



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

“Identificación de los componentes activos de la raíz de *Ligusticum porteri* y estudio de su mecanismo de acción gastroprotector en rata wistar”

TESIS

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA

M. en C. Josué Arturo Velázquez Moyado

TUTOR

Dr. Andrés Navarrete Castro

Facultad de Química UNAM

Ciudad de México, Octubre 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

“Identificación de los componentes activos de la raíz de *Ligusticum porteri*
y estudio de su mecanismo de acción gastroprotector en rata wistar”

T E S I S

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

P R E S E N T A

M. en C. Josué Arturo Velázquez Moyado

TUTOR

Dr. Andrés Navarrete Castro

Facultad de Química UNAM

Jurado Asignado

Presidente: Dr. Manuel Jiménez Estrada

Vocal: Dra. Silvia Lorenia Cruz Martín del Campo

Vocal: Dr. Mariano Martínez Vázquez

Vocal: Dr. Ricardo Reyes Chilpa

Secretario: Dr. José Fausto Rivero Cruz

Asesor: Dr. Andrés Navarrete Castro

Sustentante: M. en C. Josué Arturo Velázquez Moyado

Lugar donde se desarrolló el trabajo de tesis:

Laboratorio 126, Conjunto E, Departamento de Farmacia

Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México

Artículos

Velazquez-Moyado JA, Martinez-Gonzalez A, Linares E, Bye R, Mata R, Navarrete A. (2015); Gastroprotective effect of diligustilide isolated from roots of *Ligusticum porteri coulter & rose* (Apiaceae) on ethanol-induced lesions in rats. *Journal of Ethnopharmacology*; 174:403-409
doi:10.1016/j.jep.2015.08.030.

Velázquez-Moyado JA, Balderas-López JL, Pineda-Peña EA, Sánchez-Ortiz BL, Tavares-Carvalho JC, Navarrete A. (2017); Diligustilide releases H₂S and stabilizes S-nitrosothiols in ethanol-induced lesions on rat gastric mucosa. *Inflammopharmacology*.
doi:10.1007/s10787-017-0392-6

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo financiero otorgado para llevar acabo el presente trabajo, y por la beca otorgada para la realización de mis estudios de doctorado con número de becario 244989.

Al financiamiento para la compra de animales y reactivos de los proyectos PAIP5000-9143 e IN213818.

A la Facultad de Química y al Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Químicas, UNAM, por la formación profesional.

A mi tutor Dr. Andrés Navarrete Castro, por sus valiosos consejos para sacar adelante este proyecto.

A los miembros de mi comité tutor la Dr. Héctor Isaac Rocha González y el Dr. Manuel Jiménez Estrada por todo su apoyo en el desarrollo de este proyecto.

A mi jurado, Dr. Manuel Jiménez Estrada, Dra. Silvia Lorenia Cruz Martín del Campo, Dr. Ricardo Reyes Chilpa, Dr. Mariano Martínez Vázquez, Dr. José Fausto Rivero Cruz, por las valiosas aportaciones que hicieron al revisar este trabajo.

Al personal de la USAI por la realización de los espectros de RMN

Dedicatoria



Tabla de contenido

AGRADECIMIENTOS	5
DEDICATORIA	6
LISTA DE ABREVIATURAS	6
RESUMEN	11
ABSTRACT	13
INTRODUCCIÓN	15
1 MARCO TEÓRICO	16
1.1 ESTÓMAGO	16
1.2 ÁREA SECRETORA DE ÁCIDO (EXÓCRINA)	17
1.3 ÁREA SECRETORA DE HORMONAS (ENDÓCRINA)	18
1.4 HISTAMINA	18
1.5 GASTRINA	18
1.6 ACETILCOLINA	19
1.7 SOMATOSTATINA	19
1.8 H ⁺ /K ⁺ ATPASA	19
1.9 MECANISMOS DE DEFENSA DE LA MUCOSA GÁSTRICA	21
1.10 GLUTATIÓN (GSH)	21
1.11 BIOSÍNTESIS DEL SULFURO DE HIDRÓGENO	22
1.12 SULFURO DE HIDRÓGENO (H ₂ S)	25
1.13 ÓXIDO NÍTRICO	26
1.14 INTERACCIONES ENTRE H ₂ S Y NO	28
1.15 MUCOSA GÁSTRICA	29
1.16 BICARBONATO Y MOCO GÁSTRICO	29
1.17 CÉLULAS EPITELIALES	30
1.18 MICROCIRCULACIÓN GÁSTRICA	30
1.19 ÚLCERA GÁSTRICA	31
1.20 ESTRÉS OXIDATIVO	32
1.21 DAÑO DE LA MUCOSA A TRAVÉS DE FÁRMACOS ANTIINFLAMATORIOS NO ESTEROIDEOS (AINES)	33
1.22 TRATAMIENTO PARA LA ÚLCERA GÁSTRICA	34
1.23 <i>LIGUSTICUM PORTERI</i>	35
1.24 FITOQUÍMICA	37
1.25 BIOSÍNTESIS DE LAS FTÁLIDAS.	41
1.26 BIOACTIVIDAD DE LAS FTÁLIDAS	42
2 HIPÓTESIS	44

3 OBJETIVO GENERAL	45
OBJETIVOS PARTICULARES	45
4 PARTE EXPERIMENTAL	46
4.1 MATERIAL VEGETAL	46
4.2 PREPARACIÓN DE LOS EXTRACTOS ORGÁNICOS DE <i>L. PORTERI</i> .	46
4.3 INDUCCIÓN DEL DAÑO GÁSTRICO	46
4.4 EVALUACIÓN FARMACOLÓGICA DE LOS EXTRACTOS ORGÁNICOS DE <i>L. PORTERI</i> .	47
4.5 CONSTRUCCIÓN DE CURVAS DOSIS – RESPUESTA	47
4.6 EVALUACIÓN DEL MECANISMO DE ACCIÓN GASTROPROTECTOR DEL DILIGUSTÍLIDO	47
4.6.1 EVALUACIÓN DE LA VÍA DEL AMPC	47
4.6.2 EVALUACIÓN DE LA VÍA DEL ÓXIDO NÍTRICO	48
4.6.3 EVALUACIÓN DE LA VÍA DEL SULFURO DE HIDRÓGENO	48
4.6.4 CUANTIFICACIÓN DE GLUTATIÓN Y NITRITOS	49
4.6.5 FORMACIÓN DE LOS NITROSOTIOLES	50
4.7 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE H₂S <i>IN VIVO</i> EN TIEMPO REAL	50
4.7.1 PROCEDIMIENTO QUIRÚRGICO	50
4.7.2 CURVA DE CALIBRACIÓN	50
4.7.3 EQUIPOS	51
4.8 SISTEMA 3D DE CULTIVO PRIMARIO ESTOMACAL	51
4.9 CORTES HISTOLÓGICOS	52
4.10 TINCIÓN HEMATOXILINA Y EOSINA	52
4.11 PRUEBA DE VIABILIDAD CON MTT	53
4.12 ANIMALES	53
4.13 FÁRMACOS Y REACTIVOS	53
4.14 DETERMINACIÓN DE LAS CONSTANTES FÍSICAS Y PROPIEDADES ESPECTROSCÓPICAS Y ESPECTROMÉTRICAS	54
4.15 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	54
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	55
5.1 OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS ORGÁNICOS DE <i>L. PORTERI</i> Y EVALUACIÓN GASTROPROTECTORA.	55
5.2 AISLAMIENTO Y ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL DEL DILIGUSTÍLIDO	57
5.2.1 CARACTERIZACIÓN DEL DILIGUSTÍLIDO (14)	58
5.3 EVALUACIÓN DEL EFECTO GASTROPROTECTOR DEL DILIGUSTÍLIDO OBTENIDO DE <i>L. PORTERI</i> .	62
5.4 IDENTIFICACIÓN DEL MECANISMO DE ACCIÓN GASTROPROTECTOR DEL DLG	63
5.4.1 PARTICIPACIÓN DE LOS GRUPOS SULFHIDRILOS LIBRES Y LA VÍA DEL H ₂ S, EN EL MECANISMO DE ACCIÓN GASTROPROTECTOR DEL DILIGUSTÍLIDO EN EL DAÑO GÁSTRICO INDUCIDO POR EL ETANOL	64
5.4.2 BLOQUEO DE LOS GRUPOS SULFHIDRILO LIBRES	64
5.4.3 BLOQUEO DE LAS ENZIMAS CBS Y CSE	66
5.4.4 ADMINISTRACIÓN EXÓGENA DE H ₂ S	67
5.5 DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN <i>IN VIVO</i> DEL H ₂ S	68
5.5.1 VALIDACIÓN DEL MÉTODO <i>IN VIVO</i> PARA LA CUANTIFICACIÓN DE H₂S.	68
5.5.2 ESTUDIOS FARMACOLÓGICOS	69
5.5.3 PARTICIPACIÓN DEL DLG SOBRE LA PRODUCCIÓN DEL H₂S	73

5.6 PARTICIPACIÓN DE LA VÍA DEL ÓXIDO NÍTRICO (NO) EN EL MECANISMO DE ACCIÓN GASTROPROTECTOR DEL DILIGUSTÍLIDO EN EL DAÑO GÁSTRICO INDUCIDO POR EL ETANOL	74
5.7 PARTICIPACIÓN DE LOS CANALES DE K ⁺ DEPENDIENTES DE ATP (K _{ATP})	75
5.8 BLOQUEO DE LA FORMACIÓN DEL NO	77
5.9 PARTICIPACIÓN DE LAS PROSTAGLANDINAS	78
5.10 REGULACIÓN DE LA SECRECIÓN DEL HCL	79
5.11 FORMACIÓN DE S-NITROSOTIOLES Y SU EFECTO PROTECTOR SOBRE LA MUCOSA GÁSTRICA	81
5.11.1 CUANTIFICACIÓN DE LOS MEDIADORES ENDÓGENOS GLUTATIÓN (GSH) Y NITRITOS (NO ₂ ⁻).	83
5.11.2 EFECTO DEL DLG SOBRE LA FORMACIÓN DE LOS S-NITROSOTIOLES	88
5.12 ESTABLECIMIENTO DEL CULTIVO <i>EX VIVO</i> DE TEJIDO ESTOMACAL	91
CONCLUSIONES	98
PERSPECTIVAS	99
BIBLIOGRAFÍA	100
PUBLICACIONES	108

Listado de Figuras

Figura 1: Anatomía del estómago _____	17
Figura 2: Factores que regulan la secreción gástrica en células principales – tomado de oc-europe.com _____	20
Figura 3: Biosíntesis del H ₂ S en la célula _____	24
Figura 4: Biosíntesis del NO. _____	27
Figura 5: Raíz de <i>Ligusticum porteri</i> _____	36
Figura 6: Flores de <i>Ligusticum porteri</i> _____	36
Figura 7: Mecanismo de biosíntesis de las ftálicas. _____	43
Figura 8: Efecto gastroprotector de los extractos orgánicos de <i>L. porteri</i> _____	57
Figura 10: Espectro de RMN ¹³ C del diligustilido de <i>Ligusticum porteri</i> _____	59
Figura 11: Espectro de RMN ¹ H del diligustilido de <i>Ligusticum porteri</i> _____	60
Figura 12: Estructura del (Z,Z')-diligustilido _____	60
Figura 13: Efecto gastroprotector por vía intragástrica del diligustilido _____	63
Figura 14: Principal ruta de biosíntesis del H ₂ S _____	64
Figura 15: Bloqueo de los grupos –SH con NEM _____	65
Figura 16: El bloqueo de la actividad de la enzima CSE por PAG y CBS por HA _____	66
Figura 17: Regulación del Na ₂ S en el efecto del DLG _____	67
Figura 18: Curva de calibración de la concentración de H ₂ S vs milivolts _____	69
Figura 19: Curso temporal de la cantidad de H ₂ S liberado en el estómago de rata _____	70
Figura 20: Curso temporal de la cantidad de H ₂ S tratado con L-cisteína y DL-PAG _____	71
Figura 21. Participación de diferentes fármacos utilizados en el tratamiento de la úlcera gástrica sobre la producción de H ₂ S en el estómago de rata. _____	72
Figura 22: Curso temporal de la liberación de H ₂ S en el estómago tratados con DLG. _____	74
Figura 23: Principal ruta de señalización molecular del H ₂ S-NO. _____	75
Figura 24: Efecto del pretratamiento con glibenclamida y diazóxido en el efecto gastroprotector del DLG _____	76
Figura 25: Efecto del pretratamiento con L-NAME en el mecanismo gastroprotector de DLG _____	77
Figura 26: Efecto del pre-tratamiento con indometacina en el efecto gastroprotector del DLG _____	79
Figura 27: Mecanismo de la secreción gástrica _____	80
Figura 28: Efecto del pretratamiento con FSK y DDA sobre el efecto gastroprotector del DLG _____	81
Figura 29: La formación de los S-nitrosotioles in-vitro _____	82
Figura 30: Curva de calibración estándar para cuantificar la concentración intracelular del GSH _____	83
Figura 31: Concentraciones de glutatión presentes en homogenados del tejido gástrico _____	84
Figura 32: Curva de calibración estándar utilizada para cuantificar la concentración intracelular del nitritos (NO ₂ ⁻) _____	86
Figura 33: Concentraciones de nitritos presentes en homogenados del tejido gástrico _____	88
Figura 34: Concentración de glutatión reducido (GSH), presente en homogenados de tejido gástrico. _____	89
Figura 35: Concentración de nitritos (NO ₂ ⁻), presente en homogenados de tejido gástrico, _____	91
Figura 36: Cultivo 3D de secciones estomacales previamente lesionada. _____	92
Figura 37: Prueba de viabilidad con MTT en secciones de tejido gástrico. _____	93
Figura 38: Fotomicrografías de la mucosa gástrica. _____	94
Figura 39: Posible mecanismo de acción gastroprotector del DLG en la formación de S-nitrosotioles. _____	96



Lista de abreviaturas

AA	Aminoácidos
AcOEt	Acetato de etilo
ACh	Acetil colina
AMPC	Adenosin monofosfato cíclico
abs	absoluto
AINEs	Anti inflamatorios no esteroideos
ANADEVA	Análisis de Varianza
cm	Centímetro
CSE	Cistationina γ -liasa
CBS	Cistationina β -sintetasa
Ca ⁺²	Ión calcio
CAT	Cisteína aminotransferasa
CuCl ₂	Cloruro de cobre (II)
CO ₂	Dióxido de carbono
CDCl ₃	Cloroformo deuterado
CH ₂ Cl ₂	Cloruro de metileno
°C	Grados Celsius
CCK ₂	Receptores de colecistoquinina 2
CSE	Cistationina γ -liasa
CBS	Cistationina β -sintetasa
CGRP	Gen de la calcitonina
CO	Monóxido de carbono
COX	Ciclooxigenasa
DZX	Diazóxido
DNTB	Ácido 5,5'-Ditiobis(2-nitrobenzoico)
DLG	Diligustílido
DHMB	Ácido 4,6-dihidroxi-2-(hidroximetil)-3-metilbenzóico
DHMP	5,7-dihidroxi-4-metilftálido
DMMPA	Ácido demetil micofenólico
DE ₅₀	Dosis efectiva 50
DMSO	Dimetil sulfóxido
d	Doblete
EtOH	Etanol
EEM	Error estándar de la media
ECL	Parecido a enterocromafines
EGF	Factor de crecimiento epidermal
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ERK	Fosforilación de la cinasa regulada por señales
eNOS	Enzima óxido nítrico sintasa del endotelio
Fe ²⁺	Ion Hierro
GC	Guanilato ciclasa
Glib	Glibenclamida

GC-MS	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas
GMP	Guanosin monofosfato
GMPc	Guanosin monofosfato cíclico
GCL	Glutamato cisteína ligasa
GRP	Péptido liberador de gastrina
GSH	Glutación reducido
GSR	Glutación-reductasa
GST	Glutación transferasa
GPX	Glutación peroxidasa
GSSG	Disulfuro de glutación
g	Gramos
h	Hora
HA	Hidroxilamina
H ₂	Receptores de histamina
HgCl ₂	Cloruro de mercurio
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanosulfónico
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
HOCl	Ácido hipocloroso
HCl	Ácido clorhídrico
Hex	Hexano
HPLC	Cromatografía de líquidos de alta eficiencia
H ₂ S	Sulfuro de hidrógeno
HCO ₃ ⁻	Ácido carbónico
H ⁺	Protón
Indo	Indometacina
i.p.	Intra peritoneal
IP3	Inositol trifosfato
IBP	Inhibidores de la bomba de protones
ILGF	factor de crecimiento similar a la insulina
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
K ⁺	Ión potasio
kg	Kilogramo
K _{ATP}	Potasio dependientes de ATP
L	Litro
L-NMMA	Citrato de L-N ^G -monometil arginina
L-NAME	Éster metílico de N ^G -nitro-L-arginina
3-MST	3-mercaptopiruvato sulfurtransferasa
M	Molar
MPA	Ácido micofenólico
5-MOA	Ácido 5-metilorselínico
MeOH	Metanol
MgCl ₂	Cloruro de magnesio
mg	Miligramo

μg	Microgramo
$\mu\text{g}/\text{Kg}$	Microgramo /Kilogramos
$\mu\text{g}/\text{mL}$	Microgramo /Mililitro
mg/Kg	Miligramo /Kilogramos
μL	Microlitro
MHz	Megahertz
min	Minuto
mL	Mililitro
mm	Milímetros
μM	Micromolar
mM	Milimolar
mm^2	Milímetro cuadrado
mV	Milivolts
MRP.	Micrótopo vertical Lupetec
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difeniltetrazolio)
nm	Nanómetro
NaHCO_3	Bicarbonato de sodio
N	Normal
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido
NaOH	Hidróxido de sodio
NO	Óxido nítrico
NO	Radical óxido nítrico
$\cdot\text{NO}_2$	Radical dióxido de nitrógeno
$\cdot\text{N}_2\text{O}_3$	Radica trióxido de dinitrógeno
NaHS	Hidrogeno sulfuro de sodio
NOS	Óxido Nítrico Sintasa
NED	N-alfa-naftil-etilenediamino
NEM	N-etilmaleimida
NO_2	Dióxido de nitrógeno
NO_2^-	Nitritos
ONOO^-	Peroxinitrito
O_2	Oxígeno molecular
$\text{O}_2^{\cdot-}$	Superóxido
$\cdot\text{OH}$	Radical hidroxilo
PAG	Propargilglicina
PGE_2	Prostaglandina E_2
PGI_2	Prostaciclina I_2
PLC	Fosfolipasa C
PGs	Prostaglandinas
PGIs	Prostacilclinas
PM	Peso molecular
ppm	Partes por millón
p.o.	<i>Per os</i> , por boca
ROS	Especies reactivas de oxígeno

RMN ¹³ C	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono 13
RMN ¹ H	Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno
ROI	Intermediarios reactivos de oxígeno
RNSO	Nitrosotioles
RNS	Especies reactivas de nitrógeno
-SH	Grupo sulfhidrilo libres
SNP	Nitroprusiato de sodio
s	Señal simple
SSI	Solución salina isotónica
SNP	Nitroprusiato de sodio
SAM	S-adenosil-L-metionina
SO ₃ ²⁻	Sulfitos
S ₂ O ₃ ²⁻	Tiosulfatos
TMS	Tetrametil silano
t	Tiempo
TGF-α	Factor de crecimiento transformante alfa
USAI	Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación y a la Industria
VIP	Péptido vasoactivo intestinal
VEGF	Factor de crecimiento vascular endotelial
δ	Desplazamiento químico



Resumen

Las rizomas de *Ligusticum porteri* Coulter & Rose han sido utilizadas tradicionalmente por el grupo étnico Raramuri en el norte de México como uso ceremonial, además se les han atribuido propiedades para el tratamiento de enfermedades como la diabetes, tuberculosis, dolores estomacales y diarrea, sin embargo, no existen reportes sobre su uso en el tratamiento de la úlcera gástrica. El presente trabajo describe de forma detallada la actividad gastroprotectora de los extractos orgánicos de esta planta y del diligustírido (DLG) uno de los principales metabolitos presentes en las rizomas.

Los extractos orgánicos obtenidos de la raíz poseen actividad gastroprotectora sobre las lesiones gástricas inducidas por el etanol. Los extractos de hexano ($74.91 \pm 20.30 \text{ mm}^2$) y CH_2Cl_2 ($54.01 \pm 11.94 \text{ mm}^2$) presentaron mayor efecto a la dosis de 30 mg/Kg con respecto a los extractos de AcOEt ($130.4 \pm 36.14 \text{ mm}^2$) y MeOH ($166.5 \pm 34.4 \text{ mm}^2$).

El análisis químico del extracto de hexano permitió el aislamiento de la DLG, un metabolito que posee actividad gastroprotectora ($67.64 \pm 11.88 \text{ mm}^2$) a la dosis de 10 mg/Kg, sugiriendo que es uno de los principales metabolitos responsables de la actividad de la planta.

Con la finalidad de explorar el mecanismo de acción del DLG se evaluó la vía del sulfuro de hidrógeno (H_2S) y de óxido nítrico (NO). Los resultados indican que el bloqueo de los grupos sulfhidrilo libres ($-\text{SH}$) con N-etilmaleimida abate por completo el efecto gastroprotector del DLG, refiriendo la presencia de estos para poder ejercer su actividad. La biosíntesis del H_2S se lleva a cabo por dos enzimas cistationina γ -liala (CSE), cistationina β -sintetasa (CBS), el bloqueo de estas enzimas con DL-propargilglicina (PAG) e hidroxilamina (HA) respectivamente no modificaron dicho efecto, a diferencia de la administración exógena de H_2S (Na_2S) la cual regula de forma concentración-dependiente la actividad del metabolito.

Para corroborar si el H_2S tiene participación directa sobre el mecanismo de acción de la DLG se diseñó por primera vez una metodología que permite obtener lecturas de este gas en tiempo real. Utilizando un electrodo selectivo, se determinó la concentración

del H₂S en la mucosa gástrica en condiciones normales ($0.23 \pm 0.02 \mu\text{M}$) y en aquellas que presentaban úlcera gástrica ($0.13 \pm 0.01 \mu\text{M}$). La administración del DLG no solo previno en todo momento la disminución de este gas sino que además incrementó la concentración desde el inicio ($0.39 \pm 0.01 \mu\text{M}$). La validación de esta metodología para su uso como herramienta farmacológica se realizó con L-cisteína como control positivo ($0.51 \pm 0.04 \mu\text{M}$) y al PAG como control negativo ($0.05 \pm 0.02 \mu\text{M}$), así como fármacos de referencia como omeprazol, inhibidor de la bomba de protones, y ranitidina, un antagonista de los receptores H₂, los cuales no modifican la liberación del H₂S, a diferencia de la carbenoxolona un agente gastroprotector el cual incrementa el nivel de este gas hasta un máximo de $0.33 \pm 0.09 \mu\text{M}$.

Continuando con la exploración del mecanismo de acción se evaluó la vía H₂S/K_{ATP}/GMPc/NO; utilizando glibenclamida y diazóxido, como bloqueador y activador respectivamente, de los canales K_{ATP}, respectivamente. Se observa que no regulan la actividad del DLG, lo mismo sucede al bloquear a la enzima guanilato ciclasa con L-NAME. Sin embargo al bloquear la formación de prostaglandinas con indometacina, la actividad de DLG se pierde en su totalidad, sugiriendo que son necesarias para que el DLG ejerza su efecto.

El DLG evita la depleción del glutatión y la formación de nitritos provocado por las lesiones inducidas con etanol, sugiriendo la actividad de este metabolito como agente antioxidante.

La administración con S-Nitrosotioles exógenos protegen del daño gástrico inducido por el etanol pero no modifican el efecto gastroprotector de la DLG. Mediante el uso de la reacción de Saville, se sugiere que el DLG previene la ruptura de los S-Nitrosotioles y la oxidación del NO.

Por otro lado, se estableció por primera vez las condiciones para mantener secciones de tejido gástrico *ex vivo* por periodos prolongados, manteniendo su integridad y su organización celular. Con esta metodología, se encontró que la DLG favorece la regeneración de las secciones previamente ulceradas. Esto constituye una nueva metodología para estudiar la protección de daño gástrico *ex vivo*.

Abstract

The rhizomes of *Ligusticum porteri* Coulter & Rose have been traditionally used by the ethnic group Raramuri located in the north of Mexico in ritual ceremonies, also it has been attributed several uses for the treatments of aches like diabetes, tuberculosis, stomachaches and diarrhea, however there are no reports about its use for the treatment of peptic ulcer. This study describes the gastroprotective activity of the organic extracts of this plant and from the diligustilide, one of the active metabolites isolated from the rhizomes.

All the organic extracts obtained from the root exert gastroprotective activity on ethanol induced gastric lesions. The hexane ($74.91 \pm 20.30 \text{ mm}^2$) and CH_2Cl_2 ($54.01 \pm 11.94 \text{ mm}^2$) extracts were the most effective at the dose of 30 mg/Kg over the AcOEt ($130.4 \pm 36.14 \text{ mm}^2$) and MeOH ($166.5 \pm 34.4 \text{ mm}^2$) extracts.

The chemical analysis of the hexane extract allowed the isolation of the metabolite diligustilide, this metabolite possess gastroprotective activity ($67.64 \pm 11.88 \text{ mm}^2$) at the dose of 10 mg/Kg, suggesting is one of the responsible for the activity of the plant.

In order to explore the action mechanism of DLG we evaluated the hydrogen sulfide (H_2S) and nitric oxide (NO) pathways; the alkylation of endogenous non-protein-SH groups with N-ethylmaleimide completely abolish the gastroprotective effect of DLG suggesting the presence of this agents is needed to exert its activity; the biosynthesis of H_2S is made by two enzymes CSE and CBE, blockage with DL-propargylglycine (PAG) and hydroxylamine (HA), respectively, do not modify this effect, the exogenous administration of H_2S by Na_2S regulates in a dose - response manner the activity of the metabolite.

To corroborate if H_2S has a direct participation over the action mechanism of DLG, here we proposed a new method to detect low concentrations in the mucosa on real

time. Using a selective electrode we determinate the total concentration of H₂S on the gastric mucosa on normal conditions ($0.23 \pm 0.02 \mu\text{M}$) and on ulcerated stomachs ($0.13 \pm 0.01 \mu\text{M}$). The administration of DLG not only prevents the decreasing of this gas but also increases the total concentration ($0.39 \pm 0.01 \mu\text{M}$). For the validation of the methodology it was used L-cysteine as a positive control ($0.51 \pm 0.04 \mu\text{M}$) and DL-propargylglycine as a negative control ($0.05 \pm 0.02 \mu\text{M}$). We used reference drugs for the treatment of gastric ulcer like omeprazole, a proton pump inhibitor, and ranitidine, an antagonist of the H₂ receptors, both compounds did not modify the production of the H₂S. On the other hand, carbenoxolone, a gastroprotective agent, increases the total concentration to a maximum of $0.33 \pm 0.09 \mu\text{M}$.

Continuing with the exploration on the action mechanism of DLG, we evaluated the pathway H₂S/K_{ATP}/GMPc/NO; using glibenclamide and diazoxide, as a blocker and activator respectively of the K_{ATP} channels, did not modifies the gastroprotective activity of DLG, as well as the blockade of guanilate cyclase with L-NAME. However the depleting of prostaglandins with indomethacin the gastroprotective activity of DLG was lost.

Also DLG prevents the depleting of GSH and the formation of nitrites produced by the lesions induced by ethanol, suggesting its capability as a scavenger.

The exogenous administration of S-nitrosothiols protects the gastric mucosae against the damage induced by ethanol, but do not modify the activity of DLG, using the Saville reaction, we established that DLG prevents the rupture of S-nitrosothiols and the oxidation of NO.

Finally, we established for the first time, the conditions to maintain *ex vivo* gastric tissue sections for extended time, maintaining its architecture and cellular organization. Using this methodology, we found that the DLG increases the regeneration of ulcerated tissue sections. This is a new methodology to study the gastric damage *ex vivo*.

Introducción

La prevalencia mundial de desórdenes gastroenterales como la gastritis y la úlcera gástrica, se ha incrementado en los últimos años y es una condición que va en aumento. Datos reportados en los Estados Unidos indican que hay aproximadamente 500,000 nuevos casos y 4 millones de pacientes recurrentes de úlcera gástrica cada año [1]. Adicionalmente el costo estimado para el tratamiento de este padecimiento oscila en los \$3,300 millones de dólares en tratamiento y \$6,200 millones de dólares en gastos hospitalarios. En México no existen datos confiables sobre la incidencia y prevalencia de la enfermedad debido a que debe confirmarse la presencia de la patología en los pacientes por lo que la estimación de costos no es posible. Sin embargo, en el 2011 la úlcera gástrica fue catalogada como la primera causa de enfermedad no transmisible con más de 1.6 millones de casos en todo el país (Información Epidemiológica de Morbilidad, Anuario 2011). Actualmente se asocia al *Helicobacter pylori* como agente etiológico de esta enfermedad en un 50-70% de los casos y la ingesta de fármacos de tipo analgésicos anti-inflamatorios no esteroideos (AINE) en un 25%. Dado que los tratamientos disponibles actualmente sólo se enfocan en inhibir o neutralizar la liberación del HCl en el jugo gástrico, ofrecen poca ventaja en aquellos pacientes que se encuentran infectados por el *H. pylori*, ya que la disminución del pH favorece la proliferación de la bacteria. Esta es una de las razones por las cuales es necesario explorar otros mecanismos de acción que no involucren la modificación de la liberación del HCl.

El presente trabajo busca aportar información fitoquímica y farmacológica que demuestre la actividad gastroprotectora de la planta *Ligusticum porteri*, tanto de los extractos orgánicos como de los metabolitos, con el fin de obtener una alternativa para el tratamiento de la úlcera gástrica e identificar el mecanismo de acción de estas moléculas para comprender mejor su actividad farmacológica.

1 Marco Teórico

1.1 Estómago

El estómago es una porción dilatada del tracto gastrointestinal que tiene tres funciones principales: el almacenamiento de la comida, mezclar los alimentos con la secreción gástrica y regular el flujo de los alimentos procesados hacia el intestino para su posterior digestión y absorción. La subdivisión anatómica del estómago consiste en tres regiones (**Figura 1**):

Fondo – con forma de domo que se proyecta en la parte superior del lado izquierdo del orificio cardiaco. Funciona como reservorio de los alimentos.

Cuerpo – se extiende a nivel del orificio cardiaco hasta la incisura angularis. El cuerpo es el sitio de inicio del peristaltismo.

Región del antro-píloro se extiende desde la incisura hasta llegar a la primera sección del duodeno, funciona como el sitio donde se mezclan los alimentos además de iniciarse el proceso de digestión.

El orificio cardiaco es la parte abdominal del esófago hasta donde inicia el estómago. Aunque no cuenta con un esfínter que divida ambas secciones, existen mecanismos fisiológicos que previenen la regurgitación gastroesofágica.

En términos de la función de la mucosa gástrica el estómago puede dividirse en dos regiones, la región **exócrina** (secreción del ácido gástrico) localizada en la mucosa del cuerpo y fondo; y la parte **endócrina** (secreción hormonal) localizada en la mucosa del antro [2].

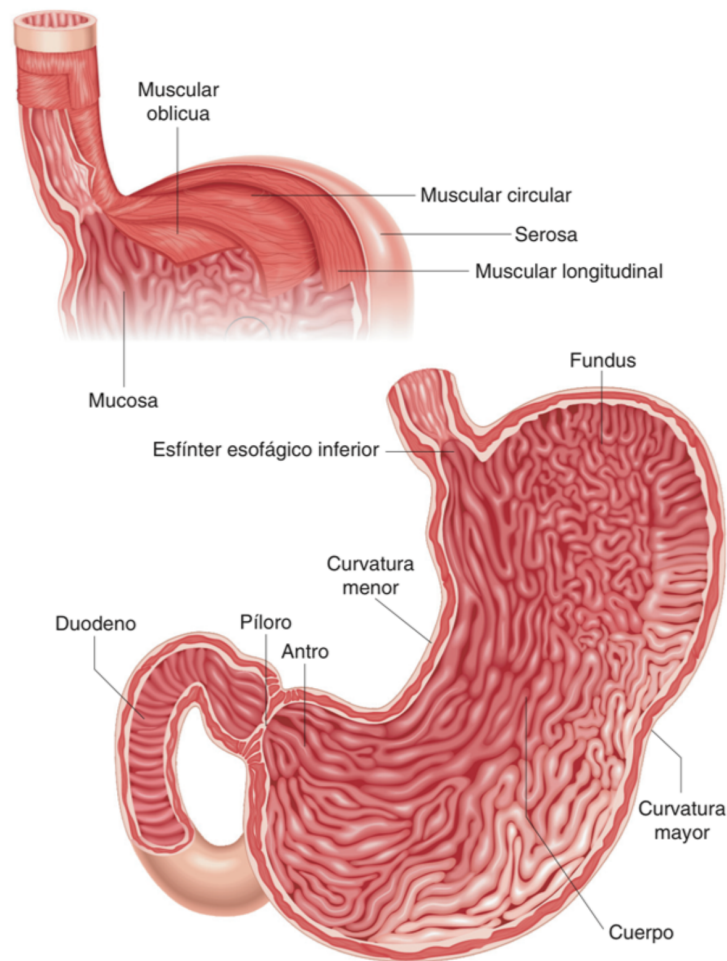


Figura 1: Anatomía del estómago – tomado de ec-europe.com

1.2 Área secretora de ácido (exócrina)

La mucosa de la porción exócrina del estómago consiste en células epiteliales columnares que se alinean en la superficie luminal. Estas células secretan moco y un fluido alcalino. En la superficie de la mucosa existen numerosas cavidades gástricas que sirven como conductos para las secreciones de las glándulas oxínticas hacia el lumen gástrico. Estas glándulas oxínticas contienen células parietales que son las secretoras del HCl y células mucosas que son las encargadas de la liberación de mucina y bicarbonato, además es el sitio de proliferación y diferenciación celular que provee a la mucosa de células de remplazo cuando estas se encuentran dañadas o son senescentes. En la base de la glándula se encuentran preferentemente las células principales que se encargan de liberar pepsinógeno.

1.3 Área secretora de hormonas (endócrina)

El área del píloro y antro, contiene células secretoras de moco similares a las presentes en las glándulas oxínticas; sin embargo esta región se caracteriza por la presencia de células endócrinas G encargadas de la liberación de gastrinas. Estas células son de forma piramidal y presentan microvellosidades en la cara apical. Los gránulos secretores se encuentran en la base de la célula y la liberación de la gastrina ocurre por fusión por exocitosis con la membrana lateral. Las células endócrinas D también se encuentran en esta región y son las encargadas de la producción de somatostatina, un regulador importante de la gastrina y de la secreción de ácido. Los principales estimulantes de la secreción del HCl son: 1) la histamina liberada por las células enterocromafines; 2) la gastrina liberada por las células G; y 3) la acetilcolina liberada por las neuronas entéricas post ganglionares. Estos agentes interactúan con receptores a través de dos vías de señalización, la vía de adenilato ciclasa en el caso de histamina y el incremento de calcio intracelular en el caso de ACh y gastrina [3]. La somatostatina se encarga de inhibir la secreción del ácido (**Figura 2**)

1.4 Histamina

La histamina es producida en las células enterocromafines por descarboxilación de L-Histidina por la enzima histidina descarboxilasa. Al ser liberada, estimula a los receptores H₂ de las células parietales, activando a la adenilato ciclasa e incrementando el nivel de AMPc. También estimula a los receptores H₃ que inhiben a la somatostatina y por lo tanto estimulan la formación de más histamina y de HCl. Tanto la gastrina como el péptido vasoactivo intestinal (VIP) y la ghrelina estimulan; mientras que la galanina, las prostaglandinas y la somatostatina inhiben la secreción de histamina[4, 5].

1.5 Gastrina

La gastrina es el principal estimulante de la secreción acida en el antro, y en mucho menor cantidad en la región proximal del intestino delgado, colon y páncreas. La gastrina se une a los receptores de colecistoquinina 2 (CCK₂), localizados en las células parecidas a las enterocromafines (ECL) y parietales. Estos receptores se encuentran acoplados a PLC favoreciendo el incremento de las concentraciones de calcio[6, 7]. La liberación de la gastrina es estimulada por la ACh, GRP, secretina, agonistas

adrenérgicos β_2 y β_3 , calcio, aminoácidos aromáticos y bebidas alcohólicas. Mientras que es inhibida por la somatostatina, galanina y adenosina [8].

1.6 Acetilcolina

Los receptores muscarínicos de las células parietales son de tipo M3 acoplados a proteínas Gq que regulan a la PLC, generando inositol trifosfato (IP3) permitiendo la liberación de calcio [9]. Las bebidas alcohólicas estimulan la secreción del HCl y estos efectos están mediados por la activación de los receptores M3 [10] y de forma indirecta regulan la producción mediante la unión sobre receptores M2 y M4, que disminuyen la actividad de las células D, bloqueando la liberación de somatostatina.

1.7 Somatostatina

La somatostatina es un zimógeno de 92 aminoácidos (AA) denominado como preprosomatostatina. Su hidrólisis forma un péptido de 14 AA y uno de 28 AA, la somatostatina-14 se encuentra preferentemente en el estómago, páncreas y neuronas entéricas. En el estómago las células productoras de somatostatina, activan a las células vecinas (parietales, ECL y principales), ya sea regulando su actividad vía procesos citoplasmáticos o bien liberando su contenido a la circulación sanguínea [11, 12]. La activación se da a través de los receptores de somatostatina de tipo 2; la gastrina, VIP, agonistas adrenérgicos β_2 y β_3 , secretina y adenosina se encargan de estimular a las células ECL; mientras que la acetilcolina y el interferón- γ se encargan de inhibir su actividad. Además cambios en el pH gástrico y regulan su liberación [13].

1.8 H^+/K^+ ATPasa

La secreción de las células parietales se incrementa por la señalización vía AMPc y Ca^{+2} intracelular, que a su vez regulan la activación de cinasas de proteínas con señalización río abajo, esto lleva a la fusión y activación de la bomba de protones H^+/K^+ ATPasa. La enzima H^+/K^+ ATPasa consta de dos subunidades, la subunidad- α y la subunidad β . La primera se encarga del intercambio electroneutral entre el K^+ extracelular y el H^+ intracelular, además de contener las secuencias responsables de su localización en la membrana apical [14]. La subunidad- β sufre glicosilaciones que protegen a la enzima de degradación o internalización hacia el citosol [15]. Cabe destacar que bajo las condiciones de pH elevado (alcalino) las vesículas que contienen a la bomba de

protones se fusionan con la membrana apical permitiendo así su translocación. Los fármacos inhibidores de la bomba de protones (IBP) como el omeprazol, constan de dos componentes, un anillo de piridina y uno de benzimidazol unidos por un grupo metilsulfóxido. Cuando estos compuestos entran a los canalículos secretores de las células parietales ($\text{pH} < 1$) los IBP sufren un re-arreglo formando una sulfenamida que reacciona con los residuos de cisteína de la subunidad- α de la bomba H^+/K^+ ATPasa evitando así que se genere el intercambio catiónico.

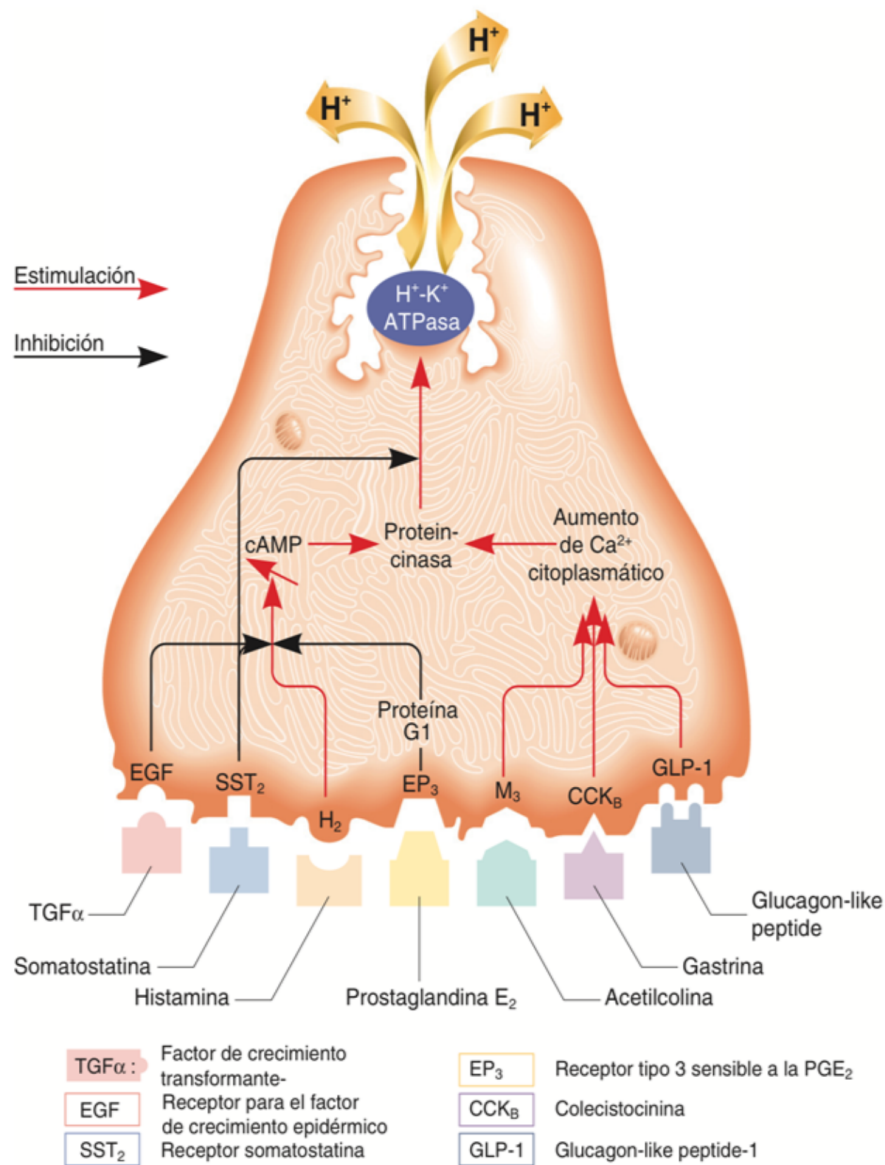


Figura 2: Factores que regulan la secreción gástrica en células principales – tomado de oc-europe.com

1.9 Mecanismos de defensa de la mucosa gástrica

La mucosa gástrica está expuesta a múltiples agentes nocivos y tóxicos, por lo tanto existen diversos mecanismos que garantizan la homeostasis del estómago o aceleran los procesos de regeneración de la mucosa, entre ellos se encuentran agentes químicos como el óxido nítrico (NO), sulfuro de hidrógeno (H₂S) y bicarbonato (HCO₃⁻) que activan vías de señalización que regulan las funciones de este órgano. También existen factores físicos como la producción de moco y la microcirculación que funcionan como la primera barrera de defensa. En la siguiente sección se mencionan los principales efectores.

