción de HPLC que contenía quercetina.

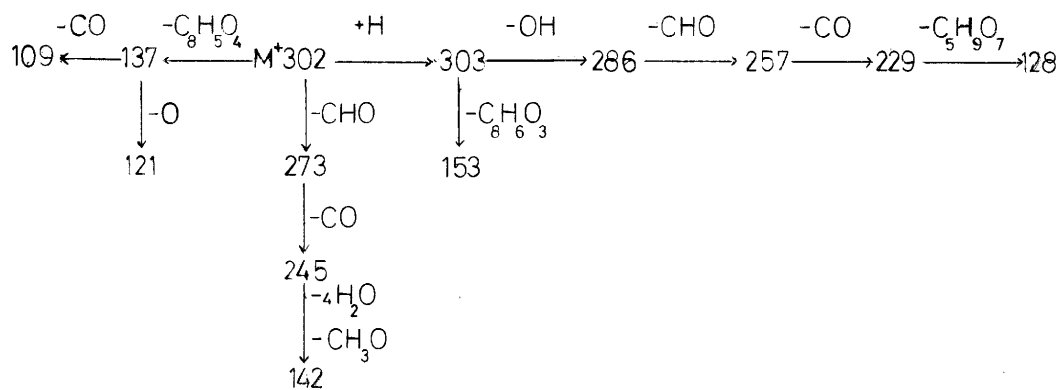


Fig. 34B: Esquema indicando la formación de los picos a partir del ion molecular.

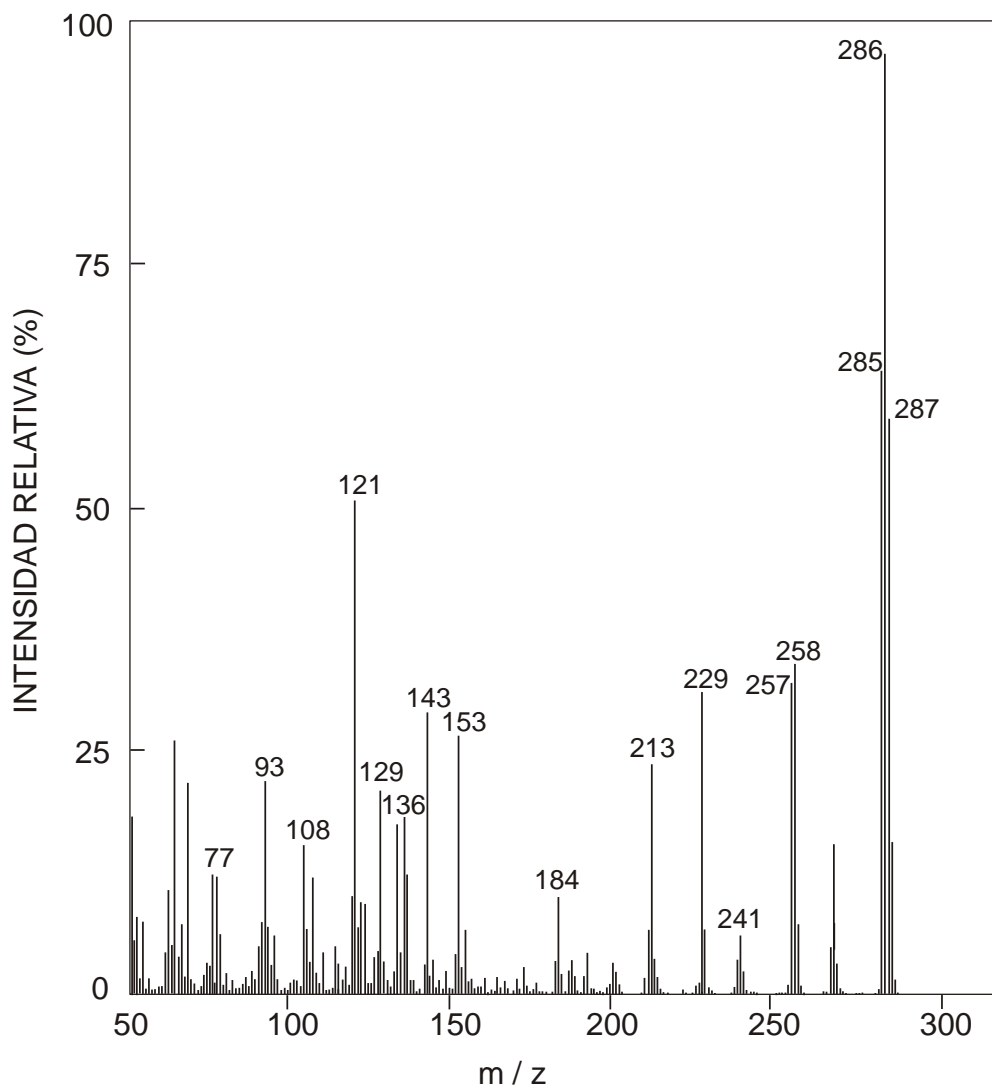


Fig. 35A: Espectro de masas de la fracción de HPLC que contenía canferol.

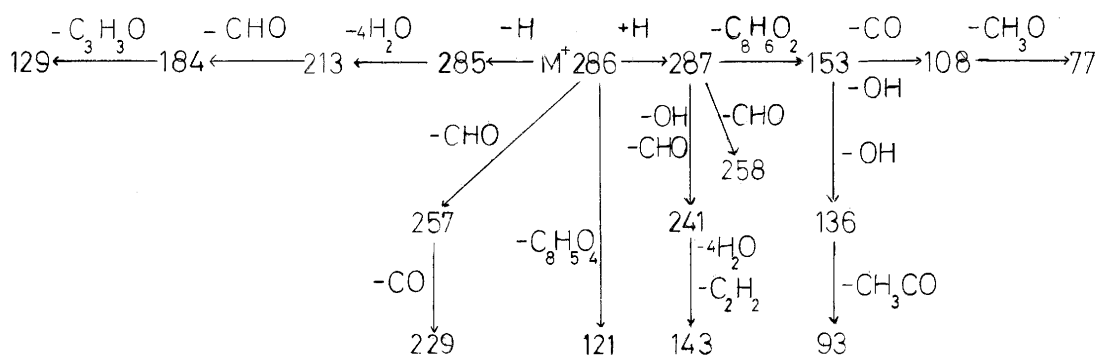


Fig. 35B: Esquema indicando la formación de los picos a partir del ion molecular.

6.2. CUANTIFICACIÓN DE QUERCETINA Y CANFEROL EN CAPÍTULOS DE *CENTAUREA SOLSTITIALIS*

El resultado negativo en la búsqueda de rutina en la fracción metanólica, permitió utilizar el método de extracción basado en la hidrólisis por ácido clorhídrico. Si las fracciones poseen rutina, ésta debe aislarse antes de hidrolizar la fracción, ya que la hidrólisis de la rutina da quercetina.

Por medio de HPLC y utilizando estándares sintéticos se elaboraron curvas de calibrado de distintas concentraciones de quercetina y canferol. Se aislaron ambos flavonoides partiendo de 10 g de capítulos de *Centaurea solstitialis* por los métodos de aislamiento detallados en el punto 6.2. de Materiales y Métodos. Los cálculos correspondientes determinaron que los capítulos de Cs contienen 0,63 mg de quercetina por gramo de materia seca y 1,47 mg de canferol por gramo de materia seca.

6.3. CARACTERIZACIÓN DE COMPUESTOS PRESENTES EN LA FRACCIÓN CLOROFÓRMICA DE *CENTAUREA SOLSTITIALIS*

La CCF utilizando sílica gel como adsorbente es uno de los métodos analíticos más utilizados para la separación de lactonas sesquiterpénicas. Los sistemas de solventes y métodos de revelado varían según el número de dobles ligaduras presentes en sus estructuras. Considerando los compuestos previamente aislados de Cs por otros autores, se seleccionó como solvente de elución benceno-dioxano-ácido acético y como método de revelado luz UV. Se consideraron de interés para analizar por ^1H RMN las bandas que dieron color violáceo con luz UV a 366 nm.

Para obtener las cantidades necesarias de los compuestos seleccionados para su posterior análisis por RMN, se cromatografió el extracto clorofórmico de capítulos de Cs en columna. El seguimiento de las distintas fracciones obtenidas utilizando CCF permitió visualizar las bandas de interés con UV y agruparlas según la presencia de éstas. Las fracciones que no presentaron bandas color violáceo fueron descartadas.

Las fracciones 8 a 14, 19 a 24 y 28 a 33, obtenidas por elución con éter etílico y las fracciones 34 a 38 obtenidas por elución con éter etílico-etanol (1:1, v/v) que presentaron un cromatograma similar, fueron juntadas y analizadas por ^1H RMN.

Solo el espectro de ^1H RMN, correspondiente a una de las bandas obtenidas de la fracción 19 a 24, presentó una señal característica (doble enlace exocíclico) que se correlaciona con lactonas sesquiterpénicas, lo que permitió caracterizar parcialmente a estos compuestos que eventualmente estarían presentes en la planta.

7.0. EFECTO DE EXTRACTOS DE *CENTAUREA SOLSTITIALIS* SOBRE EL TRÁNSITO GASTROINTESTINAL EN RATONES

Durante las necropsias de los ratones, tratados con extractos acuoso y metanólico de *Centaurea solstitialis*, se encontraron restos de los extractos en los estómagos. Este hallazgo fue menos notorio en los animales tratados con extracto clorofórmico, aunque en ambos casos los estómagos estaban dilatados. En contraste, los estómagos de los animales pertenecientes al grupo control estaban completamente vacíos sin presentar alteraciones en su tamaño. Estas observaciones llevaron a pensar que los extractos podrían actuar inhibiendo la motilidad gástrica.

Para comprobar esta hipótesis se utilizó una técnica radiográfica que consistió en tomar radiografías seriadas a ratones, permitiendo evaluar comparativamente la acción de los distintos extractos de Cs sobre el desplazamiento de una sustancia radiopaca en el tracto gastrointestinal.

En la figura 36A puede observarse la localización de la sustancia radiopaca luego de la administración a ratones. Los estómagos de los animales tratados con extractos acuoso, metanólico y clorofórmico (EA, EM, EC) se encuentran más pletóricos que el perteneciente al grupo control (GC). La sustancia radiopaca progresó en forma más notoria en el tracto intestinal de los animales pertenecientes al grupo control respecto a los demás grupos. La presencia de sustancia radiopaca en las primeras porciones del intestino de los animales radiografiados en el minuto 0, se debe a que transcurren unos minutos desde que se completan las maniobras de administración y encierro de los animales en las jaulas de inmovilización, hasta que se toma la primera placa. Este lapso, da lugar a que se desplace parte del contenido al intestino.

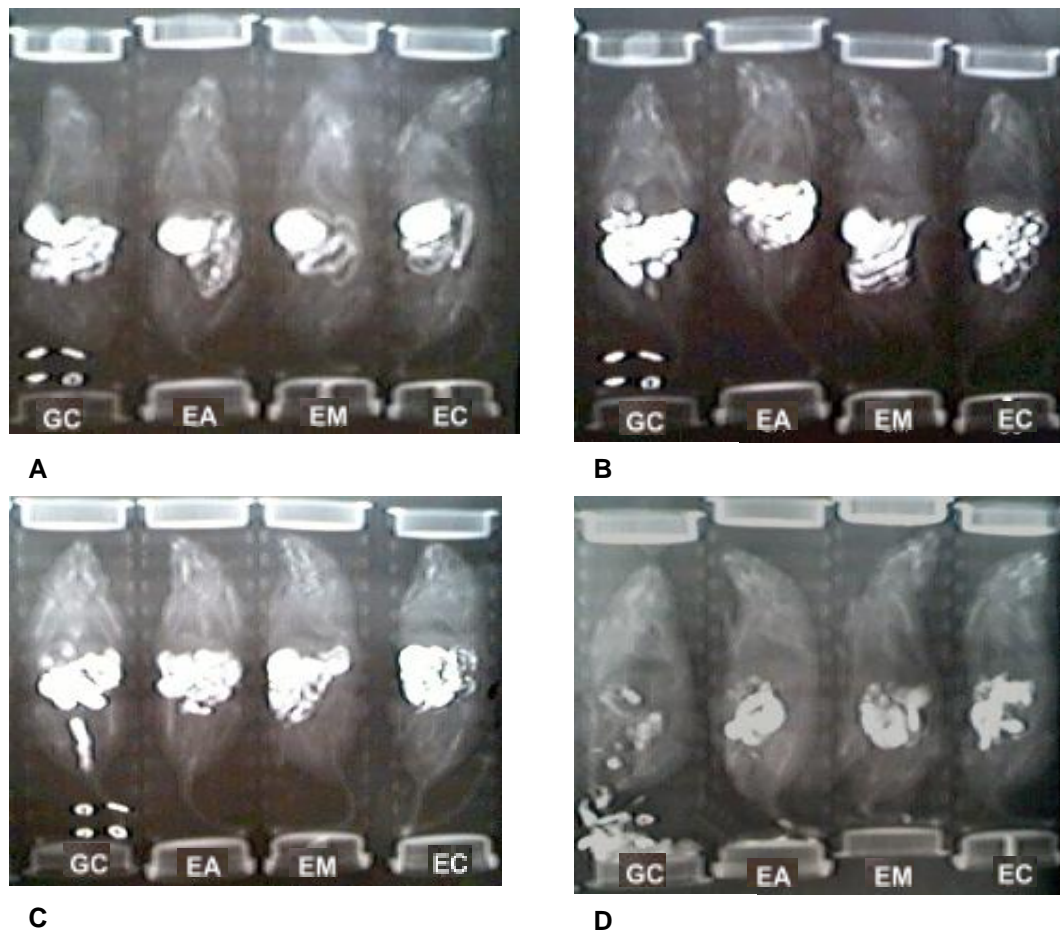


Fig. 36 (A-D): Radiografías seriadas de ratones pertenecientes a los grupos control (GC) y tratados con extractos acuoso (EA), metanólico (EM) y clorofórmico (EC) de *Centaurea sostiialis* tomadas a los 0, 60, 120 y 300 minutos respectivamente. Las cuatro marcas radiopacas que aparecen en la parte inferior de los animales del GC en todas las figuras corresponden a una señal de identificación de la jaula de inmovilización. Las figuras mostradas pertenecen a una de las cuatro repeticiones efectuadas en el presente estudio.

El vaciado gástrico se ha completado casi totalmente en el estómago del ratón perteneciente al grupo control a los 60 minutos de administrada la solución radiopaca (Fig. 36B). Puede notarse que los estómagos del resto de los animales, tratados con los distintos extractos, permanecen plétóricos y el avance del contenido intestinal no es muy importante respecto a las imágenes correspondientes de la figura 36A.

El vaciado gástrico se completó totalmente entre los 90 (datos no mostrados) y 120 minutos en todos los animales del grupo control, mientras

que no se observó un progreso significativo del contenido gastrointestinal en los animales pertenecientes a los grupos restantes.

En la radiografía correspondiente a los 120 minutos pos administración de la sustancia radiopaca, se observa un importante desplazamiento de la misma en el tracto intestinal del grupo control (Fig. 36C), haciéndose notoria la evacuación en la Fig. 36D a los 300 minutos, mientras que en los animales pertenecientes a los grupos restantes se observa un moderado progreso del contenido intestinal sin evacuación.

8.0. EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE DROGAS RELACIONADAS CON LA MOTILIDAD GÁSTRICA SOBRE LA FORMACIÓN DE ÚLCERAS

El test de inducción de úlceras por hipotermia e inmovilización produce un aumento de la motilidad gástrica que, junto con otros factores, erosionan la mucosa predisponiendo a la formación de lesiones ulcerosas. Esta referencia y la localización de las lesiones sobre las zonas más expuestas de los pliegues gástricos llevó a pensar que este factor, relacionado directamente con la etiopatogenia de la úlcera provocada por estrés, podría estar vinculado con el mecanismo de acción exhibido por los extractos.

Habiéndose comprobado en los extractos de Cs la presencia de un importante efecto inhibitor de la motilidad gastrointestinal a través de los estudios radiológicos, se diseñó una estrategia experimental para determinar si la motilidad gástrica es un factor determinante en la formación de úlceras inducidas por estrés. Se utilizó atropina como inhibitor de la motilidad y pilocarpina para aumentar las contracciones. El extracto metanólico y la pilocarpina se administraron en forma conjunta con el propósito de determinar la presencia de efectos antagónicos sobre la inducción de úlceras.

Los animales tratados con atropina y con extracto metanólico no presentaron úlceras (Tabla 7). La pilocarpina incrementó la formación de úlceras en un 64 % respecto al grupo control.

El grupo tratado con pilocarpina + extracto metanólico inhibió la formación de úlceras en un 51% respecto al grupo tratado con pilocarpina. Uno de los cinco animales pertenecientes a este grupo no presentó lesiones ulcerosas.

Las lesiones provocadas con pilocarpina se localizaron siguiendo el patrón marcado por los pliegues de la mucosa gástrica en forma similar a lo

observado en las lesiones provocadas con indometacina (Fig. 29B), la que también aumenta la motilidad gástrica.

Tabla 7

Efecto de la administración de atropina, pilocarpina, extracto metanólico y pilocarpina-extracto metanólico sobre las lesiones gástricas inducidas por hipotermia e inmovilización.

Grupos	Dosis ^a (mg/kg)	Area ulcerada ^d (mm ²) (8 ± S.D.)	Tasa de prevención de úlcera ^e	Inhibición (%)
Control	–	4,15 ± 2,01	0/5	–
Atropina	1,5	0,0 ± 0,0	5/5	100
Pilocarpina	1	6,82 ± 1,20 n.s.	0/5	–
Extracto metanólico	2545	0,0 ± 0,0	5/5	100
Pilocarpina-Extracto metanólico	1 ^b + 2545 ^c	3,31 ± 1,21 *	1/5	51

^a La atropina y la pilocarpina se administraron por vía intraperitoneal. El extracto acuoso vía oral.

^b Corresponde a la dosis de pilocarpina.

^c Corresponde a la dosis de extracto metanólico.

^d Total de la superficie ulcerada de la mucosa gástrica expresada en mm².

^e Número de animales en los cuales el extracto metanólico inhibió totalmente la formación de úlceras respecto al total.

n.s. Test "t" de Student P<0,05, n=5. El aumento del área ulcerada entre el grupo tratado con pilocarpina respecto al grupo control fue no significativo.

* Test "t" de Student P<0,05, n=5. El grupo tratado con pilocarpina-extracto metanólico se comparó respecto al tratado con pilocarpina.

9.0. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIULCEROSA DE FLAVONOIDES AISLADOS DE *CENTAUREA SOLSTITIALIS*

9.1. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIULCEROSA DE QUERCETINA EN RATONES

La administración de atropina y pilocarpina evidenciaron que la motilidad gástrica es un factor determinante en la formación de úlceras gástricas inducidas por hipotermia e inmovilización. Habiendo comprobado que la atropina previene la formación de úlceras, se pensó que la quercetina, un compuesto que también inhibe la motilidad gastrointestinal, estaría involucrado en el efecto antiulceroso exhibido por la fracción metanólica. El efecto antiulceroso de la quercetina fue comprobado por otros autores utilizando etanol como agente inductor del daño gástrico. En ese modelo experimental se evidenció que este efecto se debería a la acción antioxidante del compuesto. En el presente bioensayo, para comprobar que el posible efecto antiulceroso de la quercetina está relacionado con la actividad inhibitoria de la motilidad gástrica, se la administró vía oral inmediatamente antes de someter a los ratones a la prueba de estrés.