1.10 Glutación (GSH)

El tripéptidoglutación reducido (GSH) es una molécula ubicua de bajo peso molecular cuyas concentraciones oscilan entre 1-10 mM a nivel celular y entre 10-30 μM a nivel plasmático. Es uno de los antioxidantes más importantes que se encarga del control del estrés oxidativo, actuando como amortiguador redox. Está presente en todas las células eucarióticas en su forma reducida (GSH) y es uno de los principales antioxidantes no enzimáticos en el cuerpo. Es parte del sistema de glutación, junto con las enzimas glutación-reductasa (GSR), glutación transferasa (GST) y glutación peroxidasa (GPX)[16]. El GSH protege a las células del daño inducido por los radicales libres, ya sea evitando la peroxidación de lípidos o evitando que los grupos sulfhidrilos sufran oxidación irreversible después del daño oxidativo [17]. La exposición del GSH a las especies reactivas de oxígeno (ROS) causa su oxidación formando disulfuro de glutación (GSSG) que puede regresar a su forma reducida mediante la enzima glutación reductasa, cuya actividad depende directamente de la disponibilidad de NADPH celular [18]. El GSSG puede interaccionar con las cisteínas presentes en las proteínas formando mezclas de compuestos sulfurados, este proceso es denominado S-glutationilación [19]. El balance en los niveles de GSH se realiza a través de la síntesis *de novo* a partir de los aminoácidos precursores (glutamato, cisteína y glicina), la reducción de GSSG por la glutación reductasa (GR) y la absorción exógena del GSH. La biosíntesis de GSH se lleva a cabo en el citosol celular a partir de dos reacciones catalizadas por glutamato-cisteína ligasa (GCL) y la GSH sintasa (GS) [20].

La enzima 3-MST cataliza la conversión del 3-mercaptopiruvato a piruvato mediante la degradación de la cisteína. Esta conversión se lleva a cabo primeramente por la cisteína aminotransferasa (CAT) a partir de la incorporación de α -cetoglutarato en la reacción.

1.11 Biosíntesis del sulfuro de hidrógeno

La producción del sulfuro de hidrógeno (H_2S) dentro del organismo está a cargo de tres enzimas; cistationina γ -liasa (CSE), cistationina β -sintetasa (CBS) y por la 3-mercaptopiruvato sulfurtransferasa (3-MST). Las primeras dos utilizan como cofactor al fosfato de 5'-piridoxal y a la L-cisteína como sustrato, mientras que la 3-MST, como su nombre lo indica utiliza, al 3-mercaptopiruvato como sustrato [21, 22]. Sin embargo existe otro método de síntesis del H_2S de tipo no enzimático, regulada por el glutatión reducido (GSH) junto con los cofactores NADPH o NADH (**Figura 3**).

La enzima CBS cataliza la formación de la cistationina a través de dos mecanismos

- 1) La unión de la homocisteína con la serina [23]
- 2) La unión de la homocisteína con la cisteína [24]

La primera fase se denomina de transulfuración y permite tanto la formación de sustratos como de productos. La segunda fase se denomina de oxidación de la cisteína y ocurre en la mitocondria permitiendo así la formación de subproductos como el α -cetoglutarato y piruvato además de la liberación de H_2S . Esta fase está regulada principalmente por la enzima 3-MST.

Parte de la regulación de la actividad de la CBS depende de la presencia del grupo Hemo en la parte amino terminal de esta enzima, esto le permite tener la función como sensor gaseoso de tipo rédox [25]. Los estados de oxidación $Fe^{3+/2+}$ dependen primordialmente de las concentraciones del cofactor NADPH [26]. En el estado de oxidación Fe^{2+} la enzima CBS puede interactuar con los otros dos gasotransmisores más importantes, NO y CO [27], permitiendo así la regulación inhibitoria sobre la CBS.

La enzima CSE se considera como un productor de H_2S a nivel periférico, dada su amplia distribución en múltiples órganos y tejidos, además de ser regulada por múltiples cofactores como es el caso de la calmodulina [28]. Las altas concentraciones

de calcio intracelular disminuyen la producción de H₂S a través de esta enzima [29]. Además, está reportado que muchos de los AINEs regulan la expresión de esta enzima pero no de CBS [30]. Estos efectos mostrados por diversos compuestos como la indometacina son atribuidos a la modificación que realizan sobre el gen de esta enzima.

El sistema CBS/CSE regula las reacciones de trans-sulfuración y desulfuración en tejidos como el intestino, el hígado y el estómago [31]. La trans-sulfuración está regulada con el ciclo de metionina vía homocisteína, un aminoácido carente de grupos amino. La enzima CBS cataliza el paso inicial y dictamina la reacción limitante de la vía, realizando la condensación entre homocisteína y serina para formar cistationina; que será metabolizada por la CSE para formar cisteína, α -cetobutirato y amoniacó [32], siendo este mecanismo el único disponible para la formación de cisteína en células de mamíferos. Además de las trans-sulfuración, el sistema CBS/CSE realiza reacciones de desulfuración que son las encargadas de la formación de H₂S, CBS cataliza reacciones de remplazo en posición β , y CSE cataliza transformaciones en los carbonos β y γ [33].

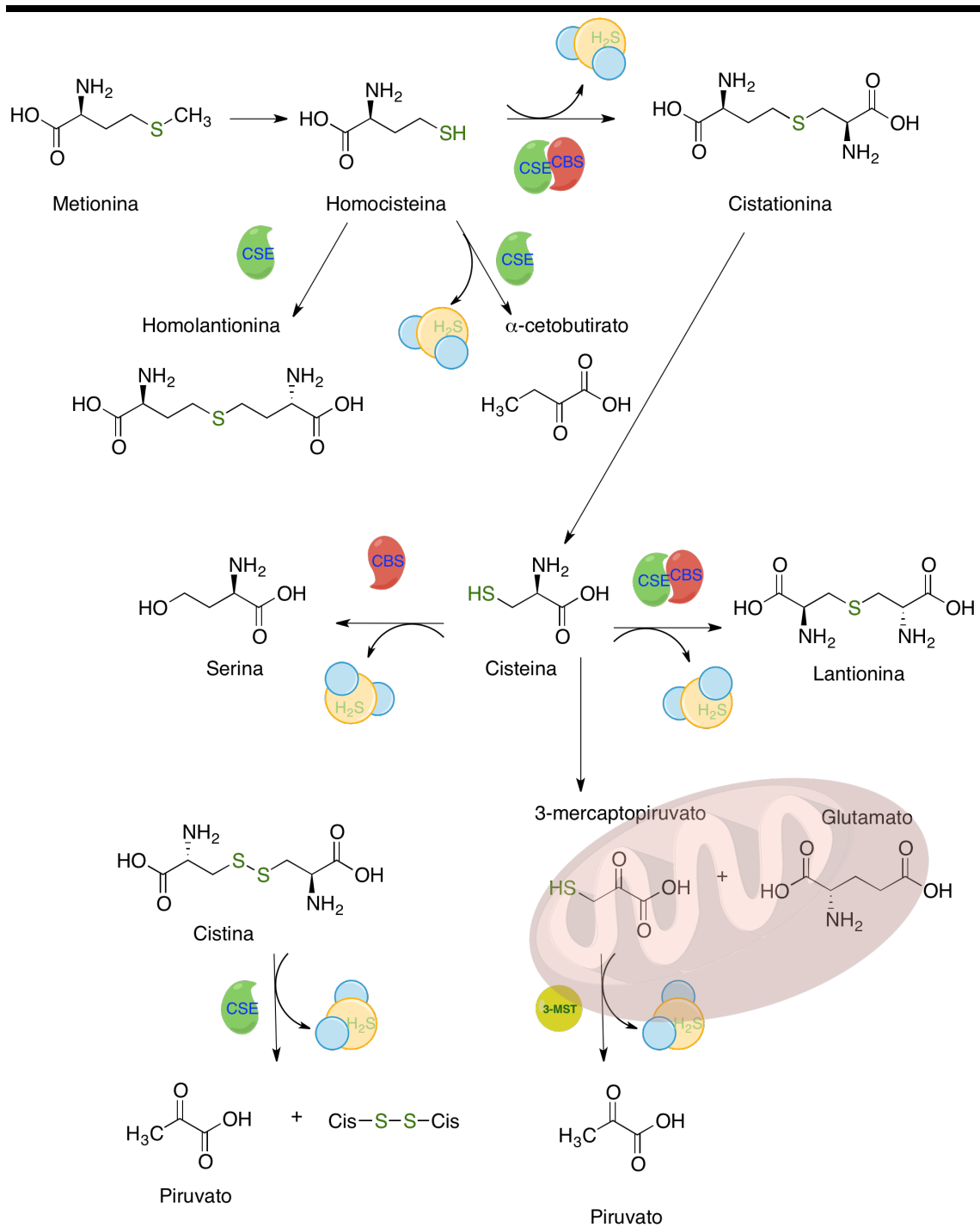
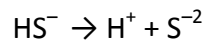


Figura 3: Biosíntesis del H₂S en la célula: la producción endógena ocurre mediante reacciones oxidativas y de trans-sulfuración a través de las enzimas CBS y CSE. La fase oxidativa de la cisteína se lleva a cabo en la mitocondria. Cistationina γ-liasa (CSE), Cistationina β-sintetasa (CBS), 3-mercaptopiruvato sulfurtransferasa (3-MST). Modificado de Vandiver, 2012 [34]

1.12 Sulfuro de Hidrógeno (H₂S)

El sulfuro de hidrógeno es un gas incoloro con olor intenso que ha sido estudiado principalmente bajo el contexto de contaminante. Sin embargo, de forma reciente se ha descrito que el H₂S posee múltiples funciones dentro del organismo.

El H₂S es un ácido diprótico que se disocia en dos pasos:



En solución acuosa, aproximadamente un tercio de este transmisor se encuentra en su forma no disociada. H₂S es permeable a la membrana plasmática debido a su solubilidad de tipo lipofílico. Es sintetizado principalmente en la circulación, sin embargo este neurotransmisor puede ser producido en diversas zonas del cerebro como la médula espinal, cerebelo, hipocampo, núcleo estriado [35] y en órganos como el corazón, hígado, bazo, pulmones y riñones [36]. El H₂S se encuentra presente en concentraciones micromolares en la sangre. Sus actividades, como las de cualquier otra molécula están dadas por la concentración en el sistema, es por esto que se han desarrollado mecanismos de metabolismo que se dan principalmente en la mitocondria por reacciones de metilación dentro del citosol. El H₂S puede ser neutralizado por la hemoglobina o por el GSH y ser excretado posteriormente por el riñón. Las concentraciones que se han detectado en el cerebro oscilan entre 50-160 μmol/L y se encarga de la regulación de múltiples funciones como la liberación de la hormona liberadora de corticotropina del hipotálamo [37], en los procesos de memoria y aprendizaje e hiperalgesia [38].

El H₂S promueve la transmisión sináptica en el hipocampo e incrementa la concentración intracelular de Ca²⁺ a través de los canales de NMDA y los receptores metabotrópicos de glutamato. En el sistema nervioso entérico se ha descrito que el H₂S regula procesos antiinflamatorios modulados por la activación de los canales K_{ATP} y regulado por la concentración de NO [39].

Dentro de los blancos moleculares más importantes que regula el H₂S, como puede observarse, es a través de la regulación directa sobre los K_{ATP}. Estos canales están

compuestos por las subunidades formadoras del poro (Kir6.x) y por las subunidades de los receptores de sulfonilureas (SUR) que permiten la conversión de señales eléctricas a metabólicas. Los procesos de inflamación, nocicepción, dolor y muerte celular, están reguladas mediante la activación de los canales K_{ATP} por modificaciones alostéricas en las subunidades SUR1 y SUR2.

Una de las funciones más destacadas y estudiadas del H_2S es su efecto sobre el sistema vascular, a través de los canales de K^+ sensibles a ATP regulan directamente el tono vascular. La apertura de estos canales hiperpolariza la membrana celular e inactiva a los canales de Ca^{+2} de tipo L, induciendo la relajación del capilar y la disminución de las concentraciones de Ca^{+2} intracelular [40] y ha generado efectos cardioprotectores sobre condiciones de arritmias previniendo el daño isquémico (I/R) [41].

Por otro lado, estudios recientes han demostrado que el H_2S contribuye a las defensas en el estómago. La mucosa gástrica expresa tanto las enzimas CBS como CSE, siendo esta última la principal encargada de la producción de H_2S en este tejido. El H_2S participa principalmente en el incremento del flujo sanguíneo y la disminución de la tensión arterial y previenen la adhesión de los leucocitos en el endotelio vascular [30].

1.13 Óxido nítrico

El óxido nítrico (NO) es uno de los principales gasotransmisores, una molécula ubicua que tiene la capacidad de difundir a través de las membranas celulares. A diferencia de otros transmisores, no puede ser ni almacenado ni recapturado. Se le han atribuido múltiples efectos en las diversas patologías del SNC como epilepsia, ansiedad, depresión mayor. Sin embargo, hoy en día se sabe que esta molécula regula funciones en todo el organismo, destacando el mantenimiento de la presión arterial en el sistema cardiovascular [42] y otras como la activación del sistema inmune [43], la regulación de la transmisión neural en el cerebro, agregación plaquetaria, memoria y aprendizaje, inflamación, citoprotección [44] y gastroprotección [45].

La síntesis de NO es catalizada por un grupo de enzimas llamadas sintasas de NO (NOS). Existen tres isoformas denominadas sintasa de NO inducible (iNOS), sintasa de NO endotelial (eNOS) y sintasa de NO neuronal (nNOS). Estas dos últimas son de tipo constitutivo, reguladas por calcio y calmodulina, y por modificaciones post-

traduccionales. El NO es producido enteramente por la conversión de L-arginina a L-citrulina catalizada por la NOS. Durante el primer paso se forma un intermediario N^ω-hidroxi-L-arginina junto con el cofactor NADPH y O₂. En el siguiente paso el NHA es oxidado a citrulina liberando una molécula de NO (**Figura 4**).

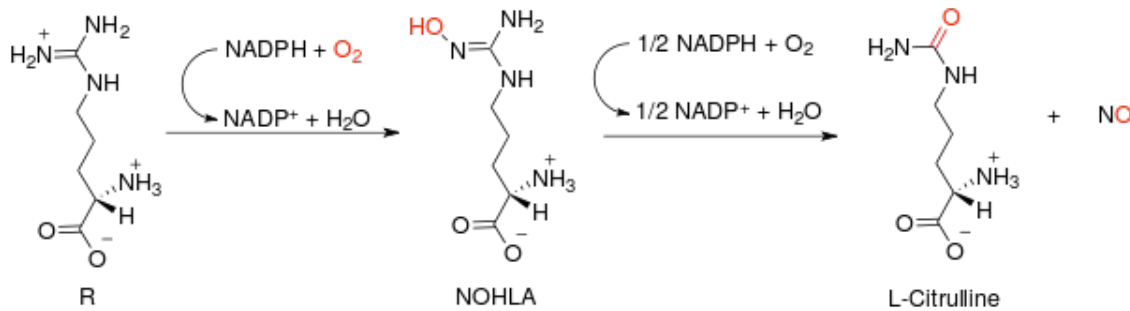


Figura 4: Biosíntesis del NO. L-arginina es oxidada al intermediario N^ω-hidroxiarginina (NOHLA), utilizando oxígeno molecular y el cofactor NADPH en presencia de tetrahydrobiopterina (BH₄). El siguiente paso es la oxidación de la NOHLA a L-citrulina bajo las mismas condiciones y la subsecuente formación del radical NO.

El óxido nítrico activa a la enzima guanilato ciclasa soluble (GC), posiblemente por la reacción con el átomo de hierro del grupo hemo. Esta enzima cataliza la conversión del trifosfato de guanosina (GTP) a trifosfato de guanosina cíclico (cGMP) cuyo principal efecto es favorecer la vasodilatación.

En el estómago, el NO modula la actividad de la bomba de protones [46] evitando el incremento del HCl en presencia de agentes nocivos como el etanol. Los agentes donadores de NO incrementan la secreción *in vivo* del moco gástrico. El mecanismo puede estar relacionado con el incremento de sintasas dependientes de calcio que estimulan la producción de GMPc a través de la activación de la enzima guanilato ciclasa [47]. Además, el NO favorece la integridad y el buen funcionamiento de la microvasculatura, a través de la adecuada irrigación en este tejido que tiene dos funciones; la primera es proveer de nutrientes a la mucosa gástrica y las células adyacentes; la segunda es la rápida y eficiente eliminación tanto de sustancias tóxicas como de las producidas por el metabolismo evitando así el contacto excesivo con el tejido. El NO también posee actividad antioxidante gracias a su capacidad para inhibir al anión superóxido (O₂⁻), previniendo así la formación de más especies pro-oxidantes.

1.14 Interacciones entre H₂S y NO

Dado que tanto el H₂S como el NO poseen efectos similares, en años recientes se ha intentado describir si existen interacciones con vías de señalización, si bien algunos donadores de NO incrementan la expresión de CSE e incrementan la producción de H₂S en las células de músculo liso [48], a su vez el H₂S activa a la sintasa de óxido nítrico endotelial (eNOS) incrementando la producción de NO[49]. Los autores mencionan que este efecto se debe a la fosforilación de esta enzima. Por otro lado, en animales que no expresan la enzima CSE, es decir KO-CSE, la concentración de cGMP es relativamente menor con respecto a los animales que sí la expresan (Wild Type), sugiriendo la participación del H₂S sobre la producción de este segundo mensajero. Sin embargo la relación directa que se ha descrito es la interacción química ya que H₂S y NO producen nitrosotioles. En el organismo el H₂S (HS⁻) libera NO a partir del acarreador intermediario nitrosoglutation (GSNO), potenciando la relajación del músculo liso [50]. Se ha reportado que en células endoteliales la formación del ácido tionitroso, el S-nitrosotiol más pequeño, se origina en estas células con la presencia de porfirinas-Fe³⁺, nitritos y H₂S, que al descomponerse forman NO y el radical HS^{*}, sin embargo aún no está clara su función[51]. Los estudios indican que los RSNO pueden funcionar como agentes de mayor estabilidad que los mensajeros individuales.

La S-nitrosación de las proteínas es considerada como uno de las modificaciones post-traduccionales más importantes, regulan la actividad de las proteínas involucradas en la contractibilidad muscular, transmisión neuronal, transporte celular y apoptosis. El análisis realizado sobre el enlace S-N revela que éste sufre de una ruptura homolítica formando NO y radicales tiilo (RSH^{*}). Estas reacciones también pueden darse junto con metales de transición como es el caso del hierro presente en la hemoglobina la cual representa una de las principales fuentes de NO. La nitrosación modifica el tiempo de respuesta así como la frecuencia de actividad de múltiples proteínas como el NF-κB, los canales de Ca²⁺ de rianodina en el corazón, factores de transcripción como el proto-oncogen perteneciente a la familia de los receptores de tirosina-cinasa c-Src, siendo la segunda modificación de las proteínas seguida por la fosforilación.

1.15 Mucosa gástrica

La mucosa gástrica contiene múltiples glándulas mucosas especializadas a lo largo del estómago. Las glándulas mucosas del cuerpo y fondo del estómago contienen células parietales que se encargan de la producción de HCl y el factor intrínseco. Las células principales liberan pepsinógeno y las células cebadas que liberan histamina. Las glándulas del antro pilórico contienen y liberan gastrina, el principal y más potente estimulador de la liberación del ácido gástrico. Las células mucosas como su nombre lo indica liberan moco rico en glicoproteínas compuesto por cuatro subunidades unidas por puentes disulfuro que le da la consistencia viscosa. La barrera mucosa y el flujo sanguíneo gástrico mantienen la integridad del estómago protegiéndolo del jugo gástrico y de los irritantes en la dieta [52]. Los niveles de GSH en la mucosa gástrica son elevados en comparación con otros tejidos (8 mM), siendo el principal antioxidante presente en la mucosa [53].

1.16 Bicarbonato y moco gástrico

La barrera de moco-bicarbonato constituye la primera línea de defensa del estómago. Esta barrera está constituida por un gel a base de moco, bicarbonato y fosfolípidos tensoactivos que recubren la superficie del órgano. Esta barrera permite la difusión del bicarbonato desde las células hasta la luz del estómago permitiendo así mantener el microambiente a un pH neutro (7.2), inactivando la actividad proteolítica de la pepsina y el daño del HCl. La consistencia del moco equivale a un 95% de agua y 5% de mucina y otras glicoproteínas [54]. Las principales proteínas que lo conforman pertenecen a la familia de las mucinas, MUC2, MUC5AC y MUC6 [55]. La secreción de moco estimula la liberación de hormonas, como la gastrina y secretina, además de prostaglandinas PGE₂ [56]. Los agentes que dañan la mucosa como los AINES y agentes necrotóxicos como el etanol, provocan una disipación del gel de moco y la capa de fosfolípidos, provocando el contacto del ácido con la monocapa de células y daño en la mucosa [57]. La secreción de HCO₃⁻ en una capa estable de moco permite un mejor control del gradiente del pH evitando así la acidificación constante de la región tanto estomacal como del duodeno. La relación de liberación del HCO₃⁻ es solo del 10% con respecto a la concentración total del HCl, por esta razón la formación del gel permite estar en

mayor contacto con el contenido gástrico además de evitar su pérdida o reabsorción a la circulación [54].

1.17 Células epiteliales

Por debajo de la capa de moco, se encuentra la monocapa de células epiteliales, su función principal es la de secreción y control en la liberación de proteínas y mediadores endógenos como el HCO_3^- , PGs, proteínas de la familia “Heat shock” factores de trefoil considerados como supresores de tumores [58].

Las células epiteliales forman una monocapa polarizada que ofrece una segunda línea de defensa, permitiendo el control de la permeabilidad de los agentes presentes en la luz del estómago y de los capilares que se encuentran por debajo de la cara basal de estas células [59]. La característica principal de la monocapa de células epiteliales es su tasa acelerada de proliferación que oscila desde los 3-7 días; sin embargo las regiones profundas donde se encuentran las células glandulares puede tardar hasta un mes en regenerarse. Esto se debe a que provienen de una sola célula troncal progenitora [60, 61] que posteriormente se convertirá en una célula epitelial, y a su vez proveerá de factores de crecimiento que estimulan tanto a las células epiteliales como a las mesenquimales [61].

Durante el daño de la mucosa, las células epiteliales vecinas activan mecanismos de migración al sitio de lesión durante los primeros minutos; finalmente la restitución de las células preservadas o de reserva se da una vez que la monocapa recupera su continuidad [62, 63]. Este proceso se regula por medio del factor de crecimiento epidermal (EGF), el factor de crecimiento transformante alfa ($\text{TGF-}\alpha$) y el factor de crecimiento similar a la insulina (ILGF), todos ellos tienen efectos sobre la cascada de señalización activada por mitógenos (MAP) [64]

1.18 Microcirculación gástrica

El suministro arterial del estómago es derivado de la arteria celiaca que proviene de la aorta. Las venas drenan en el sistema portal mientras que las linfáticas drenan a los ganglios linfáticos celiacos. Los capilares y vénulas presentes en la mucosa gástrica forman una delgada capa de células endoteliales de aproximadamente 0.5-1 μm de grosor adheridos a la membrana basal del epitelio. La microvasculatura permite el

transporte de oxígeno y nutrientes además de producir prostaglandinas y leucotrienos, factores pro-coagulantes, factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), endotelina entre otros. [65].

De la misma manera, las células endoteliales tienen la capacidad de censar cambios en la presión sanguínea, hipoxia y flujo sanguíneo. El endotelio se adapta rápidamente a cambios en el ambiente local; por ejemplo, bajo la presencia de histamina o serotonina, las células endoteliales se retraen aumentando la permeabilidad de la luz del tubo hacia la lámina propia provocando edema [66].

Cuando la mucosa gástrica se encuentra expuesta a algún agente irritante o al contacto directo con el HCl se incrementa el flujo sanguíneo. Este incremento permite la eliminación o dilución de los agentes nocivos, siendo uno de los principales mecanismos de defensa de la mucosa. Estudios han demostrado que el bloqueo de la microcirculación lleva al desarrollo de necrosis en el tejido, este proceso está regulado por la activación de los nervios sensoriales aferentes [67]. Cuando se realiza la estimulación de las terminaciones nerviosas existe la liberación de neurotransmisores como el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP) y la sustancia P [68]. El CGRP exhibe su actividad protectora de la mucosa a través de la vasodilatación de los vasos capilares activados por NO . La desensibilización de estas neuronas con concentraciones elevadas de capsaicina incrementa la susceptibilidad del tejido frente a estímulos nocivos [68].

1.19 Úlcera gástrica

La gastritis es una de las patologías más comunes del tracto digestivo, sobretodo en personas de mediana edad. Se caracteriza por una inflamación en la superficie, por lo tanto no es muy nociva. Si no es controlada y continua avanzando este padecimiento, se convierte en úlcera gástrica. Los agentes encargados de desarrollar la gastritis son principalmente la infección bacteriana o la ingesta de sustancias irritantes, ya que son las encargadas de dañar la mucosa gástrica y las uniones estrechas entre la monocapa de células. Dos de las sustancias más comunes que se encargan de dañar la mucosa son el alcohol y la aspirina u otros AINEs.

La úlcera gástrica es provocada por el desbalance entre los mecanismos de defensa y los agentes nocivos, ya sea endógenos o exógenos p.e. gastrina, HCl, pepsina, fármacos y alcohol. Cuando estas sustancias logran penetrar la mucosa gástrica entran en contacto con las secciones inferiores del estómago dañando a las células vecinas y provocando hemorragias por el daño a los capilares adyacentes. Esta condición puede ser reversible si se toman las precauciones necesarias.

1.20 Estrés oxidativo

Las especies reactivas de oxígeno (ROS), también conocidas como intermediarios reactivos de oxígeno (ROI), son productos secundarios del metabolismo celular. Concentraciones bajas o moderadas tienen impacto en múltiples funciones del organismo, como el control y erradicación de patógenos o en procesos de cicatrización. El tracto gastrointestinal es una fuente directa de formación de ROS, debido a que se encuentra en contacto directo con patógenos, materiales externos y xenobióticos que pueden provocar inflamación y subsecuentemente la activación de células del sistema inmune como macrófagos y neutrófilos polimorfonucleares [69]. Sin embargo, la sobreproducción de estas especies trae como consecuencia la disrupción de la homeostasis del organismo [70]. Los principales sistemas antioxidantes enzimáticos son la glutatión-peroxidasa, glutatión-reductasa y la superóxido dismutasa. La producción de las especies reactivas de oxígeno se favorece con la presencia de agentes nocivos como el cigarro o el alcohol, la radiación ultravioleta y el uso de fármacos anti inflamatorios no esteroideos (AINEs).

La formación de estas especies inicia con la transformación del oxígeno molecular (O_2), que se reduce y forma H_2O mediante la respiración mitocondrial, los productos secundarios que se forman se denominan en conjunto ROS, estos también pueden ser formados mediante reacciones enzimáticas, como es el caso del superóxido ($O_2^{\cdot-}$), el radical hidroxilo (OH^{\cdot}), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el ácido hipocloroso ($HOCl$) [71]. Estas moléculas se caracterizan por tener electrones de valencia no apareados de naturaleza inestable y altamente reactivos contra proteínas, lípidos, carbohidratos y ácidos nucleicos, formando reacciones irreversibles. El estado redox afecta principalmente a los principales antioxidantes disponibles en el organismo como el glutatión y la tioredoxina, disminuyendo su efectividad y agotando la concentración de

los antioxidantes. Los compuestos radicales como el óxido nítrico ($\cdot\text{NO}$), dióxido de nitrógeno ($\cdot\text{NO}_2$) y compuestos no radicales como el peroxinitrito (ONOO^\cdot) y trióxido de dinitrógeno (N_2O_3) son denominados especies reactivas de nitrógeno (RNS) las cuales generan reacciones de nitrosación implicadas en múltiples patologías [72].

1.21 Daño de la mucosa a través de fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINEs)

Los AINEs son fármacos utilizados preferentemente para el dolor no neuropático, disminuir la inflamación y evitar la pirexia corporal. Es ampliamente conocido que la administración crónica de estos fármacos produce daño en la mucosa gástrica, ocasionando erosiones superficiales (35-60 %), ulceraciones (10-25 %) y hemorragias o perforaciones del tejido (<1 %) [73]. Si bien los mecanismos por los cuales dañan la superficie de la mucosa y su caracterización microscópica se encuentran ampliamente descritos, poco se sabe sobre los mecanismos relacionados con el daño en las regiones profundas de la mucosa como la lámina propia. El daño de la mucosa gástrica causado por los AINEs puede desarrollarse mediante dos mecanismos; la inhibición de las enzimas COX-1 y COX-2. Esto disminuye la formación de PGE_2 y PGI_2 , alterando el metabolismo del ácido araquidónico y favoreciendo la formación de leucotrienos a través de la vía de la 5-lipooxigenasa.

Además los AINEs además incrementan la motilidad gástrica aumentando la compresión de los vasos sanguíneos y bloqueando la microcirculación. También incrementan las interacciones entre los neutrófilos y el endotelio y favorecen la adhesión a través de la sobreexpresión de las proteínas integrina β_2 , ICAMs y selectinas [74, 75]. Esta adhesión trae como consecuencia la sobreproducción de ROS y enzimas lisosomales que causan daño a las células de la mucosa, además de daño mitocondrial mediante mecanismos de fosforilación oxidativa, elevando la tasa de apoptosis celular [76].

Estudios han demostrado que la administración de aspirina en roedores, provoca daño en el endotelio microvascular, deposición de fibrina, agregación plaquetaria y formación de trombos. También se observa la formación de edemas e isquemia tisular, lo cual explica la formación de daño focalizado al realizar la observación macroscópica de las lesiones [77].

1.22 Tratamiento para la úlcera gástrica

La inhibición de la secreción gástrica ha sido convencionalmente la parte clave en el tratamiento de las úlceras gástricas y duodenales. Dentro de los grupos que destacan para este tratamiento se encuentran los antiácidos, los antagonistas del receptor de histamina H_2 y los inhibidores irreversibles de la bomba de protones.

Los antiácidos, como su nombre lo indica, son bases débiles de corta duración y acción rápida que se encargan de neutralizar el pH gástrico. En esta categoría se pueden destacar los compuestos que contienen hidróxidos de aluminio o magnesio, y el bicarbonato de sodio. Ofrecen un alivio rápido pero se requiere de dosis repetidas y altas para poder ofrecer un tratamiento contra el desarrollo de la úlcera.

Los antagonistas de los receptores H_2 ayudan a aliviar los síntomas y favorecen la recuperación de la mucosa gástrica. Este tipo de fármacos inhibe la interacción de la histamina con su receptor, disminuyendo el volumen y la concentración de los iones hidronio H^+ del jugo gástrico hasta en un 70%. Si bien este tipo de fármacos ofrece buenos resultados en el tratamiento de la úlcera gástrica, poco a poco han sido sustituidos por los inhibidores de la bomba de protones.

Los inhibidores de la bomba de protones son el tratamiento profiláctico para la úlcera gástrica, como su nombre lo indica bloquean de forma irreversible estructuralmente a la bomba de protones. Los inhibidores poseen un grupo benzimidazol unido con un anillo de piridina que están conectados con una cadena de metilsulfinilo. Esta característica les permite unirse de forma covalente a la ATPasa de la célula parietal a través de los residuos de cisteína [78]. Dado que actúan directamente sobre la bomba, permiten aumentar el pH y favorecer las condiciones de regeneración de la mucosa.

Sin embargo, todos estos fármacos se encargan exclusivamente del bloqueo del ácido, es por esto que en años recientes múltiples estudios se han enfocado en la búsqueda de nuevos fármacos y productos naturales con mecanismos de acción novedosos que mejoren las condiciones de la mucosa gástrica. Algunos ejemplos de metabolitos con potencial gastroprotector destacan: β -mirceno, un monoterpene aislado de *Citrus aurantium*, Este metabolito posee actividad antioxidante disminuyendo la actividad de la enzima mieloperoxidasa (MPO), actuando como antioxidante y favoreciendo la

producción de moco [79]. El ferruginol, un diterpeno aislado de la conidia *Prumnopitys andina*, tiene un mecanismo de acción basado en la liberación de la prostaglandina E2 y la inhibición de la lipoperoxidación [80]. De la misma manera el mentol, principal componente de la *Mentha sp.* ejerce su actividad a través de la activación de los canales de K_{ATP} [81]. Estos son solo algunos de los múltiples ejemplos que existen reportados en la literatura pero se puede observar que el panorama de blancos moleculares se amplía con el uso de metabolitos secundarios.

1.23 *Ligusticum porteri*

L. porteri Coult & Rose (Apiaceae, antes Umbelliferae), es una hierba perenne de 50 a 100 cm de altura. Crece en terrenos fértiles y húmedos en prados elevados y barrancos. Posee hojas lanceoladas cónicas de 15 a 30 cm de largo X 0.5 a 4 cm de ancho, posee una raíz principal cubierta con pelos reticulares fibrosos y tiene un olor característico (**Figura 5**). Las inflorescencias son blancas con 5 pétalos por flor dispuestas en forma de campana, de cima plana. Las flores son pequeñas de aproximadamente 2 a 5 mm de diámetro, y producen frutos ovalados, oblongos y acanalados de 5 a 8 mm de largo (**Figura 6**). Crece en regiones desde los 1500 m hasta los 3000 m de altura.



Figura 5: Raíz de *Ligusticum porteri* (fuente <http://www.ahpa.org/>)

L. porteri se localiza en las montañas rocosas desde el norte de Wyoming hasta Chihuahua, se puede encontrar en Colorado, Utah, Idaho, Nuevo México y Nevada.

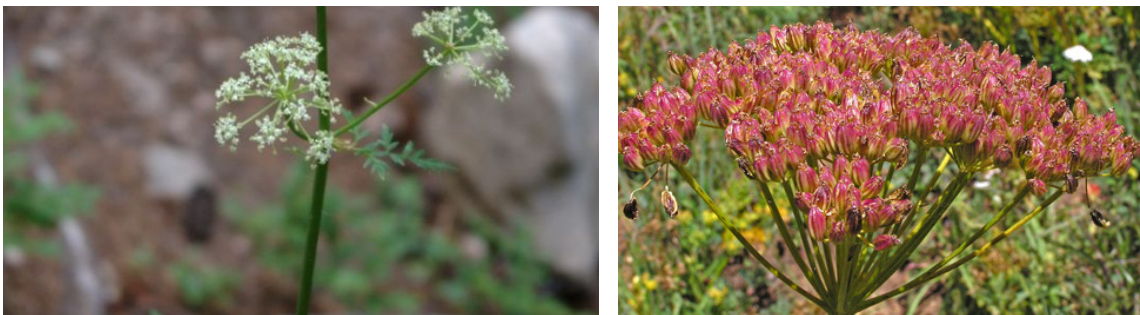


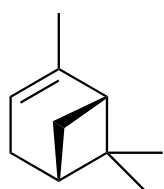
Figura 6: Flores de *Ligusticum porteri* (fuente <http://www.swcoloradowildflowers.com/>)

Es conocida en nuestro país bajo el nombre de “chuchupaste”, “chuchupate”, los Raramuri la conocen como “wasia” [82]. Otros nombres para llamar a esta planta son “osha”, “hierba del amor”, “hierba del oso” o “raíz de cochino” [83].

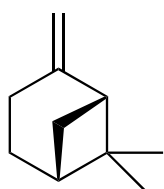
1.24 Fitoquímica

La fitoquímica de *L. porteri* se basa principalmente en estudios que se han hecho sobre la raíz de esta planta. La mayoría de los metabolitos descritos se han aislado de los extractos no polares y de polaridad media [84-86].

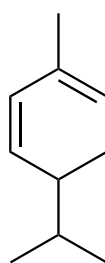
Dentro de los monoterpenos asilados la raíz de *L. porteri* se encuentran: α -pineno (**1**), β -pineno (**2**), α -felandreno (**3**), β -felandreno (**4**), *p*-cimeno (**5**), limoneno (**6**), isotimol metil éter (**7**), γ -terpineno (**8**), α -terpineno (**9**), terpinoleno (**10**), α -fenchol (**11**), trans-verbenol (**12**), mirtenol (**13**), formiato de bornilo (**14**), acetato de bornilo (**15**), tujan-2,4-(10)-dieno (**16**), terpinen-4-ol (**17**), *E*-piperitol (**18**), piperitona (**19**), timol (**20**), acetato de isobornilo (**21**), acetato de *Z*-sabinilo (**22**), acetato de α -terpinilo (**23**).



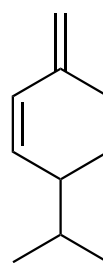
1



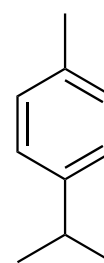
2



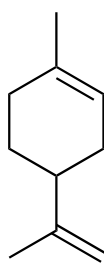
3



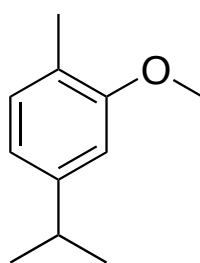
4



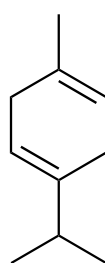
5



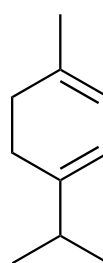
6



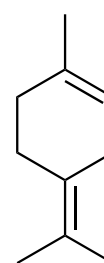
7



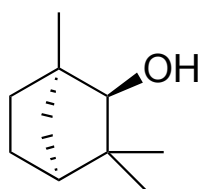
8



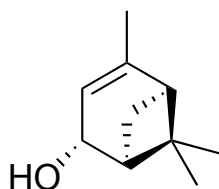
9



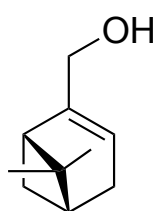
10



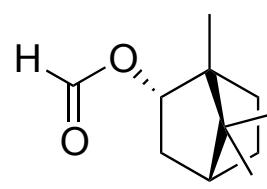
11



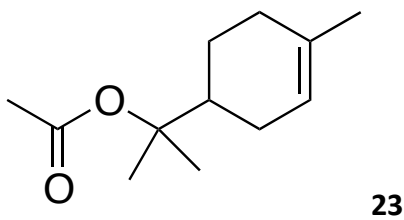
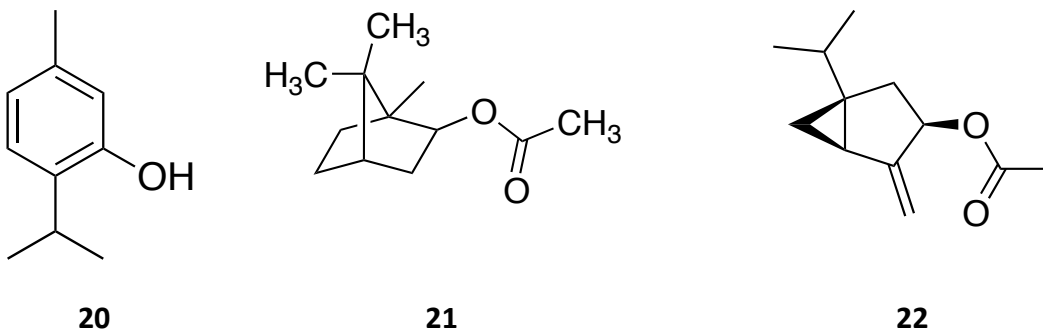
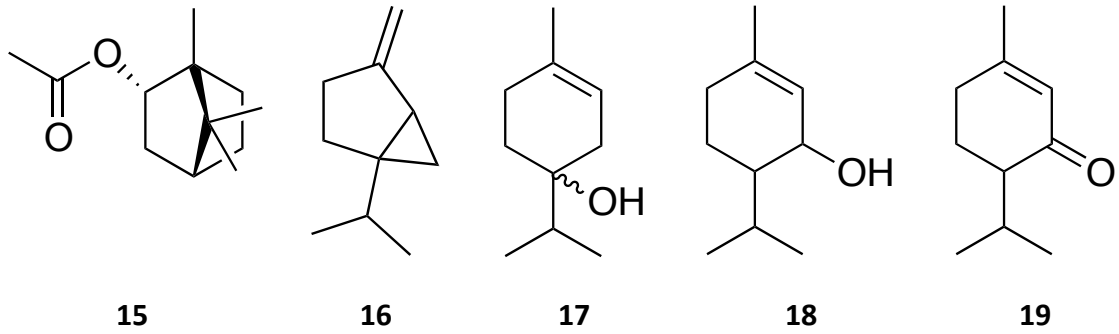
12



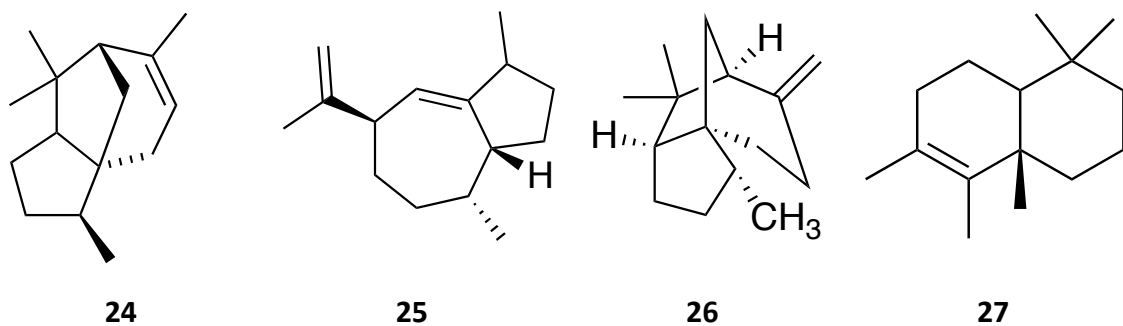
13

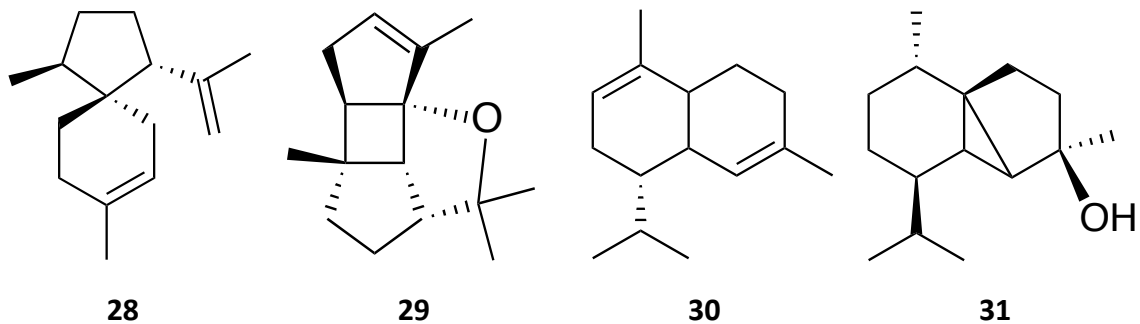


14



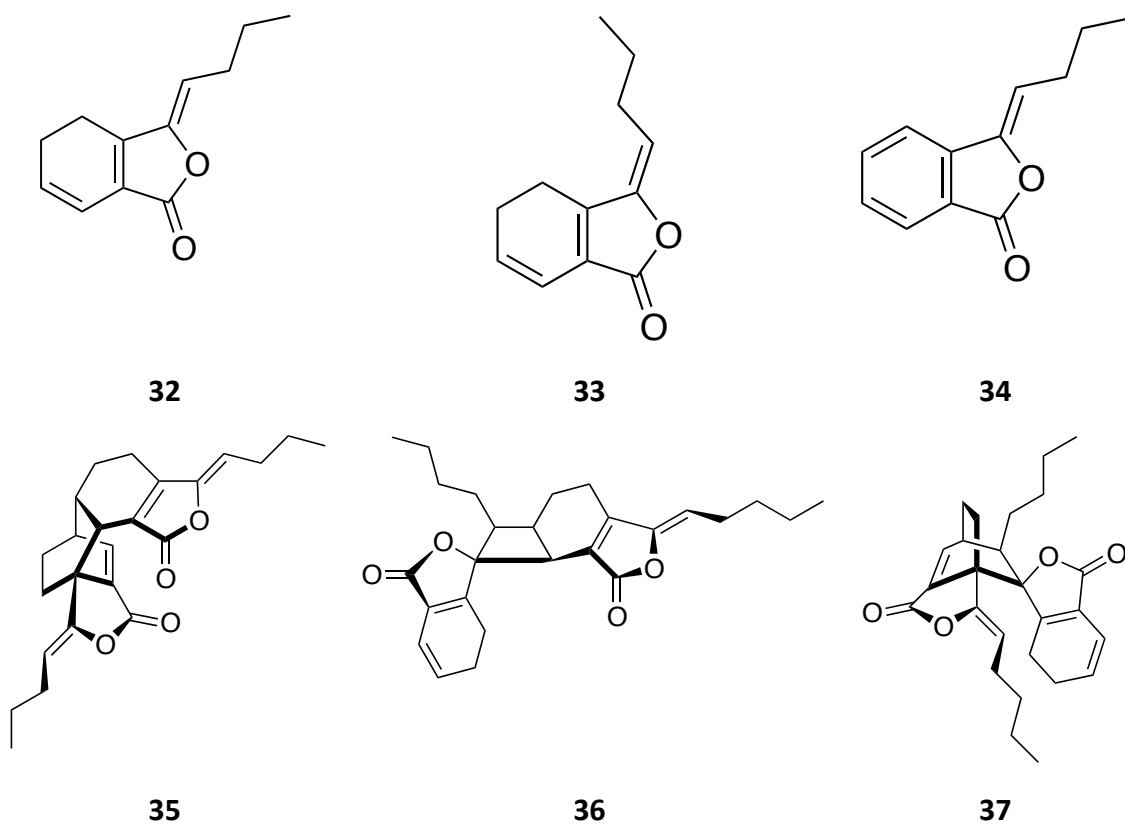
Dentro del grupo de los sesquiterpenos encontramos los siguientes metabolitos: α -epi-cedreno (**24**), γ -gurjuneno (**25**), β -cedreno (**26**), drim-8-eno (**27**), α -acoradieno, (**28**), 7-*epi*-bourban-3-en-5,11-oxido (**29**), α -amorfeno (**30**), 4-*epi*-cubebol (**31**).





Las ftálicas aisladas de *L. porteri* se incluyen:

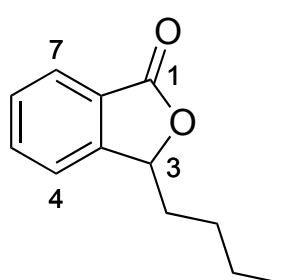
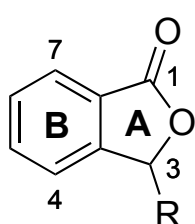
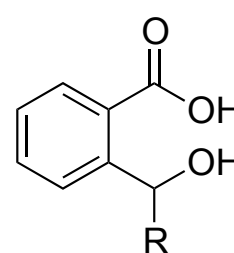
Z-ligustílido (**32**), E-ligustílido (**33**), Z-butilenftálica (**34**), diligustílido (**35**), riligustílido (**36**), tokinólido B (**37**).



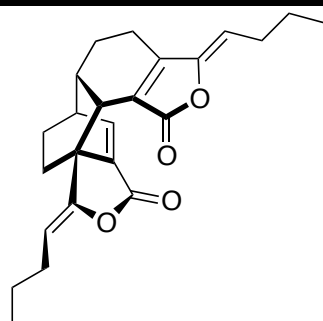
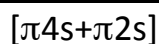
Las ftálicas son metabolitos secundarios que se encuentran preferentemente en la familia *Apiaceae* [87]. Las especies de *Ligusticum* han sido utilizadas ampliamente debido a sus aplicaciones etnobotánicas, para el tratamiento de la diarrea, diabetes, neumonía, dolores estomacales etc.[88, 89]

Se han aislado 71 ftálicas y derivados hidrogenados, así como dímeros a partir de 40 especies de plantas que pertenecen a la familia de las *Apiaceas*. Las especies que destacan son *Angelica sinensis* (Oliv.) (28 ftálicas), *Ligusticum chuanxiong* (40 ftálicas), *Ligusticum officinale* (20 ftálicas) y *Ligusticum wallichii* Franch. (27 ftálicas) [90].

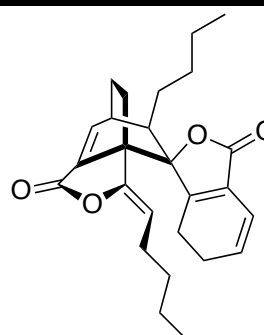
Las ftálicas también conocidas como 3H-isobenzofuran-1-onas (**38**) se caracterizan por presentar un núcleo bicíclico constituido por la fusión entre el benceno (anillo B) y una γ -lactona (anillo A)(**39**). Se ha postulado que se originan a partir de la reacción intramolecular del correspondiente ácido γ -hidroxicarboxílico (**40**).

**38****39****40**

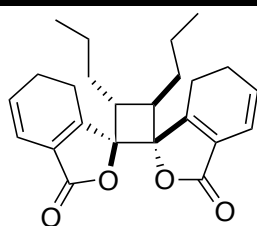
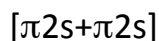
El Z-ligustílido (**32**) es considerado como el precursor biogénico de diversos dímeros aislados, a partir de reacciones pericíclicas de tipo $[\pi 4s+\pi 2s]$ para dar origen a compuestos como el diligustílido (**35**) y el tokinólido B (**37**), o también reacciones del tipo $[\pi 2s+\pi 2s]$ para dar origen compuestos como riligustílido (**36**) y el angelicólido (**41**).



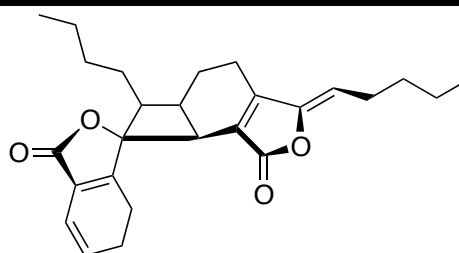
Diligustílido



Tokinólido B



Angelicólido



Riligustílido

41

1.25 Biosíntesis de las ftálicas.

Poco se conoce acerca de la biosíntesis de las ftálicas. En los años 60's el grupo de Mitsuhashi mediante el uso de marcaje isotópico postuló que la biosíntesis de estos compuestos se debía a través de la unión cabeza cola entre las unidades de acetato (**Figura 7a**) [91]. Sin embargo una de las rutas biosintéticas que ha sido elucidada y descrita es la biogénesis del ácido micofenólico a través de la ruta de los policétidos (**Figura 7b**) [92].

La síntesis de los policétidos está catalizada por un grupo de enzimas denominadas policétido sintasas. Para la formación de la parte del ftálica se parte de una un tetracétido metilado no reducido; posteriormente se cataliza una reacción intramolecular del tetracétido por el mismo dominio de la enzima MpaC' para formar el ácido 5-metilorselinico (5-MOA). La enzima MpaDE' hidroxila el metilo en posición β al carboxilo, para originar el ácido 4,6-dihidroxi-2-(hidroximetil)-3-metilbenzónico (DHMB). Posteriormente se forma lactona por el dominio de hidrolasa de la misma enzima, para dar origen al intermediario de tipo ftálica 5,7-dihidroxi-4-metilftálica (DHMP). La enzima de tipo preniltransferasa permite la adición del grupo farnesilo en el anillo de benceno de la ftálica (FDHMP), seguido de la ruptura oxidativa de la cadena de farnesilo produciendo el ácido dimetil micofenólico (DMMPA) [93]. Finalmente la O-metilación a partir de la enzima S-adenosil-L-metionina (SAM) forma el ácido micofenólico (MPA).

1.26 Bioactividad de las ftálicas

Si bien existe mucha diversidad entre los tipos de ftálicas y se encuentran ampliamente distribuidas, los estudios reportados se enfocan principalmente en los monómeros Z-ligustílico (**32**) y Z-3-butilenftálica (**34**).

Existen reportes que le atribuyen efectos sobre el sistema nervioso central. La Z-3-butilenftálica revierte los efectos de escopolamina en el modelo de cámara de evitación pasiva sobre la memoria a corto plazo [94]. De igual manera, reduce el tiempo de hipnosis ocasionado por el pentobarbital sugiriendo su participación sobre los receptores GABA_A [95]. De forma interesante si se pierde la doble ligadura de la cadena lateral en esta molécula, los efectos antes mencionados se inhiben, provocando los efectos contrarios [96].

La Z-3-butilenftálica tiene efectos sobre la vascularización, previniendo la formación de trombos y evitando la isquemia en cerebro, incrementando el flujo sanguíneo y el diámetro de las arteriolas [97], además de disminuir la expresión del mRNA que codifica para las proteínas HSP 70 y c-Fos, relacionadas con procesos inflamatorios, disminuyendo la tasa de muerte neuronal [98].

La administración de Z-ligustílico (**32**) protege contra la isquemia en el cerebro minimizando el estrés oxidativo y la disminución de apoptosis. Estos efectos se observan al disminuir el nivel de MDA e incrementando la actividad de la enzima antioxidante glutatión peroxidasa (GSH-Px) y la enzima superóxido dismutasa, además de sobreexpresar el gen de Bcl-2 y atenuar la expresión de Bax y caspasa 3 [99].

El Z-ligustílico (**32**) previene la producción de ROS y disminuye la expresión de la MAPK, NF-κB [100] e inhibe la expresión del TNF-α. Todos estos indicios revelan que las ftálicas poseen actividad preferentemente sobre el sistema inmune, previniendo el estrés oxidativo y regulando la irrigación sanguínea en la vascularización.

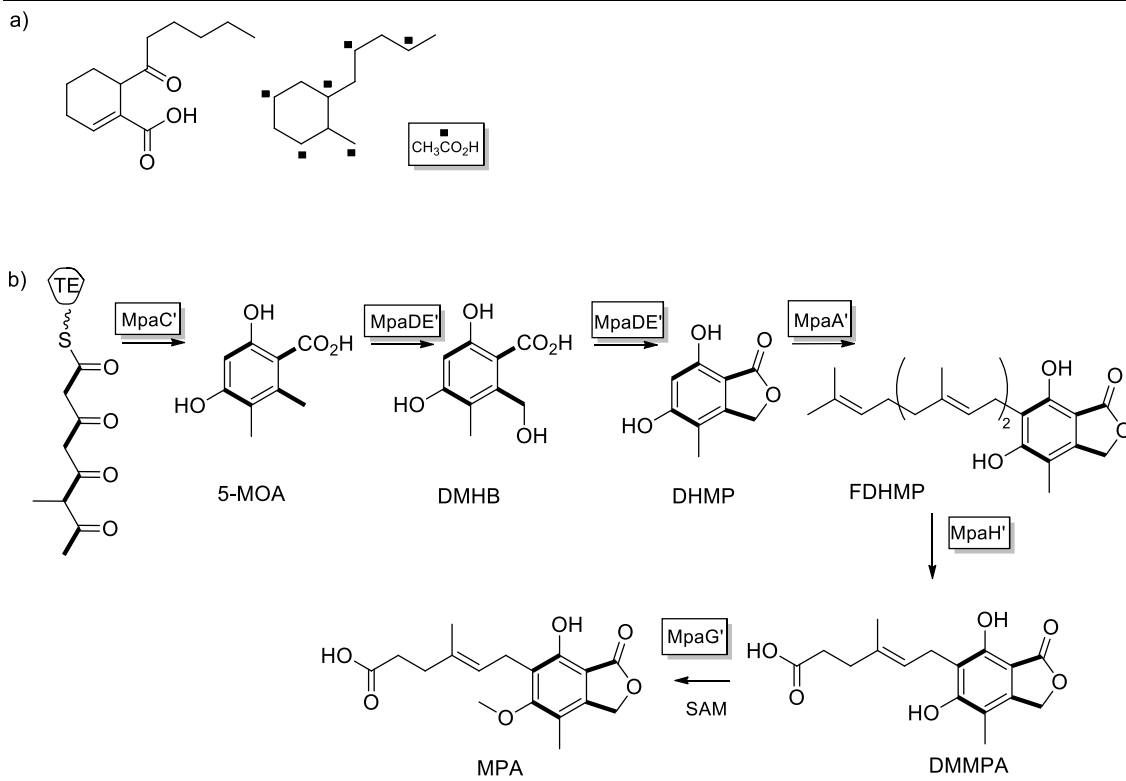


Figura 7: Mecanismo de biosíntesis de las ftálicas.

2 Hipótesis

Los distintos extractos (metanol, diclorometano, acetato de etilo y hexano) obtenidos de la raíz de *Ligusticum porteri* contendrán principios activos, los cuales presentarán un efecto gastroprotector, sobre el daño gástrico inducido por etanol, a través del incremento de la síntesis de prostaglandinas, grupos sulfhidrilos no proteicos, óxido nítrico y sulfuro de hidrógeno.

3 Objetivo General

Identificar y aislar los principales metabolitos secundarios bioactivos de la raíz de *Ligusticum porteri* (Apiaceae) con actividad gastroprotectora, así como elucidar su mecanismo de acción en el modelo de daño gástrico inducido con etanol en rata wistar.

Objetivos Particulares

1. Realizar el estudio biodirigido para identificar al o a los componentes activos gastroprotectores de la raíz de *L. porteri* en el modelo de daño gástrico inducido por etanol.
 2. Evaluar la participación de la vía del óxido nítrico (NO), AMPc, canales de potasio dependientes de ATP (K_{ATP}) en la actividad gastroprotectora de los metabolitos activos de *L. porteri*.
 3. Evaluar la participación de grupos sufihidrilos endógenos en la actividad gastroprotectora de los metabolitos activos de *L. porteri*.
 4. Desarrollar y validar una metodología para la cuantificación de H_2S *in vivo* y en tiempo real en la mucosa gástrica.
 5. Evaluar la participación del H_2S en la actividad gastroprotectora de los metabolitos de *L. porteri*.
 6. Cuantificar a los mediadores endógenos NO, glutatión GSH y nitrosotioles en la mucosa gástrica y la regulación que ejercen los metabolitos activos de *L. porteri*.
 7. Evaluar el efecto restaurador de la mucosa gástrica, de los metabolitos activos de *L. porteri in vitro* mediante un cultivo tridimensional de tejido lesionado.
-

4 Parte experimental

4.1 Material vegetal

Se utilizó 0.5 kg de la raíz de *L. porteri* previamente colectado en Basigochi (Chihuahua, México) en octubre del 2003. Un espécimen fue depositado en el Herbario Nacional (MEXU) con número de voucher (31733).

Además se consiguieron 4.7 kg de la raíz a partir de fuentes comerciales.

4.2 Preparación de los extractos orgánicos de *L. porteri*.

Para la preparación de los diferentes extractos orgánicos se emplearon 4.7 kg de la raíz de *L. porteri*, la cual se extrajo exhaustivamente mediante un proceso de maceración, empleando como disolventes, en orden creciente de polaridad hexano, diclorometano, acetato de etilo y metanol, realizándose en cada caso tres extracciones con 12 L de disolvente dejando entre cada extracción un periodo de 3 días a temperatura ambiente (22-25 °C). El extracto obtenido se filtró por gravedad y el disolvente se eliminó utilizando destilación a presión reducida obteniéndose los siguientes extractos. 185.7 g del extracto de hexano un líquido viscoso de olor característico color amarillo ámbar; 326.2 g del extracto de diclorometano líquido viscoso color café rojizo, 50 g del extracto de acetato de etilo color rojizo y 93 g del extracto de metanol color verde oscuro. Los extractos se mantuvieron sellados, protegidos de la luz y a temperatura de 4°C hasta el momento de realizar el experimento.

4.3 Inducción del daño gástrico

El desarrollo de la úlcera gástrica se llevó a cabo mediante el método de Robert [101]. Los animales fueron privados de alimento de 8 – 12 h antes de administrarles 1 mL de etanol absoluto por vía oral; el daño gástrico se observa 2 h después.

Posteriormente, los animales se sacrificaron en cámara de CO₂. Se expuso la cavidad abdominal y se procedió a la disección del estómago, cortando la sección del esófago y duodeno. El tejido se fijó mediante la inyección de 5 mL de paraformaldehído 4%. En un intervalo de 5 – 10 minutos, después se abrió el estómago realizando un corte a través de la curvatura mayor del estómago. Las imágenes del estómago se obtuvieron

con un microscopio (Celestron 44302-A), y el área de las lesiones se midió mediante el programa Image J (Rasband, W.S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://imagej.nih.gov/ij/>, 1997-2014).

4.4 Evaluación farmacológica de los extractos orgánicos de *L. Porteri*.

Los extractos orgánicos hexano, diclorometano, acetato de etilo y metanol se administraron a una sola dosis (30 mg/kg), suspendidos en solución salina isotónica 0.9 % (SSI) y como agente emulsificante Tween 80 (0.05%). Los extractos fueron administrados vía intragástrica a animales privados del alimento 10 h antes. Treinta minutos después se realizó la inducción de la úlcera gástrica como se describió anteriormente. Los animales fueron sacrificados y se disectó el estómago para medir el área de daño (mm²).

4.5 Construcción de curvas dosis – respuesta

Para la construcción de la curva dosis – respuesta de los extractos de hexano y diclorometano, se utilizaron 5 dosis (3, 10, 30, 56 y 100 mg/Kg). Los animales fueron divididos en grupos ($n = 6$). El grupo control recibió SSI – tween 80 (0.05%). También se realizó la evaluación del metabolito diligustílico (DLG) (10, 100, 300 mg/Kg). La evaluación del efecto gastroprotector se realizó como se describió antes. Las dosis fueron seleccionadas en forma logarítmica y para el cálculo de la DE₅₀ se utilizó la ecuación de Hill.

4.6 Evaluación del mecanismo de acción gastroprotector del diligustílico

4.6.1 Evaluación de la vía del AMPc

Para determinar si el DLG actúa sobre la secreción gástrica, se estudió la vía del AMPc, mediante la siguiente metodología. Se administró a animales con 10 h de ayuno previo; forskolina (84 µg/Kg p.o.) disuelta en SSI [102] como activador de la enzima adenilato ciclasa. Treinta minutos después, se administró DLG (10 mg/Kg p.o.), pasados otros 30 minutos se realizó la inducción de la úlcera gástrica con EtOH. Por otro lado, se administró dideoxiadenosina (100 µg/Kg p.o.) disuelta en SSI [103] como inhibidor de la enzima adenilato ciclasa. Posteriormente, 15 minutos después se administró DLG (10 mg/Kg p.o.) y se indujo la formación de la úlcera y se realizó la disección y análisis del daño gástrico como se mencionó previamente.

4.6.2 Evaluación de la vía del óxido nítrico

Para evaluar si el óxido nítrico participa en el mecanismo de acción del DLG, se continuó con la siguiente metodología. Se dividieron los animales en grupos ($n = 6$) privados de alimento por 10 h previo a la administración de glibenclamida (1 mg/Kg, disuelto en NaOH 0.05 M i.p.) un bloqueador de los canales K_{ATP} . El segundo grupo recibió una dosis única de diazóxido (3 mg/Kg, disuelto en NaOH 0.05 M i.p.), un activador de estos canales, un tercer grupo recibió una dosis del éster metílico de NG-nitro-L-arginina (L-NAME) (70 mg/Kg, disuelto en SSI, i.p.), un inhibidor no selectivo de la enzima óxido nítrico sintasa (NOS). Treinta minutos después de la pre-administración de cada fármaco se dio una dosis única de DLG (10 mg/Kg, p.o.), se indujo la úlcera gástrica, se disectó el estómago y se midió el área de daño como se describió previamente. Finalmente, un cuarto grupo fue pre-administrado con una dosis de nitroprusiato de sodio (SNP) (3 mg/Kg, disuelto en SSI, p.o.) un donador de óxido nítrico. Diez minutos después se administró una dosis única de DLG (10 mg/Kg, p.o.), se indujo la úlcera gástrica, se disectó el estómago y se midió el área de daño.

4.6.3 Evaluación de la vía del sulfuro de hidrógeno

Para evaluar si la participación de la vía del sulfuro de hidrógeno regula el mecanismo de acción del DLG se llevó a cabo la siguiente metodología. Se dividieron los animales en grupos ($n = 6$) privados de alimento por 10 h. El primer grupo de esta serie de experimentos recibió una dosis de N-etilmaleimida (10 mg/Kg, disuelto en SSI, s.c.) un agente alquilante de los grupos sulfhidrilos libres. Además se realizó la curva dosis – respuesta de dos inhibidores enzimáticos DL-propargilglicina, un inhibidor de la enzima cistationina γ -liasa (CSE) (12.5, 25 y 50 mg/Kg disuelto en SSI, i.p.), e hidroxilamina, un inhibidor de la enzima cistationina β -sintetasa (CBS) (1, 3, 10 y 75 mg/Kg disuelto en SSI, i.p.). Treinta minutos después de la pre-administración de cada fármaco se dio una dosis única de DLG (10 mg/Kg, p.o.), se indujo la úlcera gástrica, se disectó el estómago y se midió el área de daño como se describió previamente.

Finalmente se realizó una curva dosis – respuesta utilizando NaHS como fuente exógena de sulfuro de hidrógeno (H_2S) (15, 50 y 150 μ mol disuelto en SSI en el momento del experimento, p.o.). Diez minutos después de la pre-administración del

NaHS se dio una dosis única de DLG (10 mg/Kg, p.o.), se indujo la úlcera gástrica, se disectó el estómago y se midió el área de daño.

4.6.4 Cuantificación de glutatión y nitritos

La cuantificación de glutatión en tejido homogenado se realizó mediante el método de Ellman's [104]. Se preparó una solución de DTNB (0.01 M) disuelto en metanol absoluto, solución amortiguadora de Tris 0.2 M ajustado a pH 8.2 y disuelto en una solución de EDTA- Na_2 (0.02 M). Posteriormente el pH se ajustó con HCl 1 N. La solución amortiguadora de Tris 0.4 M a pH 8.9 se preparó de forma similar.

Se realizó la curva de calibración para los grupos $-\text{SH}$, a partir de una solución stock de glutatión 2×10^{-3} M. Las concentraciones de glutatión reducido empleadas para la realización de la curva de calibración fueron, 10×10^{-6} a 1×10^{-6} M disueltas en EDTA (0.02 M). Posteriormente se adicionó 0.1 mL de la solución DTNB y 3 minutos después se hizo la lectura a 415 nm.

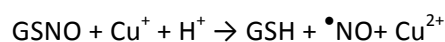
Para la cuantificación de los grupos $-\text{SH}$ libres se tomó 100 mg de tejido estomacal, disueltos en 1 mL de EDTA (0.02 M), se homogenó el tejido y tomó 400 μL de del sobrenadante. Después se mezcló con 320 μL de H_2O destilada y 80 μL de ácido tricloroacético (50% p/v). Posteriormente se centrifugó 15 minutos a 3000 g, se tomó 400 μL del sobrenadante y mezcló con 800 μL de solución amortiguadora Tris (0.4 M, pH 8.9) y 20 μL de DTNB (0.01 M). Las muestras se leyeron a 415 nm 3 minutos después.

Para la cuantificación de los nitritos se realizó una curva de calibración. Se preparó 1 mL de una solución 100 μM de nitrito de sodio, en solución amortiguadora de fosfatos (50 μM , pH 7.8). Se dispensó 50 μL de la solución amortiguadora de fosfatos en 9 pozos, en el primer pozo se agregó 100 μL de la solución de nitritos 100 μM . Después se tomó 50 μL del primer pozo y a continuación se realizó la dilución 1:2 en el siguiente pozo y así de manera consecutiva hasta llegar al último. Para obtener las concentraciones siguientes: 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.13 y 1.56 μM . Permitir que la solución de cloruro de N-1-naftiletildiamina (NED) y sulfanilamida se equilibren a temperatura ambiente (15-30 minutos). Posteriormente se adicionó 50 μL de la sulfanilamida a cada uno de los pozos que contienen las diferentes series de la curva

de nitritos, se dejó incubando 5 minutos protegidos de la luz. Finalmente se adicionó 50 μL de la solución de NED, se protegió de la luz e incubó durante 10 minutos. Transcurrido ese tiempo las muestras se leyeron a 520-550 nm.

4.6.5 Formación de los nitrosotioles

Para la formación de los nitrosotioles se realizó mediante la reacción entre nitroprusiato de sodio (SNP) e hidrogeno sulfuro de sodio (NaHS) en concentraciones equimolares a temperatura ambiente $\approx 25^\circ \text{C}$ [105]. Se utilizó cloruro de cobre (II) CuCl_2 para determinar la formación de nitrosotioles de acuerdo a la siguiente reacción.



Para la cuantificación de estas especies se utilizó una modificación de la reacción de Griess, usando el método de Saville [106] con una modificación, se sustituyó el HgCl_2 por CuCl_2 para evitar la toxicidad sobre el tejido [107]. La cuantificación de nitritos se realizó como se describió previamente.

4.7 Determinación de la concentración de H_2S *in vivo* en tiempo real

4.7.1 Procedimiento quirúrgico

Los animales se anestesiaron con pentobarbital sódico (62 mg/Kg i.p.). Después de la anestesia se realizó una incisión debajo del diafragma de aproximadamente 1 cm en la región epigástrica para exponer el estómago. Posteriormente se realizó una inserción intra-duodenal del electrodo específico ($\text{Ag}/\text{Ag}_2\text{S}$) para la cuantificación de H_2S (*ArrowH2STM*). Se aseguró que el electrodo se encontrara en el lumen del estómago para obtener una medición correcta. Con el electrodo dentro, se registró la lectura de milivolts (mV) cada 5 minutos durante 25 minutos. Consecuentemente se administraron con una jeringa de insulina 0.2 mL de etanol absoluto (>99.5%) directamente en el estómago, y se continuó tomando las lecturas cada 5 minutos durante otros 30 minutos adicionales. Durante el experimento se mantuvo al animal caliente, la herida fue cubierta con algodón y se limpió la sangre de la misma. Una vez finalizado el experimento el animal fue sacrificado por dislocación cervical.

4.7.2 Curva de calibración

Se preparó buffer antioxidante que contiene salicilato de sodio 25 g, ácido ascórbico 6.5 g e hidróxido de sodio 8.5 g en 100 mL de agua destilada. Se prepararon soluciones

desde 1 ppm hasta 30 ppm (30, 150, 300, 450, 600, 750 y 900 μM) de NaHS disueltas en el buffer. La curva de calibración se construyó de acuerdo con la relación entre los milivolts y la concentración.

4.7.3 Equipos

La concentración total de sulfuro de hidrógeno se determinó usando un micro electrodo específico LS-146AGSCM (Ag/Ag₂S) (Lazar Research Laboratories, Inc., Los Angeles, CA), la señal eléctrica fue registrada con un medidor de milivolts/pH (623N ion analyzer), conectado a una computadora. Los datos fueron adquiridos con el software ArrowION™, ION plotter (1.4.6).

4.8 Sistema 3D de cultivo primario estomacal

La evaluación del efecto de la restauración gástrica de los metabolitos aislados de *L. porteri* se llevó a cabo mediante la aplicación de un cultivo 3D, de los fragmentos del tejido estomacal lesionado [108].

Las secciones del tejido se mantuvieron en un sistema de gel de colágeno, la preparación de este gel fue la siguiente: se utilizó colágeno tipo I-A (Millipore 08-115), medio de cultivo Ham's F-12 y buffer de reconstrucción (2.2 g de NaHCO₃ en 100 mL de 0.05 N NaOH y 200 mM HEPES) y se mezcló en una proporción de 8:1:1 v/v. Se tomó 1.2 mL del gel de colágeno y se colocó en un pozo de 30 mm de diámetro interno (Caja de cultivo Millicell PICM03050, Millicell-CM, Millipore) y se incubó 30 minutos a 37° C. En el compartimento exterior de la caja de cultivo, se colocaron 5 mL con medio Ham's F-12 con 25% de suero fetal bovino y 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de gentamicina

Una vez que se desarrolló la úlcera gástrica en los animales a partir de la administración de etanol absoluto vía intragástrica, se fragmentó el tejido y lavó 3 veces con buffer de fosfatos estéril. Los fragmentos se colocaron sobre el gel de colágeno previamente preparado y se incubaron bajo una atmosfera de O₂:CO₂ (95:5). El medio de cultivo del compartimento exterior se sustituyó cada 7 días.

Cuarenta y ocho horas después de que el tejido se estabilizó, se adicionó al medio de cultivo el DLG (10 mM disuelto en SSI y con DMSO < 0.05%) durante 7 días.

4.9 Cortes histológicos

Una vez cumplidos 7 días de que el tejido estomacal se mantuvo en condiciones de cultivo, el tejido fue retirado del medio de cultivo y se fijó sumergiéndolo en una solución de paraformaldehído 5% por 15 minutos, posteriormente a los cuales se inició el proceso de deshidratación el cual consistió en la siguiente secuencia:

- + Etanol 50% – 30 minutos
- + Etanol 80% – 30 minutos
- + Etanol 96% – 30 minutos
- + Etanol absoluto – 30 minutos
- + Etanol absoluto: xilol 1:1 – 15 minutos
- + Xilol – 10 minutos
- + Xilol : parafina (1:1) – 30 minutos
- + Parafina a 56° toda la noche

Una vez formado el bloque de parafina se realizaron los cortes histológicos con un grosor de 10 micras usando un micrótopo vertical (Lupetec MRP).

4.10 Tinción Hematoxilina y Eosina

Se preparó la hematoxilina de acuerdo al método de Gill, el cual consiste en adicionar para 1 L: hematoxilina (6 g), yodato de sodio (0.6 g), sulfato de aluminio (52.8 g), agua destilada (690 mL), etilenglicol (250 mL) y ácido acético glacial (60 mL). Una vez preparada la solución, se filtró por gravedad con un papel filtro y se almacenó protegida de la oscuridad.

Para realizar la tinción las secciones previamente desparafinizadas se siguieron los siguientes pasos

1. Sumergir en la solución de hematoxilina de Gill por 15 minutos.
2. Sumergir en agua corriente por 10 minutos
3. Lavar con agua destilada
4. Contrateñir con eosina Y (5% disuelta en EtOH) por 5 minutos
5. Deshidratar con etanol al 96% por 5 minutos
6. Deshidratar con etanol absoluto por 5 minutos
7. Aclarar con xileno y montar con aceite de inmersión

Las preparaciones fueron observadas mediante un microscopio vertical Olympus BX51.

4.11 Prueba de Viabilidad con MTT

Se preparó una solución en fresco de MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio), de 5 mg/mL en medio de cultivo Ham F12 sin rojo de fenol. La solución se filtró a través de un filtro de 0.2 μm y almacenado a 2-8 °C.

La solución stock de MTT (5 mg/mL) se adicionó al cultivo que se deseó evaluar en una relación 1:10 y se dejó incubar durante 3 h. Al finalizar el tiempo se realizaron dos lavados con medio fresco. La pigmentación morada se consideró como tejido vivo.

4.12 Animales

Para todos los experimentos se utilizaron ratas wistar con un peso corporal entre 200 y 250 g. Los animales se obtuvieron del Centro de Producción UNAM-Envigo, Envigo México, S.A. de C.V. y se mantuvieron con libre acceso a agua y alimento. Cada grupo de estudio consistió de al menos seis animales y después de cada experimento los animales fueron sacrificados dentro de una cámara de CO₂. Todos los experimentos siguieron los estándares éticos que delimitan las guías internacionales para la investigación experimental del dolor en animales [109].

Así mismo, se aplicaron los lineamientos marcados por la Norma Oficial Mexicana para el Cuidado y Manejo de Animales ([NOM-062-ZOO-1999](#)) y cualquier esfuerzo fue llevado a cabo con la finalidad de minimizar el dolor y el sufrimiento en los animales, el número de ratas utilizadas por experimento fue el mínimo necesario para tener un análisis estadístico confiable. Se obtuvo la autorización del protocolo por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Facultad de Química (CICUAL/020/11-2011) y por el Comité de Ética sobre el Uso de Animales de la Universidad Federal de Amapá, Macapá Brasil (CEUA-UNIFAP-006/2017).

4.13 Fármacos y reactivos

Trizma® base (T6066), glutatión reducido (G4251), ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoico) (DNTB) (D8130), nitrato reductasa (9029-27-0), nitrito de sodio (563218), ácido sulfanilico (251917), N-alfa-naftil-etilenediamino (NED) (33461), nitroprusiato de sodio (71778), sulfuro de sodio Na₂S (407410), sulfanilamida (S9251) N-etilmaleimida (NEM) (E3876), NG-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME) (No. Cat. N5751), diazóxido (D9035), glibenclamida (G0639), forskolina (F6886) 2',5'-dideoxiadenosina (D7408), DL-

propargilglicina (No. Cat. P7888), gentamicina (50 mg/mL G1387), paraformaldehído (P6148), acetato de amonio (A1542), fueron adquiridos en Sigma Aldrich (St Louis, MO, USA). cloruro de cobre (II) adquirido de reactivos J.T. Baker®. Colágeno tipo I-A (Millipore 08-115) , suero fetal bovino (Gibco® 10437-036), medio Ham's F-12 (Gibco® 21700-075). Solución amortiguadora HEPES (Gibco® 15630-080).

4.14 Determinación de las constantes físicas y propiedades espectroscópicas y espectrométricas

Los puntos de fusión fueron determinados en un aparato Fisher-Jones y no se encuentran corregidos. El registro de los espectros fue realizado en las instalaciones de la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación y la Industria (USAI) de la Facultad de Química, UNAM por el personal de la unidad.

Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno (RMN-¹H) y de Carbono 13 (RMN-¹³C) se generaron en un aparato Unity-Inova, marca Varian, el cual se operó a una radiofrecuencia de 400 y 100 MHz respectivamente. Los espectros se realizaron en CDCl₃ y los desplazamientos químicos δ (ppm), referido al tetrametilsilano (TMS).

4.15 Análisis estadístico

Cada experimento consistió de 6 a 8 animales. Todos los resultados están representados como la media \pm error estándar de la media (EEM) del área total de daño, área bajo la curva, concentración de metabolitos. Las diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$) entre los tratamientos se determinaron por medio de un análisis de varianza de una vía seguida por una prueba *post hoc* de Dunnett o Tukey según fuera el caso.

5. Resultados y discusión

Los resultados del siguiente trabajo se dividen en el aislamiento y purificación del diligustílido. La evaluación general de la actividad gastroprotectora de los extractos de *L. porteri*. La identificación del mecanismo de acción del diligustílido y el desarrollo de dos metodologías, la cuantificación del sulfuro de hidrógeno y el establecimiento de las condiciones de cultivo *ex – vivo* del tejido gástrico.

5.1 Obtención de los extractos orgánicos de *L. porteri* y evaluación gastroprotectora.

De la maceración realizada a las rizomas de *L. porteri* se obtuvieron 185.7 g del extracto de hexano, 326.2 g del extracto de CH₂Cl₂, 50 g del extracto de AcOEt y 93 g del extracto de MeOH. Se decidió evaluar la actividad gastroprotectora de cada uno de los extractos a la dosis de 30 mg/Kg p.o., se utilizó carbenoxolona (30 mg/Kg p.o.) como control positivo[110, 111] (Figura 8).

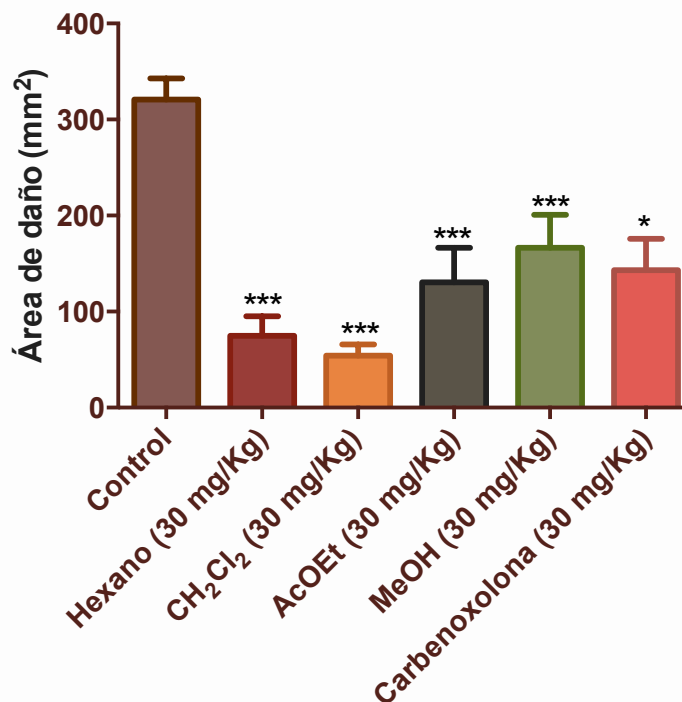


Figura 8: Efecto gastroprotector de los extractos orgánicos de *L. porteri* en ratas tratadas con EtOH abs. para desarrollarles úlcera gástrica. Cada barra representa el promedio \pm EEM del total de daño en la superficie del estómago ($n = 6$). ANADEVIA de 1 vía, prueba *post hoc* Dunnett * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$.

Los resultados demuestran que todos los extractos poseen actividad gastroprotectora destacando los extractos de hexano ($74.91 \pm 20.30 \text{ mm}^2$) 76% y CH_2Cl_2 ($54.01 \pm 11.94 \text{ mm}^2$) 83% de efecto gastroprotector, sin embargo los otros dos extractos también poseen previenen el daño de forma considerable comparada con la carbenoxolona, AcOEt ($130.4 \pm 36.14 \text{ mm}^2$) y MeOH ($166.5 \pm 34.4 \text{ mm}^2$); 60% y 48% de gastroprotección respectivamente. A la fecha no hay estudios que describan la actividad gastroprotectora de *Ligusticum porteri*, si bien los principales componentes descritos en esta planta corresponden a la familia de las ftálidas, también presenta una importante cantidad de compuestos monoterpenoides que se les ha descrito como agentes gastroprotectores, tal es el caso de α -terpinol [112], limoneno [113, 114], acetato de terpinilo [115], α -pineno [116], β -pineno [117] o el derivado del ácido cinámico el ácido ferúlico [118], la detección de estos compuestos se ha realizado mediante estudios de cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (GC/MS) [86] y por cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC, por sus siglas en inglés)[85].