La quercetina administrada por vía oral no exhibió efecto inhibitor sobre el daño gástrico inducido por estrés (Tabla 8).

Al realizar la necropsia de los animales se observó la presencia de una importante cantidad del compuesto administrado en el contenido

intestinal, pero no en el estómago. Esta observación indica que no hubo una buena absorción del compuesto.

Tabla 8

Efecto de la quercetina sobre el porcentaje de inhibición de úlceras inducidas por estrés en ratones.

Grupos	Dosis oral ^a (mg/kg)	Area ulcerada ^b ($8 \pm$ S.D.)	Tasa de prevención de úlcera ^c	Inhibición (%)
Control	–	1,09 \pm 1,0	0/5	–
Quercetina	200	2,72 \pm 2,3 n.s.	0/5	–

^a Los animales del grupo control fueron administrados con 0,5 ml de excipiente.

^b Total de la superficie ulcerada de la mucosa gástrica expresada en mm².

^c Número de animales en los cuales el extracto inhibió totalmente la formación de úlceras respecto al total.

n.s. Test “t” de Student $P < 0,05$, $n = 5$. Las diferencias entre el área ulcerada del grupo tratado con quercetina respecto al grupo control no fueron significativas.

9.2. EFECTOS ANTIULCEROSOS DE LOS FLAVONOIDES QUERCETINA Y CANFEROL LIBRES Y CONJUGADOS

Teniendo como antecedentes el resultado negativo obtenido al utilizar una elevada dosis de quercetina por vía oral y que los flavonoides libres son absorbidos con dificultad, en el presente bioensayo se administró quercetina y canferol adquiridos comercialmente por vía intraperitoneal. En el mismo ensayo se administró por vía oral quercetina y canferol conjugados aislados de Cs como se indica en Materiales y Métodos punto 9.2.3.

Las dosis utilizadas de quercetina y canferol libres fueron de 100 mg/kg de peso y se administraron 30 minutos antes del ensayo para favorecer la absorción. Las dosis de quercetina y canferol conjugadas, estuvieron relacionadas con las cantidades cuantificadas en el extracto y fueron administradas por vía oral inmediatamente antes del ensayo. Al utilizar este esquema de administración se intentó comprobar, por un lado, que los compuestos conjugados exhiben una mejor relación dosis-respuesta cuando se los utiliza tal como se encuentran en la planta, y por el otro, que la quercetina libre posee acción gastroprotectora cuando es administrada por vía intraperitoneal.

El efecto gastroprotector del canferol libre fue comprobado anteriormente por otros autores y tanto la vía de administración como la dosis utilizadas en ese experimento fueron tomadas como referencia para realizar el presente bioensayo. Para la administración de la quercetina libre se utilizó la misma vía de administración y dosis empleada para el canferol, teniendo como objetivo comparar la actividad farmacológica de estos compuestos. La quercetina y el canferol conjugados fueron administrados por separado y en forma conjunta en distintos grupos de animales para determinar la posible presencia de efectos aditivos sobre la acción gastroprotectora.

En la figura 37A se observa la fotografía de una placa de sílica gel G 60 de 20 x 20 cm tomada bajo luz UV a 366 nm. Las bandas señaladas pertenecen a las Fracciones 1 (Rf 0,39) y 2 (Rf 0,62) que corresponden respectivamente a la quercetina y canferol conjugados aislados a partir del extracto metanólico como se indicó en Materiales y Métodos punto 9.2.3. En el cromatograma de la figura 37B se observan las bandas que comigraron con la quercetina (Rf 0,96) y el canferol (Rf de 0,95) luego de la hidrólisis de las Fracciones 1 y 2 respectivamente.

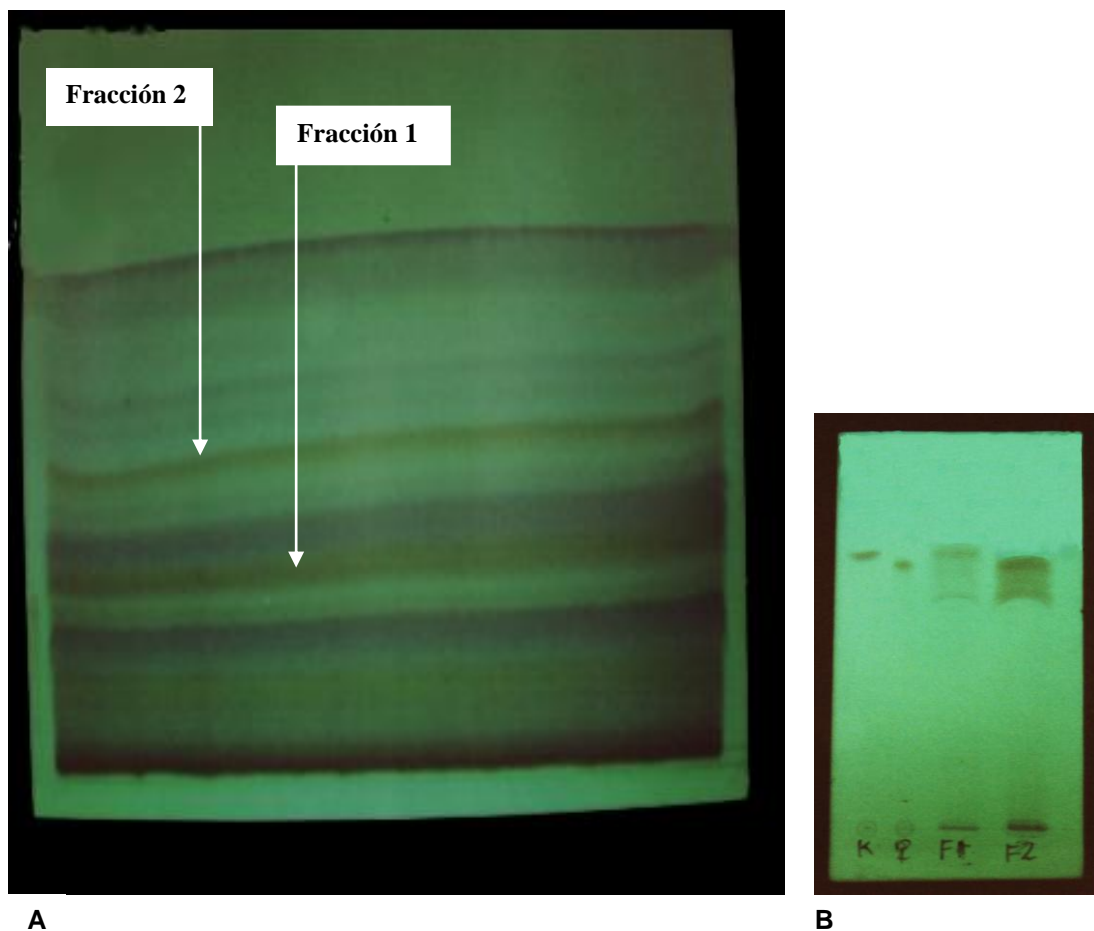


Fig. 37A,B: **A:** Cromatograma de la fracción acetato de etilo. Placa de sílica gel G 60 de 20 x 20 cm. Sistema de solventes tolueno-cloroformo-acetona (40:25:35, v/v/v). La Fracción 1 (Rf 0,39) y la Fracción 2 (Rf 0,62) corresponden a los glicósidos de quercetina y canferol respectivamente. **B:** cromatograma de las fracciones 1 (F1) y 2 (F2) que comigraron con los estándares de canferol (K) y quercetina (Q). Placa de sílica gel G 60 de 5 x 10 cm. Sistema de solventes acetato de etilo-metanol 10:1, v/v).

En la tabla 9 puede observarse que la quercetina previno en forma significativa el daño gástrico cuando se la administró por vía intraperitoneal. Durante las necropsias se encontraron restos de quercetina en la cavidad abdominal poniendo de manifiesto que no se logró una buena absorción del compuesto.

Tabla 9

Efecto de la quercetina y el canferol libres administrados intraperitonealmente y de la quercetina y el canferol conjugados aislados de Cs administrados por vía oral, sobre el porcentaje de inhibición de úlceras inducidas por estrés en ratones.

Grupos	Dosis intraperitoneal (mg/kg)	Dosis oral (mg/kg)	Area ulcerada ^e (8 ± S.D.)	Tasa de prevención de úlcera ^f	Inhibición (%)
Control ^a	–	–	2,44 ± 0,07	0/5	–
Quercetina	100	–	0,90 ± 0,9 *	4/5	63
Canferol	100	–	1,32 ± 0,2 *	1/5	46
Canferol Cs ^b		37	2,18 ± 1,1 n.s.	5/5	11
Quercetina Cs ^c		16	0,94 ± 0,9 *	4/5	61
Canf. Cs + Quercet. Cs ^d		37 + 16	0,68 ± 0,6 **	4/5	72

- ^a Los animales del grupo control fueron administrados con 0,5 ml de excipiente vía oral.
- ^{b,c,d} Canferol-glicósido, Quercetina-glicósido y Canferol-glicósido + quercetina-glicósido aislados de Cs como se indica en Materiales y Métodos punto 9.2.3.
- ^e Total de la superficie ulcerada de la mucosa gástrica expresada en mm².
- ^f Número de animales en los cuales el extracto inhibió totalmente la formación de úlceras respecto al total.
- * Test “t” de Student P<0,05, n=5. Comparación de los grupos tratados con quercetina, canferol, quercetina-glicósido y canferol-glicósido + quercetina-glicósido respecto al grupo control.
- n.s. No significativo, Test “t” de Student P<0,05, n=5.

La administración de las mismas dosis de canferol y quercetina libres, permitieron comparar su acción gastroprotectora. El canferol inhibió la formación de úlceras en menor grado que la quercetina. Los animales

presentaron durante la necropsia, al igual que los tratados con quercetina, restos de canferol en la cavidad abdominal evidenciando una absorción incompleta de los compuestos.

La quercetina conjugada aislada de la Cs inhibió en forma significativa la formación de úlceras, pero el canferol conjugado por sí mismo no demostró tener efecto. La administración conjunta de ambos compuestos aislados de Cs inhibieron en forma significativa la formación de úlceras. Puede observarse una mejora en la respuesta farmacológica con la administración conjunta de los compuestos respecto a sus acciones por separado.

10.0. EFECTO DE LA QUERCETINA Y EL CANFEROL SOBRE EL TIEMPO DE VACIADO GASTROINTESTINAL EN RATONES

Los ensayos realizados administrando quercetina libre y conjugada inhibieron en forma significativa la formación de úlceras inducidas por hipotermia e inmovilización. Para determinar si la acción gastroprotectora está relacionada con la inhibición de la motilidad gástrica, se utilizó el modelo experimental descrito en Materiales y Métodos punto 7.0.

Se evaluó comparativamente el progreso de una solución de sulfato de bario, previa administración de quercetina por vía oral e intraperitoneal y de las Fracciones 1 y 2 correspondientes a quercetina-glicósido y canferol-glicósido vía oral respectivamente. El esquema de compuestos y vías de administración utilizados tuvieron como objetivos determinar la acción inhibitoria sobre la motilidad gástrica de la quercetina, la presencia o ausencia de esta acción relacionada con la absorción del compuesto cuando es administrado en forma libre por vía oral vs. vía intraperitoneal, la presencia de actividad farmacológica en el compuesto conjugado aislado de la Cs y si el canferol conjugado aislado de la Cs exhibe acción inhibitoria sobre la motilidad gastrointestinal.

Todos los animales completaron el vaciado gástrico entre los 30 y 60 minutos (Fig. 38 A y B). A los 60 minutos se observaron restos de sustancia radiopaca en los estómagos de los animales tratados con quercetina administrada por vía intraperitoneal (2) y quercetina-glicósido (4), evidenciando un vaciado gástrico más lento que el resto de los tratamientos (Fig. 38 B).

Los ratones tratados con quercetina libre manifestaron una diferencia notable en el vaciado intestinal a los 120 minutos de administrado el sulfato de bario, dependiendo de la vía de administración utilizada (Fig. 38 C). Los animales tratados por vía oral y los pertenecientes al grupo control mostraron una imagen radiológica similar (Fig. A-D), evidenciando ausencia de actividad farmacológica.

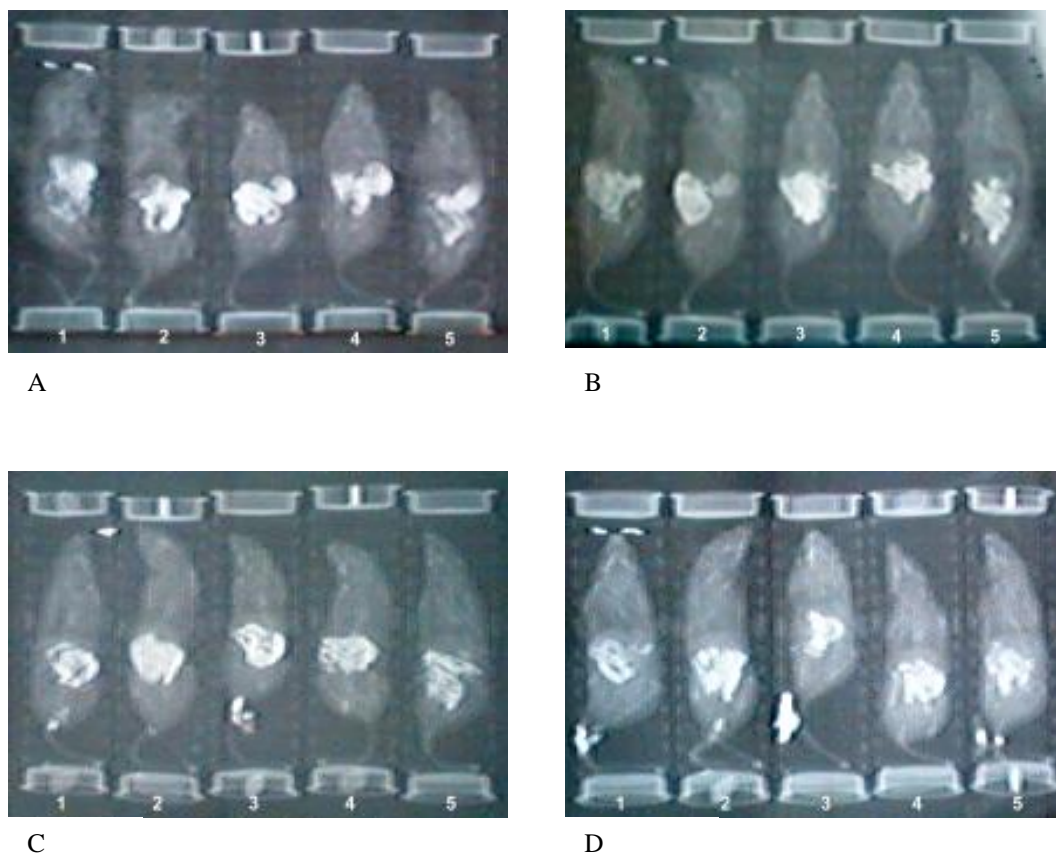


Fig. 38 (A-D): Radiografías seriadas de ratones pertenecientes a los grupos control (1) y tratados con quercetina vía intraperitoneal (2), quercetina vía oral (3), quercetina-glicósido vía oral (4) y canferol-glicósido vía oral (5), tomadas a los 30 (A), 60 (B), 120 (C) y 300 (D) minutos respectivamente. Las marcas radiopacas que aparecen en la parte superior de los animales del GC en todas las figuras corresponden a una señal de identificación de la jaula de inmovilización. Las figuras mostradas pertenecen a una de las cuatro repeticiones efectuadas en el presente estudio. Nota: las figuras son sólo cuatro muestras representativas de 6 tiempos distintos (ver Materiales y Métodos punto 10.4.).

La quercetina conjugada (4) produjo un retraso en el desplazamiento del contenido intestinal, similar al obtenido con la administración intraperitoneal de quercetina (2) que es evidente en las figuras 38 C y D. La administración de canferol conjugado (5), produjo un retraso de la sustancia radiopaca comparativamente moderado respecto a los animales pertenecientes al grupo control (1). Este retraso fue evidente a los 120 minutos (Fig. 38 C), pero a los 300 minutos los animales comenzaron la evacuación del contenido intestinal.

En la figura 38 D se observa que los animales pertenecientes al grupo control (1), tratado con quercetina por vía oral (3) y canferol conjugado (5) comenzaron la evacuación de la sustancia radiopaca, en contraste, los tratados con quercetina administrada por vía intraperitoneal (2) y quercetina conjugada (4), mostraron un progreso más lento de la sustancia radiopaca.

11.0. PARTICIPACIÓN DE LAS PROSTAGLANDINAS EN EL EFECTO ANTIULCEROSO DE LA QUERCETINA Y EL CANFEROL

Los estudios realizados con Rayos X mostraron que la quercetina actúa retrasando el tiempo de vaciado gastrointestinal evidenciando una disminución de la motilidad. Esta acción farmacológica disminuye el efecto erosivo mecánico explicando la acción antiulcerosa encontrada en los animales tratados con quercetina. En el mismo bioensayo el canferol, un compuesto con acción citoprotectora reconocida, mostró acción inhibitoria sobre la motilidad gastrointestinal, evidenciando la presencia de dos mecanismos de acción que contribuyen a prevenir las úlceras inducidas por estrés. Estos resultados y la similitud estructural de la quercetina y el canferol llevaron a pensar que estos compuestos podrían tener acciones farmacológicas similares. Habiéndose comprobado la acción sobre la motilidad gastrointestinal de ambos compuestos se realizó el presente bioensayo con el objeto de determinar la posible acción citoprotectora de la quercetina.

La indometacina, un inhibidor de la síntesis de prostaglandinas, fue utilizado para comprobar la posible acción citoprotectora de la quercetina. El canferol se usó como droga de referencia.

La indometacina produjo en los animales del grupo control lesiones con características que concuerdan con la ubicación de los pliegues de la mucosa gástrica.

Se obtuvo un porcentaje significativo de inhibición de úlceras en los animales tratados con quercetina, mientras que los tratados con canferol produjeron una inhibición no significativa respecto al grupo control (Tabla 10).

Tabla 10

Efecto de la administración previa de indometacina sobre la acción gastroprotectora de la quercetina y el canferol en ratones.

Grupos	Dosis (mg/kg)	Area ulcerada^a (8 ± S.D.)	Tasa de prevención de úlcera^b	Inhibición (%)
Control	–	6,40 ± 0,29	0/5	–
Quercetina	100	3,33 ± 1,39 *	0/5	48
Canferol	100	4,84 ± 1,55 n.s.	0/5	24

Todos los animales recibieron, 1 h antes del ensayo, una dosis subcutánea de 5 mg/kg de indometacina. La quercetina y el canferol se administraron intraperitonealmente 30 minutos después de la indometacina.

^a Total de la superficie ulcerada de la mucosa gástrica expresada en mm².

^b Número de animales en los cuales el extracto inhibió totalmente la formación de úlceras respecto al total.

* Test “t” de Student p<0,05, n=5. Se comparó estadísticamente el grupo tratado con quercetina respecto al control.

n.s. No significativo. Test “t” de Student p<0,05, n=5. Se comparó estadísticamente el grupo tratado con canferol respecto al control.

12.0. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DEL EXTRACTO METANÓLICO DE *CENTAUREA SOLSTITIALIS*

Las sustancias con actividad antioxidante colaboran manteniendo la integridad de las membranas celulares y previniendo la formación de úlceras gástricas en algunos modelos experimentales.