El siguiente paso fue realizar la curva dosis – respuesta de los dos extractos que presentaron mayor actividad a la dosis de 30 mg/Kg, los resultados mostraron que existe un comportamiento dosis – respuesta por parte de ambos extractos. Se realizó el cálculo de la DE_{50} mediante el modelo de Hill arrojando los siguientes resultados; hexano ($\text{DE}_{50} 18.58 \pm 2.15 \text{ mg/Kg}$) y CH_2Cl_2 ($\text{DE}_{50} 27.65 \pm 4.42 \text{ mg/Kg}$) **Figura 9**. En ambos casos la dosis de 100 mg/Kg logró prevenir casi en su totalidad el daño necrosante del etanol absoluto. Los resultados preliminares indican que ambos extractos poseen metabolitos secundarios con potencial antiulcerante.

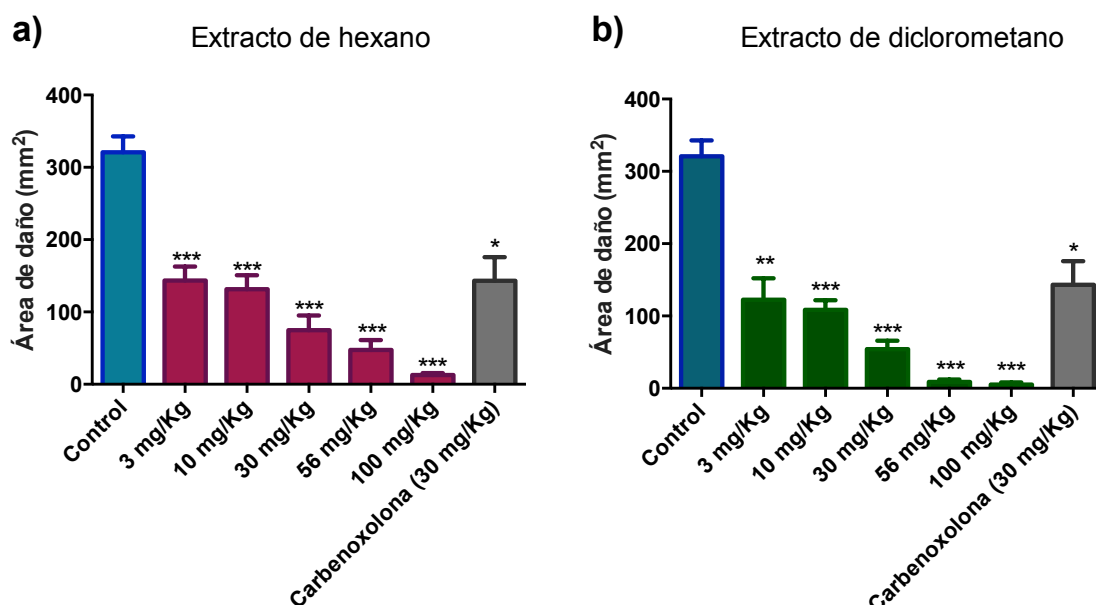


Figura 9: Efecto gastroprotector por vía p.o. de los extractos orgánicos de a) hexano y b) CH_2Cl_2 previo a la inducción de la úlcera con EtOH. Cada barra representa el promedio \pm EEM del total de daño en la superficie del estómago ($n = 6$). ANADEVa de 1 vía, prueba *post hoc* Dunnett a) * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

5.2 Aislamiento y elucidación estructural del diligustílido

De acuerdo a lo reportado en la literatura las fracciones no polares obtenidas de la raíz de *L. porteri* contienen ftálicas como el Z-ligustílido (**32**) y diligustílido (**35**) [85, 119]. Con base en los resultados anteriores se decidió hacer el fraccionamiento químico del extracto de hexano con el fin de obtener las ftálicas presentes en la raíz. El extracto de hexano (150 g) se fraccionó primariamente por cromatografía en columna abierta en gel de sílice (750 g) empleando como adsorbente gel de sílice (Sílica gel G-60 Merck, gránulos de 0.2-0.05 mm, malla 7-230). El proceso de elución se efectuó con hexano, acetato de etilo y metanol en gradiente de concentración ascendente. Se obtuvieron 130 fracciones de 200 mL cada una, reuniéndose aquellas que tuvieran similitudes cromatográficas.

En la fracción 46 se observó la presencia de un sólido cristalino (4.3 g), que fue purificado mediante lavados con hexano frío y por recristalizaciones sucesivas con hexano/AcOEt (8:2). El sólido cristalino tuvo un punto de fusión de 118 – 120 °C sin corregir.

5.2.1 Caracterización del diligustílido (14)

La elucidación estructural del diligustílido se llevó a cabo utilizando técnicas espectroscópicas y espectrométricas.

A continuación se discuten a detalle las señales principales de los espectros:

El espectro de RMN¹³C (**Figura 10**) presenta señales para 24 átomos de carbono. El análisis del espectro permitió establecer la presencia de señales para los sistemas α,β insaturados de dos γ lactonas en, δ_c 126.5 (C-7a), δ_c 155.0 (C-3a), δ_c 168.4 (C-1) y δ_c 134.18 (C-7a'), δ_c 142.0 (C-7'), 164.9 (C-1') respectivamente; cuatro carbonos olefinícos en δ_c 148.0 (C-3), δ_c 112.1 (C-8) δ_c 150.4 (C-3'), δ_c 108.6 (C-8'), ocho metilenos en δ_c 19.7 (C-4), δ_c 27.9 (C-5), δ_c 28.9 (C-9), δ_c 22,27 (C-10), δ_c 22.3 (C-10'), δ_c 31.0 (C-4'), δ_c 27.4 (C-5'), δ_c 25.7 (C-9'), también se observan señales para tres metinos cabezas de puente en δ_c 38.3 (C-6), 41.4 (C-6'), δ_c 41.5 (C-7), un carbón cuaternario cabeza de puente 47.5 (C-3a'), y dos metilos en δ_c 13.9 (C-11) y δ_c 13.8 (C-11').

En el espectro de RMN¹H (**Figura 11**) en la región de hidrógenos olefinícos se observa una señal doble ancha δ_H 7.35 ($J = 4.0$ Hz) asignable al H-7' beta al carbonilo, y dos señales triples anchas en δ_H 5.0 y δ_H 5.07 que presentan la misma constante de acoplamiento $J = 8.0$ Hz y corresponden a los hidrógenos en la posición H-8 y H-8' respectivamente.

A campo alto en δ_H 3.25 se aprecia otra señal doble ($J = 8.0$ Hz) que integra para un hidrógeno asignable a H-7. En δ_H 2.99 se observa una señal doble de dobles con constantes de acoplamiento de $J = 8.0$ y 4.0 Hz que corresponden al hidrógeno H-6', en δ_H 2.55 se observa una señal triple ancha que presenta una constante de acoplamiento de $J = 8.0$ Hz que corresponde al hidrógeno H-6.

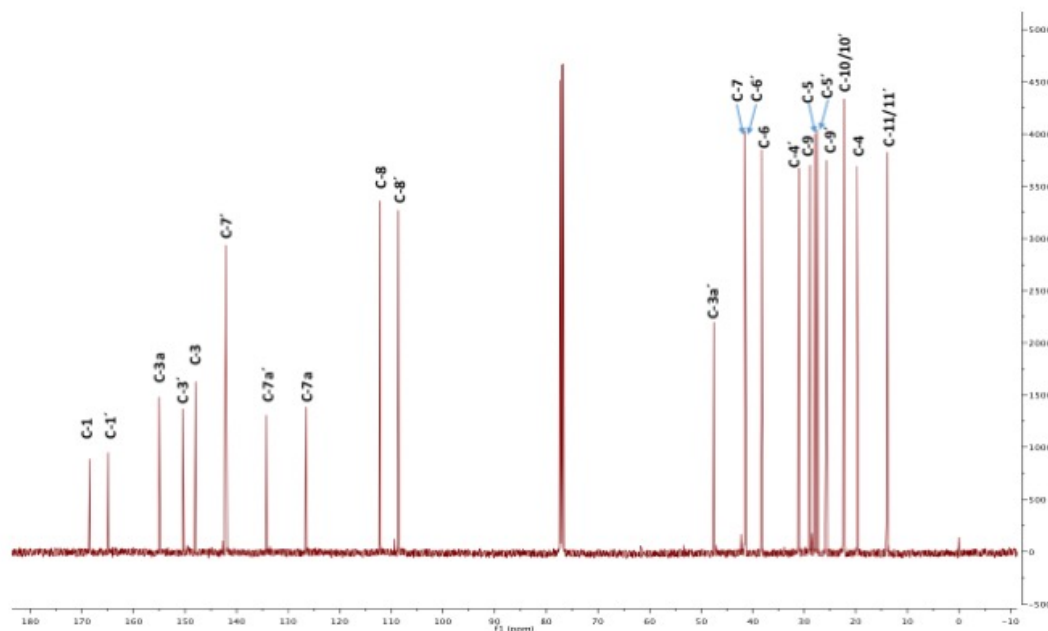


Figura 10: Espectro de RMN¹³C del Diligustílido (14) de *Ligusticum porteri* (100 MHz, CDCl₃).

También se observa una señal múltiple en δ_H 1.55 asignable a los H-10/10'; una señal triple en δ_H 2.55 ($J = 8.0$ Hz) asignable a los H-4/4'; señales cuádruples anchas en δ_H 2.19 con constante de acoplamiento de $J = 8.0$ Hz asignable a los H-5/5' y en δ_H 2.29 ($J = 8$ Hz) asignable a los H-9/9' y una señal triple en δ_H 0.93 ($J = 8.0$ Hz) asignable a los H-11/11'.

En el **Cuadro 1** se presentan los datos espectroscópicos de RMN¹³C y de RMN¹H del compuesto **14**.

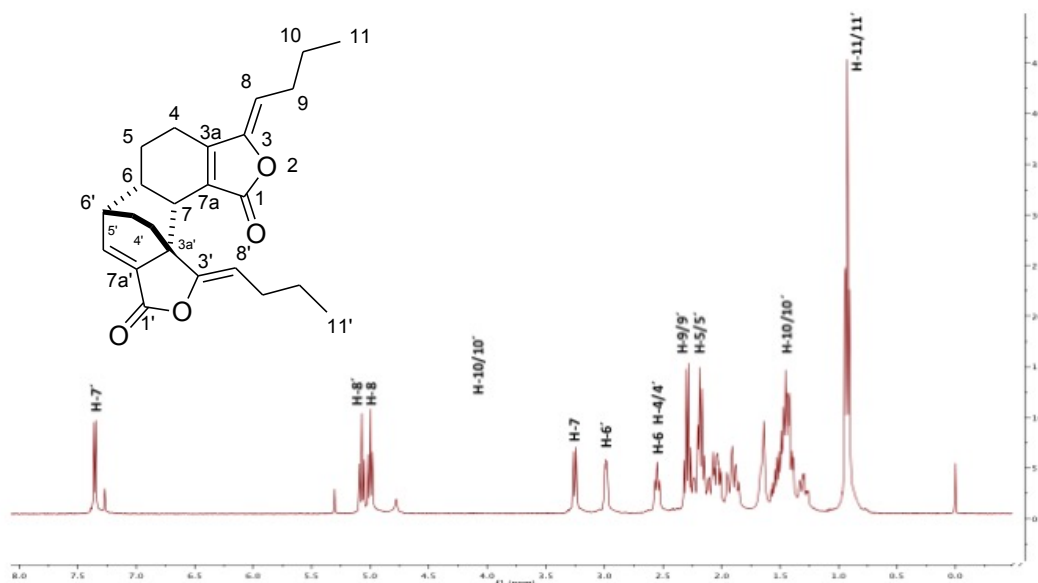


Figura 11: Espectro de RMN¹H del diligustílido (14) de *Ligusticum porteri* (400 MHz, CDCl₃)

Los espectros de resonancia magnética unidimensionales (RMN-¹H y RMN-¹³C) y permitieron confirmar que las señales tanto de desplazamiento químico como las constantes de acoplamiento coinciden con las reportadas en la literatura [84] para el producto natural Diligustílido (35). **Figura 12.**

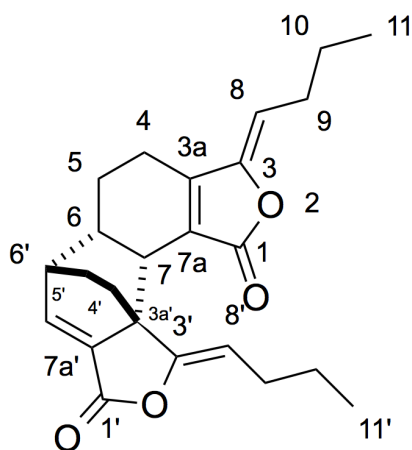


Figura 12: Estructura del (Z,Z')-diligustílido

Cuadro 1: Datos espectroscópicos de RMN¹³C (100 MHz, CDCl₃) y de RMN¹H (400 MHz, CDCl₃), del diligustílido.

Posición	¹³ C (δ _c)	¹ H (δ _H) mult. <i>J</i> en Hz
	100 MHz	400 MHz
1	168.4	
1'	164.9	
3	148.0	
3'	150.4	
3a	155.0	
3a'	47.5	
4	19.7	2.55 (tr, <i>J</i> = 8.0)
4'	31.0	
5	27.9	2.19 (qr <i>J</i> = 8.0)
5'	27.4	
6	38.3	2.55 (tr, <i>J</i> = 8.0)
6'	41.4	2.99 (dd, <i>J</i> = 8.0, 4.0)
7	41.5	3.25 (d <i>J</i> = 8.0)
7'	142.0	7.35 (dr, <i>J</i> = 4.0)
7a	126.5	
7a'	134.1	
8	112.1	5.00 (tr, <i>J</i> = 8.0)

Cuadro 1. Datos espectroscópicos de RMN¹³C (100 MHz, CDCl₃) y de RMN¹H (400 MHz, CDCl₃), del diligustílido (Continuación).

Posición	¹³ C (δ _c)	¹ H (δ _H) mult. <i>J</i> en Hz
	100 MHz	400 MHz
8'	108.6	5.07 (tr, <i>J</i> = 8.0)
9	28.9	2.29 (q, <i>J</i> = 8.0)
9'	25.7	
10	22.2	1.55 (m)
10'	22.3	
11	13.9	0.93 (t, <i>J</i> = 8.0)
11'	13.8	

5.3 Evaluación del efecto gastroprotector del diligustílido obtenido de *L. porteri*.

Posteriormente se decidió evaluar la actividad gastroprotectora del Z,Z'-diligustílido (DLG) realizando una curva dosis – respuesta utilizando las siguientes dosis; 1, 3, 10, 100 y 300 mg/Kg. Los resultados obtenidos muestran que todas las dosis presentaron efecto gastroprotector del daño causado por etanol sobre la mucosa (**Figura 13**). Como se puede observar, no existe una relación dosis – respuesta en las dosis evaluadas, las dosis de 100 y 300 mg/Kg previnieron es su totalidad (> 95%) el daño ocasionado por el etanol, mientras que a dosis bajas mantienen la misma relación de efecto entre ellas. Se utilizó la dosis de 10 mg/Kg para la realización de los siguientes experimentos.

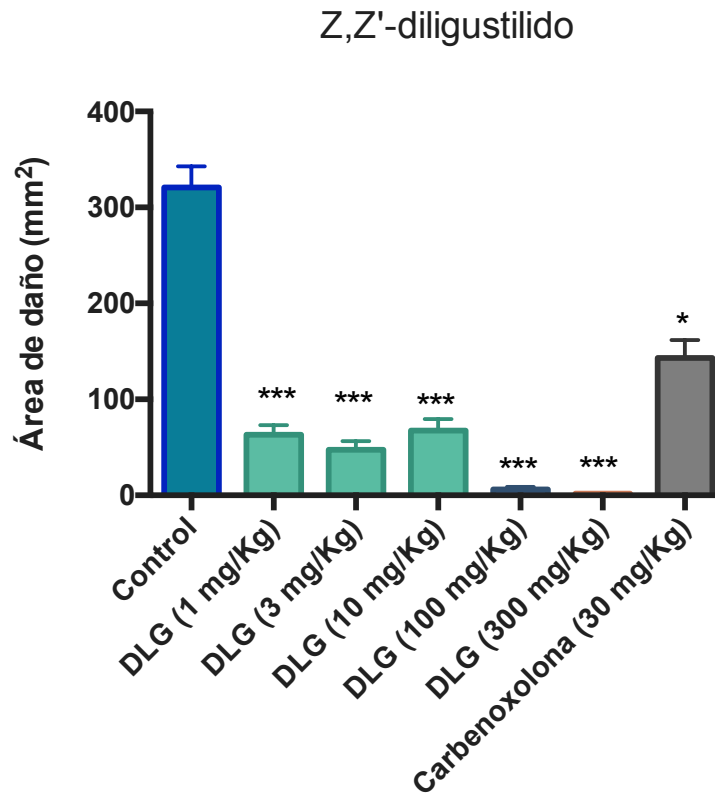


Figura 13: Efecto gastroprotector por vía intragástrica del diligustilido obtenido de *L. porteri* previo a la inducción de la úlcera con EtOH. Cada barra representa el promedio \pm EEM del total de daño en la superficie del estómago ($n = 6$). ANADEVIA de 1 vía, prueba *post hoc* Dunnett * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$.

5.4 Identificación del mecanismo de acción gastroprotector del DLG

Con base a los resultados anteriores se decidió explorar diferentes vías de señalización que participan en la gastroprotección. Dentro de los mediadores endógenos que podemos destacar está el óxido nítrico (NO), el sulfuro de hidrógenos (H_2S) y las prostaglandinas (PGs). Debido a que el modelo de inducción del daño gástrico utilizando etanol absoluto es de tipo agudo, los mecanismos que probablemente estén funcionando sean de tipo preventivo, es decir mejoren las condiciones de la mucosa, más que favorecer los procesos de regeneración y el bloqueo de la secreción del ácido clorhídrico.

5.4.1 Participación de los grupos sulfhidrilos libres y la vía del H₂S, en el mecanismo de acción gastroprotector del diligustilido en el daño gástrico inducido por el etanol

La primera parte del estudio se enfocó en el estudio del H₂S y las enzimas que participan en su biosíntesis cistationina γ-liasa (CSE), cistationina β-sintetasa (CBS) y los grupo sulfhidrilo libres (-SH) que son principalmente residuos de aminoácidos azufrados reducidos (cisteína y metionina) presentes en las proteínas. De acuerdo al siguiente esquema se muestra la liberación del H₂S, a partir de las enzimas CBS y CSE; durante la biosíntesis de los aminoácidos azufrados (**Figura 14**).

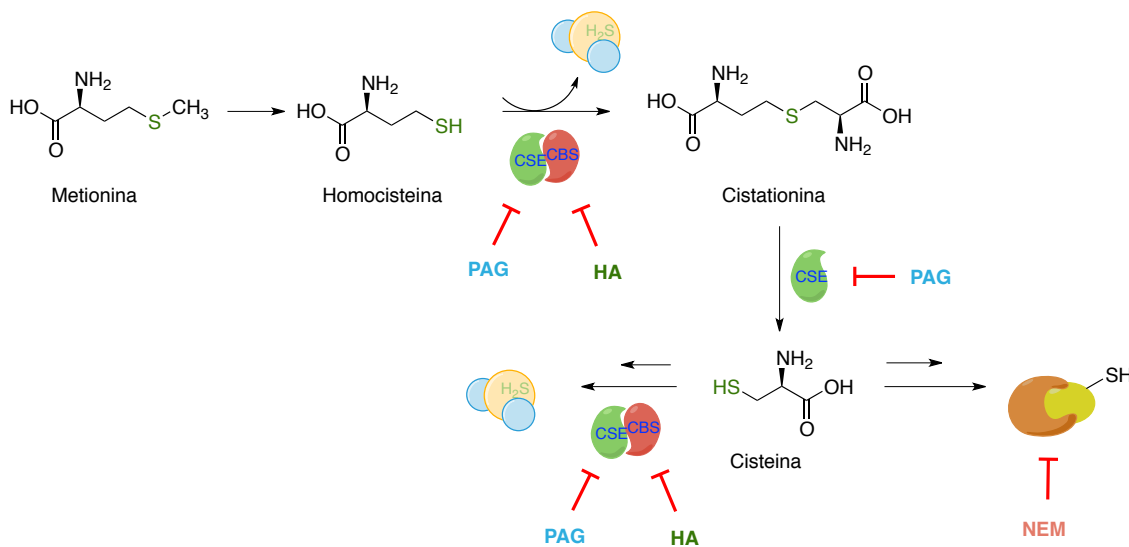


Figura 14: Principal ruta de biosíntesis del H₂S, se esquematiza la estrategia experimental para la elucidación del mecanismo de acción del DLG, utilizando propargilglicina (PAG) como inhibidor de CSE, hidroxilamina (HA) bloqueador de CBS y N-etilmaleimida como bloqueador de los grupos -SH libres.

5.4.2 Bloqueo de los grupos sulfhidrilo libres

Para determinar si la actividad del DLG depende directamente de la presencia de los grupos sulfhidrilos libres se utilizó a la N-etilmaleimida (NEM) como agente alquilante de los grupos -SH [120]. En la **Figura 15** se muestra el resultado de este experimento. La primera columna refleja el área de daño total del etanol sobre la mucosa gástrica, mientras que en la segunda columna está el efecto gastroprotector del DLG. La administración de la NEM a la dosis de 10 mg/Kg, generó un área de daño total de $557.4 \pm 30.85 \text{ mm}^2$ es decir, el daño gástrico inducido por el etanol se vió incrementado en un 73.5 %. De manera interesante la co-administración del DLG con

NEM abatió por completo el efecto gastroprotector ($510.5 \pm 30.03 \text{ mm}^2$). Estos resultados sugieren que la presencia de los grupos $-\text{SH}$ dentro de la mucosa gástrica son necesarios para que el DLG pueda ejercer su mecanismo de acción dentro del estómago.

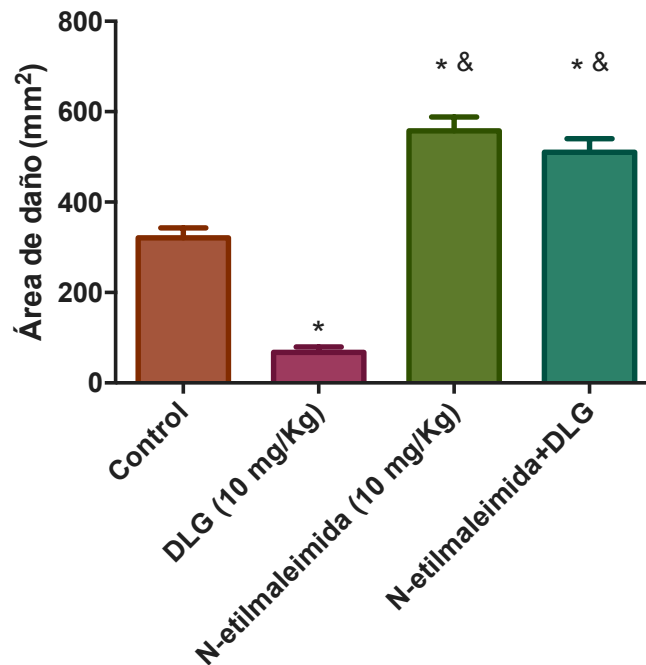


Figura 15: Bloqueo de los grupos $-\text{SH}$ con NEM. El tratamiento con N-etilmaleimida además de incrementar el daño sobre la mucosa gástrica evitó que el DLG ejerciera su efecto gastroprotector. Cada barra representa el promedio \pm EEM del total de daño en la superficie del estómago ($n = 6$). ANADEVIA de 1 vía, con prueba *post hoc* Tukey * $p < 0.001$ vs Control, & $p < 0.001$ vs DLG.

Los grupos tioles tienen la función de mantener la estabilidad de las proteínas y regular las concentraciones de glutatión dentro del organismo, regulando el estrés oxidativo dentro del tejido. El bloqueo de los grupos $-\text{SH}$ y el aumento de especies reactivas de oxígeno pueden incrementar la activación de la vía AKT/PI3K llevando así a la muerte celular [121]. Además el incremento subsecuente de la cantidad de ROS lleva a la formación del ácido sulfenilico $-\text{SOH}$. Estas especies son denominadas prooxidantes que continúan generando daño a las células vecinas, lo que podría explicar los efectos de potenciación de daño causados por el bloqueo y oxidación con la NEM.

5.4.3 Bloqueo de las enzimas CBS y CSE

El siguiente paso del estudio fue evaluar si la inhibición de las enzimas participantes en la formación del gastrotransmisor sulfuro de hidrógeno (H_2S) regula la actividad gastroprotectora del DLG. Para ello se utilizó la propargilglicina a las dosis de 12.5, 25 y 50 mg/Kg (p.o.) con base a los experimentos previamente realizados en el grupo de trabajo [122] y a la hidroxilamina en las dosis de 1, 3, 10 y 75 mg/Kg (i.p.) de acuerdo a lo reportado en la literatura [123].

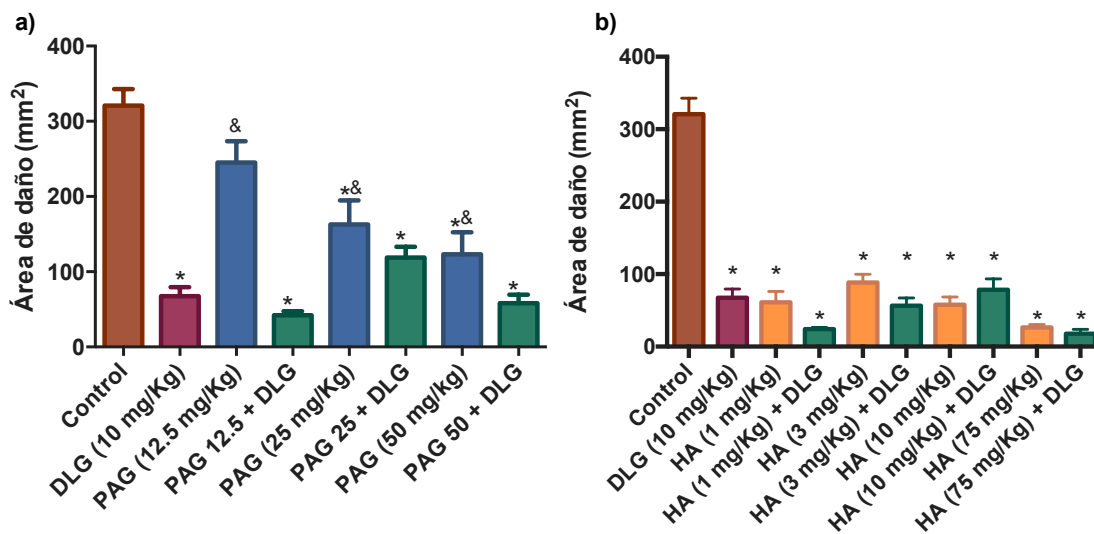


Figura 16: El bloqueo de la actividad de la enzima CSE por PAG a) y CBS por HA b) no modificó el efecto gastroprotector del DLG. Cada barra representa el promedio \pm EEM del total de daño en la superficie del estómago ($n = 6$). ANADEVIA de 1 vía, con prueba *post hoc* Tukey * $p < 0.001$ vs Control, & $p < 0.001$ vs DLG.

Los resultados obtenidos muestran un comportamiento gastroprotector dosis – respuesta por parte de PAG, sin embargo la inhibición de esta enzima no modifica el efecto gastroprotector del DLG (**Figura 16a**). Por otro lado las dosis administradas de HA no tienen un comportamiento dosis – respuesta, pero ejercen un efecto gastroprotector. Cabe destacar que a la fecha es la primera vez que se observa este comportamiento por parte de la HA, de igual forma el comportamiento del DLG se mantiene igual en presencia o ausencia de la HA (**Figura 16b**). En concentraciones que van desde 25 a 100 mg/Kg la PAG ha disminuido la inflamación ocasionada por el H_2S en ratones que presentan edema y pancreatitis [124] así como endotoxemia [125]. Estos estudios respaldan los datos presentados ya la PAG permite regular los valores de sulfuros presentes en el organismo. Por otro lado la hidroxilamina ha sido utilizado

tanto como un agente reductor como un antioxidante, inhibe a las enzimas que contengan un grupo hemo, como es el caso de la enzima CBS. Estudios han demostrado que la desmetilación del gen *cbs* favorece la expresión de la enzima CBS y esto trae como consecuencia el incremento en la señalización CBS-H₂S provocando la iniciación y el mantenimiento de la inflamación periférica e hiperalgesia. Sin embargo, se requieren más estudios para corroborar esta actividad en el tejido gástrico, pese a esto se sustentan los resultados aquí presentados.

5.4.4 Administración exógena de H₂S

Para corroborar si la concentración de H₂S juega un papel importante dentro del mecanismo de acción del DLG, a ratas con ayuno de 10 h se les dio un pretratamiento con una fuente de sulfuro de hidrógeno exógeno, NaHS en diferentes dosis; 10, 50 y 150 μ mol para incrementar la concentración total de especies azufradas dentro del tejido (Figura 17).

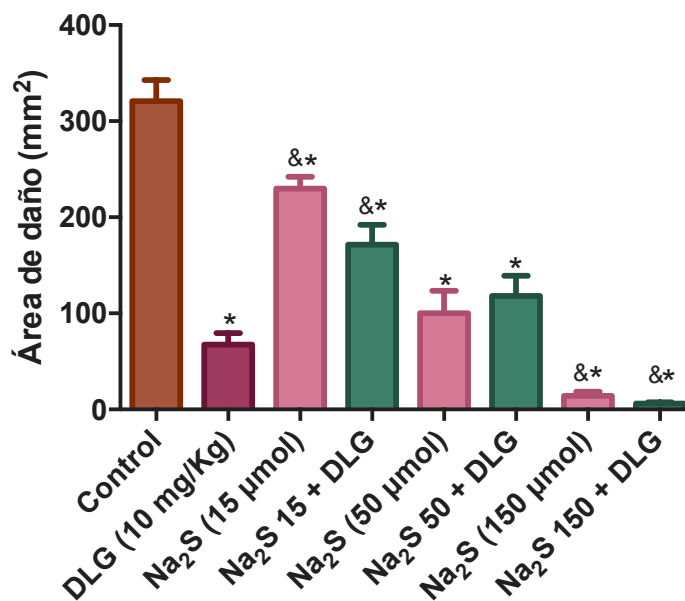


Figura 17: Regulación del Na₂S en el efecto del DLG, a bajas concentraciones (15 μ M) se disminuye el efecto gastroprotector del metabolito, mientras que con la concentración de 50 y 150 μ M se presenta efecto aditivo entre el Na₂S y el DLG. Los datos representan la media \pm EEM de 6 experimentos. El análisis estadístico se realizó mediante un ANADEVIA de una vía seguido de una prueba de Tukey. * $p < 0.05$ comparado con el control, & $p < 0.05$ comparado con DLG.

El área de daño en el estómago disminuyó con el incremento de la concentración de Na_2S . La concentración más alta, de $150 \mu\text{mol}$, se puede observar que evita el daño por completo por parte del etanol. Estos resultados se encuentran en armonía con los descritos en la literatura [126], sin embargo, puede observarse que la actividad del DLG está relacionada directamente con la concentración del H_2S . Estudios han descrito que dosis bajas de NaHS o donadores de H_2S reducen la proliferación de células de músculo liso, probablemente por la fosforilación de la cinasa regulada por señales extracelulares (ERK por sus siglas en inglés) y la cinasa inhibidora dependiente de ciclinas 1, p21^{Cip1} [127]. Además el H_2S promueve la apoptosis de las células de aorta humanas activando la cascada de señalización vía ERK y la pro-caspasa 3 [128]. Sin embargo el H_2S a concentraciones altas ejerce un efecto anti-inflamatorio disminuyendo la actividad del sistema inmune y de las células polimorfonucleares. En conjunto estos resultados sustentan que la participación del DLG depende intrínsecamente de la concentración de H_2S presente en el tejido.

5.5 Detección y cuantificación *in vivo* del H_2S

Finalmente, para corroborar si el DLG favorecía la liberación de H_2S en el tejido estomacal, se realizó la cuantificación de este gas *in vivo* mediante un electrodo selectivo en ratas anestesiadas que fueron pre-tratadas con una dosis oral única de diferentes fármacos de acción conocida junto con el metabolito DLG.

5.5.1 Validación del método *in vivo* para la cuantificación de H_2S .

Debido a que el H_2S posee alta inestabilidad y reactividad, ha dificultado su análisis adecuado y la mayoría de las técnicas existentes son exclusivamente de punto final, es decir solo permiten un único registro del valor utilizando métodos fluorométricos o colorimétricos [129, 130]. El uso de electrodos selectivos para la cuantificación con alta sensibilidad ha sido utilizado recientemente tanto en modelos *in-vitro* como *in-vivo*. En este trabajo, por primera vez, proponemos un nuevo modelo para la cuantificación en tiempo real del H_2S en el estómago de rata, utilizando un electrodo selectivo, y su aplicación en la medición de los cambios en el nivel de este gas en las lesiones inducidas por etanol.

5.5.2 Estudios farmacológicos

Dado que se trata de una metodología novedosa, es necesario validarla, para lo cual nos dimos a la tarea de probar fármacos cuya actividad han sido descritas ampliamente.

Primeramente se realizó una curva de calibración con un rango de concentraciones de 30, 150, 300, 450, 600, 750 y 900 μM (**Figura 18**). La curva de calibración se construyó de acuerdo a la relación entre los milivolts y la concentración molar.

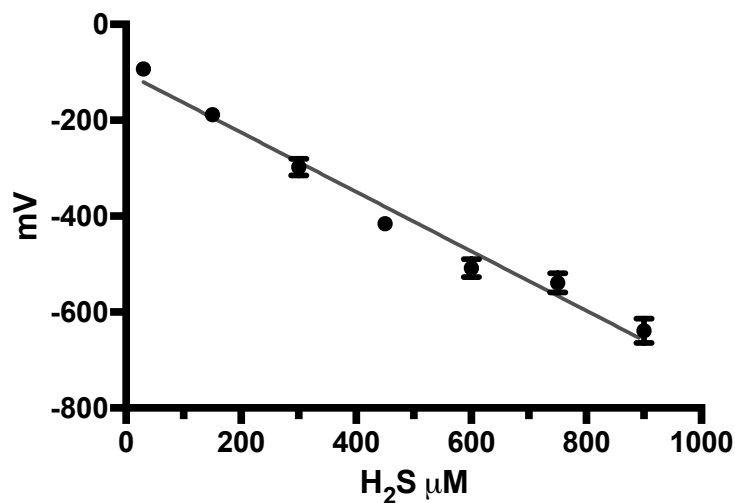


Figura 18: Curva de calibración de la concentración de H₂S vs milivolts en el microelectrodo. Los milivolts de las diferentes soluciones de Na₂S fueron medidos y analizados con el software ArrowION™ ION plotter (1.4.6). Los milivolts de las soluciones fueron graficados contra la concentración. $n = 3$, $r^2 = 0.977$, para la ecuación se obtuvieron los valores de la pendiente y ordenada al origen como se muestra: $mV = -0.6194 \pm 0.02 (\text{H}_2\text{S } \mu\text{M}) + (-101.5 \pm 10.96)$.

Una vez que se obtuvo la calibración del equipo se dispuso a realizar la cirugía sobre los animales, esta fue bien tolerada. Una sola dosis de pentobarbital (6.3 mg/Kg) fue suficiente para mantener al animal en anestesia general por alrededor de 2 h. Después de la incisión en el área peritoneal, se introdujo el electrodo 1 cm debajo del estómago en el segmento duodenal, entonces se inició el registro de la concentración de H₂S en animales con ayuno previo de 10 h. Los resultados muestran que el estómago produce en promedio $0.23 \pm 0.02 \mu\text{M}$ de H₂S. Con la administración de 0.1 mL de etanol absoluto directamente en el estómago a los 25 minutos iniciado el experimento, la concentración de H₂S empezó a decaer hasta un mínimo de $0.13 \pm 0.01 \mu\text{M}$ al minuto 60 (**Figura 19 – Control**). Para descartar si la disminución en la concentración de H₂S se

debía por la dilución provocada por el etanol dentro del estómago, otro grupo de animales recibió 1 mL de solución salina a los 25 minutos (**Figura 19** - SSI). Puede observarse que la concentración de H₂S se mantiene constante en este grupo descartando así que la disminución se debe a un efecto por dilución. El ABC de la concentración total del H₂S no mostró diferencia significativa comparada contra el control.

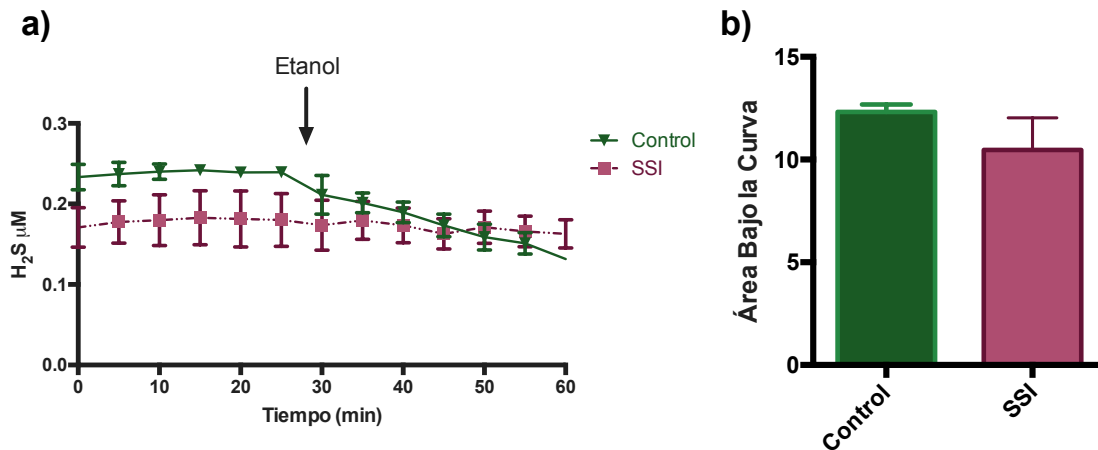


Figura 19: a) Curso temporal de la cantidad de H₂S liberado en el estómago de rata. Cuando los animales fueron tratados con etanol absoluto al $t = 25$ min, la concentración de H₂S empezó a disminuir (▼), este efecto no se observó a aquellos tratados solo con solución salina (■). b) El área bajo la curva no mostró ninguna diferencia significativa comparado con los animales control. Los datos son representados como la media \pm EEM. El análisis estadístico desarrollado fue una *t-student*.

El siguiente paso fue validar esta metodología utilizando primeramente el precursor del H₂S. Como se había mostrado previamente, la L-cisteína constituye uno de los intermediarios y sustratos más importantes para la formación de este gas a través de reacciones de trans-sulfuración a lo largo del metabolismo.

Antes de realizar la cirugía, los animales fueron pre-tratados con una dosis única de L-cisteína (50 mg/Kg, p.o.), pasados 25 minutos se realizó el procedimiento de inserción del electrodo antes mencionado, se realizó el registro y la inducción de la úlcera gástrica. Como se esperaba, la concentración inicial de H₂S se incrementó a 0.51 ± 0.04 µM. Después de la administración del etanol absoluto, en el minuto 25 la concentración empezó a disminuir hasta llegar a un mínimo de 0.39 ± 0.05 µM (**Figura 20a**). De forma interesante, el daño necrótico del etanol fue prevenido por efecto de la

L-cisteína, como había sido reportado previamente por Xiao [131]. Además los niveles de H_2S se mantuvieron por encima del grupo control en todo momento (**Figura 20b**). Por otra parte el tratamiento con DL-propargilglicina, un inhibidor selectivo de la enzima cistationina γ liasa (CSE), que participa directamente en la síntesis de H_2S , depleta la concentración de este transmisor en el estómago desde el $t = 0$ (**Figura 20a**) ($0.05 \pm 0.02 \mu M$). La administración con el etanol al minuto 25 mantuvo los niveles bajos del H_2S . La cuantificación total por medio del área bajo la curva muestra la disminución del 90% de la concentración total comparada contra el control (**Figura 20b**).