Para determinar si la fracción metanólica obtenida a partir de extractos de capítulos secos de *Centaurea solstitialis* posee efecto antioxidante, como lo sugiere la presencia de los flavonoides quercetina y canferol, se realizó un ensayo in vitro utilizando β -caroteno como indicador del porcentaje de oxidación.

La actividad antioxidante de las muestras ensayadas fue determinada monitoreando espectrofotométricamente la oxidación del β -caroteno inducida con peróxido de hidrógeno como catalizador de la reacción.

En la Tabla 11 se muestra el porcentaje de oxidación en función del tiempo del β -caroteno solo (control) o con BHT, quercetina, canferol y extracto metanólico obtenido de Cs, medidos cada 5 minutos durante 50 minutos.

Tabla 11

Actividad antioxidante de BHT, quercetina, canferol y extracto metanólico obtenido de *Centaurea solstitialis* sobre la oxidación de β -caroteno vs. tiempo.

Tiempo (min)	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50
β -caroteno	7,91	16,45	23,43	29,62	35,18	41,55	46,13	49,78	53,24	56,33
BHT	3,58	8,36	12,66	17,61	21,51	25,57	29,16	32,82	36,25	39,68
Quercetina	6,09	10,26	14,59	19,64	23,97	27,82	31,51	35,04	39,93	42,58
Canferol	7,11	14,06	18,24	23,12	27,30	34,90	38,23	41,51	44,87	48,37
Extrac. Metan.	3,95	9,09	13,98	17,69	21,73	25,52	29,65	32,97	37,57	40,35

Porcentajes de oxidación calculados como se indica en Materiales y Métodos punto 12.4. medidos cada cinco minutos durante cincuenta minutos.

En la figura 39 las curvas pertenecientes al BHT, quercetina, canferol y extracto metanólico, muestran una disminución respecto al grupo control. El extracto metanólico y el BHT presentaron una actividad antioxidante similar. La quercetina mostró mayor acción antioxidante que el canferol.

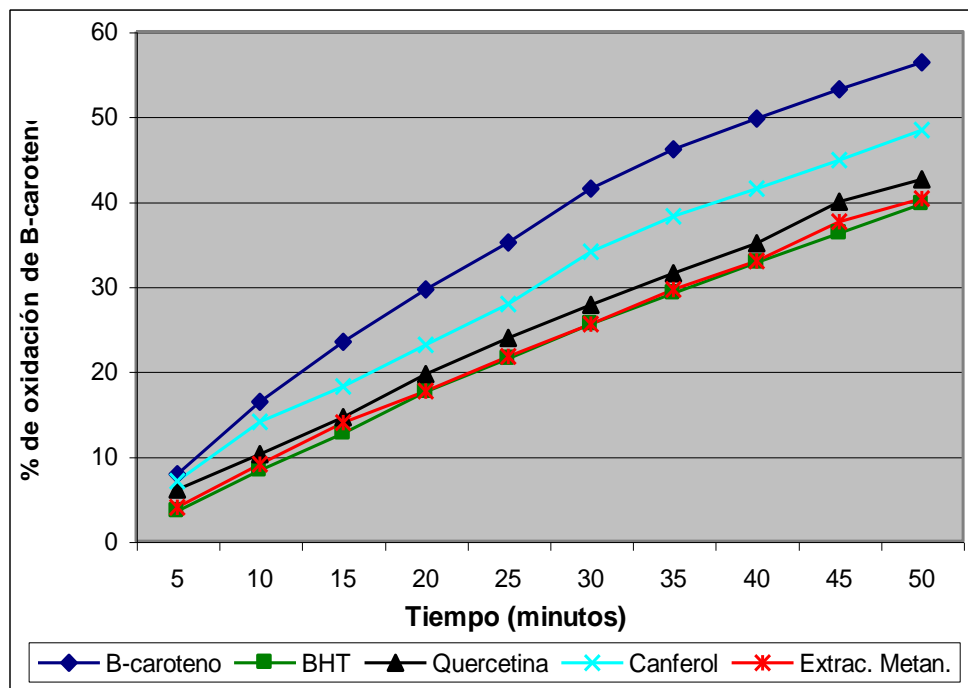


Fig. 39: Actividad antioxidante de BHT, quercetina, canferol y extracto metanólico obtenido de *Centaurea solstitialis* sobre la oxidación de β-caroteno vs. tiempo.

Si las concentraciones empleadas de cada compuesto se expresan en moles/l obtendremos que se ha utilizado: quercetina $1,5 \times 10^{-4}$ M, canferol $1,6 \times 10^{-4}$ M y BHT $1,8 \times 10^{-4}$ M. La concentración en moles/l contenidas en el extracto metanólico utilizado de quercetina es de $2,8 \times 10^{-6}$ M y de canferol $7,25 \times 10^{-6}$ M (considerando que en 1 g de materia seca de Cs hay 0,64 mg de quercetina y 1,47 mg de canferol). Estas cantidades resultan en comparación muy inferiores a las utilizadas con los compuestos de quercetina (51:1) y canferol (22:1) adquiridos comercialmente, sin embargo producen un efecto antioxidante similar al BHT y mayor que el canferol y la quercetina.

13.0. DETERMINACIÓN DEL EFECTO SEDANTE DEL EXTRACTO ACUOSO DE *CENTAUREA SOLSTITIALIS* EN RATONES

Las ratas tratadas con extractos acuosos provenientes de capítulos secos de *Centaurea solstitialis* mostraron menos actividad respecto al grupo control durante la administración crónica de extracto acuoso. Esta observación, sugirió la posible presencia de una acción sedante en el extracto.

Para evaluar el posible efecto sedante del extracto acuoso de Cs, se recurrió al sinergismo que ocurre cuando se administran en forma conjunta barbitúricos y agentes depresivos utilizando ratones como animales de experimentación. Un aumento en el período de sueño, logrado al administrar extracto acuoso de Cs con dosis hipnóticas o subhipnóticas de tiopental sódico, se interpretó como un efecto aditivo entre el extracto y el barbitúrico evidenciando un efecto sedante del extracto.

En la tabla 12 se muestran los períodos de inducción y duración del efecto hipnótico en los ratones tratados con extracto acuoso y con dosis hipnóticas y subhipnóticas de tiopental sódico, respecto a los grupos control que no fueron administrados con Cs. Se indica también la cantidad de animales de cada grupo en los cuales se logró inducir el sueño respecto al total.

El período de inducción de los grupos control respecto a los grupos tratados con extracto acuoso no varió en forma significativa cuando se administraron dosis hipnóticas y subhipnóticas.

La duración del período de sueño en el grupo tratado con extracto acuoso, aumentó significativamente en los animales que recibieron una dosis subhipnótica del barbitúrico respecto al grupo control. En los tratados con dosis hipnóticas se registró un aumento que no fue estadísticamente significativo. Se observó que algunos de los animales que recibieron dosis hipnóticas experimentaron un importante efecto del barbitúrico mientras que otros tuvieron una respuesta moderada.

Cuando se administró previamente el extracto acuoso, el número de animales en los cuales se logró inducir anestesia respecto al total evidenció una tendencia a aumentar tanto en los tratados con dosis hipnóticas como subhipnóticas del barbitúrico.

Tabla 12

Influencia de la administración previa de extracto acuoso de *Centaurea solstitialis* sobre el período de inducción y sueño en ratones tratados con dosis hipnótica y subhipnótica de tiopental sódico.

GRUPO CONTROL			GRUPO EXTRACTO ACUOSO		
INDUCCIÓN (minutos) ^a	DURACIÓN DEL EFECTO (minutos) ^a	ANEST./ TOTAL ^b	INDUCCIÓN (minutos) ^a	DURACIÓN DEL EFECTO (minutos) ^a	ANEST./ TOTAL ^b
4,25 ± 1,0	4,84 ± 3,1	4/10	3,69 ± 0,5 n.s.	31,78 ± 14,0 *	7/10
2,53 ± 1,4	68,20 ± 24,71	5/10	1,92 ± 0,9 n.s.	114,30 ± 70,5 n.s.	8/10

■ Ratones tratados con dosis subhipnótica de tiopental sódico.

□ Ratones tratados con dosis hipnótica de tiopental sódico.

^a Los valores representan la $\bar{x} \pm S.D.$ de la duración del período de sueño expresado en minutos.

^b Número de animales anestesiados sobre el total.

* Test "t" de Student $P < 0,01$, $n=10$. Se comparó la duración del efecto de una dosis subhipnótica de tiopental sódico en el grupo tratado con extracto acuoso respecto al control.

n.s. Test "t" de Student, $P < 0,05$, $n=10$. Las diferencias estadísticas entre los períodos de inducción de los grupos control respecto a los tratados con extracto acuoso fueron no significativos. La duración del efecto de la dosis subhipnótica de tiopental en el grupo tratado fue no significativa respecto al grupo control.

14.0. EFECTO DEL ESTRÉS PROVOCADO POR HIPOTERMIA E INMOVILIZACIÓN SOBRE LOS NIVELES PLASMÁTICOS DE CORTICOIDES EN RATONES TRATADOS CON EXTRACTOS DE *CENTAUREA SOLSTITIALIS*

Los corticoides confieren al organismo la capacidad de resistir a estímulos nocivos y cambios ambientales. En situaciones de estrés se elevan los niveles de estas hormonas y se ha propuesto que ellas producen alteraciones de los mecanismos de defensa de la mucosa gástrica predisponiendo al desarrollo de úlceras hemorrágicas. Con el propósito de demostrar una posible relación entre los valores plasmáticos de corticoides y la presencia de úlceras gástricas, en el presente bioensayo se registraron los niveles de corticoides en ratones normales y sometidos a estrés evaluando, al mismo tiempo, la posible variación de estos valores en animales tratados con extractos metanólico y clorofórmico. Para evaluar los niveles de corticoides se utilizaron los valores obtenidos con un kit comercial para determinar cortisol plasmático pues no se disponía al momento de realizar este ensayo del kit para la determinación de corticosterona. Teniendo en cuenta por un lado, que la corticosterona es el principal glucocorticoide de los roedores y que en éstos no se detecta cortisol plasmático, y por el otro que el método empleado para las determinaciones tienen reacción cruzada con la corticosterona, los valores obtenidos serán interpretados como indicadores de las variaciones en los niveles de corticosterona y no como valores reales.

Los ratones pertenecientes al grupo control sometidos a estrés aumentaron en forma significativa los niveles plasmáticos respecto al grupo normal que no fue sometido a estrés (Tabla 13).

Los valores obtenidos en los ratones de los grupos extracto metanólico y extracto clorofórmico aumentaron significativamente respecto al de los animales del grupo normal que no fue sometido a estrés. No se encontraron diferencias significativas en los valores plasmáticos detectados entre los grupos sometidos a estrés.

Tabla 13

Evaluación del efecto de la administración de extractos metanólico y clorofórmico de *Centaurea solstitialis* sobre los niveles plasmáticos de corticoides en ratones sometidos a estrés por hipotermia e inmovilización.

GRUPOS	CORTISOL^a µg %
NORMAL	0,9 ± 0,5
CONTROL	5,9 ± 1,2 *
EXTRACTO METANÓLICO	3,5 ± 0,8 *
EXTRACTO CLOROFÓRMICO	4,2 ± 1,4 *

^a El valor informado como cortisol es utilizado como indicador de los niveles de corticosterona como se informó en Materiales y Métodos, punto 14.0.

Los animales pertenecientes al grupo Normal recibieron una dosis del excipiente. Los grupos Control, Extracto Metanólico y Extracto Clorofórmico fueron administrados con excipientes, extractos metanólico y clorofórmico respectivamente y 30 minutos después sometidos a estrés por hipotermia e inmovilización durante 4,5 h.

* Test "t" de Student P<0,01, n=5. Comparación de los grupos tratados con excipientes, extracto metanólico y extracto clorofórmico y sometidos a estrés respecto al grupo normal. No se encontraron diferencias significativas entre el grupo Control respecto a los tratados con los extractos metanólico y clorofórmico.

15.0. EFECTOS PRODUCIDOS POR COMPUESTOS RELACIONADOS ESTRUCTURALMENTE CON FLAVONOIDES Y LACTONAS SESQUITERPÉNICAS PRESENTES EN *CENTAUREA SOLSTITIALIS* SOBRE LA ACTIVIDAD GASTROPROTECTORA Y LA MOTILIDAD GASTROINTESTINAL

15.1. DETERMINACIÓN DEL EFECTO GASTROPROTECTOR DE COMPUESTOS RELACIONADOS ESTRUCTURALMENTE CON FLAVONOIDES Y LACTONAS SESQUITERPÉNICAS PRESENTES EN *CENTAUREA SOLSTITIALIS*

Existen compuestos con similares características químicas que les confieren propiedades farmacológicas similares. La presencia o ausencia de algunas de esas características pueden actuar potenciando o atenuando su actividad principal o efectos colaterales. Estas características estructurales resultan de suma importancia para la industria farmacéutica, ya que permiten el desarrollo de drogas más efectivas y con menores efectos secundarios. Con el propósito de determinar la relación estructura-actividad gastroprotectora de compuestos relacionados estructuralmente con la quercetina y el canferol presentes en la *Centaurea solstitialis*, se evaluó la acción de la apigenina, miricetina, rutina y silibina, flavonoides que no fueron halladas en el extracto metanólico de la planta. Al mismo tiempo, se evaluó la actividad gastroprotectora del α -metileno- γ -butirolactona, un compuesto sintético que posee el mismo grupo funcional que algunas lactonas sesquiterpénicas aisladas de Cs. La acción protectora sobre la mucosa gástrica fue evaluada utilizando el test de estrés por hipotermia e inmovilización.

La apigenina y miricetina inhibieron la formación de úlceras inducidas por hipotermia e inmovilización en un 73 y 75 % respectivamente. La apigenina inhibió totalmente la formación de úlceras en 3 animales y los

dos restantes presentaron lesiones leves comprometiendo un área muy reducida de la mucosa gástrica. La miricetina mostró el mejor efecto gastroprotector de los compuestos ensayados previniendo el daño gástrico en 4 de los 5 animales tratados. La silibina no inhibió la formación de úlceras, en tanto la rutina lo hizo en un 60 % y previno totalmente el daño de la mucosa gástrica en uno de los 5 animales. El compuesto sintético α -metileno- γ -butirolactona previno el daño de la mucosa gástrica en 1 de 5 animales evidenciando un moderado efecto gastroprotector que no fue estadísticamente significativo (Tabla 14).

Tabla 14

Evaluación del efecto antiulceroso de la apigenina, miricetina, silibina, rutina y α -metileno- γ -butirolactona.

Grupos	Dosis intraperitoneal (mg/kg)	Area ulcerada ^a (8 \pm S.D.)	Tasa de prevención de úlcera ^b	Inhibición (%)
Control	–	1,00 \pm 0,3	0/5	–
Apigenina	50	0,27 \pm 0,1 *	3/5	73
Miricetina	50	0,25 \pm 0,1 *	4/5	75
Silibina	50	1,02 \pm 0,8	0/5	–
Rutina	50	0,40 \pm 0,2 *	1/5	60
α -metileno- γ -butirolactona	40	0,53 \pm 0,2 n.s.	1/5	47

^a Area ulcerada: total de la superficie ulcerada de la mucosa gástrica expresada en mm².

^b Número de animales en los cuales el extracto inhibió totalmente la formación de úlceras respecto al total.

* Test “t” de Student P<0,05, n=5. Comparación del grupo control respecto a los grupos tratados.

n.s. Test “t” de Student P<0,05, n=5. Las diferencias entre el grupo α -metileno- γ -butirolactona y el grupo control fueron no significativas.

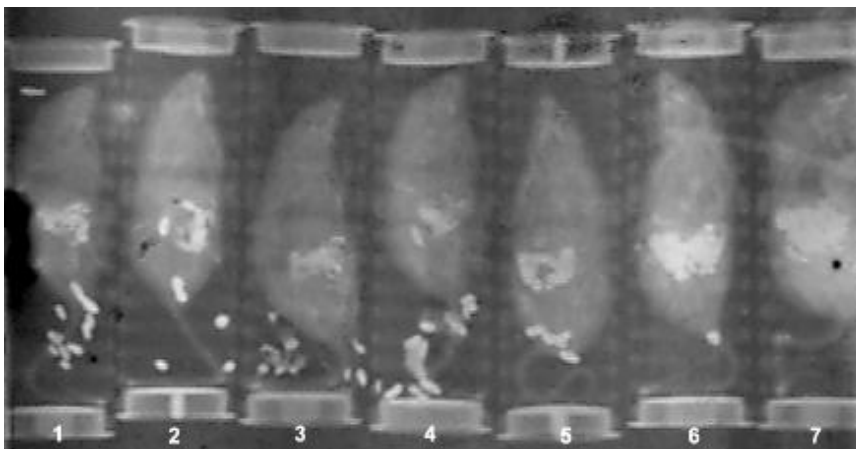
15.2. DETERMINACIÓN DEL EFECTO DE COMPUESTOS RELACIONADOS ESTRUCTURALMENTE CON FLAVONOIDES Y LACTONAS SESQUITERPÉNICAS PRESENTES EN *CENTAUREA SOLSTITIALIS* SOBRE LA MOTILIDAD GASTROINTESTINAL

Considerando que el aumento de la motilidad gástrica es un factor determinante en la formación de úlceras gástricas inducidas por hipotermia e inmovilización, se evaluó la acción de la apigenina, miricetina, silibina, rutina, canferol y del α -metileno- γ -butirolactona por métodos radiológicos en busca de relaciones estructurales con la actividad farmacológica.

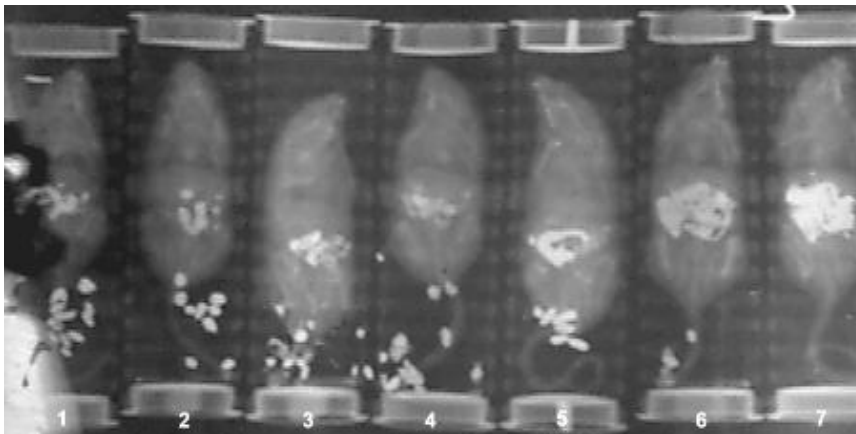
Al analizar comparativamente el progreso de la sustancia radiopaca en el tracto gastrointestinal (Fig. 40 A-C) pudo determinarse que el α -metileno- γ -butirolactona (7) seguido del canferol (6) y de la rutina (5) fueron los compuestos que inhibieron en mayor grado el tiempo de vaciado gastrointestinal. Los animales tratados con rutina (5) comenzaron la evacuación a los 210 minutos. Los ratones tratados con canferol (6), lo hicieron entre los 270 y 310 minutos posteriores a la administración (Fig. B y C), en tanto los tratados con α -metileno- γ -butirolactona (7) a los 310 minutos aún no habían comenzado la evacuación de la sustancia radiopaca (Fig. C). La apigenina (2) y la miricetina (3) produjeron efectos similares sobre el vaciado gastrointestinal, mostrando una moderada acción inhibitoria respecto al grupo control (1) hasta los 150 minutos (figura no mostrada). A los 310 minutos no fue posible observar diferencias con el grupo control. Los ratones tratados con silibina (4) aumentaron el tiempo de vaciado gastrointestinal respecto a los animales del grupo control, comenzando la evacuación a los 90 minutos (figura no mostrada).



A



B



C

Fig. 40 (A-C): Radiografías seriadas de ratones pertenecientes a los grupos control (1) y tratados con apigenina (2), miricetina (3), silibina (4), rutina (5), canferol (6) y α -metileno- γ -butirolactona (7), tomadas a los 210 (A), 270 (B) y 310 (C) minutos respectivamente. Las figuras mostradas pertenecen a una de cuatro repeticiones efectuadas en el presente estudio. Nota: las figuras son sólo tres muestras representativas de 7 tiempos distintos (ver Materiales y Métodos punto 15.2.2).

DISCUSIÓN

1.0. Determinación del efecto antiulceroso de extractos de *Centaurea solstitialis* en ratas

La actividad antiulcerosa de la *Centaurea solstitialis* (Cs) que se desarrolla en la provincia de La Pampa, Argentina, se comprobó utilizando un modelo experimental en ratas que consistió en inducir la formación de úlceras por hipotermia e inmovilización. Este modelo, empleado para confirmar el único dato etnobotánico publicado sobre el uso de la Cs en el tratamiento de úlceras gástricas por Yesilada et al. (1993b), se reprodujo parcialmente utilizando otros esquemas de extracción y profundizando los estudios farmacológicos.

Estudios fitoquímicos realizados por otros autores en partes aéreas de Cs, revelaron la presencia de flavonoides, poliacetilenos y terpenoides volátiles (Stevens y Witt, 1989; Binder et al., 1990a), flavonoides (Kamanzi y Raynaud, 1976), triterpenos (Cassady y Hokanson, 1978) y lactonas sesquiterpénicas (Merill y Stevens, 1985; Jakupovich et al., 1986; Bruno et al., 1991; Hamburger et al., 1993).

Entre los compuestos mencionados algunos flavonoides y lactonas sesquiterpénicas inhiben la formación de úlceras, lo que permitió diseñar un esquema de extracción para evaluar en forma conjunta la actividad antiulcerosa de la planta y obtener información de las acciones farmacológicas provocadas por los distintos extractos obtenidos a partir de capítulos secos de Cs. Los solventes de extracción se seleccionaron teniendo en cuenta las propiedades de los flavonoides y de las lactonas sesquiterpénicas. Las distintas polaridades de los primeros dependen, en parte, del número de glicósidos que poseen. Por ejemplo, las flavonas y los flavonoles son poco solubles en agua, mientras que los dihidroflavonoles son muy solubles, a la vez todos los flavonoides son muy solubles en metanol. Por otro lado, las lactonas sesquiterpénicas, son compuestos insolubles en agua, pero muy solubles en cloroformo o éter etílico (Domínguez, 1979). Tanto los flavonoides como las lactonas sesquiterpénicas resisten la temperatura de ebullición. Considerando estas

propiedades, se realizó una extracción por decocción en agua destilada, ya que este método permite extraer en forma exhaustiva aquellos compuestos que resisten la temperatura de ebullición. Posteriormente, a partir de los extractos acuosos secos, se realizaron extracciones clorofórmicas y metanólicas que contendrían lactonas sesquiterpénicas y flavonoides respectivamente, para evaluar las posibles acciones farmacológicas de estas fracciones.

En los bioensayos realizados en ratas se comprobó que los extractos acuoso, metanólico y clorofórmico poseen un importante efecto antiulceroso (Tabla 1). La combinación de los extractos metanólico y clorofórmico se utilizó para determinar un posible efecto aditivo entre los resultados parciales de ambos extractos. Este efecto no pudo comprobarse debido a que el extracto clorofórmico inhibió totalmente la formación de úlceras. Estos resultados, según el esquema de extracción utilizado, produjeron evidencias que permitieron considerar la presencia de distintos compuestos en los extractos metanólico y clorofórmico que actuarían a través de similares o diferentes mecanismos de acción protegiendo la mucosa gástrica. Esta hipótesis era consistente con las investigaciones realizadas por otros autores, en las cuales se encontraron acciones farmacológicas relacionadas con efectos antiulcerosos en varios flavonoides como quercetina (Martín et al., 1998) canferol (Goel et al., 1996), miricetina, rutina y silimarina (Di Carlo et al., 1993) entre otros y con la positividad de las reacciones de caracterización de Shinoda y cloruro férrico, encontrada en la fracción acuosa y metanólica de Cs, que confirmaron la presencia de compuestos fenólicos. Por otro lado, se ha determinado que la presencia de lactonas sesquiterpénicas, extraíbles con cloroformo y que presentan un grupo α -metileno- γ -butirolactona en su estructura, exhiben un importante efecto citoprotector.

Durante las pruebas piloto realizadas para poner a punto el modelo experimental, se encontraron dificultades para evaluar el daño de la mucosa gástrica que determinaron la necesidad de implementar

modificaciones al método empleado en ratas por Yesilada et al. (1993). Estos autores utilizaron la longitud de las lesiones ulcerosas expresadas en milímetros para evaluar el daño gástrico. Este método induce a error, ya que las lesiones pueden tener formas circulares o alargadas de distinto diámetro o ancho, pudiendo subestimarse o sobrestimarse el daño de la mucosa. En su reemplazo, otros autores recurrieron al método de Marazzi Uberti y Turba (1961) que consiste en calificar el grado de lesión de 0 a 5. Por ejemplo, si el estómago presenta de 1 a 3 úlceras de 4 mm o más pequeñas se califica con 1, si presenta una úlcera larga y más de 3 úlceras pequeñas se califica con 3. Como puede notarse, este método también induce a errores subjetivos y además es de difícil aplicación cuando hay combinaciones de úlceras de distintos tamaños y cantidades no previstas en la escala. Esta dificultad ha sido encontrada por otros autores, algunos de los cuales han propuestos métodos por análisis cuantitativos (Natale et al., 2001). Este método utiliza un patrón de medición para calcular la longitud o diámetro de la lesión utilizando como referencia el largo del estómago que resulta de compleja aplicación, aunque más exacto que el mencionado anteriormente. En el presente trabajo, se desarrolló un sistema de medición cuantitativo que consistió en fotografiar los estómagos junto a una escala graduada en milímetros. Utilizando esta referencia se midió la superficie de cada úlcera con un analizador de imágenes, obteniendo el área dañada total en cada estómago expresada en mm². Este método permitió realizar mediciones precisas sin errores subjetivos.

2.0. Efecto de la administración crónica de extractos acuosos de *Centaurea solstitialis* en ratas

Considerando los antecedentes sobre la toxicidad de la planta (Cordy, 1978), antes de comenzar a investigar las acciones farmacológicas de los extractos de Cs, se procedió a determinar la presencia de efectos secundarios que pudieran interferir con el modelo experimental utilizado.

La administración continua a ratas durante un período de 32 días de una dosis terapéutica de extracto acuoso de Cs, no produjo síntomas que evidenciaran efectos neurotóxicos en los animales. Este resultado fue el esperado, ya que existen diferencias sustanciales entre la ingesta del vegetal por parte de los equinos, única especie afectada, y la utilización de la planta como antiulcerosa. Entre estas diferencias puede mencionarse que en el presente estudio se utilizaron capítulos de Cs para la elaboración del extracto acuoso, en tanto, la intoxicación se produce generalmente al consumir las partes aéreas frescas de la planta antes que comience la floración. La ingesta preferencial en este período del desarrollo de la planta se debe a que las hojas son lisas y tiernas mejorando su palatabilidad. En el momento de la floración comienzan a aparecer las espinas, las que, sumadas a su fuerte sabor amargo, hacen que sea sólo consumida ante la falta de otros forrajes verdes. Por otro lado, la enfermedad puede producirse experimentalmente en los equinos pero es necesario que consuman una ración equivalente a su peso corporal de partes aéreas de la planta en un período de 35 a 85 días en forma continua (Gallo, 1979). Otras especies, tales como rumiantes, simios y roedores no son afectadas (Blood, 1988b).

La administración crónica de Cs a ratas, no produjo síntomas nerviosos. Los resultados de este experimento arrojaron evidencias adicionales respecto a la tendencia a aumentar, aunque no significativamente, la ganancia de peso diario (Tabla 2) y al menor consumo de agua (Tabla 3). La observación continua de los hábitos de los animales en busca de efectos secundarios, permitió determinar que la actividad de los animales tratados con el extracto acuoso, era sugestivamente menor que la del grupo control. La menor actividad observada explica, en parte, el leve aumento de peso obtenido en los animales administrados con los extractos acuosos, permitiendo inferir un efecto sedante sobre los animales similares a los producidos por otras plantas como *Passiflora edulis* (Maluf et al., 1991), *Albizzia julibrissin* (Kang

et al., 1999), *Matricaria chamomilla* (Avallone et al., 2000) y *Cyperus articulatus* (Rakotonirina et al., 2001). El menor consumo de agua puede ser explicado por la baja palatabilidad, debida al sabor amargo del extracto y a la disminución de la actividad corporal.

Los trabajos realizados por Akbar et al. (1995) demostraron que la repina, una lactona sesquiterpénica aislada de las partes aéreas de la Cs por Hamburger et al. (1993) y presente en otras plantas como *Russian knapweed* (Robles et al., 1998), produce hipotermia en roedores. Los registros de temperatura que se realizaron durante la administración crónica de extractos acuosos de Cs, no evidenciaron diferencias entre los grupos (Tabla 2). Por otra parte, los síntomas descritos por Robles et al. (1998) relacionados con incoordinación en la locomoción, tremor postural e indiferencia a estímulos acústicos y táctiles no fueron observados.

Teniendo en cuenta que el estrés inducido por hipotermia e inmovilización requiere de dos características fundamentales para lograr la inducción de úlceras, la disminución controlada de la temperatura corporal y el estrés psicológico (Boyd et al., 1977), la presencia de hipotermia y/o de sintomatología nerviosa, desconociendo su naturaleza y repercusiones sobre los mecanismos de defensa de los animales, habrían invalidado el modelo experimental.

3.0. Determinación del efecto antiulceroso de *Centaurea solstitialis* en ratones

Durante los ensayos realizados en ratas para confirmar la actividad gastroprotectora, se obtuvo información adicional que fue utilizada para rediseñar el modelo experimental de inducción de úlceras ajustándolo a las necesidades de los estudios farmacológicos desarrollados en el presente trabajo. Se encontró que la temperatura del agua del baño termostático en que se sumergían las ratas para provocarles hipotermia, debía ser rigurosamente controlada. Pequeñas variaciones en la temperatura incidían en forma importante sobre el desarrollo de las lesiones ulcerosas. Para

evitar las oscilaciones propias de los sistemas de regulación de la temperatura entre distintos baños termostáticos o entre un ensayo y otro, se decidió utilizar a ratones como animales de experimentación. El tamaño reducido de las jaulas de inmovilización respecto a las utilizadas para ratas, permitió colocar varios grupos en el mismo baño termostático disminuyendo el error experimental.

La utilización de ratones *Mus musculus* Cepa CF1, provistos y alimentados como se indicó en el punto 3.1 de Materiales y Métodos, ofreció ventajas importantes respecto al uso de ratas, permitiendo realizar el test de inducción de úlceras simplificando las tareas de manejo de animales. La especie respondió en forma confiable a la prueba de inducción de úlceras, logrando producir lesiones en 4,5 h en tanto la temperatura del baño termostático se mantuviera estrictamente en $22 \pm 0,2$ °C. Por otra parte, las lesiones ulcerosas presentaron bordes más definidos, permitiendo una mejor medición del área ulcerada. Estas diferencias son notorias al comparar el aspecto de las úlceras presentes en la figura 27A correspondiente a las lesiones obtenidas en estómagos de ratas, respecto a la figura 28A perteneciente a ratones. Observando las lesiones ulcerosas, puede notarse que poseen una localización generalizada sobre la superficie mucosa de los estómagos, típica de las úlceras provocadas por estrés. Estas lesiones concuerdan con los pliegues gástricos. En la figura 28A se señaló con líneas blancas el patrón de presentación de las lesiones, las cuales coinciden con los pliegues de la mucosa gástrica. En la figura 21 pueden observarse los pliegues gástricos en un estómago recién extraído. Estos pliegues no se observan en las figuras 28A-E ya que para facilitar la observación de las lesiones gástricas, los estómagos fueron insuflados y luego fijados en formol. De esta manera se evita que el estómago se retraiga, como ocurre cuando el órgano es abierto inmediatamente luego de ser extraído (Fig. 22), facilitando la posterior observación y evaluación de las lesiones. En ratas, las lesiones también parecen estar localizadas siguiendo la dirección de los pliegues

gástricos (Fig 27A), sin embargo, el aspecto y localización de las lesiones en ratones (Fig. 28A) evidenció una mayor sensibilidad de esta especie al test de inducción utilizado indicando ser la más adecuada para el estudio de agentes antiulcerosos. La administración de extractos de Cs en ratones sometidos al test de estrés, confirmaron que esta especie responde a la acción farmacológica de los mismos en forma similar a las ratas (Tabla 4). La localización de las lesiones ulcerosas sobre los pliegues gástricos sugieren que estas estructuras se lesionan con mayor facilidad por estar más expuestas. Esta observación es consistente con los estudios realizados por Takeuchi et al. (1999) sobre la fisiopatología y patogénesis de las lesiones agudas gástricas producidas por hipotermia e inmovilización en ratas. La hipermotilidad gástrica es considerada un factor inductor de lesiones ulcerosas y se ha encontrado una relación entre las alteraciones de la motilidad gástrica y la severidad de las úlceras. Disturbios en la microcirculación mucosal, alteraciones en la secreción gástrica y un aumento de la motilidad predisponen a la mucosa gástrica a sufrir lesiones ulcerosas hemorrágicas (Jacobson, 1992; Zhu et al., 1997). Otros estudios indican que la hipotermia produce un aumento de la secreción ácida y una disminución del flujo sanguíneo mucosal. El debilitamiento de la barrera mucosa gástrica permitiría que los pliegues de la mucosa gástrica, por ser las zonas más expuestas a la acción mecánica, se erosionen en un primer momento y se ulceren más tarde.

4.0. Determinación del efecto citoprotector de extractos de *Centaurea solstitialis* en ratones

Estos cambios fisiopatológicos que ocurren durante el test de estrés y la observación de restos de mucus sobre la superficie mucosa de los estómagos tratados con extractos clorofórmico (Fig. 28D) y metanólico-clorofórmico (Fig. 28E), llevaron a pensar que el mecanismo de acción exhibido por los extractos podría estar vinculado con una acción citoprotectora. Esta acción determinaría un aumento de la secreción de

mucus reforzando la barrera mucosa gástrica. La administración de indometacina, como inhibidor de la síntesis de prostaglandinas y en consecuencia de la secreción de mucus, permitió evaluar esta hipótesis. El notorio aumento de las lesiones provocadas por la administración de indometacina (Fig. 29B) respecto al grupo control (Fig. 29A), evidenciaron la eficacia del modelo empleado para determinar la participación de los efectos citoprotectores en los mecanismos de acción de los distintos extractos. Se esperaba encontrar en los animales tratados con indometacina y luego con extracto metanólico un bajo índice de prevención de úlceras ya que se preveía la presencia de flavonoides, sin embargo, se determinó una moderada participación de las prostaglandinas en la respuesta gastroprotectora del extracto que se evidenció con un alto porcentaje de inhibición de úlceras (Tabla 5). Estos datos llevaron a pensar que había otro u otros mecanismos de acción involucrados en el efecto antiulceroso. La fracción clorofórmica inhibió la formación de úlceras en un 50 % en los animales tratados con indometacina (Tabla 5), lo que permitió inferir que sus efectos se encontraban relacionados con mecanismos citoprotectores ejercidos a través de las prostaglandinas en mayor grado que la fracción metanólica y sugirieron, al igual que en el caso anterior, la participación de otro u otros mecanismos de acción. El incremento de las lesiones observadas en los animales tratados con indometacina (Fig. 29B) respecto a las pertenecientes al grupo que sólo fue sometido a estrés (Fig. 29A), puede explicarse por la suma de la acción de los efectos producidos por el estrés más el de la indometacina que conduce a un debilitamiento del efecto citoprotector.

La hipotermia produce una serie de trastornos gástricos que se evidencian en una disminución del flujo sanguíneo mucosal y un aumento de la viscosidad de la sangre y la motilidad gástrica (Murakami et al., 1985). Por otro lado, la administración de indometacina, además de inhibir la enzima ciclooxigenasa, produce un aumento de la motilidad gástrica evidenciada en modelos similares al utilizado en este ensayo (Takeuchi et

al., 1999). De acuerdo con lo expuesto y observando las figuras 29 B, D y F respecto a las figuras 29 A, C y E, puede advertirse que en las primeras se encuentran lesiones erosivas continuas bien marcadas en distintas regiones que corresponderían a la parte superior de los pliegues gástricos. En las figuras 29B y 29F las lesiones erosivas se encuentran en ocasiones interrumpidas por úlceras de distinta gravedad. Las lesiones observadas en la figura 29F evidencian un daño más severo de la mucosa respecto al observado en la figura 29D, en la cual se aprecia una menor acción citoprotectora del extracto clorofórmico respecto al extracto metanólico que fue inhibida con la indometacina.

Se señala, utilizando como ejemplo las lesiones observadas en las figuras 29B y 29F, la importancia del método que se emplea para estimar el daño gástrico. El simple recuento de las úlceras o la sumatoria de las longitudes de las lesiones, podría subestimar el daño gástrico producido en el estómago de la figura 29B, ya que no aporta datos respecto a la extensión. Como fuera señalado anteriormente, estas diferencias en las estimaciones entre los métodos, determinaron el empleo del área de la superficie ulcerada como medida de comparación entre grupos en los distintos bioensayos llevados a cabo en este trabajo.

El aumento de la secreción de mucus es una de las respuestas más significativas en los mecanismos citoprotectores. La evaluación del volumen de secreción de mucus por métodos directos fue descartada debido a la escasa cantidad producida por la mucosa del estómago de los ratones que dificulta la recuperación y medición. Se utilizaron como técnicas alternativas para confirmar los resultados encontrados al utilizar indometacina en ratones, métodos de microscopía óptica y microscopía electrónica de barrido que permitieron evaluar comparativamente la producción de mucus de estómagos pertenecientes a animales normales, sometidos a estrés y tratados con extractos metanólico y clorofórmico.