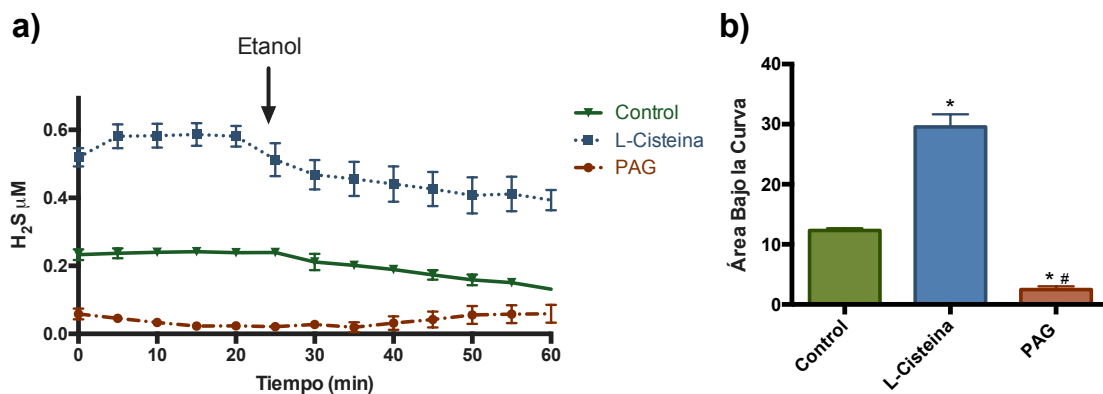


Figura 20: a) Curso temporal de la cantidad de H_2S liberado en el estómago de rata. Cuando el animal fue pre-tratado con L-cisteína (50 mg/Kg p.o.) la concentración de H_2S se incrementó (■), después de 25 minutos 0.2 mL de etanol absoluto se administró; los animales tratados con el inhibidor de H_2S DL-propargilglicina (50 mg/Kg i.p.) muestra una depleción de la concentración del gasotransmisor (●). b) El área bajo la curva muestra que la L-cisteína duplica la producción total del H_2S mientras que el pre-tratamiento con PAG los depleta. Los datos son representados como la media \pm EEM. El análisis estadístico desarrollado fue un ANADEVa seguido de un análisis de Tukey * $p < 0.05$ comparado con el control, # $p < 0.05$ comparado con L-cisteína.

Estos resultados nos permitieron corroborar los rangos de detección del sulfuro de hidrógeno producido en el estómago tanto en condiciones normales como patológicas, garantizando así la confiabilidad de las lecturas.

Para determinar la robustez de la técnica y su capacidad como una posible aplicación farmacológica, se evaluaron tres clases de fármacos utilizados en el tratamiento de la úlcera gástrica con mecanismos de acción particulares y específicos.

Primeramente se utilizó la ranitidina, un antagonista de los receptores de histamina H_2 . Los animales fueron pre-tratados con una dosis única de 50 mg/Kg p.o., también se utilizó omeprazol un inhibidor irreversible de la bomba de protones (H^+/K^+ ATPasa) a

una dosis de 40 mg/Kg p.o. Ambos fármacos se encargan de la inhibición de la secreción de HCl en el estómago, por lo que su efecto en la mucosa gástrica no depende ni de la concentración ni de la participación del H₂S. Los resultados obtenidos muestran, como era de esperarse, que el tratamiento con estos fármacos no modifican las concentraciones de H₂S en el estómago. Múltiples estudios han demostrado que tanto la ranitidina como el omeprazol previenen el daño provocado por el etanol. Los resultados obtenidos no muestran modificaciones en la concentración después de la inducción de la úlcera sobre el sulfuro de hidrógeno (**Figura 21a**). El área bajo la curva de la concentración total tampoco muestra cambios comparados contra el control (**Figura 21b**).

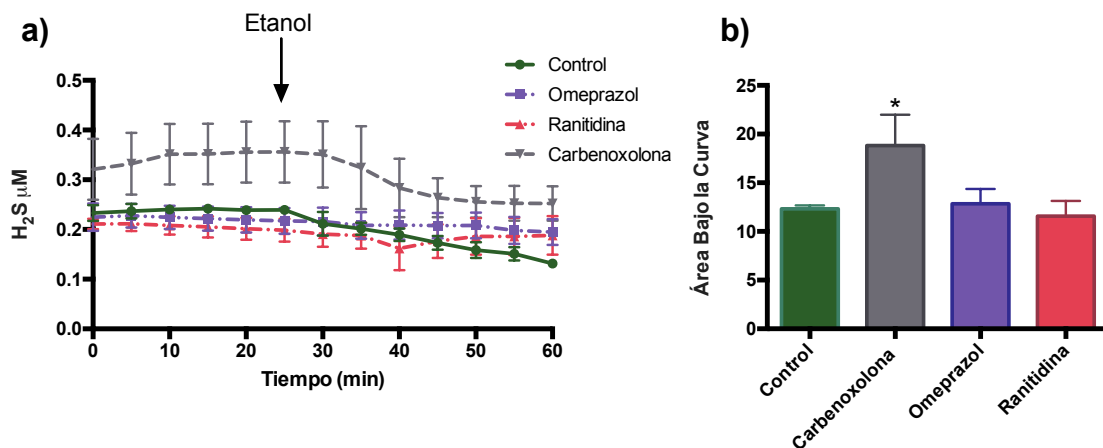


Figura 21. Participación de diferentes fármacos utilizados en el tratamiento de la úlcera gástrica sobre la producción de H₂S en el estómago de rata. a) Cuando los animales fueron pre-tratados con ranitidina (50 mg/Kg p.o.) (▲) u omeprazol (40 mg/Kg p.o.) (■) la concentración de H₂S no se modificó con la administración del etanol al minuto 25. Los animales pre-tratados con carbenoxolona (30 mg/Kg p.o.) (▼) un fármaco gastroprotector la concentración se mantuvo por encima de la del control. b) El área bajo la curva muestra que ni la ranitidina ni el omeprazol modifica la concentración total de H₂S a diferencia de la carbenoxolona. Los datos son representados como la media ± EEM. El análisis estadístico desarrollado fue un ANADEVIA seguido de un análisis de Tukey **p* < 0.05 comparado con el control.

Como control positivo se utilizó a la carbenoxolona, un agente semisintético derivado del ácido glicirrético, cuya actividad gastroprotectora ha sido estudiada ampliamente. Carbenoxolona se ha descrito como un agente modulador de la vía del óxido nítrico y prostaglandinas [111, 132]. La administración a animales pre-tratados con una dosis

única de 30 mg/Kg p.o. incrementó la producción de H₂S desde el inicio a una concentración de $0.33 \pm 0.09 \mu\text{M}$. Cuando los animales fueron tratados con el etanol el nivel de H₂S disminuyó hasta una concentración mínima de $0.23 \pm 0.06 \mu\text{M}$ al minuto 60 (**Figura 21a**), siendo superior a la concentración en condiciones basales. La concentración por encima de los niveles normales puede relacionarse con su acción gastroprotectora.

Con todos estos resultados, se demuestran las capacidades de esta nueva metodología, desarrollada por primera vez para el estudio en tiempo real de la liberación del sulfuro de hidrógeno en el estómago. En este trabajo se utilizó un electrodo de tipo Ag/Ag₂S con un rango de detección entre 0.03-100 μM de H₂S. Ese electrodo ha sido utilizado ampliamente para la cuantificación de H₂S en muestras de sangre y en aorta [133, 134], y para demostrar funciones fisiológicas del gasotransmisor dentro del organismo como es el efecto relajante en vejiga urinaria [135]. Se logró establecer las condiciones para una lectura adecuada y para determinar el curso temporal de su liberación en un sistema *in-vivo*. Con el fin de descartar falsos positivos se utilizaron diferentes fármacos con mecanismo de acción conocido.

Todo esto demuestra que esta metodología es confiable para el estudio de nuevas moléculas naturales o sintéticas que pudieran regular de forma directa o indirecta la concentración del H₂S en condiciones normales y patológicas.

5.5.3 Participación del DLG sobre la producción del H₂S

Con el fin de determinar si el DLG modifica el nivel de H₂S gástrico, los animales que fueron pretratados con una dosis única de DLG (10 mg/Kg). Los resultados muestran de forma interesante que la concentración basal del H₂S se incrementó desde el inicio ($0.39 \pm 0.01 \mu\text{M}$) aproximadamente el doble de la concentración con respecto al control ($0.23 \pm 0.02 \mu\text{M}$). Cuando se administró el etanol al minuto 25 se pudo observar que la concentración de H₂S en los animales pre-tratados con DLG no se modificó, a diferencia del control, se observó que disminuyó a un mínimo de $0.13 \pm 0.01 \mu\text{M}$ (**Figura 22a**). El área bajo la curva de este gráfico muestra de forma más clara que el incremento total en la producción de este gasotransmisor se debió a la administración del DLG (**Figura 22b**)

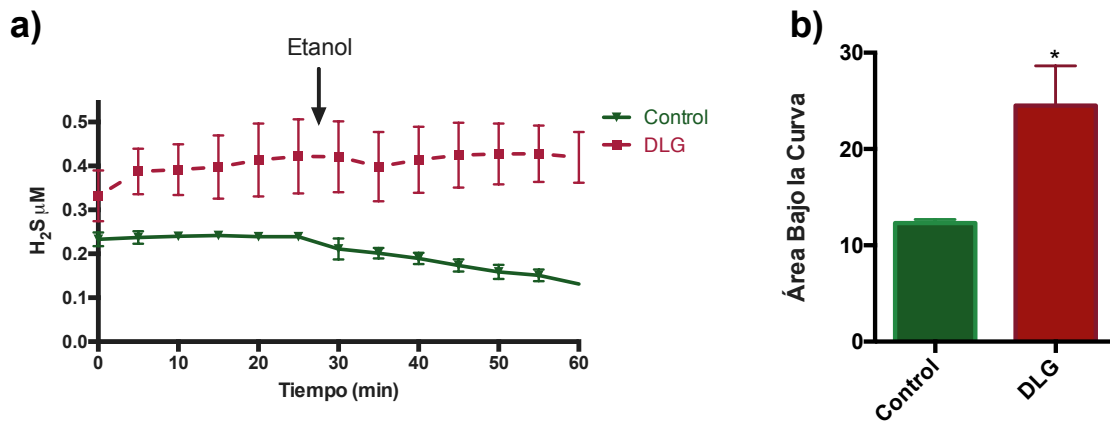


Figura 22: a) Curso temporal de la liberación de H₂S en el estómago en animales con ayuno y tratados con solución salina (▼) o DLG (■) (10 mg/Kg), al tiempo 25 minutos, 0.2 mL de etanol absoluto fueron administrados directamente en el órgano. La administración con etanol disminuye la concentración total de H₂S y mientras que el DLG mantiene constante la concentración total de este gas. b) El área bajo la curva de la concentración total de H₂S muestra que el DLG duplica la concentración con respecto al control. Los datos son representados como la media ± EEM de 6 experimentos. El análisis estadístico desarrollado fue una *t-Student*. **p* < 0.05.

Los resultados indican, por primera vez, que el DLG ejerce parte de su efecto gastroprotector en la mucosa debido a que favorece la liberación del H₂S y mantiene las concentraciones elevadas aún durante el desarrollo de la úlcera gástrica. Si bien aún desconocemos si esta actividad la realiza de forma directa o indirectamente, es decir, regulando otros mecanismos moleculares cuyo efecto final sea la activación de enzimas que liberen este mediador como las sulfurtransferasas, o favoreciendo la estabilidad del transmisor.

5.6 Participación de la vía del óxido nítrico (NO) en el mecanismo de acción gastroprotector del diligustílido en el daño gástrico inducido por el etanol

La siguiente etapa del estudio consistió en la evaluación de la vía de señalización del óxido nítrico y la participación de las prostaglandinas en el mecanismo de acción del DLG. El óxido nítrico es el primer gasotransmisor descrito. Es una molécula pequeña que difunde a través de las membranas por difusión pasiva, a la que se le han atribuido múltiples efectos dentro del organismo, destacando su función como modulador del sistema inmune y un potente vasodilatador.

Una vez demostrada la actividad del DLG sobre la producción de H₂S, se decidió explorar la vía del siguiente gasotransmisor. El NO, a través del esquema propuesto en la **Figura 23**. El H₂S tiene como blanco molecular a los canales de K_{ATP}. Dichos canales regulan por mecanismos no conocidos, a la enzima óxido nítrico sintasa del endotelio (eNOS), enzima encargada de la producción de NO en la vasculatura. A su vez, este incremento en la concentración de NO activa a la guanilato ciclasa, enzima encargada de la conversión de GMP a GMPc, un segundo mensajero que a través de fosforilaciones río abajo permite la vasodilatación en la vascularización. La formación de prostaglandinas a través de la enzima COX, permite regular la actividad de la eNOS.

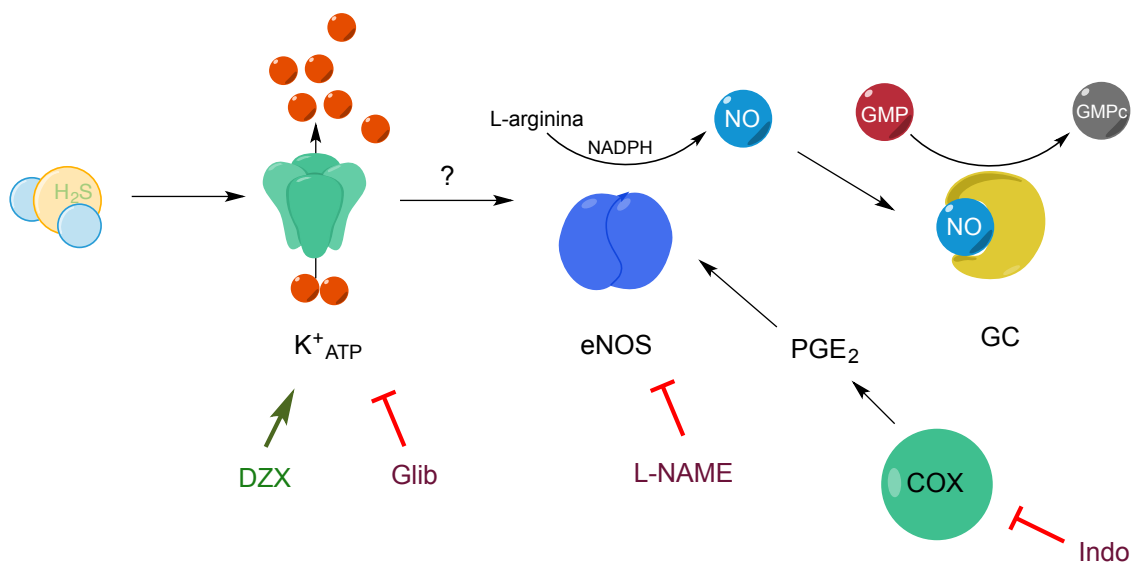


Figura 23: Principal ruta de señalización molecular del H₂S-NO. Se esquematiza la estrategia experimental para la elucidación del mecanismo de acción del DLG, utilizando diazóxido (DZX) como activador de los canales de K_{ATP} y a la glibenclamida (Glib) como inhibidor, éster metílico de N ω -Nitro-L-arginina (L-NAME) como antagonista competitivo de eNOS y la indometacina (Indo) como inhibidor no selectivo de la ciclooxigenasa (COX). guanilato ciclasa (GC), prostaglandina E₂ (PGE₂), guanosin monofosfato (GMP), guanosin monofosfato cíclico (GMPc).

5.7 Participación de los Canales de K⁺ dependientes de ATP (K_{ATP})

Los canales K_{ATP} son uno de los principales blancos moleculares del sulfuro de hidrógeno. Múltiples estudios indican que estos canales son los responsables de los efectos vasodilatadores. La glibenclamida es un fármaco perteneciente a las sulfonilureas, ampliamente utilizado en el tratamiento de la diabetes mellitus por su efecto como bloqueador de los canales K_{ATP}. Se administró una dosis única de este fármaco (1 mg/Kg, disuelto en NaOH 0.05 M, i.p.) 30 minutos antes de la

administración del DLG, para el bloqueo de los canales. Así mismo se utilizó al diazóxido como un activador de estos canales (3 mg/Kg, disuelto en NaOH 0.05 M, i.p.). La glibenclamida tiene efectos gastroprotectores a altas dosis [136] mientras que promueve el daño a dosis bajas [137]. Al usar dosis altas de glibenclamida se puede observar su efecto gastroprotector mientras que el diazóxido ejerce actividad gastroprotectora por si solo. Nuestros resultados muestran que la actividad del DLG no depende de la participación de los canales de K_{ATP} (Figura 24).

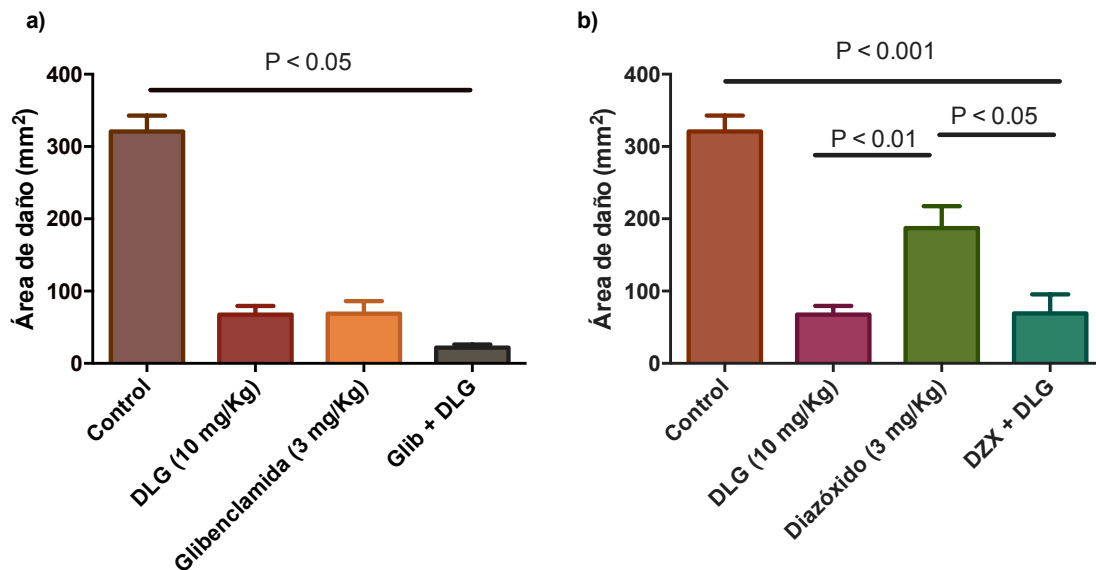


Figura 24: a) Efecto del pretratamiento con glibenclamida (3 mg/Kg, p.o.) o b) diazóxido (3 mg/Kg, p.o.) en el efecto gastroprotector del DLG (10 mg/Kg, p.o.) en lesiones inducidas por etanol en ratas. Ni la activación o inhibición de los canales K_{ATP} modifican el efecto gastroprotector del DLG. Cada barra representa el promedio \pm EEM del total de daño en la superficie del estómago ($n = 6$). ANADEVIA de 1 vía, con prueba *post hoc* Tukey **a)** $p < 0.05$ vs Control, **b)** $p < 0.001$ vs control, $p < 0.01$ DLG vs DZX, $p < 0.05$ DZX vs DZX + DLG.

A la fecha está poco claro el efecto que tienen los canales de K_{ATP} sobre el efecto gastroprotector. El grupo de trabajo de Wallace et. al. [138] demostró que la activación de estos canales con el agonista pinandicil no produce efectos benéficos en el proceso del mejoramiento de la úlcera gástrica. Dichos autores reflejan que parte de los efectos benéficos del H_2S están en parte relacionados con otros mecanismos que no se relacionan a los canales iónicos, mientras que el grupo de Medeiros et al.[126] demuestra que la glibenclamida previene el efecto gastroprotector de la L-cisteína de forma dosis dependientes, y que probablemente el mecanismo gastroprotector en conjunto radique principalmente en mecanismos accesorios como la activación de los

canales TRPV1 en las neuronas aferentes dentro de la mucosa. Sin embargo, nuestros resultados muestran que la regulación de estos canales no participa en el mecanismo gastroprotector del DLG.

5.8 Bloqueo de la formación del NO

El siguiente paso fue evaluar si la inhibición de la producción del óxido nítrico mediante la pre-administración de L-NAME, un antagonista análogo de la L-arginina, que bloquea la función de las diferentes isoformas de la enzima óxido nítrico sintasa (NOS). Se pre-administró una dosis única de L-NAME (70 mg/Kg, s.c.) 30 minutos antes de la dosis del DLG (10 mg/Kg p.o.). El bloqueo de la formación de NO, a través de L-NAME, incrementó el efecto necrosante del etanol sobre la mucosa gástrica en un 48% con respecto al control. Sin embargo, el bloqueo en la producción del NO, no modificó el efecto gastroprotector del DLG, sugiriendo que el mecanismo de acción de este metabolito es a través de una vía independiente del NO (**Figura 25**).

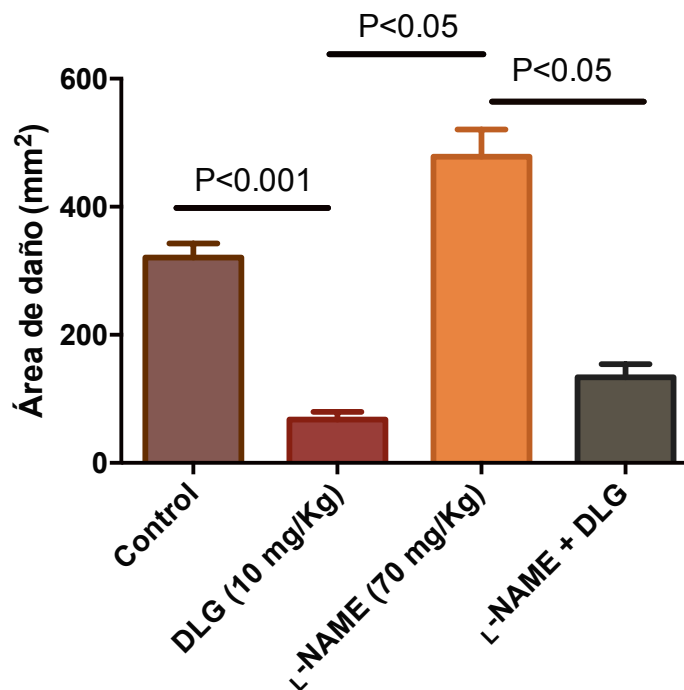


Figura 25: Efecto del pretratamiento con L-NAME (70 mg/Kg, s.c.) en el mecanismo gastroprotector de DLG (10 mg/Kg, p.o.) en las lesiones inducidas por el etanol en el estómago de rata. El bloqueo de la formación de NO incrementa el daño en la mucosa gástrica, sin embargo no modifica el efecto gastroprotector del DLG. Cada barra representa el promedio \pm EEM del total de daño en la superficie del estómago ($n = 6$). ANADEVIA de 1 vía, con prueba *post hoc* Tukey $p < 0.001$ Ctrl vs DLG, $p < 0.05$ DLG vs L-NAME, $p < 0.05$ L-NAME vs L-NAME + DLG.

El NO juega un papel crucial dentro de la microcirculación del estómago, ya que permite regular la tensión arterial. Se ha descrito que la administración de inhibidores como L-NMMA o L-NAME incrementan la tensión arterias y aumentan la resistencia vascular de los capilares, volviéndolos más frágiles y susceptibles a hemorragias. Este efecto puede explicar el incremento del daño gástrico observado en nuestros resultados, a pesar de ello, el DLG pudo prevenir el daño ocasionado por el EtOH inclusive en ausencia de la producción del NO.

5.9 Participación de las prostaglandinas

Las prostaglandinas son producidas por la enzima ciclooxigenasa utilizando al ácido araquidónico como sustrato, y pueden ser sintetizadas tanto por la enzima constitutiva COX-1 como por la inducible COX-2. Las prostaglandinas tienen múltiples funciones dentro del organismo, entre las que destacan la regulación de la tonicidad de los capilares y la activación del sistema inmune. Es ampliamente conocido que los antiinflamatorios no esteroideos (AINES) son inhibidores no selectivos de las dos isoformas de la COX. Al dar un pre-tratamiento con indometacina (10 mg/Kg, i.p.) se genera una depleción no selectiva de prostaglandinas. Los resultados de nuestro trabajo muestran, como es de esperarse, que el tratamiento con indometacina produce daño sobre la mucosa gástrica. Sin embargo, se observa una menor área de daño sobre el tejido. De forma interesante, el tratamiento con indometacina ocasiona que el DLG pierda su actividad gastroprotectora, sugiriendo que las prostaglandinas son necesarias para que este metabolito puede ejercer su efecto protector en la mucosa (**Figura 26**). Esta información nos permite tener nociones de la vía de señalización en la que participa el DLG.

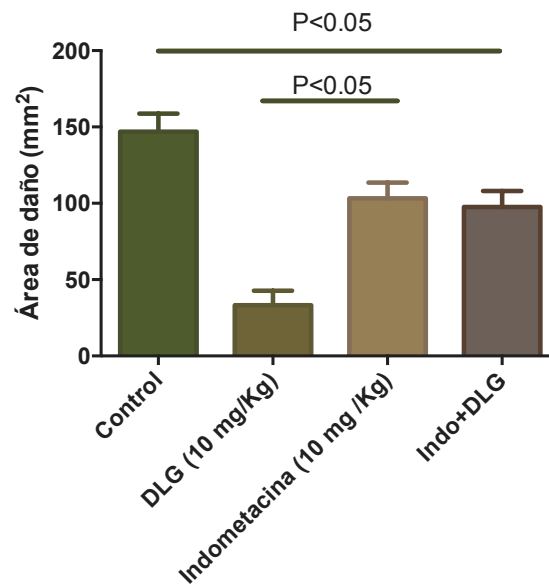


Figura 26: Efecto del pre-tratamiento con indometacina (10 mg/Kg, i.p.) en el efecto gastroprotector del DLG sobre las lesiones inducidas con etanol. El bloqueo de la COX por la indometacina disminuye el efecto del metabolito DLG, sugiriendo que la presencia de las prostaglandinas es necesaria para que prevenga el daño ocasionado por el etanol. Cada barra representa el promedio \pm EEM del total de daño en la superficie del estómago ($n = 6$). ANADEVIA de 1 vía, con prueba *post hoc* Tukey $p < 0.05$ vs control, $p < 0.05$ DLG vs Indo.

5.10 Regulación de la secreción del HCl

Cómo se ha mencionado antes, la mayoría de los fármacos disponibles hoy en día para el tratamiento de la úlcera gástrica radican en la actividad que ejercen sobre la liberación del ácido gástrico ya que la sobreproducción de HCl favorece la formación de úlceras gástricas, se decidió explorar si el DLG regulaba la secreción gástrica a través del incremento del AMPc, con base en el siguiente esquema (**Figura 27**).

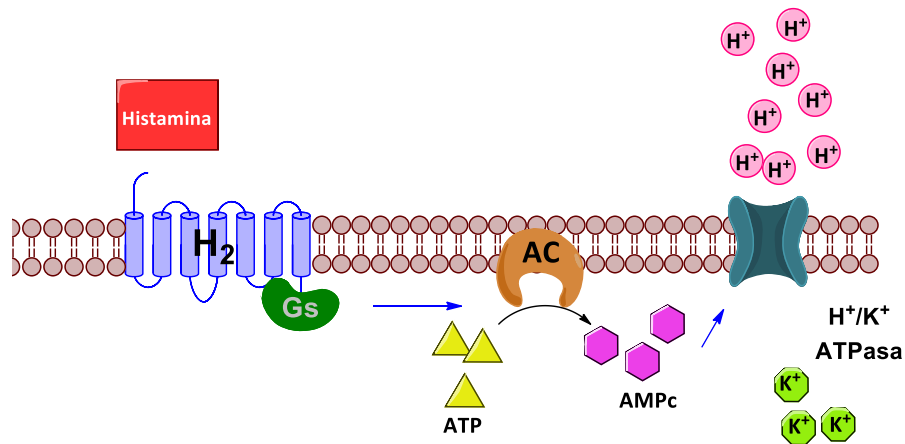


Figura 27: La secreción del H⁺ está regulada por el incremento del AMPc a través de la activación de receptores de histamina H₂ por su ligando, permitiendo así regular el funcionamiento de la bomba H⁺/K⁺, en este trabajo se exploró esta vía utilizando a la forskolina como agente activador de la adenilato ciclasa, y a la dideoxiadenosina como inhibidor de esta enzima.

Para investigar la participación del AMPc en la secreción del ácido gástrico en la gastroprotección inducida por el diligustílido (10 mg/Kg, p.o.), administramos forskolina (84 µg/Kg, i.p.), un diterpeno de tipo labdano, activador de la enzima adenilato ciclasa que incrementa el nivel de AMPc producido en el estómago y disminuye el pH en este tejido [139]. Se dio una única dosis 30 minutos antes de la administración del DLG, también se administró dideoxiadenosina (100 µg /Kg, p.o.) [103] como un agente inhibidor de la adenilato ciclasa; 15 minutos antes de la administración del metabolito.

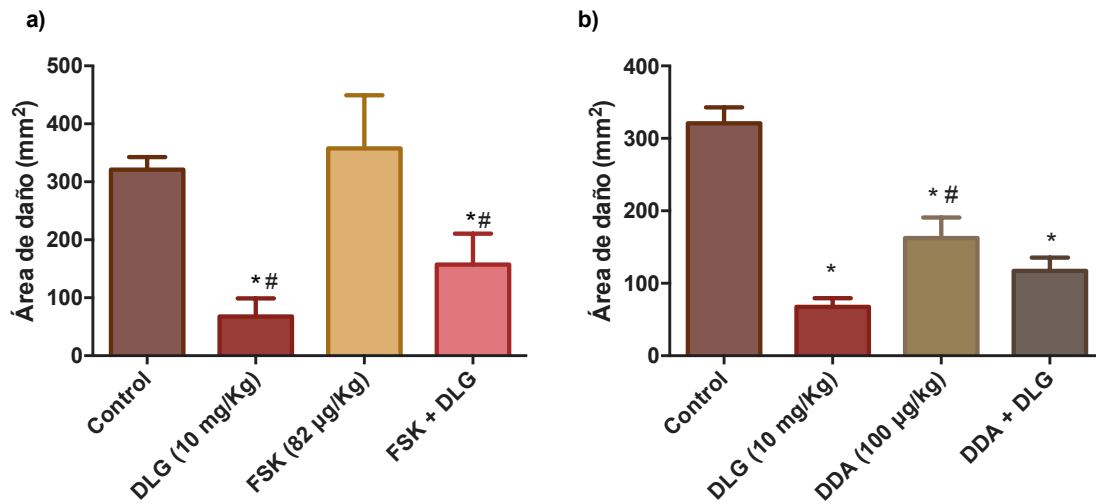


Figura 28: a) Efecto del pretratamiento con FSK (forskolina, 84 µg/Kg i.p.) y b) DDA (dideoxiadenosina 100 µg /Kg, i.p.), sobre el efecto gastroprotector del DLG en las lesiones inducidas por el etanol en ratas. El efecto gastroprotector del DLG no se ve alterado por los cambios en el 2do mensajero. Cada barra representa el promedio \pm EEM del total de daño en la superficie del estómago ($n = 6$). ANADEVIA de 1 vía, con prueba *post hoc* Tukey a) * $p < 0.05$ vs control, # $p < 0.05$ vs FSK. b) * $p < 0.05$ vs control, # $p < 0.05$ vs DLG.

Nuestros resultados muestran que el tratamiento con forskolina, como era de esperarse, no tiene un efecto protector sobre la mucosa gástrica, ni modifica el efecto gastroprotector del DLG (**Figura 28a**). Por el contrario, la disminución del AMPc por la dideoxiadenosina (**Figura 28b**), ofrece una disminución del área total de daño. Parte de la respuesta observada se debe a que, por un lado, disminuye el transporte de los iones hidronio a la luz del estómago, evitando que el pH del estómago descienda. Como consecuencia, las concentraciones totales de HCO_3^- se encuentran elevadas, frenando así la actividad de la gastrina, una de las enzimas proteolíticas más importantes dentro del órgano, enzima que se activa en presencia de pH ácido. Los resultados indican que el aumento o disminución del AMPc y por consecuencia del pH no modifica los efectos gastroprotectores del DLG, esto junto con resultados obtenidos en un trabajo previo [140] demuestran que el DLG no modifica ni la producción del HCl ni altera el pH estomacal.

5.11 Formación de S-nitrosotioles y su efecto protector sobre la mucosa gástrica

La interacción entre el NO y las moléculas de $-\text{SH}$ son la base para la inducción de la S-nitrosilación, y dado que el H_2S es el tiol más sencillo que existe es posible que el H_2S y

el NO puedan interactuar para la formación de los nitrosotioles (RNSO)[141]. Por lo tanto, para la formación de los RNSO, de forma exógena, se utilizó mediante la reacción de SNP, un donador de NO, con NaHS, un donador de H₂S. Esta reacción se da a temperatura ambiente, a pH neutro y de forma espontánea en 10 minutos, de acuerdo a lo reportado en la literatura [141]. La administración de nitrosotioles exógenos posee un efecto gastroprotector previniendo el daño ocasionado por el etanol. El CuCl₂ funciona como un agente oxidante permitiendo la degradación de los nitrosotioles siguiendo la siguiente reacción: GSNO + Cu⁺² + H⁺ → GSH + NO[•] + Cu⁺. Los resultados muestran, como era de esperarse, que al inducir la formación de los gasotransmisores a causa del Cu⁺² incrementan el efecto gastroprotector comparado lo que se observa en los animales pre-tratados con RNSO, y el DLG mantiene su actividad gastroprotectora y no cambia en estas condiciones (**Figura 29**)

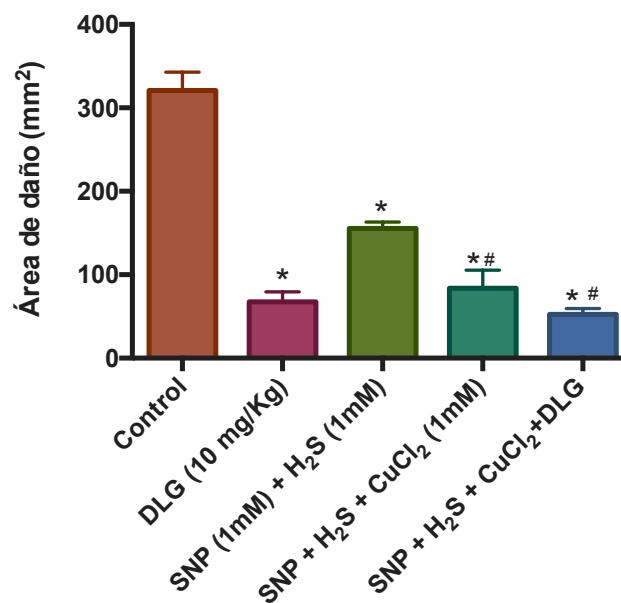


Figura 29: Formación de los S-nitrosotioles *in-vitro* previene el daño gástrico inducido por el etanol; utilizando CuCl₂ se induce la liberación de NO[•] del HSNO formado por la reacción entre SNP y H₂S. En estas condiciones el efecto gastroprotector del DLG se mantiene. Cada barra representa el promedio ± EEM del total de daño en la superficie del estómago (*n* = 6). ANADEVIA de 1 vía, con prueba *post hoc* Tukey **p* < 0.05 vs control, #*p* < 0.05 vs SNP + H₂S.

Tanto el NO como el H₂S controlan y participan en procesos muy similares dentro del organismo como procesos inflamatorios, aprendizaje y memoria, control de la presión arterial, edema, etc. Además de que ambos transmisores se encuentran en concentraciones muy elevadas cuando existe una patología. Estos indicios llevaron a

postular la teoría de que habría un entrecruzamiento entre ambas vías de señalización, sin embargo, a la fecha hay poca información sobre este fenómeno. Los nitrosotioles han sido descritos como especies que permiten la estabilización de los dos mediadores y que tienen blancos moleculares propios. Los resultados aquí presentados indican que estas especies poseen actividad gastroprotectora por si solos y que no regulan la actividad del DLG.

5.11.1 Cuantificación de los mediadores endógenos glutatión (GSH) y nitritos (NO_2^-).

Con la finalidad de realizar la cuantificación del glutatión, uno de los principales antioxidantes no enzimáticos del organismo, se utilizó la reacción colorimétrica de Ellman, la cual consiste en una reacción entre el DNTB y un grupo tiol reducido R-SH, formando un producto tiobenzoato como se muestra en seguida:



Utilizando esta reacción, se construyó una curva de calibración utilizando glutatión reducido como agente estándar. Se tomaron concentraciones de GSH desde 1×10^{-5} a 1×10^{-4} M, dichas concentraciones se encuentran dentro del rango fisiológico (**Figura 26**).

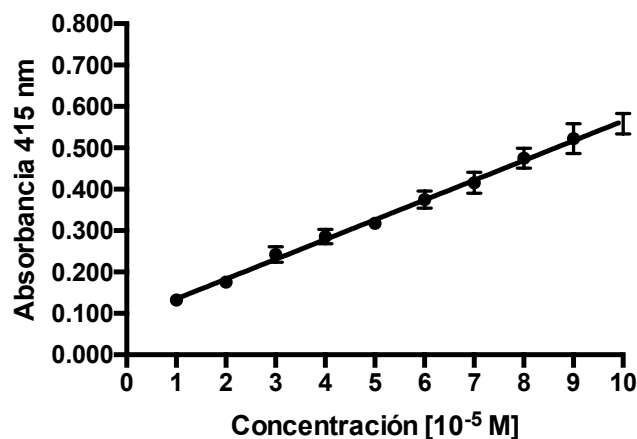


Figura 30: Curva de calibración estándar utilizada para cuantificar la concentración intracelular del GSH en tejido estomacal cuantificada mediante la reacción entre DNTB y soluciones preparadas en el momento de glutatión reducido ($10 - 100 \mu\text{M}$) fueron medidas y analizadas en un lector de placas BioRad 680 XR. La absorbancia obtenida de cada solución fue graficada vs la concentración de GSH. $n = 3$, $r^2 = 0.986$ para la ecuación $\text{Abs} = 0.0477 \pm 0.0009[\text{GSH}] + 0.0875 \pm 0.006$, con una pendiente diferente de cero, $p < 0.001$.

Una vez obtenida la curva de calibración se realizó la cuantificación de la concentración de GSH dentro de las muestras de tejido estomacal con diferentes tratamientos; el primer grupo sólo fue administrado con SSI, para cuantificar la concentración total del GSH presente en el tejido; el siguiente grupo fue tratado con 1 mL de EtOH absoluto (p.o.) para inducción de la úlcera gástrica y determinar el comportamiento del mediador en condiciones patológicas. Posteriormente se administró el DLG (10 mg/Kg, p.o.) para determinar si modifica la concentración de GSH en condiciones normales, también se evaluó si el DLG modifica las concentraciones de GSH en presencia del etanol. Como control positivo se utilizó L-cisteína (50 mg/Kg, p.o.), el precursor biosintético del GSH, y como control negativo se utilizó a L-arginina, un aminoácido que no participa en la vía de síntesis del GSH. (Figura 27)

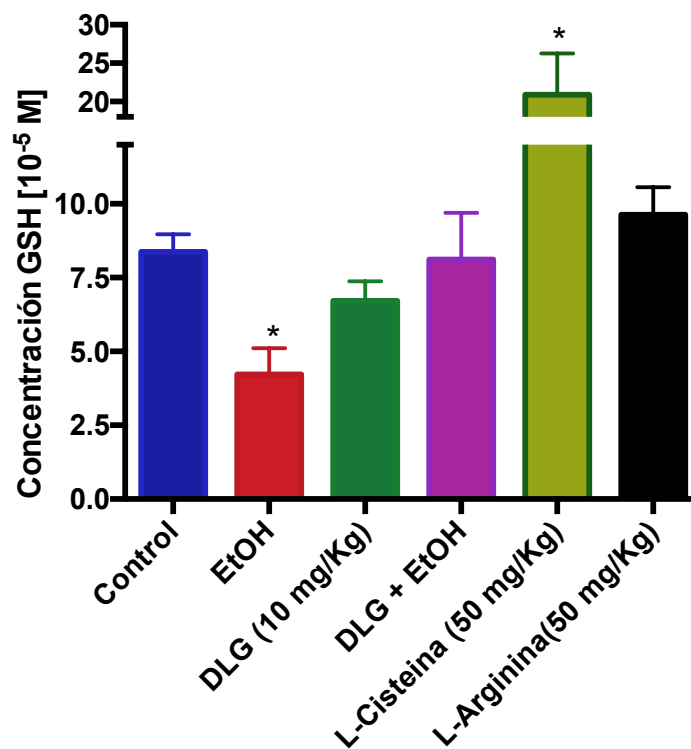
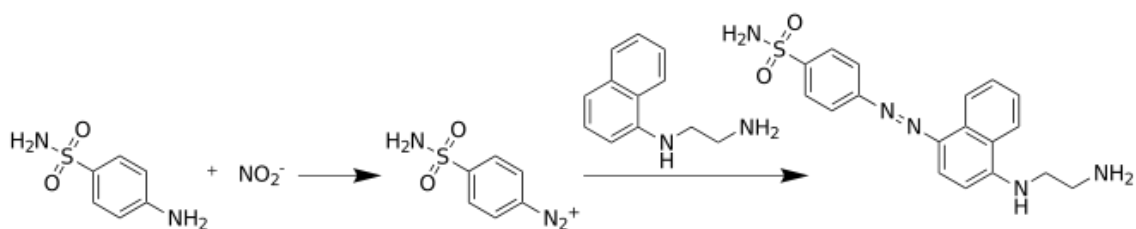


Figura 31: Concentraciones de glutatión presentes en homogenados del tejido gástrico, pre tratados con salina (control), ulcerados (EtOH), DLG 10 mg/Kg, L-cisteína fue utilizado como control positivo mientras que L-arginina como control negativo. Cada barra representa el promedio \pm EEM del total de daño en la superficie del estómago ($n = 6$). ANADEVIA de 1 vía, con prueba *post hoc* Tukey * $p < 0.05$ vs control.