Los resultados obtenidos al administrar indometacina en forma conjunta con extractos metanólico y clorofórmico que evidenciaron el grado

de participación de los mecanismos citoprotectores mediados por prostaglandinas, estuvieron en concordancia con la localización de las reacciones PAS positivas en cortes histológicos de estómagos de animales tratados con extractos metanólico y clorofórmico (Fig. 30A-D). La reacción PAS positiva estuvo presente ocupando el tercio superior de las glándulas gástricas en la mucosa normal (Fig. 30A). En contraste con el aspecto que mostraron estos cortes, se observaron cambios notorios en aquellos obtenidos de los animales sometidos a estrés mostrados en la figura 30B, correspondientes a secciones realizadas sobre áreas erosionadas. La falta de reacción PAS positiva sobre la superficie celular, es un dato relevante que refuerza la teoría del efecto erosivo mecánico como un factor que contribuye a la inducción de úlceras. En tanto, el desplazamiento de la reacción PAS positiva en las glándulas gástricas hacia la luz del órgano, indica una disminución en la producción de mucus y bicarbonato que estaría relacionada con la disminución del flujo sanguíneo mucosal. Estos cambios están acompañados por una disminución en el pH de la superficie de la mucosa, probablemente debido al aumento de secreción de ácido clorhídrico y pepsina que actúan debilitando la barrera mucosa gástrica. Los cambios en la barrera mucosa impedirían que actúe el mecanismo de neutralización en contracorriente. Este mecanismo se produce entre el bicarbonato que se libera a través del gel de mucus desde la superficie mucosa hacia la luz del órgano, en contracorriente con el ácido clorhídrico que se dirige desde la luz del órgano hacia la mucosa gástrica (Fig. 8). La barrera mucosa debilitada permitiría que el ácido clorhídrico y la pepsina digieran las células de la superficie mucosa. Estos procesos se ven favorecidos por la hipermotilidad gástrica que a través de una acción mecánica actuaría desprendiendo el gel mucoso. En una primera instancia, como fue mencionado anteriormente, estos procesos ocurrirían con mayor rapidez sobre los bordes de los pliegues gástricos por ser las regiones más expuestas, explicando la localización de las lesiones erosivas y ulcerosas observadas (Fig. 28A). En los cortes pertenecientes a los ratones tratados

con extracto metanólico (Fig. 30C) el desplazamiento de la reacción PAS positiva hacia la región apical de las glándulas gástricas indica un aumento en la producción de mucus. Si se comparan las reacciones PAS positivas de la figura 30C respecto a las de la figura 30D correspondientes a ratones tratados con extracto clorofórmico, podrá notarse en esta última que la reacción PAS positiva es más intensa, completando en mayor grado el interior de las glándulas gástricas.

Las imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido (Fig. 31A-D) evidenciaron la presencia de restos de filamentos mucosos sobre la superficie de la mucosa gástrica que permitieron analizar comparativamente los efectos sobre la secreción de mucus de los extractos metanólico y clorofórmico. Los resultados concordaron con las evidencias mostradas por los cortes histológicos teñidos con la técnica de PAS. La menor cantidad de restos mucosos presente en los estómagos de los animales sometidos a estrés (Fig. 31B) respecto a los normales (Fig. 31A), sugiere el compromiso de los mecanismos secretorios durante el estrés. Los estómagos pertenecientes a ratones tratados con extracto clorofórmico (Fig. 31D) mostraron imágenes con mayor cantidad de restos de mucus que los tratados con extracto metanólico (Fig. 31C), éstos, a su vez, presentaron comparativamente mayor cantidad de restos de mucus que los animales normales (Fig. 31A). Estos resultados evidencian la presencia de un efecto citoprotector en ambos extractos y explican, en parte, los resultados hallados al utilizar indometacina. Las evidencias mostradas en los resultados obtenidos con la administración de extracto metanólico, donde se infería una escasa participación del efecto citoprotector mediado por prostaglandinas (Tabla 5), fue confirmada por la escasa acumulación de mucus manifestada por la técnica histológica de PAS (Fig. 30C) y microscopía electrónica de barrido (Fig. 31C). De igual forma puede explicarse el mayor daño ocasionado por la indometacina en animales tratados con extracto clorofórmico (Fig. 29F). Estos extractos perdieron la mitad de su efecto gastroprotector (Tabla 5), el cual estaría mediado por las

prostaglandinas cuya síntesis fue inhibida por la indometacina. El aumento de la secreción de mucus se hace evidente en los estómagos de los animales tratados con extracto clorofórmico, tanto por la reacción PAS positiva (Fig. 30D) como por microscopía electrónica de barrido (Fig. 31D), cuando se observan comparativamente con las figuras 30C y 31C respectivamente, pertenecientes a ratones administrados con extracto metanólico. En concordancia con estos resultados, los restos de mucus adheridos a la mucosa gástrica de ratones tratados con extracto clorofórmico (Fig. 28D) y metanólico-clorofórmico (Fig. 28E), estaría explicado por el aumento en la producción de mucus producida por el extracto clorofórmico evidenciada en estos estudios.

Los resultados obtenidos con los animales tratados con indometacina y extracto clorofórmico son consistentes con los hallados por otros autores que determinaron que una lactona sesquiterpénica, la dehidroleucodina, aislada de la *Artemisia douglasiana*, produce una liberación masiva de mucus. Los estudios realizados en ratas induciendo daño de la mucosa gástrica con etanol determinaron que el compuesto que posee un grupo α -metileno- γ -butirolactona previene la formación de úlceras (Giordano et al., 1997). Estos autores realizaron estudios histológicos y de microscopía electrónica de barrido sobre mucosas de estómagos de ratas para evaluar la secreción gástrica. Estos estudios determinaron un desplazamiento de la reacción PAS positiva hacia la región apical de las glándulas gástricas y la presencia de restos de mucus sobre la superficie mucosa similares a los resultados obtenidos con el extracto clorofórmico de Cs (Fig. 30D y 31D). Esta acción estaría mediada en parte por las prostaglandinas, ya que la administración de indometacina produce una significativa reducción del efecto citoprotector (Maria et al., 1998). Compuestos aislados e identificados por otros autores a partir de Cs poseen en su estructura un grupo α -metileno- γ -butirolactona (Fig. 12). La interpretación de resultados obtenidos al utilizar indometacina deben ser evaluados considerando que las prostaglandinas juegan un papel

importante, pero no único, en el mecanismo denominado citoprotector (Whittle, 1981). Varios estudios han determinado que las prostaglandinas actúan aumentando la resistencia de las células gástricas a la acción necrosante de irritantes fuertes (Robert et al., 1979). Por otra parte, se ha determinado que los efectos de las prostaglandinas dependen del agente injuriante utilizado para inducir úlceras, por ejemplo la PGE_2 reduce a cerca de la mitad el daño ultraestructural producido en respuesta a la aspirina, pero no al etanol (Hawkey y Rampton, 1985). Las lesiones gástricas inducidas por indometacina en muchos animales de experimentación, se previenen más fácilmente que las inducidas con aspirina al administrar prostaglandinas o sus análogos (Flower et al., 1985). Estas variaciones en las respuestas ante los diferentes agentes injuriantes que determinan lesiones en la mucosa gástrica, fueron consideradas para seleccionar la droga que evidencia con mayor sensibilidad el efecto citoprotector mediado por las prostaglandinas en el modelo experimental utilizado en este ensayo. La mayor facilidad con que se previenen las lesiones gástricas provocadas por la indometacina con la administración de prostaglandinas exógenas, determinó la selección de esta droga para evaluar la respuesta citoprotectora de los extractos obtenidos de Cs.

De acuerdo con lo expuesto, puede inferirse que el aumento de las lesiones encontradas al administrar indometacina en el modelo experimental utilizado en ratones, está relacionado con la inhibición de la síntesis de prostaglandinas con acción citoprotectora y que este efecto inhibitor es antagonizado parcialmente por la fracción clorofórmica en mayor magnitud que la metanólica.

Las micrografías de las células mucosas obtenidas por microscopía electrónica de barrido a mayor aumento (Fig. 32A-D) evidencian distintos aspectos que concuerdan con los resultados mencionados para la técnica de PAS y las micrografías de barrido a menor aumento. Las notables diferencias morfológicas que poseen las células de la figura 32D pertenecientes a ratones tratados con extracto clorofórmico, en contraste

con aquellas pertenecientes a animales tratados con extracto metanólico (Fig. 32C) e incluso con las de animales normales (Fig. 32A), podrían interpretarse como cambios estructurales que determinan un aumento de la secreción y por lo tanto una mayor resistencia a las injurias. Se han encontrado cambios en la estructura de la célula y en su metabolismo relacionados con la síntesis proteica que actuarían alterando la proliferación celular frente a agentes endógenos como el estrés y exógenos como la aspirina y el etanol. Estos procesos estarían relacionados con un aumento de la renovación celular del epitelio de la mucosa gástrica (Gregory y Eastwood, 1977).

5.0. Efecto del estrés provocado por hipotermia e inmovilización sobre la temperatura corporal y el pH gástrico en ratones tratados con extractos de *Centaurea solstitialis*

Los ratones, luego de 4,5 h de permanecer inmovilizados y sumergidos en agua a 22 °C, disminuyeron drásticamente la temperatura corporal (Tabla 6). La hipotermia causa trastornos circulatorios que afectan la microcirculación mucosal provocando hipoxia y disminución de la secreción de mucus y bicarbonato. El pH, medido sobre la mucosa glandular de los estómagos de los ratones, evidenció valores similares para los animales tratados solamente con excipientes sometidos y no sometidos a estrés (Tabla 6). El bajo pH encontrado en los animales que no fueron sometidos a estrés se atribuye al prolongado período de ayuno a que fueron expuestos los animales antes del ensayo. Este valor de pH, es seguramente el más bajo que puede lograr la secreción ácida gástrica, ya que valores inferiores a 1,5 inhiben la secreción de gastrina, razón por la cual no se encontraron diferencias entre los animales sometidos y no sometidos a estrés. Estos resultados están en concordancia con los hallados por Murakami et al. (1985) quienes demostraron que la temperatura corporal de ratas sumergidas en agua a 23 °C desciende a valores similares en una hora y el pH a 2,12 luego de 2 h. La

administración de extractos metanólico y clorofórmico produjo en ambos casos un aumento significativo del pH gástrico (Tabla 6). Estos resultados son consistentes con la acción citoprotectora evidenciada a través de la administración de indometacina, reacción de PAS y microscopía electrónica de barrido que mostraron un aumento de la secreción mucosa que es acompañada por la secreción de bicarbonato. El aumento de mucus y bicarbonato por acción de las prostaglandinas explicaría el aumento del pH sobre la superficie de la mucosa gástrica en los animales que fueron administrados con extractos de Cs. La presencia de extractos metanólico y clorofórmico en el estómago de los animales tratados permite decir que éstos, que poseen un pH gástrico más elevado que los animales sometidos a estrés, colaboran aumentando el pH. Por otro lado, el método de medición empleado indicó diferencias tan grandes que permitieron desestimar el error por la presencia de proteínas sobre los indicadores.

6.0. Estudios fitoquímicos de extractos metanólico y clorofórmico de *Centaurea solstitialis*

Las evidencias encontradas en los distintos ensayos realizados para determinar el efecto citoprotector de los extractos de Cs y la positividad de las reacciones de caracterización de la fracción metanólica para flavonoides, permitieron iniciar estudios fitoquímicos orientados a la búsqueda de compuestos con acción citoprotectora. Por otro lado y considerando que la localización de las lesiones erosivas y ulcerosas se deberían a una acción erosiva mecánica, se investigó la presencia de compuestos flavonoides con posible acción inhibitoria sobre la motilidad gástrica. Debido a ello se seleccionaron estándares auténticos de rutina, quercetina y apigenina, compuestos con reconocida actividad inhibitoria sobre el tránsito intestinal (Di Carlo et al., 1993), considerando que actuarían de la misma forma sobre la musculatura lisa gástrica. Además se empleó un estándar auténtico de canferol, compuesto con reconocida acción citoprotectora.

El aislamiento por HPLC e identificación por espectrometría de masas de canferol en la fracción metanólica (Fig. 33B y 35A respectivamente), permitió realizar comparaciones con resultados hallados por otros autores con respecto a su acción citoprotectora. Goel et al. (1996) determinaron que la administración intraperitoneal de canferol en ratas sometidas a estrés por frío e inmovilización produce una inhibición del daño gástrico dosis dependiente. Una dosis de 50 mg/kg de peso produjo un porcentaje de inhibición del 24,5 % mientras que con una dosis de 200 mg/kg de peso el porcentaje de inhibición fue del 43,3 %.

Los estudios cuantitativos realizados con capítulos secos de Cs, determinaron la presencia de 1,47 mg de canferol por gramo de materia seca. Considerando que la inhibición de úlceras en el modelo experimental utilizado en este trabajo se logra con una dosis del extracto metanólico proveniente de 0,75 g de Cs, se está administrando aproximadamente 37 mg/kg de peso de canferol. Esta dosis resulta comparativamente más baja que la dosis necesaria para lograr un porcentaje de inhibición de úlceras del 24,5% en ratas, tal como fue observado por Goel et al. (1996). Teniendo presente que se utilizaron distintos animales y vías de administración en los ensayos mencionados, la comparación de los resultados se tomaron como orientativos, pero indujeron a pensar que el canferol tendría una acción sistémica, ya que la administración intraperitoneal fue efectiva. Además, se pudo inferir que, probablemente, la moderada acción citoprotectora exhibida por la fracción metanólica, determinada por la administración de indometacina, pueda explicarse por la presencia de una escasa cantidad del compuesto en la dosis efectiva administrada del extracto metanólico. Lo expuesto evidencia la presencia de otro u otros mecanismos de acción que contribuyen a lograr el efecto gastroprotector exhibido por el extracto metanólico.

Siguiendo el esquema de extracción utilizado para el aislamiento de quercetina a partir de la fracción acetato de etilo, se realizó una hidrólisis de la fracción metanólica con ácido clorhídrico para separar los glicósidos

(Fig. 24). Este procedimiento permitió el aislamiento de canferol y quercetina libres. La presencia de rutina se investigó antes del agregado del ácido clorhídrico a la fracción metanólica, ya que la hidrólisis de este flavonoide da quercetina (Fig. 41).

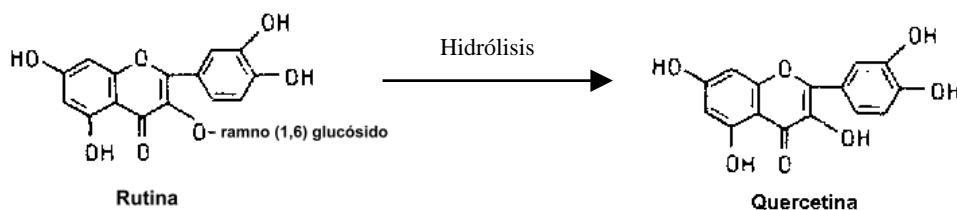


Fig. 41: Reacción de formación de quercetina a partir de la hidrólisis de rutina.

La presencia de rutina, en el esquema de extracción utilizado, determinaría un aumento en la concentración de quercetina, cuyo valor detectado de 0,63 mg por gramo de materia seca de capítulos de Cs no sería real, ya que estaría enmascarado por una mayor cantidad del flavonoide proveniente de la hidrólisis de la rutina. Por lo tanto, se realizó una extracción con acetato de etilo de la fracción metanólica y se cromatografió en capa fina con resultados negativos. En forma simultánea se cromatografió la fracción metanólica con estándares auténticos de quercetina y canferol para determinar la presencia de estos compuestos en forma libre con resultados negativos. Esto fue lo esperado, ya que, en general, los flavonoides se encuentran en las plantas en su forma conjugada. La unión con glicósidos hacen a estos compuestos menos reactivos y más solubles, permitiendo ser almacenados en las vacuolas celulares, donde son comúnmente hallados (Markham, 1982; DuPont et al., 2000). La apigenina, otro de los compuestos ensayados, no fue detectada por el método utilizado, pero se logró el aislamiento por HPLC e identificación por espectrometría de masas de quercetina en la fracción metanólica (Fig. 33A y 34A).

Los estudios fitoquímicos sobre la fracción clorofórmica permitieron la caracterización parcial de lactonas sesquiterpénicas por ^1H RMN. Esta

evidencia permitió relacionar a estos compuestos con la acción antiulcerosa exhibida por la fracción correspondiente. La relación estructura-actividad antiulcerosa que presentan algunos de estos compuestos podría explicar los resultados hallados en los ensayos con indometacina en los cuales se determinó un importante efecto citoprotector del extracto clorofórmico.

7.0. Efecto de extractos de *Centaurea solstitialis* sobre el tránsito gastrointestinal en ratones

Habiéndose logrado el aislamiento e identificación de canferol y quercetina a partir del extracto metanólico de Cs, se decidió centrar las investigaciones en estos compuestos con el propósito de determinar su participación en la acción antiulcerosa exhibida por el extracto. Considerando que sólo se logró la caracterización parcial de lactonas sesquiterpénicas en el extracto clorofórmico, se realizaron algunos ensayos en forma conjunta con los extractos metanólicos que aportaron evidencia sobre sus efectos farmacológicos que permitirán orientar futuras investigaciones.

Estudios llevados a cabo por Di Carlo et al. (1993), determinaron que la administración de quercetina en dosis de 12,5 a 50 mg/kg de peso producen una reducción significativa del tránsito intestinal de hasta el 134 % en ratones. Otros trabajos realizados in vitro por Hammad y Abdalla (1997), determinaron que la quercetina produce un importante efecto relajante sobre íleon aislado de rata. Estas investigaciones llevaron a pensar que los extractos acuoso y metanólico de Cs, que contendrían quercetina, podrían exhibir una acción similar que, sumada al efecto citoprotector del canferol, contribuiría a proteger la mucosa gástrica. Los estudios cuantitativos realizados con capítulos secos de Cs determinaron la presencia de 0,63 mg de quercetina por gramo de materia seca. Considerando que en el presente trabajo se logra inhibir la formación de úlceras con una dosis de extracto metanólico proveniente de 0,75 g, se

está administrando aproximadamente 15,75 mg/kg de peso de quercetina, una dosis efectiva según los trabajos de Di Carlo et al. (1993). Esta hipótesis fue consistente con las observaciones adicionales realizadas durante las necropsias de los ratones que advirtieron sobre la presencia de extractos acuoso y metanólico en el estómago, aún después de 4,5 h pos administración. Esta misma observación, aunque en menor grado, fue realizada en los animales tratados con extracto clorofórmico, lo que llevó a ensayar también este extracto.

El tránsito gastrointestinal, se evaluó tomando radiografías seriadas luego de administrar una sustancia radiopaca en ratones tratados con extractos acuoso, metanólico y clorofórmico. Las imágenes obtenidas por Rayos X (Fig. 36A-D) evidenciaron un notorio retraso en el tiempo de vaciado gástrico e intestinal de los grupos tratados con extractos acuoso, metanólico y clorofórmico respecto a los animales del grupo testigo. Estos resultados apoyaron la hipótesis que proponía una combinación de acciones farmacológicas citoprotectoras y espasmolíticas para explicar la acción antiulcerosa exhibida por la fracción metanólica. La acción espasmolítica se hizo evidente en este bioensayo con el aumento del tiempo de vaciado gástrico que estaría producido por una disminución de la motilidad. El retraso observado en la fracción clorofórmica podría deberse a la presencia de lactonas sesquiterpénicas. Uno de estos compuestos aislado de Cs, la repina, ha sido estudiada junto a otras lactonas como posibles medicamentos para el tratamiento del cáncer. Durante estos estudios, se encontraron una serie de efectos adversos que producen estos compuestos entre los cuales se menciona el bloqueo de la acetil colina que provoca alteraciones en la motilidad gastrointestinal (Pogrebnyak et al., 1998). Esto podría determinar un efecto similar al encontrado al administrar atropina.

Otros estudios realizados con cinaropicrina, que posee un grupo α -metileno- γ -butirolactona y solstitialina 13-acetato que carece de ese grupo funcional (Fig. 12), aisladas de Cs, determinaron una relación estructural-

actividad relacionada con el efecto inhibitor sobre músculo liso en experimentos *in vitro*. Se demostró que las sesquiterpeno-butirolactonas como la cinaropicrina poseen acción inhibitoria sobre el músculo liso de anillos aislados de aorta, mientras que la sostitalina 13-diacetato es inactiva (Hay et al., 1994).

8.0. Efecto de la administración de drogas relacionadas con la motilidad gástrica sobre la formación de úlceras

El test de inducción de úlceras por hipotermia e inmovilización produce un aumento de la motilidad gástrica que, junto con otros factores, como por ejemplo disminución del flujo sanguíneo mucosal, secreción de bicarbonato y aumento de la secreción ácida, erosionan la mucosa predisponiendo a la formación de lesiones ulcerosas. Esta referencia y la localización de las lesiones sobre las zonas más expuestas de los pliegues gástricos, llevó a pensar que una disminución de la motilidad gástrica podría estar vinculada con la acción farmacológica exhibida por los extractos. Para determinar la importancia de la motilidad gástrica en los mecanismos que inducen la formación de úlceras producidas por estrés por hipotermia e inmovilización, se utilizó atropina como inhibidor y pilocarpina como estimulador de la motilidad gástrica. La atropina inhibió totalmente la formación de úlceras (Tabla 7). Este resultado debe ser interpretado teniendo en cuenta que la atropina, además de actuar sobre la motilidad gastrointestinal, también lo hace sobre la secreción gástrica disminuyendo el volumen y el contenido ácido total, aunque este efecto está descrito solamente en animales de experimentación cuando reciben grandes dosis de atropina. En forma similar, la pilocarpina estimula la secreción de un jugo gástrico rico en ácido, pero esencialmente abundante en pepsina y mucina (Taylor, 1985). Aún teniendo en cuenta que las funciones secretorias se encuentran alteradas, la influencia de éstas para el caso de la atropina está condicionada a la dosis, habiendo también una disminución de mucus que podría predisponer a úlceras. En el caso de la pilocarpina, la

secreción se acompaña de una gran cantidad de mucina que actúa a la vez como protectora. Por lo expuesto, puede considerarse que el efecto espasmolítico es el factor que explica en forma mayoritaria los resultados hallados al administrar estas drogas. La administración conjunta de pilocarpina y extracto metanólico sugiere un efecto antagónico del extracto sobre el aumento de la motilidad producida por la pilocarpina (Tabla 7). Estos resultados indican que, probablemente, el aumento de la actividad motora favorece la formación de las úlceras por acción de un efecto erosivo mecánico como lo indica la localización de las lesiones, que se suma a otros factores como por ejemplo disminución del flujo sanguíneo mucosal, secreción de bicarbonato y aumento de la secreción ácida. Una disminución de la motilidad contribuiría, probablemente, a mantener la integridad de la mucosa al evitar el desprendimiento de la capa mucosa en las áreas más expuestas, evitando que el ácido clorhídrico y la pepsina digieran la pared del estómago.

9.0. Determinación de la actividad antiulcerosa de flavonoides aislados de *Centaurea solstitialis*

Habiéndose comprobado que la atropina previene la formación de úlceras gástrica se pensó que la quercetina, un compuesto que también inhibe la motilidad gastrointestinal, estaría involucrado en la acción antiulcerosa exhibida por el extracto metanólico. La administración de una dosis elevada de quercetina por vía oral no produjo respuesta gastroprotectora (Tabla 8). Observaciones adicionales durante la necropsia de los animales, mostraron la presencia de una cantidad importante de la suspensión de quercetina administrada en el tracto intestinal, evidenciando una baja absorción de la droga. Considerando que el tiempo de vaciado gastrointestinal en ratones, medido con Rayos X (Resultados punto 7.0.), es casi completo luego de 5 h (Fig. 36A-D, grupo control), el hallazgo de importantes cantidades de la suspensión administrada de quercetina en el tracto intestinal de los ratones luego de 4,5 h de administrado, permite

inferir que ha habido un retraso del vaciado intestinal, pero no suficiente para lograr una respuesta farmacológica. Una lenta absorción de la droga determina bajas concentraciones plasmáticas explicando estas observaciones.

Considerando que los flavonoides están en su mayor parte conjugados con glicósidos y que no pudo detectarse la presencia de quercetina en forma libre en los estudios fitoquímicos realizados con la fracción metanólica, se pensó que, probablemente, la falta de respuesta gastroprotectora podría deberse a una lenta absorción por su escasa solubilidad. Se descartó la posibilidad de que la droga se inactive por el pH estomacal, ya que resiste la acidez.

En la tabla 9 se observa que la quercetina, cuando se administró por vía intraperitoneal, aún cuando se empleó la mitad de la dosis oral (Tabla 8), exhibió efecto gastroprotector. Este resultado confirma que el compuesto en forma libre posee una baja absorción. El canferol, compuesto utilizado en la misma dosis, también mostró efecto gastroprotector. Estos resultados confirman la acción farmacológica de ambos compuestos y sugieren que la respuesta gastroprotectora de la quercetina administrada por vía oral, informada por Suzuki et al. (1988) y Martín et al. (1998) se debe, posiblemente en forma exclusiva, a los efectos antioxidantes del compuesto. Estos autores utilizaron etanol como inductor de úlceras, el cual actúa lesionando la mucosa gástrica a través de mecanismos oxidativos, por lo que se infiere que probablemente la acción gastroprotectora se produzca a través de mecanismos locales y no sistémicos. Aunque no puede descartarse que ocurran procesos oxidativos en el modelo de estrés por hipotermia e inmovilización que contribuyan al daño celular, los resultados obtenidos con la administración oral de quercetina mostraron que no es el mecanismo de acción principal. Los trabajos realizados por Di Carlo et al. (1993) apoyan las evidencias que sugieren una acción sistémica de la quercetina relacionada con la inhibición

de la motilidad gastrointestinal, ya que estos autores utilizaron la vía intraperitoneal para la administración del compuesto.

La utilización de quercetina y canferol conjugados aislados de Cs (Tabla 9), permitieron explicar el efecto exhibido por el extracto metanólico al ser administrado por vía oral. El empleo de dosis similares a las cuantificadas en el extracto de los compuestos no hidrolizados, determinaron que es necesario que se encuentren en forma de glicósidos para ser efectivos por vía oral.

Utilizando procedimientos extractivos y de aislamiento se obtuvieron dos fracciones que contendrían los compuestos canferol y quercetina conjugados. Al desconocer la composición de los azúcares conjugados, se corroboró la presencia de canferol y quercetina hidrolizando las fracciones con ácido clorhídrico y cromatografiándolas con los correspondientes estándares auténticos (Fig. 37A,B). Este experimento tuvo por objetivo demostrar que las elevadas dosis de quercetina necesarias para lograr un efecto farmacológico, estarían relacionadas con la baja solubilidad que posee el compuesto en forma libre, provocando una escasa absorción, mientras que el compuesto conjugado, al ser más soluble, sería absorbido en mayor grado mejorando la relación dosis-respuesta. Hollman y Katan (1998) sugieren que es posible la absorción de los flavonoides en forma de glicósidos y agliconas. Sin embargo, se determinó que la biodisponibilidad de la quercetina en humanos es del 52 % cuando se encuentra en forma de glicósido y del 24 % como aglicón (Hollman y Katan, 1999). Se ha determinado que la quercetina en forma de glicósido puede ser rápidamente absorbida y lentamente eliminada (Hollman et al., 1996; Hollman y Katan, 1997; Paganga y Rice-Evans, 1997). La farmacocinética del compuesto está relacionada con el tipo de glicósido. La absorción de quercetina-3-rutinósido es de sólo el 20 % en humanos pero aumenta sensiblemente si se transforma en quercetina-3-glucósido por separación de la molécula de ramnosa. Por otro lado, se ha determinado que la quercetina glicósido es rápidamente absorbida respecto a la forma libre, sin

importar la posición de la molécula de glucosa (Olthof et al., 2000). La quercetina que llega al intestino grueso, si se encuentra como glicósido, es hidrolizada por los microorganismos, los cuales al mismo tiempo degradan al flavonoide (Hollman y Katan, 1997).

La administración de canferol conjugado determinó que posee un moderado grado de participación, que no llegó a ser significativo, en la respuesta antiulcerosa, pero la administración conjunta de éste con quercetina conjugada, mostraron una posible acción sinérgica (Tabla 9). El efecto citoprotector producido por el canferol aislado de la Cs y que fuera demostrado por los estudios realizados a través de la administración de indometacina, reacción de PAS y microscopía electrónica de barrido, no alcanzó a expresar un efecto citoprotector estadísticamente significativo por sí mismo. La administración en forma conjunta con la quercetina aislada de Cs produjo un sinergismo demostrando que ambos compuestos actúan favoreciendo la protección gástrica.

Estos resultados permitieron deducir que los compuestos canferol y quercetina, cuando se encuentran en sus formas conjugadas, actúan como protectores gástricos en bajas dosis. Por otro lado, se evidenció un efecto sistémico y no local de estos compuestos. La acción sistémica y la baja potencia del canferol fue demostrada en los trabajos realizados por Goel et al. (1986), estos autores debieron administrar dosis de hasta 200 mg/kg de peso por vía intraperitoneal en ratones para obtener una respuesta inhibitoria cercana al 50 %. En el presente trabajo, con las condiciones experimentales estandarizadas para inducir úlceras, se lograron resultados similares utilizando la mitad de la dosis empleada por estos autores.

10.0. Efecto de la quercetina y el canferol sobre el tiempo de vaciado gastrointestinal en ratones

El empleo de Rayos X (Fig. 38A-D), para demostrar la acción de la quercetina y el canferol sobre la motilidad gastrointestinal, evidenció que la quercetina administrada por vía intraperitoneal retrasa el vaciado

gastrointestinal en forma similar a la quercetina-glicósido aislada de Cs y administrada por vía oral. El canferol conjugado mostró una actividad inhibitoria sobre el tránsito gastrointestinal comparativamente más moderada que la quercetina conjugada, ya que los ratones tratados con estos compuestos mostraron una imagen radiológica similar hasta los 120 minutos, pero a los 300 minutos se hizo evidente la evacuación de la sustancia radiopaca en los ratones tratados con canferol. Estos resultados confirmaron que la acción inhibitoria sobre la motilidad gastrointestinal atribuida a la quercetina por otros autores, se expresa en forma efectiva durante el modelo experimental utilizado en este trabajo. Por otro lado, se evidenció que la quercetina conjugada aislada de la Cs posee una importante acción sobre la motilidad gástrica en dosis que se correlacionan con las cantidades detectadas por los estudios fitoquímicos.

Estos resultados y las referencias bibliográficas permitieron inferir que la acción antiulcerosa mostrada por el extracto metanólico se debería a la acción de los flavonoides quercetina y canferol. La quercetina actuaría inhibiendo la motilidad gástrica y el canferol tendría, además, una acción citoprotectora mediada por las prostaglandinas.

11.0. Participación de las prostaglandinas en el efecto antiulceroso de la quercetina y el canferol

Habiéndose comprobado la acción sobre la motilidad gastrointestinal de la quercetina y el canferol y teniendo en cuenta la similitud estructural de estos compuestos (Fig. 11), se estudió la posible acción citoprotectora de la quercetina. La administración de indometacina en forma previa a la administración de canferol, mostró que la acción farmacológica de este compuesto se debe, en forma mayoritaria, a las prostaglandinas, en tanto, la quercetina produjo una protección significativa evidenciando la ausencia de mecanismos de acción mediados por las prostaglandinas (Tabla 10).

Estos resultados hacen posible pensar que la quercetina y el canferol, presentes en el extracto metanólico de Cs, actúen en forma

sinérgica inhibiendo la motilidad intestinal. La acción farmacológica más importante estaría representada por los efectos sobre la motilidad gástrica en la que intervendrían ambos compuestos. La moderada acción citoprotectora del extracto metanólico se evidenció por el alto porcentaje de inhibición obtenido al administrarlo en forma conjunta con la indometacina (Tabla 5).

12.0. Determinación de la actividad antioxidante del extracto metanólico de *Centaurea solstitialis*

La acción antioxidante de la quercetina, como se mencionó anteriormente, no es un factor de importancia para inhibir las formación de úlceras en el modelo experimental utilizado en este trabajo. Aunque la administración por vía oral no evidenció una acción local del compuesto que determine un efecto gastroprotector, se conoce que los procesos oxidativos contribuyen al daño celular. Los compuestos quercetina, canferol, BHT y el extracto metanólico mostraron tener efecto antioxidante in vitro (Tabla 11). En este ensayo se utilizaron las sustancias ensayadas en las mismas concentraciones expresadas en mg/l permitiendo determinar que la quercetina evidencia un mayor efecto antioxidante que el canferol, coincidiendo con las referencias bibliográficas. Al expresar la concentración molar de los compuestos utilizados se observó que, aún cuando las cantidades calculadas de quercetina y canferol contenidas en el extracto metanólico son muy inferiores a las utilizadas por separado de los compuestos adquiridos comercialmente (50:1 para el canferol y 22:1 para la quercetina), evidenciaron un mayor efecto antioxidante por lo que puede inferirse una acción sinérgica cuando la quercetina y el canferol actúan juntos, o la presencia en el extracto de otros compuestos que mejoren la respuesta. La acción antioxidante encontrada en el extracto metanólico, de potencia similar al BHT (Fig. 39), permite considerar una posible contribución a los mecanismos gastroprotectores. Desórdenes vasculares provocados por el estrés hipotérmico causan daño oxidativo en las

membranas celulares del epitelio gástrico que pueden ser revertidos o atenuados por la acción de sustancias antioxidantes exógenas que se ubican sobre las membranas celulares para ejercer su acción (Torel et al., 1986). La quercetina intervendría en las respuestas celulares tales como multiplicación, apoptosis y transformación (Gamet-Payrastre et al., 1999).

13.0. Determinación del efecto sedante del extracto acuoso de *Centaurea solstitialis* en ratones

Otra de las acciones farmacológicas investigadas, que podrían influir sobre los mecanismos gastroprotectores, están en concordancia con las observaciones realizadas durante la administración crónica de extracto acuoso de Cs en ratas. Estas observaciones sugirieron que el extracto producía un efecto sedante sobre los animales. En el modelo experimental utilizado, una prolongación en el período de sueño logrado al administrar extracto acuoso de Cs con dosis hipnóticas o subhipnóticas de tiopental sódico, fue interpretado como el resultado de un efecto aditivo entre el extracto y el barbitúrico, evidenciando un efecto sedante del extracto. Los períodos de sueño, logrados en los ratones utilizando dosis hipnóticas del barbitúrico, mostraron una importante variabilidad que es propia en las respuestas a esta droga (Tabla 12). Para salvar esta dificultad se utilizaron dosis hipnóticas y subhipnóticas, permitiendo hacer comparaciones para confirmar los resultados. Los animales que recibieron una dosis previa de extracto acuoso y luego fueron administrados con dosis subhipnótica mostraron un aumento significativo del período de sueño. Los administrados con dosis hipnóticas, aún cuando el período de sueño aumentó, su incremento no fue estadísticamente significativo debido a las variaciones entre animales mencionadas anteriormente. Con un modelo experimental similar se determinó que la quercetina, la penta-O-etilquercetina (Picq et al., 1988), la quercitrina y la isoquercitrina, estos tres últimos con quercetina como aglicón, poseen efecto sedante (Kang et al., 2000). Los efectos sedantes del extracto deben ser tenidos en cuenta con

relación al modelo de inducción de úlceras utilizado, ya que la disminución controlada de la temperatura corporal y el estrés psicológico fueron considerados como factores principales por Boyd et al. (1977). Con relación a lo expresado, es probable que la menor actividad observada en las ratas que recibieron una administración crónica de extracto acuoso de Cs, esté relacionada con el efecto sedante y que éste produzca modificaciones sobre la actividad secretoria de la mucosa gástrica y la motilidad contribuyendo al efecto gastroprotector observado. Debe señalarse que los estudios in vitro, utilizando músculo aislado, muestran un efecto miolítico no dependiente de una acción central que estaría indicando la presencia de distintos mecanismos de acción. Otros autores han realizado ensayos con distintas sustancias en animales anestesiados y no anestesiados, con el fin de determinar la influencia del estrés psicológico sobre los mecanismos secretores (Murakami et al., 1985; Takeuchi et al., 1999).

14.0. Efecto del estrés provocado por hipotermia e inmovilización sobre los niveles plasmáticos de corticoides en ratones tratados con extractos de *Centaurea solstitialis*

La inducción de úlceras por estrés responde a una serie de cambios fisiopatológicos que contribuyen al debilitamiento de las defensas gástricas. Aunque se conoce que los corticoides son indispensables en las respuestas adaptativas a los cambios del organismo y medio ambientales, dependiendo de la intensidad de éstos, una dosis determinada de corticoesteroides puede considerarse fisiológica o farmacológica (Haynes y Murad, 1985). Teniendo en cuenta estas acciones, puede inferirse que una descarga de corticoides en busca de una respuesta adaptativa, puede interferir la síntesis de prostaglandinas predisponiendo a la mucosa gástrica a sufrir lesiones. Es sabido que el cortisol en el hombre induce la producción intracelular de un polipéptido llamado lipocortina el cual inhibe a la fosfolipasa A₂ y a la producción de ácido araquidónico limitando la síntesis de prostaglandinas (Mayes, 1997). Se utilizaron los niveles de

cortisol para evaluar la respuesta de los animales al estrés ya que no se disponía, al momento de realizar este ensayo, del kit para su determinación. El fabricante del kit para determinación de cortisol (DPC®) en humanos informa que hay una reacción cruzada del 0,45 % con la corticosterona y en su catálogo Veterinary Applications of DPC Kits (1993) comunican el uso en ratones. Basados en estas referencias y considerando que la bibliografía no informa valores de cortisol plasmático en ratones, se utilizaron los valores obtenidos como un indicador de los niveles plasmáticos de corticosterona. Los resultados obtenidos confirmaron que tal como se esperaba, el estrés producido elevaría los valores de corticoides en forma significativa (Tabla 13). Por otro lado, se pensó que los extractos metanólico y clorofórmico podrían influir sobre los niveles de corticoides, pero no se encontraron diferencias significativas respecto a los animales que no recibieron los extractos. Es probable, que la falta de diferencias en los valores plasmáticos detectados entre los grupos que han sido sometidos a hipotermia e inmovilización, se explique por la presencia de un estrés máximo compatible con la vida de los animales. Es posible pensar que no habría una relación entre la administración de extractos de la Cs y los niveles séricos de corticosterona.

15.0. Efectos producidos por compuestos relacionados estructuralmente con flavonoides y lactonas sesquiterpénicas presentes en *Centaurea solstitialis* sobre la actividad gastroprotectora y la motilidad gastrointestinal

Los estudios realizados para determinar una relación entre la estructura química de compuestos estructuralmente relacionados con los flavonoides encontrados en la Cs, determinaron que todos aquellos que poseen un grupo oxhidrilo en el carbono C-4' del anillo B como la miricetina, apigenina y rutina poseen acción gastroprotectora (Tabla 14) y un efecto inhibitorio sobre la motilidad gastrointestinal (Fig. 40A-C). Hammad y Abdalla (1997) concluyeron en sus estudios sobre íleon aislado de rata, que la presencia de un sustituyente oxhidrilo en la posición C-3,

que diferencian los flavonoles de las flavonas (Fig. 10), es una condición esencial para inhibir la motilidad. En los estudios realizados en este bioensayo (Fig. 40A-C), se pudo comprobar que los compuestos que poseen más oxhidrilos en el anillo B mostraron menor acción inhibitoria farmacológica pudiendo ordenarse de acuerdo a su potencia de menor a mayor de la siguiente forma: miricetina, rutina y canferol (Fig. 42 y 11 respectivamente).