Los resultados muestran que los niveles del GSH en el estómago se encuentran en $83.79 \pm 5.96 \mu\text{M}$. La inducción de la úlcera gástrica por el etanol disminuyó las concentraciones totales del glutatión a $42.27 \pm 8.87 \mu\text{M}$. Se ha descrito que la exposición crónica con etanol depleta los niveles de GSH tanto in vivo [142] como in vitro, además que la sobreproducción del radical hidroxilo por las condiciones oxidativas que genera el etanol y la necrosis ocasionada, genera la depleción del GSH [143], también provoca la disminución de la enzima glutatión peroxidasa y de la peroxidasa gástrica [144]. El tratamiento con DLG no modifica las concentraciones totales de GSH dentro del tejido gástrico ($67.79 \pm 6.59 \mu\text{M}$), pero de forma interesante, en condiciones oxidantes, mediante la inducción de la úlcera con EtOH, el DLG previene que la concentración total disminuya $81.14 \pm 1.58 \mu\text{M}$. Estos resultados sustentan el efecto previamente observado en la (**Figura 31**), donde se demostró que el DLG favorece la liberación del H_2S , uno de los principales reguladores de la estabilización del glutatión reducido. Estudios han demostrado que el sulfuro de hidrógeno regula a la enzima glutamato cisteína ligasa (GCL), la cuál es la enzima limitante para la producción de GSH [145]. Es sabido que el ftálica Z-ligustílica, uno de los principales componentes de *L. porteri* protege contra el daño oxidativo ocasionado por el H_2O_2 en células PC12 [146]. Además, se ha demostrado que el DLG posee propiedades antioxidantes sobre células de origen umbilical previniendo el daño por H_2O_2 y disminuyendo los niveles de MDA [147]. Las propiedades antioxidantes de los ftalidos podrían explicar parte de los efectos observados contra el daño oxidativo.

Para la cuantificación de nitritos se utilizó la reacción de Griess, que es una reacción colorimétrica entre el ácido sulfanílico con los nitritos, que posteriormente formará una sal de diazonio con el compuesto N-naftil-etilendiamino, dando como resultado un producto morado, de acuerdo a la reacción siguiente:



Utilizando esta reacción se construyó una curva de calibración utilizando Nitrito de sodio como agente estándar, se tomaron concentraciones de NO_2^- , 6.25, 12.5, 25, 50 y 100 μM (Figura 32). Una vez construida la curva de calibración se analizó la concentración total de nitritos ya que dicha cuantificación es una medición indirecta de la concentración total de óxido nítrico y de otras especies nitrogenadas.

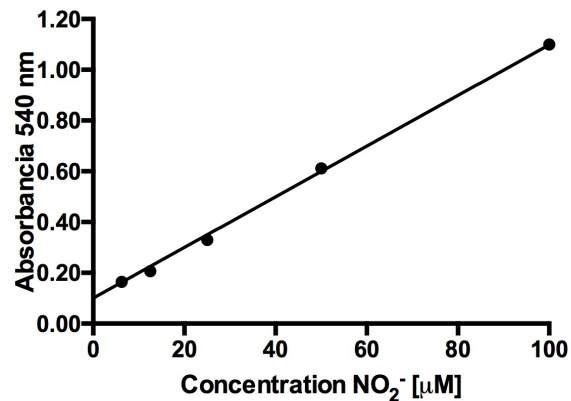


Figura 32: Curva de calibración estándar utilizada para cuantificar la concentración intracelular del nitritos (NO_2^-) en tejido estomacal cuantificada mediante la reacción entre DNTB y soluciones preparadas en el momento de Nitrito de sodio (6.25, 12.5, 25, 50 y 100 μM) fueron medidas y analizadas en un lector de placas BioRad 680 XR. La absorbancia obtenida de cada solución fue graficada vs la concentración de NO_2^- . $n = 3$, $r^2 = 0.996$ para la ecuación $\text{Abs} = 0.00998 \pm 0.00014[\text{NO}_2^-] + 0.1005 \pm 0.0066$, con una pendiente diferente de cero, $p < 0.001$.

Se realizó la cuantificación de nitritos totales en el tejido gástrico administrado únicamente con solución salina en animales con ayuno de 10 h. Los resultados indican que la concentración total es de $14.58 \pm 0.55 \mu\text{M}$. De nueva cuenta se cuantificó la concentración de estas especies en animales a los que se les desarrolló la úlcera gástrica con la administración de EtOH abs y la concentración de nitritos se incrementó hasta un máximo de $66.71 \pm 12.06 \mu\text{M}$. Esto se debe principalmente a que, dado que el etanol es por un lado un agente oxidante, favorece la conversión de especies intermedias como, óxido nítrico (NO), dióxido de nitrógeno (NO_2), trióxido de dinitrógeno (N_2O_3), peroxinitrito (ONOO^-), que son convertidas en nitritos (NO_2^-) [148] en condiciones oxidantes, por lo que dicho enriquecimiento se logra observar en nuestros resultados. Además, cuando los nitritos entran en contacto con el pH ácido del jugo gástrico son rápidamente protonados formando ácido nitroso (HNO_2), que

también puede descomponerse en las especies antes mencionadas, generando un ciclo de oxidación consecutiva. El tratamiento con DLG no modificó la concentración total de nitritos en el tejido homogenizado ($11.36 \pm 4.4 \mu\text{M}$), en animales sin presencia de úlceras. Sin embargo, en los animales que fueron pre-tratados con DLG y se les indujo la úlcera con EtOH, se observa que el DLG previno que la concentración total de nitritos se incrementara llegando a una concentración final de $20.33 \pm 4.26 \mu\text{M}$. Estos resultados indican que el DLG, a través de mecanismos directos o indirectos, regula las condiciones que disminuye el estrés oxidativo en general o favoreciendo la activación de otros mediadores que tienen como blanco enzimas reductoras que favorecen la conversión de NO_2^- a NO, como es el citocromo C y la enzima xantino oxidasa [149]. Esta enzima se encuentra sobreexpresada durante condiciones de isquemia o hipoxia y es una de las principales fuentes de NO en el tejido endotelial. Así mismo, existen estudio de otros productos naturales como la vitamina C y los polifenoles que incrementan la concentración total de NO en el estómago, sugiriendo que ambas moléculas cuentan con características antioxidantes[150].

Se utilizó L-cisteína como control negativo dado que es un aminoácido esencial que no participa en la biosíntesis de compuestos nitrogenados. Los resultados muestran que no modifica la concentración total de estas especies ($20.08 \pm 1.61 \mu\text{M}$). Mientras que L-arginina, si disminuyó la concentración total de nitritos ($4.69 \pm 0.83 \mu\text{M}$) esto puede explicarse debido a que en condiciones de daño e inflamación aguda se favorece la depuración total de arginina [151], y solamente el 1.6% de la arginina circulante entra en la vía de biosíntesis del óxido nítrico (**Figura 33**).

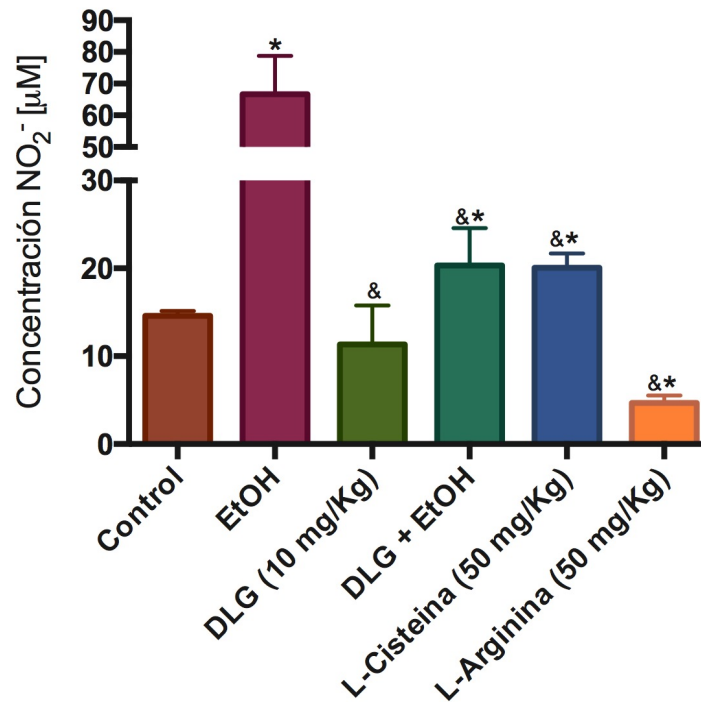


Figura 33: Concentraciones de nitritos presentes en homogenados del tejido gástrico, pre tratados con salina (control), ulcerados (EtOH), DLG 10 mg/Kg, L-cisteína fue utilizado como control negativo mientras que L-arginina como control positivo. Cada barra representa el promedio \pm EEM del total de daño en la superficie del estómago ($n = 6$). ANADEVIA de 1 vía, con prueba *post hoc* Tukey * $p < 0.05$ vs control & $p < 0.05$ vs EtOH.

5.11.2 Efecto del DLG sobre la formación de los S-nitrosotioles

Con los resultados anteriores se pudo observar que el DLG regula los niveles de los mediadores endógenos, además de favorecer la liberación de H₂S. Por otro lado, se observó que la administración de S-nitrosotioles exógenos posee efecto gastroprotector. El siguiente paso fue determinar si el DLG regula la formación de S-nitrosotioles, tomando en cuenta que se requiere de una reacción entre un grupo tiol (-SH) y un grupo monóxido de nitrógeno (NO). De acuerdo con la reacción de Saville, utilizando un metal como Cobre o mercurio, se favorece la ruptura de estas especies liberando NO.

Se decidió cuantificar tanto las concentraciones de GSH como de NO₂⁻. Primero se administró una dosis única de nitrosotiol (SNP + Na₂S) a animales con 10 h de ayuno previo a la inducción de la úlcera gástrica. Los resultados muestran que dicha actividad no previno que se disminuyera el nivel de GSH contenido en el tejido ($5.24 \pm 0.30 \mu\text{M}$) con respecto al control ($8.37 \pm 0.59 \mu\text{M}$) (**Figura 34**). Posteriormente, al utilizar CuCl₂

junto con la pre-administración de nitrosotiol (SNP + Na₂S + CuCl₂) el nivel de GSH se mantiene constante ($7.08 \pm 0.88 \mu\text{M}$), inclusive en presencia del agente oxidante EtOH (Figura 34).

El siguiente paso fue determinar si el DLG favorece la formación de S-nitrosotioles o estabiliza estas especies, sustituyendo uno de los precursores de su formación por el DLG. Para ello, se utilizó la mezcla entre DLG + SNP y los resultados muestran que dicha combinación evita que la concentración total de GSH se mantenga, disminuyéndola hasta $3.36 \pm 0.51 \mu\text{M}$ (Figura 34). Cabe destacar que dicha combinación abolió completamente la protección del DLG sobre la concentración de GSH como se había mencionado anteriormente (Figura 31). La siguiente combinación fue entre el DLG + Na₂S, de igual forma se puede observar que con la administración del EtOH la concentración disminuye a $3.16 \pm 0.33 \mu\text{M}$ (Figura 34), depletando la concentración total de GSH. Finalmente, se utilizaron a todos los componentes para la formación de los S-nitrosotioles (SNP+Na₂S) junto con el DLG. Nuevamente podemos observar que la mezcla de los tres elementos no previene la disminución en la concentración total de GSH ($4.59 \pm 0.41 \mu\text{M}$) (Figura 34)

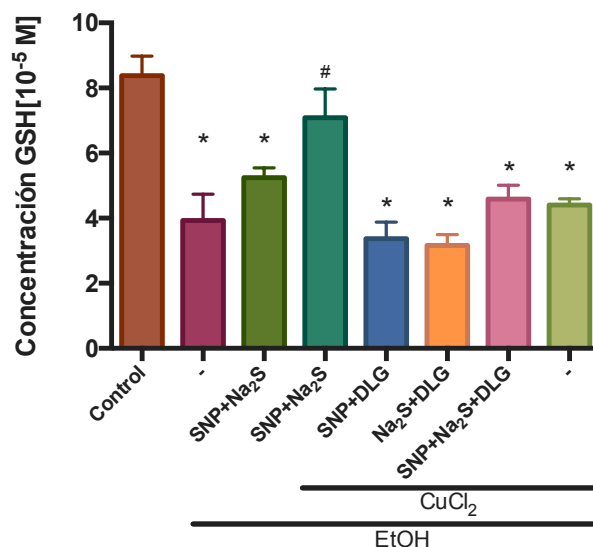


Figura 34: Concentración de glutatión reducido (GSH), presente en homogenados de tejido gástrico. La formación de nitrosotioles se llevó a cabo mediante la adición de SNP + Na₂S, mientras que la degradación se realizó mediante la adición de CuCl₂. DLG fue substituido por una de las fuentes para la formación de los compuestos RNSO. Cada barra representa el promedio \pm EEM del total de daño en la superficie del estómago ($n = 6$). * $p < 0.05$ vs control, # $p < 0.05$ vs EtOH, ANADEVIA de 1 vía, con la prueba *post hoc* de Tukey.

Estos resultados indican que la combinación de los diferentes mediadores NO y H₂S incrementa el estrés oxidativo, teniendo como consecuencia la disminución de los agentes antioxidantes como el glutatión reducido. Las especies nitrogenadas y azufradas tienen la capacidad de reaccionar entre ellas, modulando su actividad y liberación. También se pueden reactivar los sistemas de vías convergentes y finalmente reaccionar entre ellas formando especies totalmente diferentes con blancos moleculares particulares. Como se mencionó antes, el oxígeno puede reaccionar con especies nitrogenadas dando como resultado NO₂, N₂O₃, y con el H₂S formando especies azufradas oxidadas como sulfitos (SO₃²⁻), tiosulfatos (S₂O₃²⁻), dependiendo de las concentraciones de reactivos y reactantes o del pH [152]. Dichas especies son prooxidantes que favorecen la formación de especies reactivas de oxígeno, que al reaccionar con los tioles libres de las proteínas o el glutatión, terminan formando ácido sulfénico mediante la siguiente reacción: RSH + H₂O₂ → RSOH + H₂O. Estas condiciones pueden explicar la disminución en la concentración del GSH reducido. Sin embargo, cabe destacar que dichas condiciones previnieron el daño del etanol sobre la mucosa.

La siguiente fase fue cuantificar la concentración total de nitritos en la mucosa gástrica con el mismo esquema de combinaciones. La pre-administración con nitrosotioles (SNP + Na₂S) no modificó la concentración de nitritos producidos en el tejido gástrico expuesto a EtOH abs (5.86 ± 1.82 μM), la ruptura de los S-nitrosotioles con CuCl₂ favorecen la liberación de NO. Como puede observarse, el nivel de nitritos se incrementó a 30 ± 5.30 μM, aunque no llegó a la concentración observada en animales que sólo se les indujo la úlcera con EtOH abs (66.71 ± 12.08 μM).

Al sustituir uno de los componentes requeridos para la formación de RSNO, se puede observar, para la primera condición, SNP + DLG, que el nivel de nitritos incrementa hasta una concentración máxima de 24.16 ± 4.65 μM. Este mismo efecto pudo observarse al utilizar la otra combinación, DLG + Na₂S, obteniendo una concentración de 19.63 ± 2.89 μM. Sin embargo, al adicionar los S-nitrosotioles previamente formados (SNP + Na₂S) junto con el DLG se puede observar que la concentración de nitritos disminuye a 3.50 ± 1.11 μM (**Figura 35**). Estos resultados sugieren que el DLG previene la oxidación del NO y la ruptura de los S-nitrosotioles.

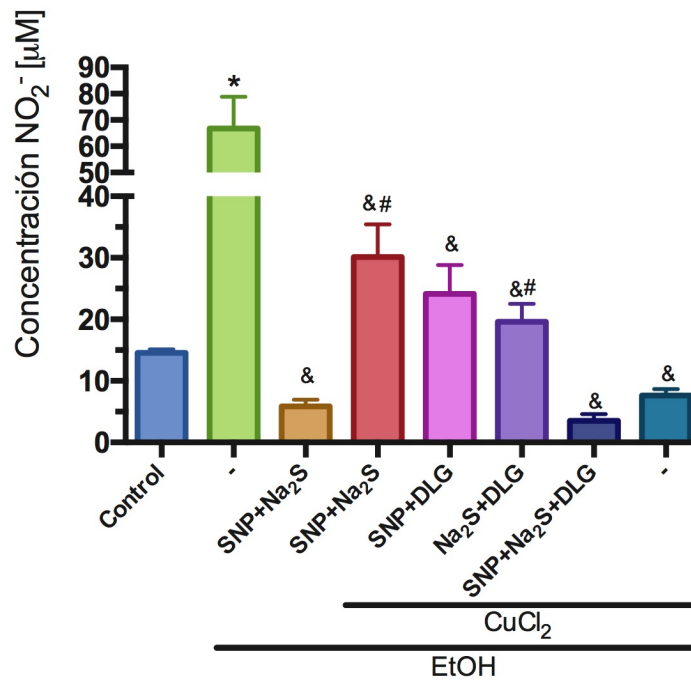


Figura 35: Concentración de nitritos (NO_2^-), presente en homogenados de tejido gástrico, la formación de nitrosotioles se llevó a cabo mediante la adición de SNP + Na_2S , mientras que la degradación se realizó mediante la adición de CuCl_2 . DLG fue substituido por una de las fuentes para la formación de los compuestos RNSO. Cada barra representa el promedio \pm EEM del total de daño en la superficie del estómago ($n = 6$). ANADEVIA de 1 vía, con prueba *post hoc* Tukey * $p < 0.05$ vs control, & $p < 0.05$ vs EtOH, # $p < 0.05$ vs SNP + Na_2S .

5.12 Establecimiento del cultivo *ex vivo* de tejido estomacal

Debido a las limitaciones inherentes de los cultivos 2D de células epiteliales, se han diseñado estrategias para mejorar las condiciones de cultivo. El estómago es un órgano que posee una gran diversidad celular en la superficie lo que dificulta su cultivo. Aquí se utilizó un sistema con una base de gel de colágeno que favorece la rigidez y permite la difusión de los componentes liberados y el desarrollo de la matriz extracelular. Además, las secciones estomacales se colocaron sobre un fondo permeable que permite el libre paso de ambos compartimentos favoreciendo la distribución de los componentes [108, 153].

Se logró mantener las secciones de tejido estomacal lesionadas por 14 días, observándose de manera macroscópica una reducción en el área lesionada, esto

sugiere que existe un recambio en la monocapa de células lesionadas como se observa en la **Figura 36**. Y se sugiere que las secciones se mantienen en buenas condiciones.

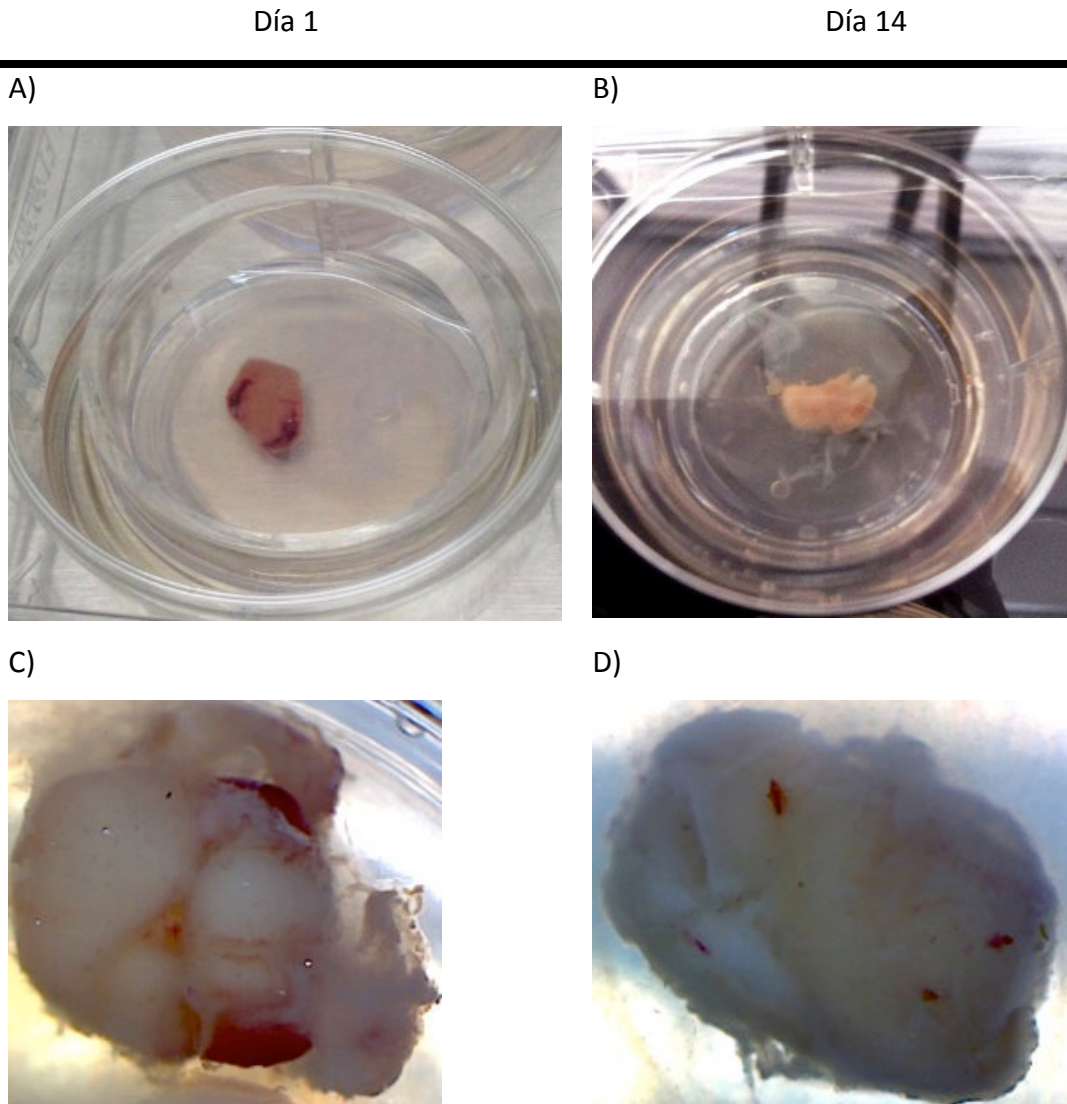
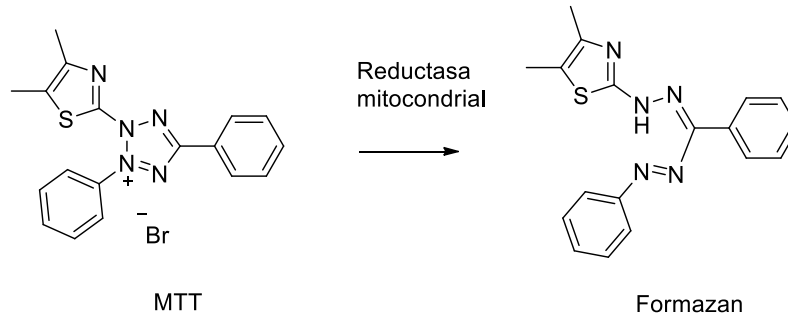


Figura 36: Cultivo 3D de secciones estomacales previamente lesionadas, los tejidos gástricos se mantuvieron en geles de colágeno dentro de una interfase con microambiente líquido-aire. A) y C) Sección lesionada previamente en animales tratados con etanol absoluto, las regiones rojizas son áreas necrosadas. B) y D) Después de mantener las secciones 14 días en condiciones in vitro se observa una disminución en el área de las regiones lesionadas. n = 3.

Para determinar que realmente las secciones se encontraban viables se realizó la prueba de MTT, un ensayo colorimétrico para determinar la actividad metabólica de las enzimas oxidoreductasas dependientes de NAD(P)H, que en condiciones definidas esto indica que las células se encuentran viables. Estas enzimas convierten al MTT, una

sustancia amarillenta, en formazán el cual es impermeable en la membrana celular, a través de un proceso reductivo (**Figura 37**).

A)



B)

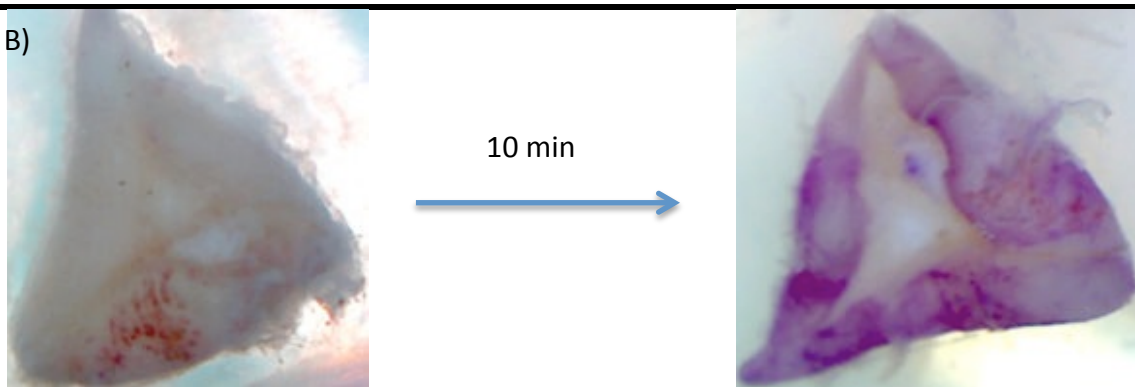


Figura 37: Prueba de viabilidad con MTT en secciones de tejido gástrico. A) Reacción de transformación de MTT por las enzimas oxidoreductasas mitocondriales a formazán, la coloración morada indica que la reacción se llevó a cabo indicando que las células se encuentran activas. B) Secciones de tejido de 14 días fueron incubadas con formazán, pasados 10 minutos se observa que la mayor parte de la sección cambia de coloración.

Los resultados indican que las secciones e tejido de 14 días, mantenidas en condiciones *in vitro*, se mantienen viables durante ese tiempo, sugiriendo así que las condiciones de cultivo y los nutrientes adicionados son adecuados para mantener la proliferación celular.

Finalmente se realizaron cortes histológicos en las secciones de tejido estomacal para determinar si las condiciones de cultivo mantenían la organización celular. Uno de los principales problemas que se genera al tener secciones de cultivo *ex vivo* es que son susceptibles de perder la organización celular y la desdiferenciación, perdiendo la polarización de la monocapa. Dado que el estómago es un órgano de alto recambio en el epitelio, es necesario asegurar que dichas condiciones mantengan la organización por tiempos prolongados para garantizar los estudios *in vitro*.

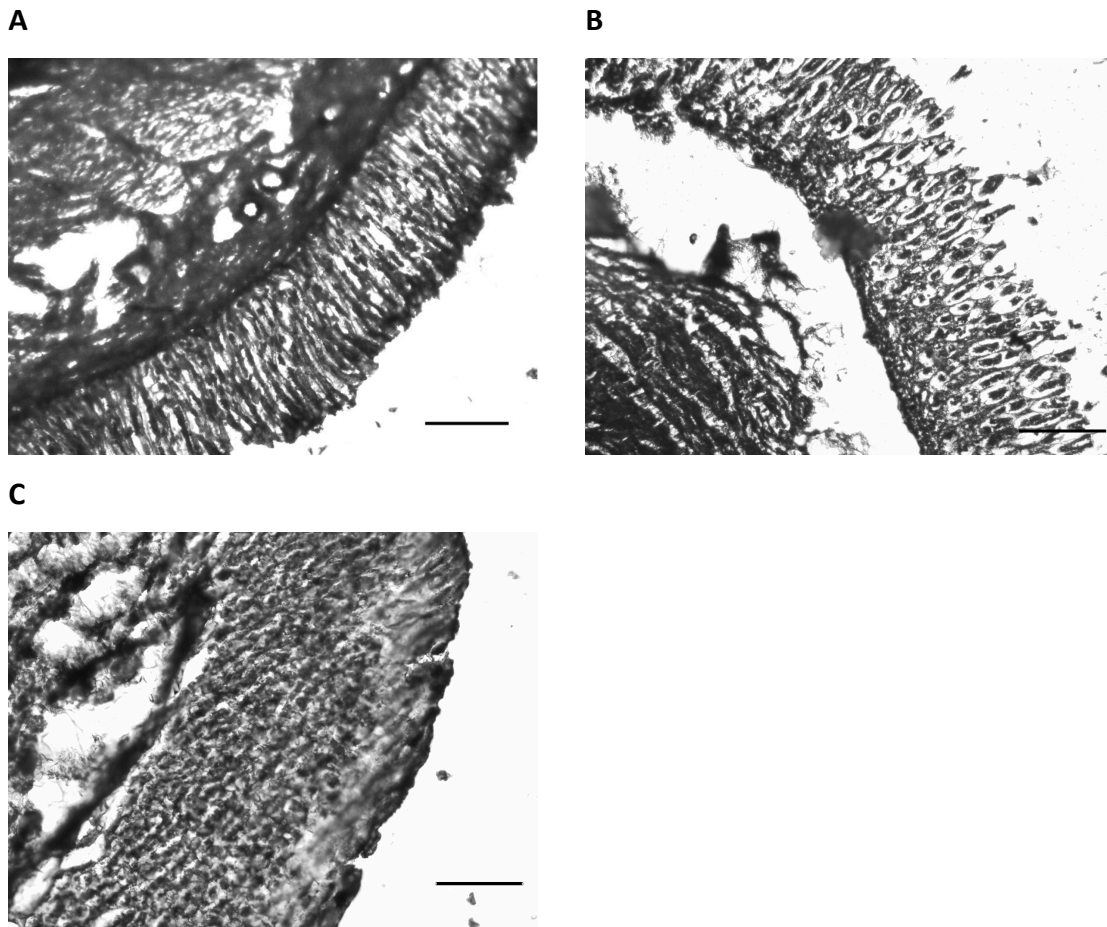


Figura 38: Fotomicrografías de la mucosa gástrica (aumento 40 X): A) Control, B) Secciones de animales previamente tratados con EtOH. Puede observarse la ruptura de las glándulas gástricas y pérdida de las células epiteliales, C) Secciones de tejido de animales previamente tratados con EtOH, y expuestas con DLG 1 mM en el medio de cultivo por 48 h. Barra = 100 μ m.

El análisis microscópico indica que las condiciones de cultivo mantienen la arquitectura celular de estas secciones estomacales, manteniendo la organización celular y sobre todo preservando la mucosa gástrica y la continuidad de las células epiteliales, además de mantener la región muscular de forma organizada por debajo de la zona mucosa (**Figura 38a**). En las secciones de tejido de animales pre-tratados con etanol y luego preservados *in vitro* por 7 días se logra observar la discontinuidad del epitelio, el adelgazamiento de la mucosa gástrica y la desorganización de la región basal a la mucosa y hemorragia interna (**Figura 38b**). Finalmente, se tomaron secciones de tejido de animales ulcerados mediante el pre-tratamiento con etanol; al segundo día de

cultivo, el medio se recambió con otro que contenía DLG (disuelto en DMSO < 0.5%) a la concentración final de 1 mM durante 48 h. Los resultados muestran que el DLG favorece el restablecimiento y la organización de la mucosa gástrica (**Figura 38c**).

El presente estudio es el primero en investigar el potencial protector de la raíz de *Ligusticum porteri* en las lesiones inducidas por el etanol y provee información adicional sobre el mecanismo de acción del diligustólido el componente principal de esta planta medicinal. Los resultados muestran que todos los extractos contienen metabolitos con actividad gastroprotectora destacando aquellos cuya polaridad es baja. De acuerdo con la literatura, estas fracciones son ricas en metabolitos secundarios pertenecientes a los ftálicas, entre los cuales se encuentran el Z-ligustólido (**32**) y el (Z,Z')-diligustólido (**35**). Se logró explorar a detalle el mecanismo de acción de este metabolito como agente gastroprotector ya que los resultados muestran que puede proteger a la mucosa gástrica del daño inducido por etanol a través de la vía de los sulfhidrilos no protéicos (-SH), mediante el uso de la N-etilmaleimida, un aceptor de Michael y las prostaglandinas (PGs). Además este compuesto estabiliza los nitrosotioles e inhibe la oxidación de NO a nitritos e incrementa los niveles de H₂S. También, evita que se agoten los agentes antioxidantes no proteicos del organismo, como es el caso del GSH, y acelerando la velocidad de regeneración del epitelio del estómago. Los resultados convergen entre las vías de señalización descritas para NO y H₂S, que como se mencionó anteriormente, son moléculas ubicuas y con funciones similares. La información obtenida sugiere que la actividad del DLG está relacionada con la regulación de la vía del H₂S y su efecto a través del NO. Estos efectos pueden explicarse a través de la formación de S-nitrosotioles cuyas funciones son la regulación de diferentes proteínas como los canales de NDMA y TRPV1, así como los K_{ATP}. Otra de sus funciones es como sistema de reserva para el NO. Nuestros resultados muestran que el DLG previene la liberación del NO a partir del HSNO formado, además la la concentración GSH disminuyó por la adición del H₂S o el NO con el DLG. Este efecto puede ser explicado por la formación de una molécula intermediaria como el GSNO, uno de los vaso-relajantes más poderosos [154] y que también funciona como acarreador. Podemos concluir que el DLG induce la formación *de novo* de H₂S sin la presencia de daño en la mucosa, induce y estabiliza la formación de HSNO en el tejido,

además se ha reportado que otros ftalidos poseen actividad antioxidante. Aunque se requiere de más experimentos, podemos proponer el siguiente mecanismo (**Figura 39**).

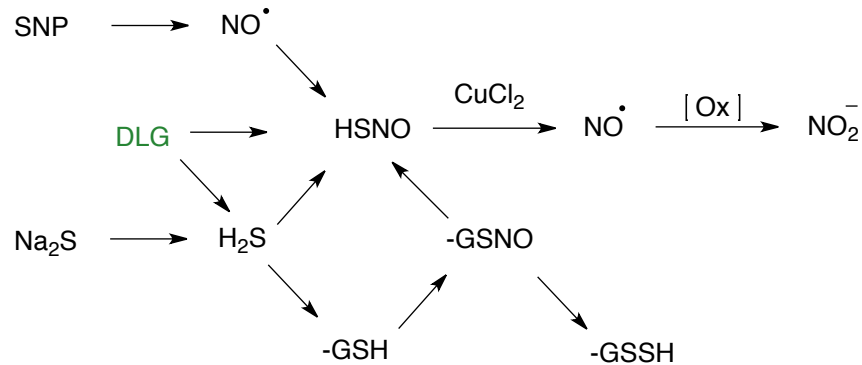


Figura 39: Formación de los S-nitrosotioles utilizando la reacción de Saville, como un posible mecanismo de acción gastroprotector del DLG en la formación de S-nitrosotioles. Los resultados indican que el DLG favorece la liberación de H_2S además previene la formación de nitritos posiblemente estabilizando los S-nitrosotioles.

Como se mencionó al inicio, las terapias disponibles para el tratamiento de la úlcera gástrica se enfocan exclusivamente al bloqueo de la secreción del HCl y a su neutralización. En años recientes se ha descrito un concepto denominado gastroprotección, el cual puede denominarse como la respuesta fisiológica de la mucosa frente a condiciones patológicas. Una de las primeras respuestas de defensa es la inflamación, la cual provoca cambios en la vascularización del tejido incrementando la permeabilidad vascular y el flujo sanguíneo, seguido por eventos celulares como la infiltración de células del sistema inmune, como macrófagos y linfocitos Th1 y neutrófilos. Estos cambios incrementan de forma considerable la cantidad de ROS generadas adelgazando y dañando la parte superficial de la región perivascular, alterando a la vez el mecanismo de la “barrera de histodilución” termino asignado por Szabo [155]. Dicho de otra forma, si se disminuye la cantidad de sangre en la superficie gástrica, los agentes nocivos están en contacto con la mucosa por mayor tiempo, agravando así la condición de la mucosa. Los gastroprotectores son agentes que permiten mejorar las condiciones de las células de la mucosa, ya sea ayudando a mejorar la tasa de supervivencia o neutralizando a los agentes tóxicos, sin modificar el pH gástrico. Dado que el diligustílido cumple con estos requerimientos podemos asegurar de que se trata de un agente gastroprotector.

Conclusiones

- 1.- Los extractos orgánicos de *L. porteri* poseen metabolitos secundarios con actividad gastroprotectora en el modelo de daño gástrico inducido por el etanol.
 - 2.- El Z,Z'-diligustílido es uno de los metabolitos responsables de la actividad gastroprotectora de *L. porteri*.
 - 3.- El efecto gastroprotector del Z,Z'-diligustílido depende de la presencia de grupos sulfhidrilos libres y de prostaglandinas.
 - 4.- El Z,Z'-diligustílido favorece la producción del mediador endógeno H₂S en un modelo *in vivo* en tiempo real.
 - 5.- El Z,Z'-diligustílido previene la disminución de la concentración de glutatión reducido, la formación de nitritos en la mucosa gástrica, además de estabilizar y favorecer la formación de S-nitrosotioles (**Figura 39**).
 - 6.- Se desarrolló y validó una nueva metodología para el estudio de la liberación de H₂S en el estómago mediante el uso de un electrodo selectivo para este gas.
 - 7.- Se establecieron las condiciones para mantener secciones de tejido gástrico sano y ulcerado *ex vivo* por tiempos prolongados sin perder su organización celular y arquitectura.
 8. El Z,Z'-diligustílido y/o *Ligusticum porteri* pueden constituir un tratamiento eficaz como agente protector de la mucosa gástrica sin alterar la secreción ácida mediante un mecanismo de acción diferente al de los fármacos utilizados en clínica.
-

Perspectivas

- 1.- Realizar la obtención del extracto acuoso de las rizomas de *L. porteri* y correlacionar la actividad gastroprotectora para su uso como posible aplicación etnomédica.
 - 2.- Aislar y purificar el mayor número de metabolitos secundarios responsables de la actividad gastroprotectora demostrada, de los diferentes extractos orgánicos de *L. porteri*.
 - 3.- Evaluar la actividad gastroprotectora del monómero Z-ligustílico y correlacionar si existe relación estructura actividad con respecto al Z,Z'-diligustílico.
 - 4.- Determinar el potencial anti-inflamatorio del Z,Z'-diligustílico sobre líneas celulares de macrófagos humanos, así como determinar la participación de los mediadores inflamatorios como interleucinas, TNF- α y NF- κ B.
 - 5.- Evaluar la funcionalidad de las secciones gástricas mantenidas *ex vivo*, cuantificando la producción de HCl, pepsinógeno, gastrina y bicarbonato.
 - 6.- Realizar la medición de la producción de H₂S en las secciones gástricas a diferentes concentraciones de DLG por tiempo prolongado.
 - 7.- Evaluar la producción de H₂S en animales que presentan úlcera gástrica producida por AINEs, con el fin de correlacionar la respuesta del sistema inmune sobre la producción de este gasotransmisor.
-

Bibliografía

1. Ramakrishnan, K. and R.C. Salinas, *Peptic ulcer disease*. Am Fam Physician, 2007. **76**(7): p. 1005-12.
 2. Schubert, M.L., *Gastric secretion*. Curr Opin Gastroenterol, 2014. **30**(6): p. 578-82.
 3. Soll, A.H., *Potentiating interactions of gastric stimulants on [14 C] aminopyrine accumulation by isolated canine parietal cells*. Gastroenterology, 1982. **83**(1 Pt 2): p. 216-23.
 4. Christian Prinz, et al., *Physiology of Gastric Enterochromaffin-Like Cells*. Annual Review of Physiology, 2003. **65**(1): p. 371-382.
 5. Lindstrom, E. and R. Hakanson, *Prostaglandins inhibit secretion of histamine and pancreastatin from isolated rat stomach ECL cells*. Br J Pharmacol, 1998. **124**(6): p. 1307-13.
 6. Kulaksiz, H., et al., *Expression and cell-specific localization of the cholecystokinin B/gastrin receptor in the human stomach*. Cell Tissue Res, 2000. **299**(2): p. 289-98.
 7. Tari, A., et al., *Role of gastrin/CCK-B receptor in the regulation of gastric acid secretion in rat*. Dig Dis Sci, 1997. **42**(9): p. 1901-7.
 8. Wu, S.V., et al., *Effects of inhibition of gastric secretion on antral gastrin and somatostatin gene expression in rats*. Am J Physiol, 1990. **258**(5 Pt 1): p. G788-93.
 9. Kajimura, M., M.A. Reuben, and G. Sachs, *The muscarinic receptor gene expressed in rabbit parietal cells is the m3 subtype*. Gastroenterology, 1992. **103**(3): p. 870-5.
 10. Yamaji, N., et al., *Structural determination of two active compounds that bind to the muscarinic M3 receptor in beer*. Alcohol Clin Exp Res, 2007. **31**(1 Suppl): p. S9-14.
 11. Schubert, M.L., et al., *Inhibition of neurally mediated gastrin secretion by bombesin antiserum*. Am J Physiol, 1985. **248**(4 Pt 1): p. G456-62.
 12. Larsson, L.I., et al., *Somatostatin cell processes as pathways for paracrine secretion*. Science, 1979. **205**(4413): p. 1393-5.
 13. Schubert, M.L., N.F. Edwards, and G.M. Makhlof, *Regulation of gastric somatostatin secretion in the mouse by luminal acidity: a local feedback mechanism*. Gastroenterology, 1988. **94**(2): p. 317-22.
 14. Spicer, Z., et al., *Stomachs of mice lacking the gastric H,K-ATPase alpha -subunit have achlorhydria, abnormal parietal cells, and ciliated metaplasia*. J Biol Chem, 2000. **275**(28): p. 21555-65.
 15. Asano, S., et al., *The roles of carbohydrate chains of the beta-subunit on the functional expression of gastric H(+),K(+)-ATPase*. J Biol Chem, 2000. **275**(12): p. 8324-30.
 16. Meister, A. and M.E. Anderson, *Glutathione*. Annu Rev Biochem, 1983. **52**: p. 711-60.
 17. Mehta, A., S. Singh, and N.K. Ganguly, *Impairment of intestinal mucosal antioxidant defense system during Salmonella typhimurium infection*. Dig Dis Sci, 1998. **43**(3): p. 646-51.
 18. Wernerman, J. and F. Hammarqvist, *Modulation of endogenous glutathione availability*. Curr Opin Clin Nutr Metab Care, 1999. **2**(6): p. 487-92.
 19. Dalle-Donne, I., et al., *S-glutathionylation in protein redox regulation*. Free Radic Biol Med, 2007. **43**(6): p. 883-98.
 20. Meister, A. and S.S. Tate, *Glutathione and related gamma-glutamyl compounds: biosynthesis and utilization*. Annu Rev Biochem, 1976. **45**: p. 559-604.
 21. Shibuya, N., et al., *3-Mercaptopyruvate sulfurtransferase produces hydrogen sulfide and bound sulfane sulfur in the brain*. Antioxid Redox Signal, 2009. **11**(4): p. 703-14.
-

-
22. Steegborn, C., et al., *Kinetics and inhibition of recombinant human cystathionine gamma-lyase. Toward the rational control of transsulfuration.* J Biol Chem, 1999. **274**(18): p. 12675-84.
 23. Stipanuk, M.H., *Metabolism of sulfur-containing amino acids.* Annu Rev Nutr, 1986. **6**: p. 179-209.
 24. Chen, X., K.H. Jhee, and W.D. Kruger, *Production of the neuromodulator H₂S by cystathionine beta-synthase via the condensation of cysteine and homocysteine.* J Biol Chem, 2004. **279**(50): p. 52082-6.
 25. Banerjee, R. and C.G. Zou, *Redox regulation and reaction mechanism of human cystathionine-beta-synthase: a PLP-dependent hemesensor protein.* Arch Biochem Biophys, 2005. **433**(1): p. 144-56.
 26. Kabil, O., et al., *Reversible heme-dependent regulation of human cystathionine beta-synthase by a flavoprotein oxidoreductase.* Biochemistry, 2011. **50**(39): p. 8261-3.
 27. Puranik, M., et al., *Dynamics of carbon monoxide binding to cystathionine beta-synthase.* J Biol Chem, 2006. **281**(19): p. 13433-8.
 28. Yang, G., et al., *H₂S as a physiologic vasorelaxant: hypertension in mice with deletion of cystathionine gamma-lyase.* Science, 2008. **322**(5901): p. 587-90.
 29. Mikami, Y., et al., *Hydrogen sulfide is produced by cystathionine gamma-lyase at the steady-state low intracellular Ca(2+) concentrations.* Biochem Biophys Res Commun, 2013. **431**(2): p. 131-5.
 30. Fiorucci, S., et al., *Inhibition of hydrogen sulfide generation contributes to gastric injury caused by anti-inflammatory nonsteroidal drugs.* Gastroenterology, 2005. **129**(4): p. 1210-24.
 31. Finkelstein, J.D., *The metabolism of homocysteine: pathways and regulation.* Eur J Pediatr, 1998. **157 Suppl 2**: p. S40-4.
 32. Dominy, J.E. and M.H. Stipanuk, *New roles for cysteine and transsulfuration enzymes: production of H₂S, a neuromodulator and smooth muscle relaxant.* Nutr Rev, 2004. **62**(9): p. 348-53.
 33. Singh, S. and R. Banerjee, *PLP-dependent H₂S biogenesis.* Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics, 2011. **1814**(11): p. 1518-1527.
 34. Vandiver, M. and S.H. Snyder, *Hydrogen sulfide: a gasotransmitter of clinical relevance.* J Mol Med (Berl), 2012. **90**(3): p. 255-63.
 35. Hannestad, U., S. Margheri, and B. Sorbo, *A sensitive gas chromatographic method for determination of protein-associated sulfur.* Anal Biochem, 1989. **178**(2): p. 394-8.
 36. Ogasawara, Y., S. Isoda, and S. Tanabe, *Tissue and subcellular distribution of bound and acid-labile sulfur, and the enzymic capacity for sulfide production in the rat.* Biol Pharm Bull, 1994. **17**(12): p. 1535-42.
 37. Dello Russo, C., et al., *Evidence that hydrogen sulphide can modulate hypothalamo-pituitary-adrenal axis function: in vitro and in vivo studies in the rat.* J Neuroendocrinol, 2000. **12**(3): p. 225-33.
 38. Abe, K. and H. Kimura, *The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous neuromodulator.* J Neurosci, 1996. **16**(3): p. 1066-71.
 39. Distrutti, E., et al., *Evidence that hydrogen sulfide exerts antinociceptive effects in the gastrointestinal tract by activating KATP channels.* J Pharmacol Exp Ther, 2006. **316**(1): p. 325-35.
 40. Wang, R., *Shared signaling pathways among gasotransmitters.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(23): p. 8801-2.
 41. Johansen, D., K. Ytrehus, and G.F. Baxter, *Exogenous hydrogen sulfide (H₂S) protects against regional myocardial ischemia-reperfusion injury--Evidence for a role of K ATP channels.* Basic Res Cardiol, 2006. **101**(1): p. 53-60.
 42. Ignarro, L.J., et al., *Nitric oxide as a signaling molecule in the vascular system: an overview.* J Cardiovasc Pharmacol, 1999. **34**(6): p. 879-86.
-

-
43. Singh, V.K., et al., *Modulation of autoimmune diseases by nitric oxide*. Immunol Res, 2000. **22**(1): p. 1-19.
 44. Murad, F., *Nitric oxide signaling: would you believe that a simple free radical could be a second messenger, autacoid, paracrine substance, neurotransmitter, and hormone?* Recent Prog Horm Res, 1998. **53**: p. 43-59; discussion 59-60.
 45. Lanas, A., *Role of nitric oxide in the gastrointestinal tract*. Arthritis Research & Therapy, 2008. **10**(Suppl 2): p. S4-S4.
 46. Bulut, R., et al., *Nitric Oxide-Mediated Regulation of Gastric H⁺, K⁺-ATPase and Alcohol Dehydrogenase Following Ethanol-Induced Injury in Rats*. Digestive Diseases and Sciences, 1999. **44**(7): p. 1417-1422.
 47. Brown, J.F., et al., *Nitric oxide generators and cGMP stimulate mucus secretion by rat gastric mucosal cells*. Am J Physiol, 1993. **265**(3 Pt 1): p. G418-22.
 48. Zhao, W., et al., *The vasorelaxant effect of H(2)S as a novel endogenous gaseous K(ATP) channel opener*. Embo j, 2001. **20**(21): p. 6008-16.
 49. King, A.L., et al., *Hydrogen sulfide cytoprotective signaling is endothelial nitric oxide synthase-nitric oxide dependent*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014. **111**(8): p. 3182-7.
 50. Ondrias, K., et al., *H(2)S and HS(-) donor NaHS releases nitric oxide from nitrosothiols, metal nitrosyl complex, brain homogenate and murine L1210 leukaemia cells*. Pflugers Arch, 2008. **457**(2): p. 271-9.
 51. Filipovic, M.R., et al., *Chemical characterization of the smallest S-nitrosothiol, HSNO; cellular cross-talk of H2S and S-nitrosothiols*. J Am Chem Soc, 2012. **134**(29): p. 12016-27.
 52. Laine, L., K. Takeuchi, and A. Tarnawski, *Gastric mucosal defense and cytoprotection: bench to bedside*. Gastroenterology, 2008. **135**(1): p. 41-60.
 53. *Redox biology of the intestine*. Free Radical Research, 2011. **45**(11-12): p. 1245-1266.
 54. Atuma, C., et al., *The adherent gastrointestinal mucus gel layer: thickness and physical state in vivo*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2001. **280**(5): p. G922-9.
 55. Gendler, S.J. and A.P. Spicer, *Epithelial mucin genes*. Annu Rev Physiol, 1995. **57**: p. 607-34.
 56. deFoneska, A. and J.D. Kaunitz, *Gastroduodenal mucosal defense*. Curr Opin Gastroenterol, 2010. **26**(6): p. 604-10.
 57. Darling, R.L., et al., *The effects of aspirin on gastric mucosal integrity, surface hydrophobicity, and prostaglandin metabolism in cyclooxygenase knockout mice*. Gastroenterology, 2004. **127**(1): p. 94-104.
 58. Feng, G., et al., *DNA methylation of trefoil factor 1 (TFF1) is associated with the tumorigenesis of gastric carcinoma*. Mol Med Rep, 2014. **9**(1): p. 109-17.
 59. Werther, J.L., *The gastric mucosal barrier*. Mt Sinai J Med, 2000. **67**(1): p. 41-53.
 60. Modlin, I.M., et al., *Gastric stem cells: an update*. Keio J Med, 2003. **52**(2): p. 134-7.
 61. Leedham, S.J., et al., *The stomach periglandular fibroblast sheath: all present and correct*. Gut, 2006. **55**(2): p. 295-6.
 62. Lacy, E.R. and S. Ito, *Rapid epithelial restitution of the rat gastric mucosa after ethanol injury*. Lab Invest, 1984. **51**(5): p. 573-83.
 63. Tarnawski, A., et al., *Prostaglandin protection of the gastric mucosa against alcohol injury--a dynamic time-related process. Role of the mucosal proliferative zone*. Gastroenterology, 1985. **88**(1 Pt 2): p. 334-52.
 64. Nguyen, T., et al., *Novel Roles of Local Insulin-Like Growth Factor-1 Activation in Gastric Ulcer Healing : Promotes Actin Polymerization, Cell Proliferation, Re-Epithelialization, and Induces Cyclooxygenase-2 in a Phosphatidylinositol 3-Kinase-Dependent Manner*. The American Journal of Pathology, 2007. **170**(4): p. 1219-1228.
 65. Gryglewski, R.J., *Pharmacology of vascular endothelium. Delivered on 27 June 2004 at the 29th FEBS Congress in Warsaw*. Febs j, 2005. **272**(12): p. 2956-67.
-

-
66. Shasby, D.M., et al., *Histamine stimulates phosphorylation of adherens junction proteins and alters their link to vimentin*. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2002. **282**(6): p. L1330-8.
 67. Cervi, A.L., M.K. Lukewich, and A.E. Lomax, *Neural regulation of gastrointestinal inflammation: role of the sympathetic nervous system*. *Auton Neurosci*, 2014. **182**: p. 83-8.
 68. Stroff, T., et al., *Protection by gastrin in the rat stomach involves afferent neurons, calcitonin gene-related peptide, and nitric oxide*. *Gastroenterology*, 1995. **109**(1): p. 89-97.
 69. Wroblewski, L.E., R.M. Peek, Jr., and L.A. Coburn, *The Role of the Microbiome in Gastrointestinal Cancer*. *Gastroenterol Clin North Am*, 2016. **45**(3): p. 543-56.
 70. Harman, D., *Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry*. *J Gerontol*, 1956. **11**(3): p. 298-300.
 71. Huang, J.Q., et al., *Meta-analysis of the relationship between cagA seropositivity and gastric cancer*. *Gastroenterology*, 2003. **125**(6): p. 1636-44.
 72. Elfvin, A., et al., *Oxidative and nitrosative stress enzymes in relation to nitrotyrosine in Helicobacter pylori-infected humans*. *World J Gastrointest Pathophysiol*, 2014. **5**(3): p. 373-9.
 73. Halter, F., et al., *Cyclooxygenase 2-implications on maintenance of gastric mucosal integrity and ulcer healing: controversial issues and perspectives*. *Gut*, 2001. **49**(3): p. 443-53.
 74. Yoshida, N., et al., *Role of neutrophil-endothelial cell interactions in gastric mucosal injury induced by aspirin*. *J Clin Gastroenterol*, 1995. **21 Suppl 1**: p. S73-7.
 75. Kurose, I., et al., *Microvascular dysfunction induced by nonsteroidal anti-inflammatory drugs: role of leukocytes*. *Am J Physiol*, 1996. **270**(2 Pt 1): p. G363-9.
 76. Husain, S.S., et al., *MAPK (ERK2) kinase--a key target for NSAIDs-induced inhibition of gastric cancer cell proliferation and growth*. *Life Sci*, 2001. **69**(25-26): p. 3045-54.
 77. Tarnawski, A., et al., *GASTRIC MICROVASCULAR ENDOTHELIUM - A MAJOR TARGET FOR ASPIRIN-INDUCED INJURY AND ARACHIDONIC-ACID PROTECTION - AN ULTRASTRUCTURAL ANALYSIS IN THE RAT*. *European Journal of Clinical Investigation*, 1990. **20**(4): p. 432-440.
 78. Olbe, L., E. Carlsson, and P. Lindberg, *A proton-pump inhibitor expedition: the case histories of omeprazole and esomeprazole*. *Nat Rev Drug Discov*, 2003. **2**(2): p. 132-9.
 79. Bonamin, F., et al., *The effect of a minor constituent of essential oil from Citrus aurantium: The role of β -myrcene in preventing peptic ulcer disease*. *Chemico-Biological Interactions*, 2014. **212**: p. 11-19.
 80. Theoduloz, C., M. Pertino, and G. Schmeda-Hirschmann, *Gastroprotective Mechanisms of Action of Semisynthetic Carnosic Acid Derivatives in Human Cells*. *Molecules*, 2014. **19**(1): p. 581.
 81. Rozza, A.L., et al., *Effect of menthol in experimentally induced ulcers: Pathways of gastroprotection*. *Chemico-Biological Interactions*, 2013. **206**(2): p. 272-278.
 82. Camou-Guerrero, A., et al., *Knowledge and Use Value of Plant Species in a Rarámuri Community: A Gender Perspective for Conservation*. *Human Ecology*, 2008. **36**(2): p. 259-272.
 83. Linares, E. and R.A. Bye, Jr., *A study of four medicinal plant complexes of Mexico and adjacent United States*. *J Ethnopharmacol*, 1987. **19**(2): p. 153-83.
 84. Delgado, G., et al., *Secondary metabolites from the roots of Ligusticum porteri (Umbelliferae). X-ray structure of Z-6.6',7.3a'-diligustilide*. *Heterocycles*, 1988. **27**(6): p. 1305-12.
 85. Rivero, I., et al., *Quantitative HPLC method for determining two of the major active phthalides from Ligusticum porteri roots*. *J AOAC Int*, 2012. **95**(1): p. 84-91.
-

-
86. Cégiéla-Carlio, P., et al., *Modulation of multi-drug resistance (MDR) in Staphylococcus aureus by Osha (Ligusticum porteri L., Apiaceae) essential oil compounds*. Flavour and Fragrance Journal, 2005. **20**(6): p. 671-675.
 87. Beck, J.J. and S.C. Chou, *The structural diversity of phthalides from the Apiaceae*. J Nat Prod, 2007. **70**(5): p. 891-900.
 88. Appelt, G.D., *Pharmacological aspects of selected herbs employed in Hispanic folk medicine in the San Luis Valley of Colorado, USA: I. Ligusticum porteri (osha) and Matricaria chamomilla (manzanilla)*. J Ethnopharmacol, 1985. **13**(1): p. 51-5.
 89. Kelley, B.D., G.D. Appelt, and J.M. Appelt, *Pharmacological aspects of selected herbs employed in hispanic folk medicine in the San Luis Valley of Colorado, USA: II. Asclepias asperula (inmortal) and Achillea lanulosa (plumajillo)*. J Ethnopharmacol, 1988. **22**(1): p. 1-9.
 90. Beck, J.J. and S.-C. Chou, *The Structural Diversity of Phthalides from the Apiaceae*. Journal of Natural Products, 2007. **70**(5): p. 891-900.
 91. Mitsuhashi, H. and M. Nomura, *Studies on the Constituents of Umbelliferae Plants. XII. Biogenesis of 3-Butylphthalide. (1)*. CHEMICAL & PHARMACEUTICAL BULLETIN, 1966. **14**(7): p. 777-778.
 92. Zhang, W., et al., *Functional characterization of MpaG', the O-methyltransferase involved in the biosynthesis of mycophenolic acid*. Chembiochem, 2015. **16**(4): p. 565-9.
 93. Regueira, T.B., et al., *Molecular basis for mycophenolic acid biosynthesis in Penicillium brevicompactum*. Appl Environ Microbiol, 2011. **77**(9): p. 3035-43.
 94. Hsieh, M.T., et al., *Reversal caused by n-butylidenephthalide from the deficits of inhibitory avoidance performance in rats*. Planta Med, 2001. **67**(1): p. 38-42.
 95. Woo, J.H., et al., *Potentiation of decursinol angelate on pentobarbital-induced sleeping behaviors via the activation of GABA(A)-ergic systems in rodents*. The Korean Journal of Physiology & Pharmacology : Official Journal of the Korean Physiological Society and the Korean Society of Pharmacology, 2017. **21**(1): p. 27-36.
 96. Bjeldanes, L.F. and I.-S. Kim, *SEDATIVE ACTIVITY OF CELERY OIL CONSTITUENTS*. Journal of Food Science, 1978. **43**(1): p. 143-144.
 97. Peng, Y., et al., *l-3-n-Butylphthalide improves cognitive impairment induced by chronic cerebral hypoperfusion in rats*. J Pharmacol Exp Ther, 2007. **321**(3): p. 902-10.
 98. Chang, Q. and X.L. Wang, *Effects of chiral 3-n-butylphthalide on apoptosis induced by transient focal cerebral ischemia in rats*. Acta Pharmacol Sin, 2003. **24**(8): p. 796-804.
 99. Kuang, X., et al., *Protective effect of Z-ligustilide against amyloid beta-induced neurotoxicity is associated with decreased pro-inflammatory markers in rat brains*. Pharmacol Biochem Behav, 2009. **92**(4): p. 635-41.
 100. Su, Y.W., et al., *Ligustilide prevents LPS-induced iNOS expression in RAW 264.7 macrophages by preventing ROS production and down-regulating the MAPK, NF-kappaB and AP-1 signaling pathways*. Int Immunopharmacol, 2011. **11**(9): p. 1166-72.
 101. Robert, A., et al., *Cytoprotection by prostaglandins in rats. Prevention of gastric necrosis produced by alcohol, HCl, NaOH, hypertonic NaCl, and thermal injury*. Gastroenterology, 1979. **77**(3): p. 433-43.
 102. Wilson, G.A.M. and I.H.M. Main, *Stimulatory effect of forskolin on gastric acid secretion in the rat, in vitro and in vivo*. European Journal of Pharmacology, 1986. **123**(3): p. 371-377.
 103. Leme Tdos, S., et al., *Role of prostaglandin/cAMP pathway in the diuretic and hypotensive effects of purified fraction of Maytenus ilicifolia Mart ex Reissek (Celastraceae)*. J Ethnopharmacol, 2013. **150**(1): p. 154-61.
 104. Ellman, G.L., *Tissue sulfhydryl groups*. Arch Biochem Biophys, 1959. **82**(1): p. 70-7.
 105. Whiteman, M., et al., *Evidence for the formation of a novel nitrosothiol from the gaseous mediators nitric oxide and hydrogen sulphide*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2006. **343**(1): p. 303-310.
-

-
106. Saville, B., *A scheme for the colorimetric determination of microgram amounts of thiols*. *Analyst*, 1958. **83**(993): p. 670-672.
 107. Singh, R.J., et al., *Mechanism of nitric oxide release from S-nitrosothiols*. *J Biol Chem*, 1996. **271**(31): p. 18596-603.
 108. Ootani, A., et al., *Foveolar differentiation of mouse gastric mucosa in vitro*. *Am J Pathol*, 2003. **162**(6): p. 1905-12.
 109. Zimmermann, M., *Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals*. *Pain*, 1983. **16**(2): p. 109-10.
 110. Dembinska-Kiec, A., et al., *Effect of carbenoxolone on the biological activity of nitric oxide: relation to gastroprotection*. *British Journal of Pharmacology*, 1991. **104**(4): p. 811-816.
 111. Chavez-Pina, A.E., et al., *Carbenoxolone gastroprotective mechanism: participation of nitric oxide/(c) GMP/K(ATP) pathway in ethanol-induced gastric injury in the rat*. *Fundam Clin Pharmacol*, 2011. **25**(6): p. 717-22.
 112. Souza, R., et al., *Gastroprotective activity of alpha-terpineol in two experimental models of gastric ulcer in rats*. *Daru*, 2011. **19**(4): p. 277-81.
 113. Moraes, T.M., et al., *Effects of limonene and essential oil from Citrus aurantium on gastric mucosa: role of prostaglandins and gastric mucus secretion*. *Chem Biol Interact*, 2009. **180**(3): p. 499-505.
 114. Moraes, T.M., et al., *Healing actions of essential oils from Citrus aurantium and d-limonene in the gastric mucosa: the roles of VEGF, PCNA, and COX-2 in cell proliferation*. *J Med Food*, 2013. **16**(12): p. 1162-7.
 115. Ben Hsouna, A., et al., *Characterization of essential oil from Citrus aurantium L. flowers: antimicrobial and antioxidant activities*. *J Oleo Sci*, 2013. **62**(10): p. 763-72.
 116. Pinheiro Mde, A., et al., *Gastroprotective effect of alpha-pinene and its correlation with antiulcerogenic activity of essential oils obtained from Hyptis species*. *Pharmacogn Mag*, 2015. **11**(41): p. 123-30.
 117. Rozza, A.L., et al., *Gastroprotective mechanisms of Citrus lemon (Rutaceae) essential oil and its majority compounds limonene and beta-pinene: involvement of heat-shock protein-70, vasoactive intestinal peptide, glutathione, sulfhydryl compounds, nitric oxide and prostaglandin E(2)*. *Chem Biol Interact*, 2011. **189**(1-2): p. 82-9.
 118. Garro, M.F., et al., *Gastroprotective effects and antimicrobial activity of Lithraea molleoides and isolated compounds against Helicobacter pylori*. *J Ethnopharmacol*, 2015. **176**: p. 469-74.
 119. Delgado, G., et al., *Phthalides and Monoterpenes of the Hexane Extract of the Roots of Ligusticum-Porteri*. *Planta Medica*, 1992. **58**(6): p. 570-570.
 120. Szabo, S., J.S. Trier, and P.W. Frankel, *Sulfhydryl compounds may mediate gastric cytoprotection*. *Science*, 1981. **214**(4517): p. 200-2.
 121. Lee, S.B., et al., *Link between mitochondria and NADPH oxidase 1 isozyme for the sustained production of reactive oxygen species and cell death*. *J Biol Chem*, 2006. **281**(47): p. 36228-35.
 122. Chavez-Pina, A.E., G.R. Tapia-Alvarez, and A. Navarrete, *Inhibition of endogenous hydrogen sulfide synthesis by PAG protects against ethanol-induced gastric damage in the rat*. *Eur J Pharmacol*, 2010. **630**(1-3): p. 131-6.
 123. Qi, F., et al., *Promoter demethylation of cystathionine-beta-synthetase gene contributes to inflammatory pain in rats*. *Pain*, 2013. **154**(1): p. 34-45.
 124. Bhatia, M., et al., *Role of hydrogen sulfide in acute pancreatitis and associated lung injury*. *Faseb j*, 2005. **19**(6): p. 623-5.
 125. Collin, M., et al., *Inhibition of endogenous hydrogen sulfide formation reduces the organ injury caused by endotoxemia*. *Br J Pharmacol*, 2005. **146**(4): p. 498-505.
-

-
126. Medeiros, J.V., et al., *Hydrogen sulfide prevents ethanol-induced gastric damage in mice: role of ATP-sensitive potassium channels and capsaicin-sensitive primary afferent neurons*. *J Pharmacol Exp Ther*, 2009. **330**(3): p. 764-70.
 127. Du, J., et al., *The possible role of hydrogen sulfide as a smooth muscle cell proliferation inhibitor in rat cultured cells*. *Heart Vessels*, 2004. **19**(2): p. 75-80.
 128. Yang, G., X. Sun, and R. Wang, *Hydrogen sulfide-induced apoptosis of human aorta smooth muscle cells via the activation of mitogen-activated protein kinases and caspase-3*. *Faseb j*, 2004. **18**(14): p. 1782-4.
 129. Li, Z.G., *Quantification of hydrogen sulfide concentration using methylene blue and 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) methods in plants*. *Methods Enzymol*, 2015. **554**: p. 101-10.
 130. Shyla, B. and G. Nagendrappa, *New spectrophotometric methods for the determinations of hydrogen sulfide present in the samples of lake water, industrial effluents, tender coconut, sugarcane juice and egg*. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2012. **96**: p. 776-783.
 131. Xiao, A., et al., *L-Cysteine enhances nutrient absorption via a cystathionine- β -synthase-derived H₂S pathway in rodent jejunum*. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 2016. **43**(5): p. 562-568.
 132. Pinder, R.M., et al., *Carbenoxolone: a review of its pharmacological properties and therapeutic efficacy in peptic ulcer disease*. *Drugs*, 1976. **11**(4): p. 245-307.
 133. Gu, Q., et al., *Contribution of hydrogen sulfide and nitric oxide to exercise-induced attenuation of aortic remodeling and improvement of endothelial function in spontaneously hypertensive rats*. *Mol Cell Biochem*, 2013. **375**(1-2): p. 199-206.
 134. Meng, Q.H., et al., *Protective Effect of Hydrogen Sulfide on Balloon Injury-Induced Neointima Hyperplasia in Rat Carotid Arteries*. *The American Journal of Pathology*, 2007. **170**(4): p. 1406-1414.
 135. Dombkowski, R.A., et al., *Hydrogen sulfide mediates hypoxia-induced relaxation of trout urinary bladder smooth muscle*. *J Exp Biol*, 2006. **209**(Pt 16): p. 3234-40.
 136. Peskar, B.M., K. Ehrlich, and B.A. Peskar, *Role of ATP-sensitive potassium channels in prostaglandin-mediated gastroprotection in the rat*. *J Pharmacol Exp Ther*, 2002. **301**(3): p. 969-74.
 137. Medeiros, J.V., et al., *Role of the NO/cGMP/K(ATP) pathway in the protective effects of sildenafil against ethanol-induced gastric damage in rats*. *Br J Pharmacol*, 2008. **153**(4): p. 721-7.
 138. Wallace, J.L., et al., *Hydrogen sulfide enhances ulcer healing in rats*. *FASEB J*, 2007. **21**(14): p. 4070-6.
 139. Wilson, G.A. and I.H. Main, *Stimulatory effect of forskolin on gastric acid secretion in the rat, in vitro and in vivo*. *Eur J Pharmacol*, 1986. **123**(3): p. 371-7.
 140. Velazquez-Moyado, J.A., et al., *Gastroprotective effect of diligustilide isolated from roots of *Ligusticum porteri coulter & rose* (Apiaceae) on ethanol-induced lesions in rats*. *J Ethnopharmacol*, 2015. **174**: p. 403-9.
 141. Whiteman, M., et al., *Evidence for the formation of a novel nitrosothiol from the gaseous mediators nitric oxide and hydrogen sulphide*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006. **343**(1): p. 303-10.
 142. Fernandez-Checa, J.C., M. Ookhtens, and N. Kaplowitz, *Effect of chronic ethanol feeding on rat hepatocytic glutathione. Compartmentation, efflux, and response to incubation with ethanol*. *Journal of Clinical Investigation*, 1987. **80**(1): p. 57-62.
 143. Yoshikawa, T., et al., *Role of active oxygen, lipid peroxidation, and antioxidants in the pathogenesis of gastric mucosal injury induced by indomethacin in rats*. *Gut*, 1993. **34**(6): p. 732-737.
 144. Chattopadhyay, I., et al., *Indomethacin inactivates gastric peroxidase to induce reactive-oxygen-mediated gastric mucosal injury and curcumin protects it by*
-

-
- preventing peroxidase inactivation and scavenging reactive oxygen*. Free Radical Biology and Medicine, 2006. **40**(8): p. 1397-1408.
145. Kimura, Y., Y. Goto, and H. Kimura, *Hydrogen sulfide increases glutathione production and suppresses oxidative stress in mitochondria*. Antioxid Redox Signal, 2010. **12**(1): p. 1-13.
146. Zhang, S., et al., *Extraction, chemical analysis of Angelica sinensis polysaccharides and antioxidant activity of the polysaccharides in ischemia-reperfusion rats*. Int J Biol Macromol, 2010. **47**(4): p. 546-50.
147. Li, W., et al., *Antioxidant properties of cis-Z,Z'-3a.7a',7a.3a'-dihydroxylicustilide on human umbilical vein endothelial cells in vitro*. Molecules, 2013. **18**(1): p. 520-34.
148. Fukuto, J.M., et al., *Small molecule signaling agents: the integrated chemistry and biochemistry of nitrogen oxides, oxides of carbon, dioxygen, hydrogen sulfide, and their derived species*. Chem Res Toxicol, 2012. **25**(4): p. 769-93.
149. Cantu-Medellin, N. and E.E. Kelley, *Xanthine oxidoreductase-catalyzed reduction of nitrite to nitric oxide: Insights regarding where, when and how*. Nitric Oxide, 2013. **34**: p. 19-26.
150. Sobko, T., et al., *Gastrointestinal nitric oxide generation in germ-free and conventional rats*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2004. **287**(5): p. G993-7.
151. Kao, C.C., et al., *Arginine, citrulline and nitric oxide metabolism in sepsis*. Clin Sci (Lond), 2009. **117**(1): p. 23-30.
152. Chen, K.Y. and J.C. Morris, *Kinetics of oxidation of aqueous sulfide by oxygen*. Environmental Science & Technology, 1972. **6**(6): p. 529-537.
153. Ootani, A., et al., *Sustained in vitro intestinal epithelial culture within a Wnt-dependent stem cell niche*. Nat Med, 2009. **15**(6): p. 701-6.
154. Ondrias, K., et al., *H₂S and HS⁻ donor NaHS releases nitric oxide from nitrosothiols, metal nitrosyl complex, brain homogenate and murine L1210 leukaemia cells*. Pflügers Archiv - European Journal of Physiology, 2008. **457**(2): p. 271-279.
155. Szabo, S., *"Gastric cytoprotection" is still relevant*. J Gastroenterol Hepatol, 2014. **29 Suppl 4**: p. 124-32.
-

Publicaciones



Gastroprotective effect of diligustilide isolated from roots of *Ligusticum porteri* Coulter & Rose (Apiaceae) on ethanol-induced lesions in rats [☆]



Josué A. Velázquez-Moyado ^a, Alejandro Martínez-González ^a, Edelmira Linares ^b, Robert Bye ^b, Rachel Mata ^a, Andrés Navarrete ^{a,*}

^a Facultad de Química, Departamento de Farmacia, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Coyoacán 04510, México D.F., México

^b Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Coyoacán 04510, México D.F., México

ARTICLE INFO

Article history:

Received 27 February 2015

Received in revised form

3 July 2015

Accepted 22 August 2015

Available online 28 August 2015

Keywords:

Ligusticum porteri

Phthalides

Gastroprotection

Diligustilide

Osha

Chuchupate

Chemical compounds studied in this article:

Diligustilide (PubChem CID: 70698035)

Glibenclamide (PubChem CID: 3488)

Diazoxide (Pub ChemCID: 25014811)

Indomethacin (PubChem CID: 3715)

Forskolin (PubChem CID: 47936)

2'

5'-Dideoxyadenosine (PubChem CID: 65166)

N-ethylmaleimide (PubChemCID: 4362)

NaHS (PubChem CID: 16211346)

DL-Propargylglycine (PubChem CID: 95575)

l-NAME (PubChem CID: 135193)

Cimetidine (PubChemCID: 2756)

Carbenexolone (PubChem CID: 636402)

ABSTRACT

Ethnopharmacological relevance: The rhizome of *Ligusticum porteri* Coulter & Rose (LP) has been traditionally used by the ethnic group Raramuri in the North of México for treatment of diabetes, tuberculosis, stomachaches, diarrhea and ritual healing ceremonies. Its use as antiulcer remedy has been extended to all Mexico.

Aim of the study: To evaluate the gastroprotective activity of LP organic extracts and the major natural product diligustilide (DLG), using as experimental model the inhibition of the ethanol-induced lesions in rats.

Materials and methods: Gastric ulcers were induced by intragastric instillation of absolute ethanol (1 mL). We tested the gastroprotective activity of the organic extracts of LP and the pure compound DLG. The ulcer index (UI) was determined to measure the activity. In order to elucidate the action mechanism of DLG the animals were treated with l-NAME, N-ethylmaleimide, Forskolin, 2',5'-dideoxyadenosine, Indomethacin, Glibenclamide, Diazoxide, NaHS and DL-Propargylglycine. The pylorus-ligated rat model was used to measure gastric secretion.

Results: The oral administration of organic extracts of *Ligusticum porteri* showed gastroprotective effect at 30 mg/Kg on ethanol induced gastric lesions; hexane and dichloromethane extracts were the most active. DLG was the major compound in the hexane extract. This compound at 10 mg/kg prevented significantly the gastric injuries induced by ethanol. The alkylation of endogenous non-protein-SH groups with N-ethylmaleimide abolished the gastroprotective effect of DLG and blocking the formation of endogenous prostaglandins by the pretreatment with indomethacin attenuated the gastroprotective effect of DLG.

Conclusion: The gastroprotective activity demonstrated in this study tends to support the ethnomedical use of *Ligusticum porteri* roots. DLG, isolated as major compound of this medicinal plant has a clear gastroprotective effect on the ethanol-induced gastric lesions. The results suggest that the antiulcer activity of DLG depends on the participation of the endogenous non-protein -SH groups and prostaglandins.

© 2015 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The development of peptic ulcers and gastric mucosal damage depends on any factor such as the stress, smoking, alcohol consumption, infections with *Helicobacter pylori* and due to use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs, causes the gastric ulceration and others (Mozsik, 2010). Also an imbalance of the gastroprotective factors like, nitric oxide (NO) (Ma and Wallace, 2000),

prostaglandins (PGEs) (Hatazawa et al., 2007), hydrogen sulfide (H₂S) (Chavez-Pina et al., 2010), reactive oxidant species (ROS) (Liu et al., 2012), enzymatic and non-enzymatic antioxidants (Bandyopadhyay et al., 2001; Bhattacharjee et al., 2002), bicarbonate and mucus secretion (Johansson et al., 2013), mucosal blood flow (Abdel-Salam et al., 2001) and inflammation mediators induce peptic ulcers.

The major therapeutic target in peptic ulcers the control of the secretion of gastric acid using, antacids, H₂-Receptor antagonists and the inhibition of the proton pump (Jain et al., 2007). However, gastric ulcer therapy has been loss effectiveness in the last decade, and various etiologies contribute to generate recurrent peptic ulcer disease, and must of the drugs currently available show limited

[☆]Taken in part of Ph.D. work of Josué Arturo Velázquez-Moyado.

* Corresponding autor. Fax: +52 55 56225329.

E-mail address: anavarrt@unam.mx (A. Navarrete).

efficacy against gastric diseases.

The roots of *Ligusticum porteri* Coulter & Rose (Apiaceae) commonly referred as Osha and Chuchupate (Linares and Bye, 1987). This plant has been used traditionally in decoction to treat gastrointestinal malaises, headaches, fever and respiratory illness (Linares and Bye, 1987). In Mexican market exist several artisanal medicines in the form of capsules containing powder of this medicinal plant (Rivero et al., 2012). Phthalides (e.g. Z-ligustilide, Z-butylidenephthalide), dimeric phthalides (e.g. diligustilide, tokinolide B, riligustilide), terpenoids and phenyl propanoids (e.g. ferulic acid) have been isolated from the organic extract of *L. porteri* roots (Delgado et al., 1988, 1992).

More recently, it has been described Z-ligustilide as an α -glucosidase inhibitor (Brindis et al., 2010). The organic extract obtained from the roots increased the antimicrobial activity of norfloxacin against the MDR-*Staphylococcus aureus* strain (Cegiela-Carlioz et al., 2005). The monomeric phthalides Z-ligustilide and senkyunolide F exhibit smooth muscle relaxant activity in guinea pig ileum *in vitro* (Leon et al., 2011). The dimeric phthalide ligustilide present antiproliferative activity against lung and colon cancer cell lines (Leon and Delgado, 2012).

However, there are no reports on the gastroprotective effect of *L. porteri*, or their components. Therefore the objective of the present study was to demonstrate the gastroprotective effect of the crude drugs extracts and the major pure compound from roots of *L. porteri* using as an experimental model the inhibition of the ethanol-induced ulcers in rats (Navarrete et al., 1998).

2. Materials and methods

2.1. Plant material

The roots of *L. porteri* were collected in Basigochi (Chihuahua, Mexico) in October 2003. A voucher specimen (No. 31733) is deposited at the National Herbarium (MEXU), Mexico City.

2.2. Extraction and isolation

The dried rhizomes of *L. porteri* (5 kg) were grounded into small pieces. The plant material was extracted consecutively three times with, *n*-hexane (8.5 L), dichloromethane (8.5 L), ethyl acetate (8.5 L) and methanol (8.5 L) at room temperature (22–25 °C). After evaporated the solvents it was obtained 185.7 g of hexane extract; 330 g of dichloromethane extract, 50 g of ethyl acetate extract and 93 g of methanol extract. Hexane extract was one of the more active gastroprotective extract, therefore it was subjected to fractionation by open column chromatography on silica gel (2 kg, Merck 70–230 mesh) eluting with a gradient of hexane-ethyl acetate (from 100:0 to 0:100), affording 3.2 g of a compound identified as diligustilide (Fig. 1) (DLG; m.p. 119–120 °C) by comparison of NMR spectroscopy data with those reported for this compound (Delgado et al., 1988). Melting points were measured on a Fisher Johns apparatus and are uncorrected. The NMR spectra were recorded on a Varian Unity Plus 400 spectrometer at 400 (^1H) and 125 MHz (^{13}C) using TMS (tetramethylsilane) as the internal standard; chemical shifts were recorded as δ values.

Diligustilide (DLG): ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3, δ): 7.35 (dt, $J=9.5, 2.0$ Hz, H-7'); 5.07 (dt, $J=9.9, 1.8$ Hz, H-8'); 5.00 (dt, $J=9.9, 1.8$ Hz, H-8); 3.25 (d, H-7); 2.99 (dd, $J=7.6, 1.0$ Hz, H-6'); 2.55 (dd, $J=7.6, 1.0$ Hz, H-6); 2.40 (m, H-4/4'); 2.30 (m, H-9/9'); 2.15 (m, H-5/5'); 1.56 (m, H-10/10'); 0.92 (t, 7.5 Hz, H-11/11'), ^{13}C NMR: (125 MHz, CDCl_3, δ): 168.31 (C-1), 164.75 (C-1'), 154.83 (C-3a), 150.26 (C-3'), 147.81 (C-3), 141.89 (C-7'), 133.99 (C-7'a), 126.34 (C-7a), 112.00 (C-8), 108.46 (C-8'), 47.39 (C-3'a), 41.37 (C-7), 41.26 (C-6'), 38.12 (C-6), 30.85 (C-4'), 28.76 (C-9), 27.81 (C-5), 27.28 (C-5'),

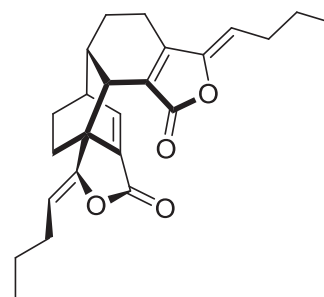


Fig. 1. Chemical structure of diligustilide (1).

25.57 (C-9'), 22.12 (C-10/10'), 19.55 (C-4), 13.72 (C-11/11').

2.3. Animals

All the experiments were performed with male Wistar rats (250–300 g) obtained from Centro UNAM-Harlan (Harlan México S.A. de C.V.). Procedures involving rats and their care were conducted in conformity with the Mexican Official Norm for Animal Care and Handling (NOM-062-ZOO-1999) and in compliance with the international rules on care and use of laboratory animals. Furthermore, clearance for conducting the studies was obtained from the Ethics Committee for the Use of Animals in Pharmacological and Toxicological Testing (CICUAL/020/11, 2011), Facultad de Química, UNAM. The sample size per group was six to nine animals. Rats were fed with standard laboratory chow and tap water *ad libitum*. The rats were placed singly in cages with wire-mesh floors and fasted 24 h before experimentation, but allowed free access to tap water.

2.4. Acute gastric ulcers induced by absolute ethanol

Ulceration was induced according to the method described by Robert (1979). Briefly, intragastric instillation of 1 mL of absolute ethanol was administered. Two hours after ethanol administration, the rats were sacrificed in a CO_2 chamber. The stomach was exposed following a midline laparotomy and opened with an incision along the greater curvature. The stomach and duodenum were removed, inflated with 10 mL of 4% paraformaldehyde, and placed in 4% paraformaldehyde for at least 15 min to fix both the inner and outer layers. The duodenum was opened along its anti-mesenteric side and the stomach along the greater curvature. An observer, unaware of the drug treatment measured the area damage (mm^2) of each lesion, the images were taken with a microscope (Celestron 44302-A), and the area of the lesions was measured with the program Image J (Rasband, W.S., Image J, U.S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://imagej.nih.gov/ij/>, 1997–2014.).

2.5. Gastroprotective activity of organic extracts and DLG obtained from *L. porteri*

To investigate whether the organic extracts or DLG administration could prevent the gastric injury caused by absolute ethanol, rats were treated orally with each extract at dose of 30 mg/kg, and 30 min later were given 1 mL of absolute ethanol orally, the rats were sacrificed 2 h later in a CO_2 chamber, and gastric mucosal damage activity evaluated as described above. The gastroprotective effect of hexane and dichloromethane extracts, were evaluated at doses of 3, 10, 30, 56 and 100 mg/kg (p.o.) and diligustilide (DLG) was tested at 10, 100 and 300 mg/kg (p.o.). We used carbenoxolone (30 mg/kg p.o.) as a positive control for gastroprotection (Chavez-Pina et al., 2011).