Reforzando estas observaciones se encontró que la silibina (Fig. 42), un compuesto que no presenta grupos oxhidrilos en el anillo B, no exhibió acción sobre la motilidad gástrica ni actividad gastroprotectora. Di Carlo et al. (1993) en experimentos in vivo en ratones, lograron una moderada acción inhibitoria de la silibina sobre la motilidad gástrica con dosis hasta 5 veces mayores a las utilizadas en este bioensayo, resultado que confirma la baja potencia de este flavonoide y su posible relación con la ausencia de oxhidrilos en el anillo B. En concordancia con lo expuesto, Hammad y Abdalla (1997) encontraron que la presencia de una doble ligadura en C2-3, ausente en la silibina, incrementa la potencia de las flavonas respecto a las flavanonas.

Cuando se sustituye el oxhidrilo del C-3 de la quercetina por un grupo O-ramno(1,6)glucósido se obtiene la rutina (Fig. 41).

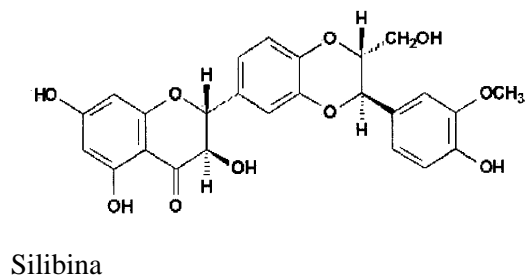
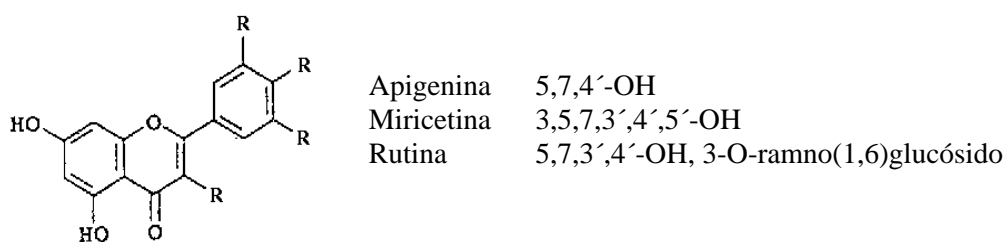


Fig. 42: Estructura química de la apigenina, miricetina, rutina y silibina.

Podría esperarse que la rutina, que posee una estructura básica igual a la quercetina, exhiba mayor potencia que el canferol, sin embargo, en las condiciones de este ensayo fue menor. Este resultado se atribuye a que se utilizó una dosis de canferol de 100 mg/kg ya que ésta exhibió un efecto gastroprotector significativo en bioensayos anteriores (Tabla 9) y la dosis utilizada de rutina fue de 50 mg/kg de peso. La ausencia de actividad biológica de la rutina, cuando fue utilizada sobre músculo aislado in vitro (Hammad y Abdalla, 1997) y la presencia de esta actividad en los ensayos realizados en este trabajo (Fig. 40A-C) y por otros autores in vivo (Di Carlo et al., 1993), podría explicarse por una acción sobre el mecanismo de regulación a nivel central.

La utilización del compuesto sintético α -metileno- γ -butirolactona produjo un moderado efecto gastroprotector que no llegó a ser significativo (Tabla 14) y una potente acción inhibitoria sobre la motilidad gastrointestinal (Fig. 40A-C). Hamburger et al. (1994), informaron que la cinaropicrina, un compuesto aislado de Cs que posee un grupo α -metileno- γ -butirolactona (Fig. 12, estructura química 8), inhibió la contractilidad del

músculo liso. Estos estudios determinaron, además, que este grupo funcional es crítico para esta acción, ya que compuestos como el solstitialina 13-acetato (Fig. 12, estructura química 3), que no posee el grupo α -metileno no inhibió las contracciones del músculo liso. Estos estudios y la acción inhibitoria de la motilidad gastrointestinal que se encontró al administrar α -metileno- γ -butirolactona, explican el retraso del tránsito gastrointestinal observado al administrar el extracto clorofórmico de Cs (Fig. 36A-D).

CONCLUSIONES

- Los extractos acuoso, metanólico y clorofórmico obtenidos a partir de capítulos secos de la *Centaurea solstitialis* que se desarrolla en el Departamento Maracó de la Provincia de la Pampa, inhiben la formación de úlceras inducidas por estrés por hipotermia e inmovilización en ratas y ratones.
- La administración crónica de dosis terapéuticas de extracto acuoso de capítulos de *Centaurea solstitialis* no produce síntomas neurotóxicos ni hipotermia.
- El análisis de los resultados obtenidos al utilizar ratas y ratones como animales de experimentación en el modelo de inducción de úlceras por hipotermia e inmovilización, demostró que el empleo de ratones permite contar con un modelo experimental más confiable, reproducible y sensible a las lesiones gástricas.
- El extracto metanólico obtenido de *Centaurea solstitialis* protege la mucosa gástrica a través de mecanismos citoprotectores mediados por prostaglandinas en menor grado que el extracto clorofórmico.
- Los extractos metanólicos y clorofórmicos inhiben la motilidad gastrointestinal.
- La quercetina y el canferol, aislados e identificados a partir del extracto metanólico de *Centaurea solstitialis*, son los compuestos responsables de la inhibición de la motilidad gastrointestinal. La quercetina posee mayor potencia inhibitoria sobre la motilidad gástrica que el canferol.
- El canferol actúa inhibiendo la motilidad gástrica y reforzando la barrera mucosa gástrica. La quercetina no posee acción citoprotectora.

- Los compuestos conjugados aislados de la planta poseen mejor relación dosis-respuesta que sus formas libres.
- La quercetina y el canferol, cuando se administran en forma conjunta, exhiben un efecto gastroprotector aditivo.
- El aumento de la motilidad gástrica, provocado por el test de hipotermia e inmovilización, es un factor determinante en la inducción de úlceras gástricas.
- Los resultados obtenidos al evaluar la actividad citoprotectora y la motilidad gastrointestinal determinaron que los extractos metanólico y clorofórmico obtenidos de *Centaurea solstitialis*, poseen distintos compuestos que actúan en forma similar reforzando la barrera mucosa y evitando el efecto mecánico erosivo para proteger la mucosa gástrica.
- El estrés provocado por hipotermia e inmovilización produce un aumento en los niveles plasmáticos de corticosterona y éstos no son modificados por la administración de extractos metanólico y clorofórmico de *Centaurea solstitialis*.
- Los extractos metanólico y clorofórmico de *Centaurea solstitialis* elevan los valores de pH gástrico durante el estrés.
- El número de sustituyentes oxhidrilo en el anillo B de los flavonoides está relacionado con la motilidad gastrointestinal.
- Las lactonas sesquiterpénicas, que poseen un grupo α -metileno- γ -butirolactona en su estructura, exhiben un importante efecto inhibitorio de la motilidad gastrointestinal.

- Futuros estudios permitirán, probablemente, contar con un medicamento proveniente de una fuente económica, que pueda incorporarse efectivamente al arsenal farmacológico para ser utilizado en medicina humana y veterinaria.

BIBLIOGRAFÍA

Akbar, S.; Fries, D.S.; Malone, M.H. (1995). Effect of various pretreatments on the hypothermic activity of repin in naive rats. *J. Ethnopharmacol.*, 49: 91 - 97.

Anandan, R.; Deepa Rekha, R.; Saravanan, N.; Devaki, T. (1999). Protective effects of *Picrorrhiza kurroa* against HCl/ethanol-induced ulceration in rats. *Fitoterapia*, 70: 498 - 501.

Argenzio, R. A. (1999a). Digestión, absorción y metabolismo. En: *Fisiología de los animales domésticos de Dukes*. 5° edición (M.J. Swenson y W.O. Reece, eds.). Ed. Uthea-Noriega Editores, México D. F., México, pp. 325 - 335.

Argenzio, R. A. (1999b). Digestión, absorción y metabolismo. En: *Fisiología de los animales domésticos de Dukes*. 5° edición (M.J. Swenson y W.O. Reece, eds.). Ed. Uthea-Noriega Editores, México D. F., México, pp. 336 - 343.

Auguste, L. J.; Lackner, R.; Ratner, L.; Stein, T. A.; Bailey, B. (1990). Prevention of stress-induced erosive gastritis by parenteral administration of arachidonic acid. *Journal of parenteral and enteral nutrition*, 14: 615 - 617.

Avallone, R.; Zanolli, P.; Puia, G.; Kleinschnitz, M.; Schreier, P.; Baraldi, M. (2000). Pharmacological profile of apigenin, a flavonoid isolated from *Matricaria chamomilla*. *Biochem. Pharmacol.*, 59: 1387 - 1394.

Baldessarini, R. J. (1985). Las drogas y el tratamiento de las enfermedades psiquiátricas. En: *Las bases farmacológicas de la terapéutica*. 6° Edición (A. Goodman Gilman, L. S. Goodman y A. Gilman, eds.). Ed. Editorial Médica Panamericana, Madrid, España, pp. 440 - 448.

Boyd, S. C.; Caul, W. F.; Bowen, B. K. (1977). Use of cold restraint to examine psychological factors in gastric ulceration. *Physiol. Behav.*, 18: 865 - 870.

Beretz, A.; Stoclet, J.; Anton, R. (1980). Inhibition of isolated rat aorta contraction by flavonoids. Possible correlation with cAMPC phosphodiesterase inhibition. *Planta Med.*, 39: 236 - 237.

Berruecos, J. M.; Done, J. T.; Ramírez Necoechea, R.; García Rivas, J. (1986). Problemas hereditarios y congénitos. En: *Enfermedades de los cerdos*. 1° edición (R. Ramírez Necoechea y C. Pijoán Aguadé, eds.). Ed. Grupo Diana, México D. F., México, pp. 61-63.

Binder, R. G.; Turner, Ch. E.; Flath, R. A. (1990a). Comparison of Yellow Starthistle volatiles from different plant on parts. *J. Agric. Food Chem.*, 38: 764 - 767.

Binder, R. G.; Turner, Ch. E.; Flath, R. A. (1990b). Volatile components of Purple Starthistle. *J. Agric. Food Chem.*, 38: 1053 - 1055.

Blanco, A. (1997). Digestión. Absorción. En: *Química Biológica*. 5° edición. Ed. El Ateneo, Buenos Aires, Argentina, pp. 188 -192.

Blood, D. C.; Henderson, J. A.; Radostits, O. M. (1988a). *Medicina Veterinaria*. Ed. Nueva Editorial Interamericana. 6ª edición. México D.F., México, pp. 184 - 185.

Blood, D. C.; Henderson, J. A.; Radostits, O. M. (1988b). *Medicina Veterinaria*. Ed. Nueva Editorial Interamericana. 6ª edición. México. D.F., México, p. 1301.

Breggia, M. E.; Miguenz, M.; Silberman, P. E.; Laudisi, C.; Lemberg, A.; Filingier, E. (2000). Fármacos usados para el control de la acidez gástrica y el tratamiento de la úlcera gástrica. *Acta Farm. Bon.*, 19: 133 - 142.

Bruno, M.; Díaz, J. G.; Herz, W. (1991). Guaianolides and lignans from *Centaurea solstitialis* subsp. *Schouwii*. *Pytochemistry*, 30: 4165 - 4167.

Brunton, L. L. (1996). Fármacos para el control de la acidez gástrica y el tratamiento de úlceras pépticas. En: *Las bases farmacológicas de la terapéutica*. 9° edición (J. G. Hardman, L. E. Limbird y A. Goodman Gilman, eds.). Ed. Interamericana McGraw-Hill, México D. F., México, pp. 965 - 980.

Bubenchikova, V. N. (1990). Coumarins of plants of the genus *Centaurea*. *Chemistry of Natural Compounds*, 26: 706 - 709.

Cassaday, J. M.; Hokanson, G. C. (1978). $3\alpha,16\alpha$ -Dihydroxytaraxene-3-acetate: a new triterpene from *Centaurea solstitialis*. *Phytochemistry*, 17: 324 - 325.

Cordy, D.R. (1978). *Centaurea* species and equine nigropallidal encephalomalacia. En: *Effects of poisonous plants on livestock*. (R.F. Keeler; K.R. Van Kampen y L.F. James, eds). Ed. Academic Press, New York, Estados Unidos de Norteamérica, pp. 327-336.

Crawford, J. M. (1998). El tracto gastrointestinal. En: *Patología estructural y funcional*. 5° edición. (F. J. Schoen, ed.). Ed. Interamericana McGraw-Hill, Getafe, Madrid, España, pp. 854 - 862.

Desmarchelier, C.; Ciccía, G. (1998). Antioxidantes de origen vegetal. *Ciencia Hoy*, 8: 33 - 41.

Detweiler, D. K. (1999a). Mecanismos de control del sistema circulatorio. En: Fisiología de los animales domésticos de Dukes. 5° edición (M.J. Swenson y W.O. Reece, eds.). Ed. Uthea-Noriega Editores, México D. F., México, pp. 190 - 191.

Detweiler, D. K. (1999b). Mecanismos de control del sistema circulatorio. En: Fisiología de los animales domésticos de Dukes. 5° edición (M.J. Swenson y W.O. Reece, eds.). Ed. Uthea-Noriega Editores, México D. F., México, p. 215.

de Vries, J.H.; Hollman, P.C.; Meyboom, S.; Buysman, M. N.; Zock, P. L.; van Staveren, W. A.; Katan, M. B. (1998). Plasma concentrations and urinary excretion of the antioxidant flavonols quercetin and kaempferol as biomarkers for dietary intake. *Am. J. Clin. Nutr.*, 68: 60 - 65.

Di Carlo, G.; Autore, G.; Izzo, A. A.; Maiolino, P.; Mascolo, N.; Viola, P.; Diurno, M. V.; Capasso, F. (1993). Inhibition of intestinal motility and secretion by flavonoids in mice and rats: structure-activity relationships. *J. Pharm. Pharmacol.*, 45: 1054 -1059.

Domínguez, X. A. (1979). Métodos de Investigación Fitoquímica. Ed. Limusa, México D. F., México, pp. 93-117.

DuPont, M. S.; Mondin, Z.; Williamson, G.; Price, K. R. (2000). Effect of variety, processing, and storage on the flavonoid glycoside content and composition of lettuce and endive. *J. Agric. Food Chem.*, 48: 3957 - 3964.

Enriz, D.; Giordano, O. S.; Guzman, J. A. (1994). Structure-activity relationship in the cytoprotective effect of helenanin and related compounds. *Drug Design and Discovery*, 11: 23 -38.

Evans, W. C. (1995). Farmacognosia. Trease y Evans. 13ª edición. Ed. Interamericana, McGraw-Hill. México D. F., México, pp. 743-746.

Feldman, M.; Colturi, T. J. (1984). Effect of indomethacin on gastric acid and bicarbonate secretion in humans. *Gastroenterology*, 7: 1339 - 1343.

Flower, R. J.; Moncada, S.; Vane, J. R. (1985). Agentes analgésicos-antipiréticos y antiinflamatorios; drogas empleadas en el tratamiento de la gota. En: Las bases farmacológicas de la terapéutica. 6º Edición. (A. Goodman Gilman, L. S. Goodman y A. Gilman, eds.). Ed. Editorial Médica Panamericana, Madrid, España, pp. 696 - 697.

Fujimoto, Y.; Soemartono, A.; Sumatra, M. (1988). Sesquiterpene lactones from *Blumea balsamifera*. *Phytochemistry*, 27: 1109 - 1111.

Fujita, T.; Sezik, E.; Tabata, M.; Yesilada, E.; Honda, G.; Takeda, Y.; Taanka, T.; Takaishi, Y. (1995). Traditional medicine in Turkey. VII. Folk medicine in middle and west Black Sea regions. *Econ. Bot.*, 49: 406 - 422.

Gallo, G. G. (1979). Plantas tóxicas para el ganado en el cono sur de América. Ed. Universitaria de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina, pp. 147 - 149.

Gamet-Payrastre, L.; Manenti, S.; Gratacap, M-P.; Tulliez, J.; Chap, H.; Payrastre, B. (1999). Flavonoids and the inhibition of PKC and PI 3-kinase. *Gen. Pharmacol.*, 32: 279 - 286.

Ganong, W. F. (1998). Fisiología Médica. Ed. El Manual Moderno, México D.F., México, pp. 548 - 555.

Geissman, T.A., (1962). The Chemistry of Flavonoids Compounds. Pergamon Press, Oxford, Gran Bretaña, pp. 72-76.

Geneser, F. (1997). Histología. 2ª edición. Ed. Editorial Médica Panamericana, México D. F., México, pp. 403 - 413.

Giordano, O. S.; Guerreiro, E.; Guzman, J. A.; Penissi, A. B.; Piezzi, R. S. (1997). Citoprotectores gastrointestinales obtenidos a partir de especies vegetales. *Pren. Méd. Argent.*, 84: 890 - 899.

Goel, R.K.; Maiti, R.N.; Tavares, I.A. (1996). Role of endogenous eicosanoids in the antiulcer effect of kaempferol. *Fitoterapia*, 67: 548-552.

Grant, H. W.; Palmer, R. W.; Kelly, R. W.; Wilson, N. H.; Misiewicz, J. (1988). Dietary linoleic acid, gastric acid, and prostaglandin secretion. *Gastroenterology*, 94: 955 - 959.

Gregory, I.; Eastwood, M. D. (1977). Progress in gastroenterology. Gastrointestinal epithelial renewal. *Gastroenterology*, 72: 962 - 975.

Gros, E.G.; Pomilio, A.B.; Seldes, A.M.; Burton, G. (1985). Introducción al estudio de los productos naturales. Ed. Editorial Secretaría General de la Organización de Estados Americanos, Washington D.C., Estados Unidos de Norteamérica, pp. 69 - 77.

Guth, P. H.; Aures, D.; Paulsen, G. (1979). Topical aspirin plus HCl gastric lesions in the rat. Citoprotective effect of prostaglandin, cimetidine and probanthine. *Gastroenterology*, 76: 87 - 93.

Güntner, C.; Barra, C.; Cesio, V.; Dellacassa, E.; Ferrando, L. (1999). Antioxidant properties of *Solidago chilensis* L. flavonoids. Pharmacognosy, Pharmacology, Phytomedicines, Toxicology, WOCMAP-2, pp. 159 - 162.

Hamburger, M.; Wolfender, J.; Hostettmann, K. (1993). Search for chlorinated sesquiterpene lactones in the neurotoxic thistle *Centaurea solstitialis* by liquid chromatography-mass spectrometry, and model studies on their possible artifactual formation. Natural Toxins, 1: 315 - 327.

Hammad, H. H.; Abdalla, S. S. (1997). Pharmacological effects of selected flavonoids on rat isolated ileum: structure-activity relationship. Gen. Pharmac., 28: 767 - 771.

Hawkey, C. J.; Rampton, D. S. (1985). Prostaglandins and the gastrointestinal mucosa: are they important in its functions, disease, or treatment?. Gastroenterology, 89: 1162 - 1188.

Hay, A. J.; Hamburger, M.; Hostettmann, K.; Hoult, J. R. (1994). Toxic inhibition of smooth muscle contractility by plant-derived sesquiterpenes caused by their chemically reactive alpha-methylenebutyrolactone functions. J. Pharmacol., 112: 9 - 12.

Haynes, R. C.; Murad, F. (1985). Hormonas adrenocorticotróficas, esteroides adrenocorticales (corticosuprarrenales) y sus análogos; sintéticos inhibidores de la biosíntesis de esteroides corticosuprarrenales. En: Las bases farmacológicas de la terapéutica. 6^o edición (A. Goodman Gilman, L. S. Goodman y A. Gilman, eds.). Ed. Editorial Médica Panamericana, Madrid, España, pp. 440 - 448.

Hertz, W.; Sosa, V. (1988). Sesquiterpene lactones and other constituents of *Arnica acaulis*. *Phytochemistry*, 27: 155 - 159.

Hollman, P. C. H.; Gaag, M. V. D.; Mengelers, M. J. B.; van Trijp, J. M. P. (1996). Absorption and disposition kinetics of the dietary antioxidant quercetin in man. *Free Radical Biol. Med.*, 21: 703 - 707.

Hollman, P. C. H.; Katan, M. B. (1997). Absorption, metabolism and health effects of dietary flavonoids in man. *Biomed. Pharmacother.*, 51: 305 - 310.

Hollman, P. C. H.; Katan, M. B. (1998). Bioavailability and health effects of dietary flavonols in man. *Arch. Toxicol.*, 20: 237 - 248.

Hollman, P. C. H.; Katan, M. B. (1999). Health effects and bioavailability of dietary flavonols. *Free Radic. Res.*, 31: 75 - 80.

Ivy, A. C.; Grossman, M. I.; Bachrach, W. H. (1954). *Úlcera Péptica*. Ed. El Ateneo. Buenos Aires, Argentina, pp. 362 - 367.

Jacobson, E. D. (1992). Circulatory mechanisms of gastric mucosal damage and protection. *Gastroenterology*, 102: 1788 - 1800.

Jakupovic, J.; Jia, Y.; Pathak, V. P.; Bohlmann, F.; King, R. M. (1986). Bisabolone derivatives and sesquiterpene lactones from *Centaurea* Species. *Planta Med.*, 5: 399 - 401.

Jerzy Glass, G. B. (1978a). *Introducción a la fisiología gastrointestinal*. Ed. Editorial Universitaria de Buenos Aires. Buenos Aires, Argentina, p. 53.

Jerzy Glass, G. B. (1978b). Introducción a la fisiología gastrointestinal. Ed Editorial Universitaria de Buenos Aires. Buenos Aires, Argentina, pp.102 - 103.

Kamanzi, K.; Raynaud, J. (1976). Contribution à l'étude des glycosides flavonoïques de *Centaurea solstitialis* L. Plant. Méd. Phytothér., 10: 78 - 84.

Kamanzi, P. K.; Voirin, B.; Raynaud, E. T. (1983). Methoxy flavonoids from the flowers of *Centaurea solstitialis* L. (Compositae). Plant. Méd. Phytothér., 17: 52 - 56.

Kang, T. H.; Jeong, S. J.; Kim, N. Y.; Higuchi, R.; Kim, Y. C. (2000). Sedative activity of two flavonol glycosides isolated from the flowers of *Albizia julibrissin* Durazz. J. Ethnopharmacol., 71: 321 - 323.

Kauffman, G. L.; Grossman, M. I. (1978). Prostaglandin and cimetidine inhibit the formation of ulcers produced by parenteral salicylates. Gastroenterology, 75: 1099 - 1102.

Lamberto, S. A.; Valle, A. F.; Aramayo, E. M.; Andrada, A. C. (1997). Manual ilustrado de las plantas silvestres de la región de Bahía Blanca. Departamento de Agronomía. Universidad Nacional del Sur. Ed. Diagrama SRL, Bahía Blanca, Argentina, p. 239.

Larson, R. A. (1988). The antioxidants of Higher Plants. Phytochemistry, 4: 969 - 978.

Lee, K.; Huang, E.; Piantadosi, C.; Pagano, J. S.; Geissman, T. A. (1971). Cytotoxicity of sesquiterpene lactones. Cancer Research, 31: 1649 - 1654.

Levine, R. A.; Schwartzel, E. H. (1984). Effect of indomethacin on basal and histamine stimulated human gastric acid secretion. Gut, 25: 718 - 722.

Lin, W. C.; Tan, T. W. (1994). The rol of gastric muscle relaxation in cytoprotection induced by San-huang-xie-xin-tang en rats. J. Ethnopharmacol., 44: 171 - 179.

Maddox, D. M.; Mayfield, A.; Poritz, N. H. (1985). Distribution of Yellow Starthistle (*Centaurea solstitialis*) and Russian Knapweed (*Centaurea repens*). Weed Sc., 33: 315 - 327.

Maluf, E.; Barros, H. M. T.; Frochtengarten, M. L.; Benti, R.; Leite, R. (1991). Assessment of hypnotic/sedative effects and toxicity of *Passiflora edulis* aqueous extract in rodents an humans. Phytotherapy Res., 5: 262 - 266.

Marazzi Uberti, E.; Turba, C. (1961). Antiulcer and secretion inhibitory properties of the tricyclic derivative. Doxepin in rats and dogs. Med. Exp., 4: 284 - 287.

Markham, K. R. (1982). Techniques of flavonoids identification. Ed. Academic Press. New York. Estados Unidos de Norteamérica, pp. 1 - 7.

Maria, A. O.; Wendel, G. H.; Guardia, T.; Guzmán, J. A.; Pestchanker, M. J.; Guerreiro, E.; Giordano, O. S. (1995). Gastric cytoprotective activity of 2-cyclopenten-1-one and related compounds. Biol. Pharm. Bull., 18: 1784 - 1786.

Maria, A. O. M.; Franchi, A. M.; Wendel, G. H.; Gimeno, M.; Guzmán, J. A.; Giordano, O. S.; Guerreiro. E. (1998). Gastric cytoprotective activity of dehydroleucodine in rats. Role of prostaglandins. Biol. Pharm. Bull., 21: 335 - 338.

Martín, M. J.; La Casa, C.; Alarcón de la Lastra, C.; Cabeza, J.; Villegas, I.; Motilva, V. (1998). Anti-oxidant mechanisms involved in gastroprotective effects of quercetin. *Z. Naturforsch.*, 53: 82 - 88.

Martino, V. (2000). Los flavonoides como promisorios agentes preventivos y terapéuticos. *Acta Farm. Bon.*, 18: 303 - 308.

Masso, J. L.; Bertran, M. N.; Adzet, T. (1979). Contribution to a chemical and pharmacological study of several species of *Centaurea* (Compositae). *Plant. Méd. Phytothér.*, 13: 41 - 45.

Mayes, P. A. (1997). Metabolismo de los ácidos grasos insaturados y de los eicosanoides. En: *Bioquímica de Harper*. (R. K. Murray, P. A. Mayes, D. K. Granner, V. W. Rodwell, eds.). 14^o edición. Ed. El Manual Moderno, México D. F., México. pp. 299 - 317.

Merrill, G. B.; Stevens, K. L. (1985). Sesquiterpene lactones from *Centaurea solstitialis*. *Phytochemistry*, 24: 2013 - 2018.

Miller, T. A.; Jacobson, E. D. (1979). Gastrointestinal cytoprotection by prostaglandins. *Gut*, 20: 75 - 85.

Morales, M. A.; Lozoya, X. (1994). Calcium-antagonist effects of quercetin on aortic smooth muscle. *Planta Med.*, 60: 313 - 317.

Murakami, M.; Lam, S. K.; Inada, M. (1985). Pathophysiology and pathogenesis of acute gastric mucosal lesions after hypothermic restraint stress in rats. *Gastroenterology.*, 88: 660 - 665.

Murakami, S.; Muramatsu, M.; Otomo, S. (1992). Inhibition of gastric H⁺,K⁺-ATPase by quercetin. *J. Enzym. Inhib.*, 5: 293 - 298.

Musial, F.; Ench. P. (1993). Stress and gastrointestinal motility. En: An illustrated guide to gastrointestinal motility. (D. Kumar, D.Wingate, eds.). 2^o edition. Ed. Churchill Livingstone, Cambridge, Gran Bretaña. pp. 104 - 107.

Natale, G.; Lazzeri, G.; Blandizzi, C.; Gherardi, G.; Lenzi, P.; Pellegrini, A.; Del Tacca, M. (2001). Seriate histomorphometry of whole rat stomach: an accurate and reliable method for quantitative analysis of mucosal damage. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 1: 17 - 26.

Nieva Moreno, I.; Isla, M. I.; Sampietro, A. R.; Vattuone, M. A. (2000). Comparison of the free radical-scavenging activity of propolis from several regions of Argentina. *J. Ethnopharmacol.*, 71: 109 - 114.

Olarte, J. (1996). Impacto de la investigación sobre la práctica médica: Conocimientos recientes sobre el mecanismo de acción de los antiinflamatorios no esteroideos. *Asociación Colombiana de Farmacología*, 4: 3 - 7.

Olthof, M. R.; Hollman, P. C. H.; Vree, T. B.; Katan, M. B. (2000). Bioavailabilities of quercetin-3-glucoside and quercetin-4'-glucoside do not differ in humans. *J. Nutr.*, 130: 1200 - 1203.

Paganga, G.; Rice-Evans, C. A. (1997). The identification of flavonoids as glycosides in human plasma. *FEBS Lett.*, 401: 78 - 82.

Penissi, A. B.; Fogal, T. H.; Guzmán, J. A.; Piezzi, R. S. (1998). Gastroduodenal mucosal protection induced by dehydroleucodine. Mucus secretion and role of monoamines. *Digestive Disease and Science*, 43: 791 - 798.

Pérez Guerrero, C.; Martín, M. J.; Marhuenda, E. (1994). Prevention by rutin of gastric lesions induced by ethanol in rats: role of indogenous prostaglandins. *Gen. Pharmacol.*, 25: 575 - 580.

Petkov, E.; Uzunov, P.; Kostova, I.; Somleva, T.; Ognyanov, I. (1983). Inhibition of rat heart phosphodiesterase by some ratenoids and isoflavonoids. *Planta Med.*, 47: 237 - 239.

Piezzi, R. S.; Guzmán, J. A.; Guardia, T.; Pestchanker, M. J.; Guerreiro, E.; Giordano, O. S. (1995). Dehydroleucodine prevents ethanol-induced necrosis in the mice duodenal mucosa. A histological study. *Biocell.*, 19: 27 - 33.

Picq, M.; Cheav, S. L.; Prigent, A. F. (1988). Effect of two flavonoid compounds on central nervous system. Analgesic activity. *Life Sci.*, 49: 1979 - 1988.

Pogrebnyak, A. V.; Poroikov, V. V.; Starykh, V. V.; Konovolov, D. A. (1998). Computer forecast of the anticancer activity of sesquiterpene lactones discovered in representatives of the family Asteraceae. *Rastitel'nye Resursy*, 34: 61 - 64.

Rakotonirina, V. S.; Bum, E. N.; Rakotonirina, A.; Bopelet, M. (2001). Sedative properties of the decoction of the rhizome of *Cyperus articulatus*. *Fitoterapia*, 72: 22 - 29.

Reith, E. J.; Ross, M. H. (1969). *Atlas de Histología*. Ed. El Ateneo, Buenos Aires, Argentina, pp. 108 - 113.

Reyes, M.; Martín, C.; Alarcón de la Lastra, C.; Trujillo, J.; Toro, M. V.; Ayuso, M. J. (1996). Antiulcerogenicity of the flavonoid fraction from *Erica andevalensis* Cabezudo-Rivera. *Z Naturforsch.* 51: 563 - 569.

Robert, A.; Schultz, J. E.; Nezamis, J. E.; Lancaster, C. (1976). Gastric antisecretory and antiulcer properties of PGE₂, 15-methyl PGE₂, and 16,16-dimethyl PGE₂. *Gastroenterology*, 70: 359 - 370.

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

Robert, A.; Nezamis, J.E.; Lancaster, C.; Hanchar, A. J. (1979). Cytoprotection by prostaglandins in rats. Prevention of gastric necrosis produced by alcohol, HCl, NaOH, Hypertonic NaCl, and thermal injury. *Gastroenterology*, 77: 433 - 443.

Robles, M.; Aregullin, M.; West, J.; Rodriguez, E. (1995). Recent studies on the Zoopharmacognosy, Pharmacology and Neurotoxicology of sesquiterpene lactones. *Planta Med.*, 61: 199 - 203.

Robles, M.; Choi, B. H.; Han, B.; Santa Cruz, K.; Kim, R. C. (1998). Repin-induced neurotoxicity in rodents. *Exp. Neurol.*, 152: 129 - 136.

Rodríguez, E.; Towers, G. H. N.; Mitchell, J. C. (1976). Biological activities of sesquiterpene lactones. *Phytochemistry*, 15: 1571 - 1580.

Ruckebusch, Y.; Phaneuf, L.-P.; Dunlop, R. (1994a). Secreciones digestivas exocrinas. En: *Fisiología de pequeñas y grandes especies*. Ed. El Manual Moderno, S. A. de C. V., México D. F., México, pp. 227 - 306.

Ruckebusch, Y.; Phaneuf, L.-P.; Dunlop, R. (1994b). Secreciones digestivas exocrinas. En: Fisiología de pequeñas y grandes especies. Ed. El Manual Moderno, S. A. de C. V., México D. F., México, pp. 324 - 328.

Ruíz de Aguiar, A.; Orejas, B. (1992). Fisiología de la secreción salival y gástrica. En: Fisiología humana (J. A. F. Tresguerres, ed.). 1º edición. Ed. Interamericana McGraw-Hill, Madrid, España, pp. 761-762.

Schepp, W.; Steffen, B.; Ruoff, H.; Schusdziarra, V.; Classen, M. (1988). Modulation of rat gastric mucosal prostaglandin E₂ release by dietary linoleic acid: Effect on gastric acid secretion and stress-induced mucosal damage. *Gastroenterology*, 95: 18 - 25.

Seibl, J. (1973). Propiedades del ion molecular. En: Espectrometría de masas. (J. Calderón, M. Stud, Eds.). Ed. Alhambra, Madrid, España, pp. 29 - 36.

Shah, A. H.; Khan, Z. A.; Baig, M. Z. A.; Quereshi, A. M.; Ai-Bekairi, A. I. (1997). Gastroprotective effects of pretreatment with *Zizyphus sativa* fruits against toxic damage in rats. *Fitoterapia*, 68: 226 - 233.

Shinoda, J., (1928). Color reactions of flavone and flavonol derivatives and the like. *J. Pharm. Soc. Jpn.*, 48: 214-220.

Sisson, S. (1996). Sistema digestivo de los equinos. En: Sisson y Grossman. Anatomía de los animales domésticos. 5º edición. (R. Getty, ed). Ed. JGH Editores, México D. F., México, p. 537.

Snedecor, G. W.; Cochran, W. G. (1967). *Statistical Methods*, Iowa State University Press, Ames, Estados Unidos de Norteamérica, pp. 120 - 134.

Stevens, K. L.; Witt, S. C. (1989). Separation and identification of labile polyacetilenes by RP-HPLC. *J. Liquid Chromatogr.*, 12: 1203 - 1211.

Stevens, K. L.; Witt, S. C.; Turner, C. E. (1990). Poliacetylenes in Related Thistles of the Subtribes Centaureinae and Carduinae. *Biochemical Systematics and Ecology*, 18: 229 - 232.

Suzuki, Y.; Ishihara, M.; Segami, T.; Ito, M. (1998). Anti-ulcer effects of antioxidants, quercetin, alpha-tocopherol, nifedipine and tetracycline in rats. *Jpn. J. Pharmacol.*, 78: 435 - 441.

Svanes, K.; Ito, K.; Takeuchi, K.; Silen, W. (1982). Restitution of the surface epithelium of the in vitro frog gastric mucosa after damage with hyperosmolar sodium chloride. *Gastroenterology*, 82: 1409 - 1426.

Swenson, M. J.; Reece, W.O. (1999). *Fisiología de los animales domésticos de Dukes*. 5ª edición. Ed. Uthea-Noriega Editores, México D. F., México, pp. 351 - 357.

Takeuchi, K.; Suzuki, K.; Araki, H.; Mizoguchi, H.; Sugamoto, S.; Umeda. (1999). Roles of endogenous prostaglandins and nitric oxide in gastroduodenal ulcerogenic responses induced in rats by hypothermic stress. *J. Physiol.*, 93: 423 - 431.

Taylor, P. (1985). Agonistas colinérgicos. En: *Las bases farmacológicas de la terapéutica*. 6ª edición (A. Goodman Gilman; L. S. Goodman y A. Gilman, eds.). Ed. Editorial Médica Panamericana, Madrid, España, pp. 105 - 113.

Tepperman, B. L.; Miller, T. A.; Johnson, L. T. (1978). Effect of 16,16-dimethyl, prostaglandin E₂, on ethanol-induced damage to canine oxyntic mucosa. *Gastroenterology*, 75: 1061 - 1066.

Todorova, M. N.; Tsankova, E. T.; Trendafilova, A. B.; Gushev, Ch. V. (1996). Sesquiterpene lactones with the uncommon rotundane skeleton from *Artemisia pontica* L.. *Phytochemistry*, 41: 553 - 556.

Torel, J.; Cillard, J.; Cillard, P. (1986). Antioxidant activity of flavonoids and reactivity with peroxy radical. *Phytochemistry*, 25: 383 - 385.

Turner, C. E.; Johnson, J. B.; McCafrey, J. P. (1995). Yellow starthistle. En: *Biological control in the Western United States*. (J. R. Nechols; L. A. Andres; J. W. Beardsley, R. D. Goeden, C. G. Jackson, eds.). Ed. University of California, Division of Agriculture and Natural Resources, California, Estados Unidos de Norteamérica., pp. 270 - 275.

Waisman, Y.; Dinari, G.; Marcus, H.; Ligumsky, M.; Rosenbach, Y.; Zahavi, I.; Nitzan, M. (1985). Naloxone is protective against indomethacin-induced intestinal ulceration in the rat. *Gastroenterology*, 89: 86 - 91.

Whittle, B. J. R. (1981). Temporal relationship between cyclooxygenase inhibition, as measured by prostacyclin biosynthesis, and the gastrointestinal damage induced by indomethacin in the rat. *Gastroenterology*, 80: 94 - 98.

Yesilada, E.; Honda, G.; Sezix, E.; Tabata, M.; Fujita, T.; Tanaka, T.; Takeda, Y.; Takaishi, Y. (1993a). Traditional medicine in Turkey. V. Folk medicine in the inner Taurus Mountains. *J. Ethnopharmacol.*, 46: 133 - 152.

Yesilada, E.; Sezik, E.; Fujita, T.; Tanaka, S.; Tabata, M. (1993b). Screening of some Turkish medicinal plants for their antiulcerogenic activities. *Phytotherapy Res.*, 7: 263 -265.

Yesilada, E.; Gurbuz, I.; Shibata, H. (1999). Screening of Turkish anti-ulcerogenic folk remedies for anti-*Helicobacter pylori* activity. *J. Ethnopharmacol.*, 3: 289 - 293.

Zhu, M.; Lew, T. H.; Luk, C. T. (1997). Gastric protective effect of *Lentinus edodes* against ethanol-induced ulceration. *Fitoterapia*, 68: 537 - 442.