2.6. Ethanol-induced gastric mucosal lesions in N^G-nitro-L-arginine methyl ester pretreated rats

To investigate the involvement of endogenous NO in the gastroprotective effect of DLG, N^G-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME, 70 mg/kg dissolved in saline solution) an inhibitor of NO synthase (NOS) activity was subcutaneously administered 30 min before the administration of DLG (10 mg/kg p.o.) (Navarrete et al., 2005). The gastric mucosal lesions were induced and measured as described above.

2.7. Ethanol-induced gastric mucosal lesions in Glibenclamide or Diazoxide pretreated rats

To investigate the involvement of K_{ATP} channels on gastroprotection induced by diligustilide (10 mg/kg p.o.), we administered glibenclamide (1 mg/kg, dissolved in NaOH 0.05 M, i.p.) or diazoxide (3 mg/kg, dissolved in NaOH 0.05 M, i.p.) (Medeiros et al., 2008) 30 min before diligustilide administration. Thirty minutes later, the gastric lesions were induced and measured as described above.

2.8. Ethanol-induced gastric mucosal lesions in Forskolin or 2',5'-Dideoxyadenosine pretreated rats

To investigate the involvement of cAMP on gastric acid secretion in the gastroprotection induced by diligustilide (10 mg/kg p.o.), we administered Forskolin (84 µg/kg, p.o.) (Wilson and Main, 1986) 30 min before the administration of diligustilide or 2',5'-Dideoxyadenosine (100 µg/kg, p.o.) (Leme Tdos et al., 2013) 15 min before the administration of the natural product. Thirty minutes later, the gastric lesions were induced and measured as described above.

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

To investigate the involvement of Prostaglandins on gastroprotection induced by diligustilide (10 mg/kg p.o.), we administered Indomethacin (10 mg/kg, s.c.) (Navarrete et al., 2005) 30 min before administration of diligustilide. Thirty minutes later, the gastric lesions were induced and measured as described above.

2.10. Ethanol-induced gastric mucosal lesions in exogenous and endogenous H₂S pretreated rats

To investigate the effect of exogenous H₂S on DLG gastroprotection, 1 h after DLG (10 mg/kg p.o.) administration, NaHS was gavaged (8.4 mg/kg p.o.) (Medeiros et al., 2009) and 30 min later the mucosal lesions were induced and measured as described above. Also to evaluate the participation of endogenous H₂S we use an inhibitor of the enzyme cystathionine γ lyase (CSE), DL-propargylglycine (25 mg/kg, dissolved in saline solution,) was intraperitoneally 1 h before the administration of DLG (10 mg/kg p.o.) (Chavez-Pina et al., 2010). The gastric mucosal lesions were induced and measured as described above.

2.11. Ethanol-induced gastric mucosal lesions in N-ethylmaleimide pretreated rats

To investigate the involvement of endogenous non-protein-SH groups in the gastroprotective effect of DLG, N-ethylmaleimide (10 mg/kg, dissolved in saline solution) an alkylator of -SH groups (Matsuda et al., 1999) was subcutaneously injected 30 min before the administration of DLG (10 mg/kg p.o.). The gastric mucosal lesions were induced and measured as described above.

2.12. Pylorus-ligated gastric secretion

The pylorus-ligated rat model first described by Shay Shay et al. (1954) was used. Gastric content was measured and analyzed for hydrogen ion concentration by potentiometer titration with 0.01 M NaOH.

2.13. Drugs

N-ethylmaleimide (NEM) (No. Cat. E3876), Indomethacin (No. Cat. I7378), N^G-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) (No. Cat. N5751), Diazoxide (No. Cat. D9035), Glibenclamide (No. Cat. G0639), Forskolin (No. Cat. F6886) 2',5'-Dideoxyadenosine (No. Cat. D7408), Sodium hydrosulfide NaHS (No. Cat. 161527), DL-Propargylglycine (No. Cat. P7888), Carbenoxolone (No. Cat. C4790) were purchased from Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA).

3. Results

The oral administration of organic extracts of *Ligusticum porteri* showed gastroprotective effect at 30 mg/kg on ethanol induced gastric lesions (Fig. 2) similar to the gastroprotective agent carbenoxolone. The hexane and dichloromethane extracts showed more activity than ethyl acetate and methanol extracts. Hexane and dichloromethane extracts showed similar composition by thin layer chromatography and showed gastroprotective effect in a dose-dependent form (Fig. 3). Hexane extract showed the presence of a major component that was isolated and identified as diligustilide (DLG) (1). The oral administration of this compound at 10, 100 and 300 mg/kg prevented significantly the gastric injuries induced by ethanol (Fig. 4), but it did not inhibit the gastric secretion in the pylorus-ligated rat model (Table 1). In the exploration of the action mechanism of DLG; the alkylation of endogenous non-protein-SH groups with N-ethylmaleimide abolished the gastroprotective effect of DLG (Fig. 5) and the blocking the formation of endogenous prostaglandins by the pretreatment with indomethacin attenuated the gastroprotective effect of DLG (Fig. 6). The increase of exogenous H₂S with NaHS significantly attenuated the gastroprotective effect of DLG (Fig. 7A), however the reduction of endogenous H₂S using Propargylglycine, a CSE inhibitor, the protective effect of DLG still remains (Fig. 7B). Diminishing the endogenous level of NO by L-NAME did not reverse the DLG-induced gastroprotective

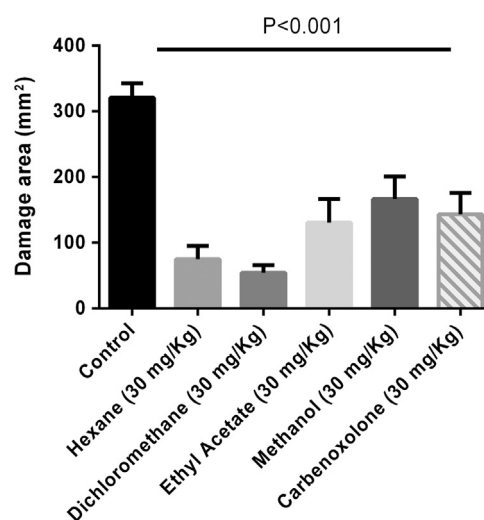


Fig. 2. Gastroprotective activity of the organic extracts (30 mg/kg) obtained from *L. porteri* on total area of lesion and carbenoxolone (30 mg/kg). Results are mean ± SEM for six rats. Statistical comparison was performed using ANOVA followed by Dunnett's t test.

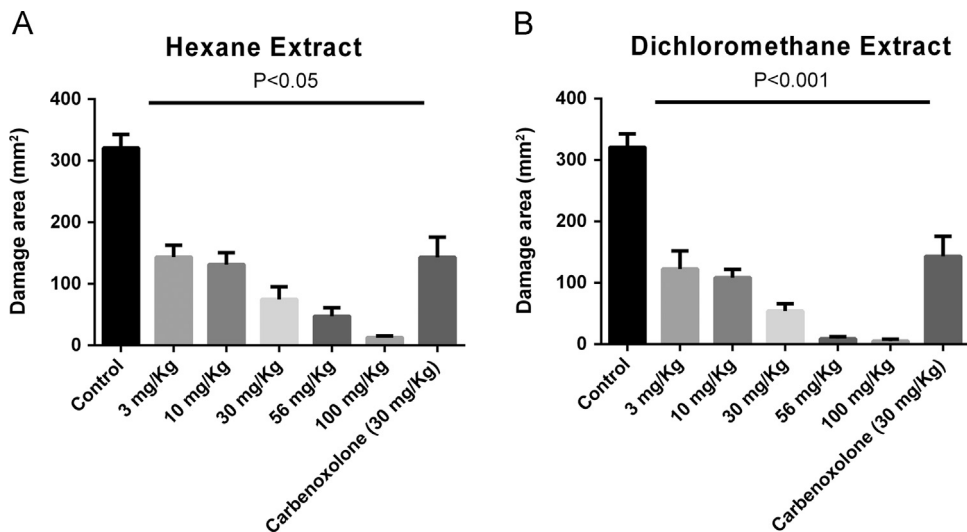


Fig. 3. Dose-response curves for gastroprotective activity of the Hexane (A) and Dichloromethane (B) extracts obtained from *L. porteri* on total area of lesion. Results are mean \pm SEM for six rats. Statistical comparison was performed using ANOVA followed by Dunnett's *t* test.

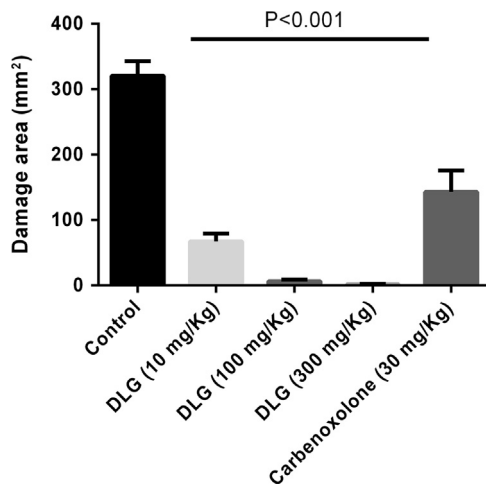


Fig. 4. Dose-response curve for gastroprotective activity of diligustilide (DLG) obtained from *L. porteri* against ethanol-induced lesions. Results are mean \pm SEM for six rats. Statistical comparison was performed using ANOVA followed by Dunnett's *t* test.

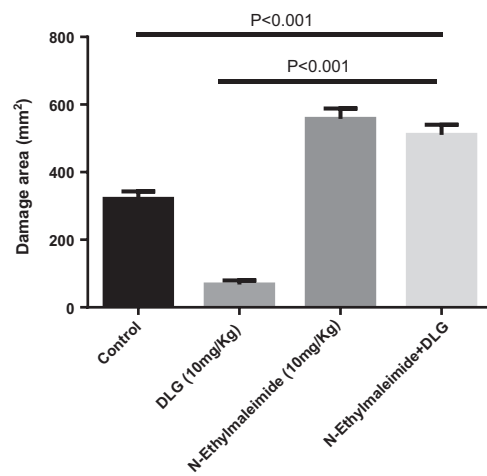


Fig. 5. Effect of pretreatment with NEM (N-Ethylmaleimide, 10 mg/kg s.c.) on DLG (diligustilide, 10 mg/kg p.o.) gastroprotection on gastric lesions induced by ethanol in rats.

Table 1

Gastric secretion volumes (mL), acid output (μ eq) and pH of rats treated with diligustilide of *L. porteri* p.o. or cimetidine.

Treatment	Dosage (mg/kg)	Gastric secretion		
		Acid output (μ eq)	Volume (mL)	pH
Control	–	169.47 \pm 20.02	1.24 \pm 0.14	5.00 \pm 0.41
Cimetidine	10	53.57 \pm 21.83*	0.95 \pm 0.17*	6.62 \pm 0.14
DLG	10	151.2 \pm 15.06	1.04 \pm 0.15	5.33 \pm 0.28

Results are mean \pm S.E.M. for six rats. Statistical comparison was performed using ANOVA followed by Dunnett's test.

* $P < 0.05$ vs control.

effect Fig. 8. Neither the inhibition (Fig. 9A) nor the activation (Fig. 9B) of the K_{ATP} channels attenuates the gastroprotective effect of DLG. Finally, neither the stimulation of gastric acid secretion, by increase of cAMP levels with Forskolin (Fig. 10A) nor the inhibition of gastric acid secretion by decreasing the levels of cAMP with 2',5'-Dideoxyadenosine (Fig. 7B) reversed the DLG-induced gastroprotective effect.

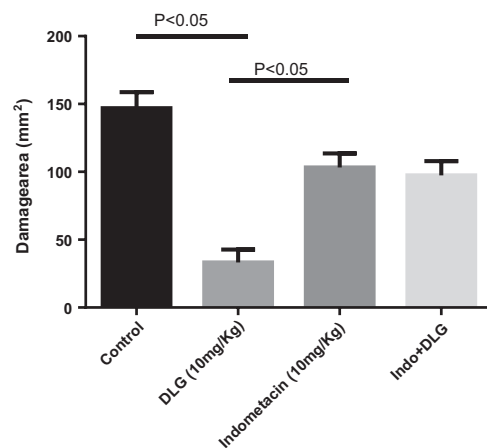


Fig. 6. Effect of pretreatment with Indomethacin (10 mg/kg i.p.) on DLG (diligustilide, 10 mg/kg p.o.) gastroprotection on gastric lesions induced by ethanol in rats. Data are presented as mean \pm S.E.M. ($n=6-9$). Statistical comparison was performed using ANOVA followed by Tukey test.

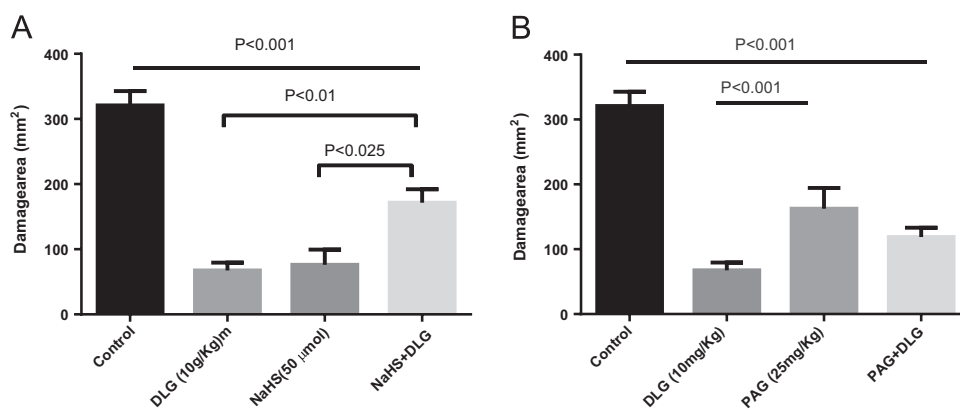


Fig. 7. (A) Effect of post-treatment with NaHS (Hydrogen Sulfide, 50 μmol p.o.) and (B) pretreatment with PAG (DL-Propargylglycine, 25 mg/kg, i.p.) on DLG (diligustilide, 10 mg/kg p.o.) gastroprotection on gastric lesions induced by ethanol in rats. Data are presented as mean ± S.E.M. ($n=6-9$). Statistical comparison was performed using ANOVA followed by Tukey test.

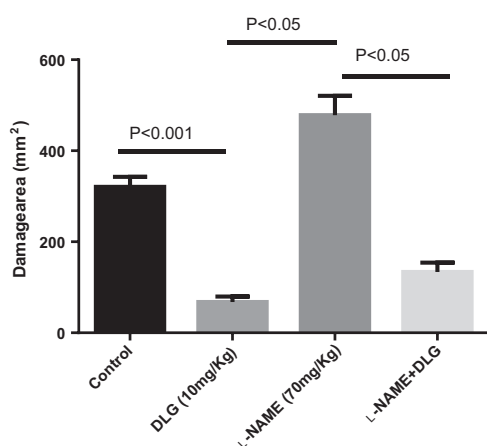


Fig. 8. Effect of pretreatment with L-NAME (70 mg/kg c.) on DLG (diligustilide, 10 mg/kg p.o.) gastroprotection on gastric lesions induced by ethanol in rats. Data are presented as mean ± S.E.M. ($n=6-9$). Statistical comparison was performed using ANOVA followed by Tukey test.

4. Discussion

The present study is the first to investigate the gastroprotective potential of *Ligusticum porteri* roots in ethanol-induced gastric lesions and provide significant novel insights into the action mechanism for the gastroprotective effect of diligustilide, the major component of this medicinal plant. The results indicate that

diligustilide can significantly protect the rat gastric mucosa from ethanol-induced injury via endogenous non-protein sulfhydryl (SH) groups and prostaglandins (PG) without inhibition of gastric secretion. Glutathione and SH groups mainly acts as scavengers of free radicals antioxidants, and maintains the viability of the cell (Hoensch et al., 2002), whereas PG at gastroprotective doses enhance gastric bicarbonate (Flemstrom, 1977) and mucus secretion (Lamont et al., 1983). It has been described that gastroprotective drugs prevent and/or accelerate healing of gastric lesions induced by ethanol and other irritant compounds such as HCl, NaOH, hot water and hypertonic NaCl, without inhibiting acid secretion (Robert et al., 1986; Szabo, 2014). Prostaglandins and sulfhydryls are endogenous substances that play a mechanistic role in gastroprotection, since -SH alkylators like N-ethylmaleimide (NEM) counteract virtually any form of gastroprotection (Szabo et al., 1992), however the cyclooxygenase inhibitor indomethacin diminished but never abolished gastroprotection by other drugs (Korman et al., 1994). Gastroprotection can be understood as a complex physiological response of the gastric mucosa under pathologic conditions. One of the first physiologic defense response is inflammation that starts with rapid vascular changes (e.g. increased vascular permeability and blood flow), followed by cellular events (e.g. infiltration by acute and chronic inflammatory cells). Thus, the increasing of vascular permeability creates a perivascular edema in the top part of the gastric lamina propria, named by Szabo Szabo (2014) "histodilutional barrier" which dilutes intraluminal toxic chemicals, delays their absorption, and preserves the integrity of subepithelial vascular

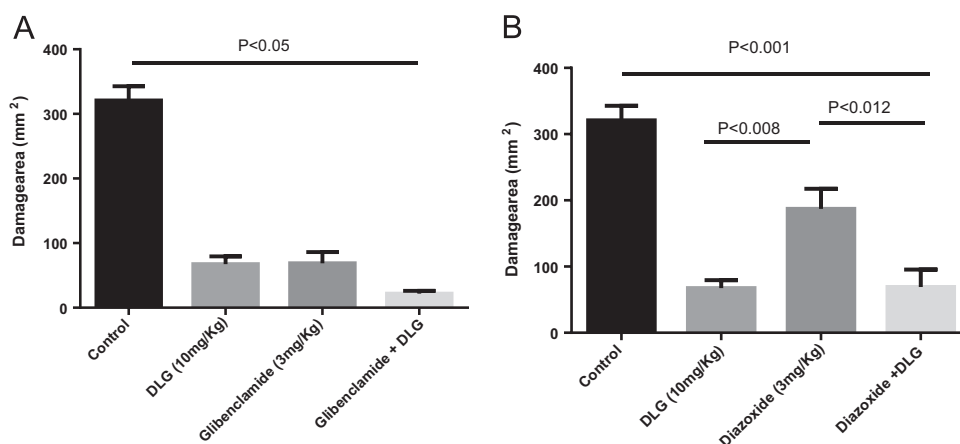


Fig. 9. (A) Effect of pretreatment with Glibenclamide (1 mg/kg i.p.) or (B) Diazoxide (3 mg/kg i.p.) on DLG (diligustilide, 10 mg/kg p.o.) gastroprotection on gastric lesions induced by ethanol in rats. Data are presented as mean ± S.E.M. ($n=6-9$). Statistical comparison was performed using ANOVA followed by Tukey test.

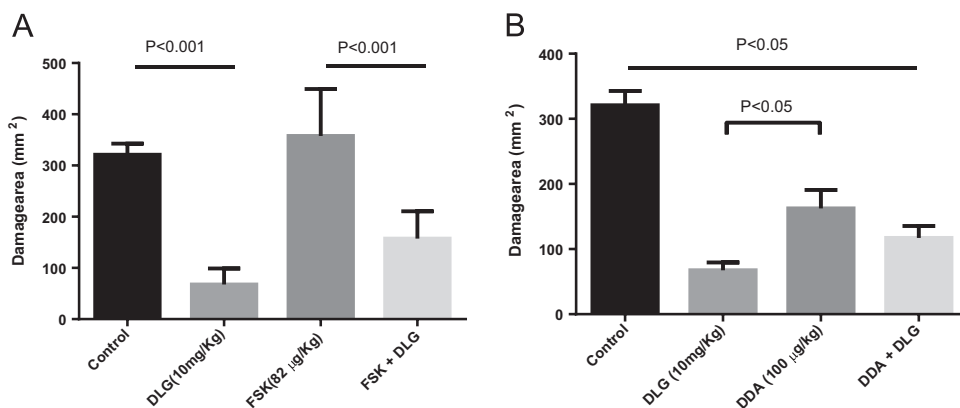


Fig. 10. (A) Effect of pretreatment with FSK (Forskolin, 84 µg/kg i.p.) and (B) DDA (2',5'-Dideoxyadenosine, 100 µg/kg, i.p.) on DLG (diligustilide, 10 mg/kg p.o.) gastroprotection on gastric lesions induced by ethanol in rats. Data are presented as mean \pm S.E.M. ($n=6-9$). Statistical comparison was performed using ANOVA followed by Tukey test.

endothelial cells allowing the maintenance of mucosal blood flow (Szabo, 2014). According this, diligustilide is a typical gastroprotective agent, because NEM completely abolished and indomethacin diminished its gastroprotective effect. Although it is probably that DLG could participate in the modulation of the synthesis of prostaglandins or by the stabilization of the sulfhydryl bonding, further studies need to be done, besides many of the mechanisms involved in the regulation of the SH groups are still unknown.

Is endogenously generated by the trans-sulfuration enzymes cystathionine β synthase (CBS) and cystathionine γ lyase (CSE) (Fiorucci et al., 2006). Another less important endogenous source of H₂S is the nonenzymatic reduction of elemental sulfur to H₂S using reducing equivalents obtained from the oxidation of glucose (Searcy and Lee, 1998). There are links between the synthesis of glutathione and the synthesis of H₂S, since L-cysteine is a common substrate for both. We, therefore, examined the possibility that the beneficial effects of DLG on ulcer healing may have been due to the presence of gastric glutathione, rather than to effects on the activity of H₂S and its synthesis (Fig. 7). First, we observed that administration of an inhibitor of CSE, propargylglycine (PAG) did not enhance the gastroprotection of DLG. Indeed, PAG reduced the gastric damage induced by ethanol. However, the increase of exogenous H₂S by NaHS diminished the gastroprotective effect of DLG. These results are in agreement with a previous work of our research group, in which we demonstrated that the levels of gastric H₂S were increased after ethanol-induced gastric damage and that they were reverted by PAG. Contrariwise, NaHS increase the levels of gastric H₂S aggravating the ethanol-induced damage (Chavez-Pina et al., 2010), therefore counteracting the gastroprotective effect of DLG.

We also demonstrate that neither the inhibition of the NO synthase nor the modulation of the K_{ATP} channels modify the activity of DLG, suggesting therefore that the NO/cGMP/K_{ATP} channels pathway did not participate in the gastroprotection of DLG on ethanol-induced gastric damage.

In conclusion, the results presented in the current study show that the crude extracts and mainly the phthalide diligustilide, isolated from *Ligusticum porteri* roots, have a clear gastroprotective effect on the ethanol-induced gastric lesions, being the first report of the gastroprotective effect for this kind phytochemical compounds.

Declaration of interest

There are no conflicts interest related with the present investigation.

Acknowledgments

Josué Velázquez-Moyado acknowledges fellowship from CON-ACyT México (244989) to carry out graduate studies. This work was supported by the Grants PAIP5000-9143 from Facultad de Química and DGAPA-UNAM IN203614 from Dirección General de Asuntos del Personal Académico, Universidad Nacional Autónoma de México.

References

- Abdel-Salam, O.M., Czimmer, J., Debreceni, A., Szolcsanyi, J., Mozsik, G., 2001. Gastric mucosal integrity: gastric mucosal blood flow and microcirculation. An overview. *J. Physiol. Paris* 95, 105–127.
- Bandyopadhyay, D., Biswas, K., Bhattacharyya, M., Reiter, R.J., Banerjee, R.K., 2001. Gastric toxicity and mucosal ulceration induced by oxygen-derived reactive species: protection by melatonin. *Curr. Mol. Med.* 1, 501–513.
- Bhattacharjee, M., Bhattacharjee, S., Gupta, A., Banerjee, R.K., 2002. Critical role of an endogenous gastric peroxidase in controlling oxidative damage in *H. pylori*-mediated and nonmediated gastric ulcer. *Free Radic. Biol. Med.* 32, 731–743.
- Brindis, F., Rodríguez, R., Bye, R., González-Andrade, M.n., Mata, R., 2010. (Z)-3-Butylideneephthalide from *Ligusticum porteri*, an α -glucosidase inhibitor. *J. Nat. Prod.* 74, 314–320.
- Cegiela-Carlioz, P., Bessiere, J.M., David, B., Mariotte, A.M., Gibbons, S., Dijoux-Franca, M.G., 2005. Modulation of multi-drug resistance (MDR) in *Staphylococcus aureus* by Osha (*Ligusticum porteri* L., Apiaceae) essential oil compounds. *Flavour Fragr. J.* 20, 671–675.
- Chavez-Pina, A.E., Tapia-Alvarez, G.R., Navarrete, A., 2010. Inhibition of endogenous hydrogen sulfide synthesis by PAG protects against ethanol-induced gastric damage in the rat. *Eur. J. Pharmacol.* 630, 131–136.
- Chavez-Pina, A.E., Tapia-Alvarez, G.R., Reyes-Ramirez, A., Navarrete, A., 2011. Carbenoxolone gastroprotective mechanism: participation of nitric oxide/ (c) GMP/K(ATP) pathway in ethanol-induced gastric injury in the rat. *Fundam. Clin. Pharmacol.* 25, 717–722.
- Delgado, G., Reza-Garduno, R.G., Toscano, R.A., Bye, R., Linares, E., 1988. Secondary metabolites from the roots of *Ligusticum porteri* (Umbelliferae). X-ray structure of Z-6',7,3a'-diligustilide. *Heterocycles* 27, 1305–1312.
- Delgado, G., Rezagarduno, R.G., Rios, M.Y., Delrio, F., 1992. Phthalides and monoterpenes of the hexane extract of the roots of *Ligusticum-Porteri*. *Planta Med.* 58, 570.
- Fiorucci, S., Distrutti, E., Cirino, G., Wallace, J.L., 2006. The emerging roles of hydrogen sulfide in the gastrointestinal tract and liver. *Gastroenterology* 131, 259–271.
- Flemstrom, G., 1977. Active alkalization by amphibian gastric fundic mucosa in vitro. *Am. J. Physiol.* 233, E1–E12.
- Hatazawa, R., Tanaka, A., Tanigami, M., Amagase, K., Kato, S., Ashida, Y., Takeuchi, K., 2007. Cyclooxygenase-2/prostaglandin E2 accelerates the healing of gastric ulcers via EP4 receptors. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 293, G788–G797.
- Hoensch, H., Morgenstern, I., Peterleit, G., Siepmann, M., Peters, W.H., Roelofs, H.M., Kirch, W., 2002. Influence of clinical factors, diet, and drugs on the human upper gastrointestinal glutathione system. *Gut* 50, 235–240.
- Jain, K.S., Shah, A.K., Bariwal, J., Shelke, S.M., Kale, A.P., Jagtap, J.R., Bhosale, A.V., 2007. Recent advances in proton pump inhibitors and management of acid-peptic disorders. *Bioorg. Med. Chem.* 15, 1181–1205.
- Johansson, M.E., Sjoval, H., Hansson, G.C., 2013. The gastrointestinal mucus system

- in health and disease. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 10, 352–361.
- Korman, M.G., Bolin, T.D., Szabo, S., Hunt, R.H., Marks, I.N., Glise, H., 1994. Sucralofate: the Bangkok review. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 9, 412–415.
- Lamont, J.T., Ventola, A.S., Maull, E.A., Szabo, S., 1983. Cysteamine and prostaglandin F₂ beta stimulate rat gastric mucin release. *Gastroenterology* 84, 306–313.
- Leme Tdos, S., Prando, T.B., Gasparotto, F.M., de Souza, P., Crestani, S., de Souza, L.M., Cipriani, T.R., Lourenco, E.L., Gasparotto Jr., A., 2013. Role of prostaglandin/cAMP pathway in the diuretic and hypotensive effects of purified fraction of *Maytenus ilicifolia* Mart ex Reissek (*Celastraceae*). *J. Ethnopharmacol.* 150, 154–161.
- Leon, A., Delgado, G., 2012. Diligustilide: enantiomeric derivatives, absolute configuration and cytotoxic properties. *J. Mex. Chem. Soc.* 56, 222–226.
- Leon, A., Toscano, R.A., Tortoriello, J., Delgado, G., 2011. Phthalides and other constituents from *Ligusticum porteri*; sedative and spasmolytic activities of some natural products and derivatives. *Nat. Prod. Res.* 25, 1234–1242.
- Linares, E., Bye Jr., R.A., 1987. A study of four medicinal plant complexes of Mexico and adjacent United States. *J. Ethnopharmacol.* 19, 153–183.
- Liu, X., Chen, Z., Mao, N., Xie, Y., 2012. The protective of hydrogen on stress-induced gastric ulceration. *Int. Immunopharmacol.* 13, 197–203.
- Ma, L., Wallace, J.L., 2000. Endothelial nitric oxide synthase modulates gastric ulcer healing in rats. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 279, G341–G346.
- Matsuda, H., Li, Y., Yoshikawa, M., 1999. Roles of capsaicin-sensitive sensory nerves, endogenous nitric oxide, sulfhydryls, and prostaglandins in gastroprotection by momordin Ic, an oleanolic acid oligoglycoside, on ethanol-induced gastric mucosal lesions in rats. *Life Sci.* 65, PL27–PL32.
- Medeiros, J.V., Bezerra, V.H., Gomes, A.S., Barbosa, A.L., Lima-Junior, R.C., Soares, P.M., Brito, G.A., Ribeiro, R.A., Cunha, F.Q., Souza, M.H., 2009. Hydrogen sulfide prevents ethanol-induced gastric damage in mice: role of ATP-sensitive potassium channels and capsaicin-sensitive primary afferent neurons. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 330, 764–770.
- Medeiros, J.V., Gadelha, G.G., Lima, S.J., Garcia, J.A., Soares, P.M., Santos, A.A., Brito, G.A., Ribeiro, R.A., Souza, M.H., 2008. Role of the NO/cGMP/K(ATP) pathway in the protective effects of sildenafil against ethanol-induced gastric damage in rats. *Br. J. Pharmacol.* 153, 721–727.
- Mozsik, G., 2010. Gastric cytoprotection 30 years after its discovery by Andre Robert: a personal perspective. *Inflammopharmacology* 18, 209–221.
- Navarrete, A., Arrieta, J., Terrones, L., Abou-Gazar, H., Calis, I., 2005. Gastroprotective effect of Astragaloside IV: role of prostaglandins, sulfhydryls and nitric oxide. *J. Pharm. Pharmacol.* 57, 1059–1064.
- Navarrete, A., Martinez-Urbe, L.S., Reyes, B., 1998. Gastroprotective activity of the stem bark of *Amphipterygium adstringens* in rats. *Phytother. Res.* 12, 1–4.
- Rivero, I., Juarez, K., Zuluaga, M., Bye, R., Mata, R., 2012. Quantitative HPLC method for determining two of the major active phthalides from *Ligusticum porteri* roots. *J. AOAC Int.* 95, 84–91.
- Robert, A., 1979. Cytoprotection by prostaglandins. *Gastroenterology* 77, 761–767.
- Robert, A., Nezamis, J.E., Lancaster, C., Hanchar, A.J., 1986. Cytoprotection by prostaglandins in rats. *Gastroenterology* 77, 433–443.
- Searcy, D.G., Lee, S.H., 1998. Sulfur reduction by human erythrocytes. *J. Exp. Zool.* 282, 310–322.
- Shay, H., Sun, C.H., Gruenstein, M., D., 1954. A quantitative method for measuring spontaneous gastric secretion in the rat. *Gastroenterology* 26, 906–913.
- Szabo, S., 2014. “Gastric cytoprotection” is still relevant. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 29 (Suppl. 4), S124–S132.
- Szabo, S., Nagy, L., Plebani, M., 1992. Glutathione, protein sulfhydryls and cysteine proteases in gastric mucosal injury and protection. *Clin. Chim. Acta Int. J. Clin. Chem.* 206, 95–105.
- Wilson, G.A., Main, I.H., 1986. Stimulatory effect of forskolin on gastric acid secretion in the rat, in vitro and in vivo. *Eur. J. Pharmacol.* 123, 371–377.



Diligustilide releases H₂S and stabilizes S-nitrosothiols in ethanol-induced lesions on rat gastric mucosa

Josué Arturo Velázquez-Moyado¹ · José Luis Balderas-López¹ · Elizabeth Arlen Pineda-Peña¹ · Brenda Lorena Sánchez-Ortiz^{1,2} · José Carlos Tavares-Carvalho² · Andrés Navarrete¹

Received: 20 July 2017 / Accepted: 19 August 2017
© Springer International Publishing AG 2017

Abstract (Z,Z')-Diligustilide (DLG) or levistolide A is a dimeric phthalide isolated from *Ligusticum porteri* (Osha), the roots of which are used in the traditional treatment of many diseases including gastric aches. However, its action has not been completely elucidated. We analyzed the contributions of hydrogen sulfide and S-nitrosothiols to the action of DLG. Animals were pretreated with freshly formed in vitro nitrosothiol using Na₂S and sodium nitroprusside to elucidate participation in the action of DLG. We also evaluated the production of H₂S in vivo and in real time on the stomach via a specific electrode introduced into the stomachs of anaesthetized animals pretreated with DLG. Treatment with 10 mg/kg DLG increases gastric H₂S production in vivo from 7.8 ± 0.81 ppm to 13.1 ± 3.01 ppm and prevents the decrease in gastric injury caused by absolute ethanol. In addition, it maintains endogenous concentrations of GSH and NO[·]. Exogenous S-nitrosothiols protect the gastric mucosa from damage, suggesting that the action of DLG might be associated with S-nitrosothiol and H₂S formation.

Keywords Hydrogen sulfide · Nitrosothiols · Diligustilide · Gastric ulcer · Gastroprotection

Taken in part of the Ph.D. work of JA Velázquez-Moyado.

✉ Andrés Navarrete
anvarrt@unam.mx

¹ Facultad de Química, Departamento de Farmacia, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Coyoacán, 04510 Ciudad de México, México

² Laboratorio de Pesquisa em Farmacos, Curso de Farmacia, Departamento de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal do Amapá, Macapa, AP, Brasil

Introduction

Gasotransmitters are small molecules that participate in several cellular communication processes; among them, nitric oxide (NO[·]), hydrogen sulfide (H₂S) and carbon monoxide are considered the three most important (Farrugia and Szurszewski 2014). These gases can diffuse through membranes without need for a transporter. In addition, they directly modify their corresponding molecular targets. These compounds are synthesized in small amounts, and their therapeutic or toxicological effects depend directly on their concentrations: at higher concentrations they react with each other and with oxygen-forming oxidant species and free radicals (Papapetropoulos et al. 2015).

These gasotransmitters directly regulate mucosal defenses: several mechanisms reportedly increase blood flow and affect the production of bicarbonate, prostaglandins, ghrelin (Sibilia et al. 2008), leptin (Motawi et al. 2008; Ptak-Belowska et al. 2008) and orexin-A (Bulbul et al. 2008).

Nitric oxide is a freely diffusible molecule capable of regulating gastric mucosal microcirculation, thus modulating the protective effect of calcitonin gene-related peptides (Magierowski et al. 2014) by controlling gastric blood flow (Konturek et al. 1993). Hydrogen sulfide mediates prostaglandin production and the activation of glutathione's antioxidant properties (Wallace 2012).

Phthalides are a group of compounds isolated primarily from herbs of the *Apiaceae* family. *Ligusticum porteri* is an endemic *Apiaceae* species distributed in México and the southern United States (Linares and Bye 1987). Its composition has been extensively reported (Brindis et al. 2011; Deciga-Campos et al. 2005; Deciga-Campos et al. 2007; Leon et al. 2011). Several activities have been reported for

compounds isolated from *L. porteri* including cardioprotective (Kim and Rhyu 2010), anti-inflammatory (Del-Angel et al. 2015) and neuroprotective (Kuang et al. 2009) effects. In previous work, we studied the gastroprotective effects of (Z,Z')-diligustilide (DLG) (levistolide A), a dimeric phthalide (Velazquez-Moyado et al. 2015). We now report the participation of NO[·] and H₂S and the stabilization of S-nitrosothiols (RSNOs) in the gastroprotective actions of DLG.

Materials and methods

Animals

All procedures complied with the Mexican Official Norm for Animal Care and Handling (NOM-062-ZOO-1999). Furthermore, clearance for conducting this study was obtained from The Ethics Committee on Animal Use of the Amapá Federal University, Macapá Brasil (CEUA-UNIFAP-006/2017, date of approval: 06 March 2017). Wistar rats weighing about 200–250 g obtained from Centro UNAM-Envigo (Envigo México S.A. de C.V.) were fed a standard diet and provided with water ad libitum. They were divided into 36 groups of six to eight animals each. The rats were placed singly in cages with wire mesh floors and were fasted with free access to tap water for 10 h before use.

Reagents

Trizma[®] base (T6066), reduced L-glutathione (GSH, G4251), 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid (D8130), nitrate reductase (9029-27-0), sodium nitrite (563218), sulfanilic acid (251917), N-alpha-naphthyl ethylenediamine (33461), sodium nitroprusside (SNP) (71778), sodium sulfide (Na₂S) (407410), sulfanilamide (S9251), DL-propargylglycine (PAG) (P7888) and hydroxylamine (HA) (159417) were purchased from Sigma-Aldrich. Absolute ethanol (99.9%), analytical reagent and Copper (II) chloride were purchased from J.T. Baker[®] chemicals. The DLG was isolated from *Ligusticum porteri* roots as described elsewhere (Velazquez-Moyado et al. 2015).

Acute gastric lesions induced by absolute ethanol

As described elsewhere (Velazquez-Moyado et al. 2015), acute gastric damage was induced by intragastric administration of 1 mL of absolute ethanol. After exposure for 2 h, the stomach was removed from the peritoneal cavity, rinsed in a phosphate buffer solution and opened along the greater curvature. Images were taken using a digital microscope (Celestron 44302-A), and the damaged area was measured using Image J software (Rasband, W.S.,

Image J, U.S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://imagej.nih.gov/ij/>, 1997–2014). Tissues were immediately preserved at –70 °C until analyses could be performed.

Participation of H₂S, NO[·] and RNSO in the action of DLG

Fasted animals were pretreated with 15, 50 or 150 μM Na₂S in isotonic saline solution *p.o.* as an exogenous source of H₂S, 12.5, 25 or 50 mg/kg PAG in isotonic saline solution *i.p.* as an irreversible inhibitor of cystathionine γ-lyase (CSE), 1, 3, 10 or 75 mg/kg HA *i.p.* as an inhibitor of the enzyme cystathionine β-synthase (CBS) or 0.1, 1, 3 or 10 mg/kg SNP as a nitric oxide donor 30 min prior to DLG administration at 10 mg/kg *p.o.* after 30 min, ethanol was administered to induce gastric lesions.

Nitrosothiols are formed by the reaction between SNP and Na₂S in equimolar concentrations at room temperature (Whiteman et al. 2006b). Although HgCl₂ has been used to determine RSNO formation, CuCl₂ was used to avoid Hg toxicity (Singh et al. 1996): $\text{GSNO} + \text{Cu}^+ + \text{H}^+ \rightarrow \text{GSH} + \text{NO}^{\cdot} + \text{Cu}^{2+}$

Reduced glutathione levels

One gram gastric tissue, which included the mucosal layer and the submucosa of segments with visible hemorrhage, was cut into small pieces and homogenized in 1 mL of ice-cold 0.02 M EDTA, 320 μL of distilled water and 400 μL of 50% aqueous tri-chloroacetic acid using an Ultra-turrax[®]. The homogenates were centrifuged at 5000 g for 15 min on a refrigerated centrifuge at 4 °C. Then, 400 μL of the supernatant was added to 800 μL of 40 mM Tris buffer (pH 8.9) and 100 μL of 10 mM 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid). The reaction was monitored for 3 min, the absorbance was read at 412 nm, using a microplate reader, and the results are expressed in GSH concentration. Standard curves were previously constructed using 10–100 μM GSH.

Nitrite levels

Nitrite quantification indirectly refers to the amount of NO[·] produced in the gastric mucosa. It was determined using a colorimetric assay of the Griess reaction (Moshage et al. 1995). Briefly, 100 μL of the supernatant was mixed with 50 μL of a solution of 1% sulfanilamide dissolved in 1% phosphoric acid after which 50 μL of 0.1% naphthyl ethylenediamine dihydrochloride was added. The resulting mixture was incubated at room temperature (22 °C) for 10 min, and absorbance at 540 nm was measured using a microplate reader; the results are expressed as NaNO₂

concentration. Standard curves were previously constructed using 1.45–100 μM NaNO₂.

Nitrosothiol formation

Nitrosothiol formation was measured using the Saville reaction (Saville 1958), a modified Griess reaction wherein 1 mM nitroprusside, an NO[•] donor, was added to 1 mN Na₂S and 1 mN CuCl₂, a reagent that converts GSNO to NO[•] and then to NO₂⁻. Nitrites were then quantified using the colorimetric assay.

Quantification of H₂S in vivo

A micro-ion-sensitive sulfide Ag/Ag₂S electrode (LS-146AGSCM; Lazar Research Laboratories, Inc., Los Angeles, CA) coupled with a digital pH/millivolt meter (6230 N) ion analyzer was used to quantify the H₂S concentration in the stomach as previously described (Velázquez-Moyado and Navarrete 2017). Briefly, fasted animals were given 10 mg/kg DLG orally. After 30 min, they were anaesthetized using sodium pentobarbital (62 mg/kg *i.p.*). The abdominal region was cleaned, an incision approximately 1 cm in length was made below the diaphragm in the epigastric region to expose the stomach and the microelectrode was placed in the middle of the stomach via a small cut in the duodenum. Millivolts were recorded at 5-min intervals for 30 min before and 30 min after 0.2 mL of absolute ethanol was administered directly into the stomach using an insulin syringe. Hydrogen sulfide concentration was calculated from Na₂S concentration. Standard curves were previously constructed using 0.1–1.0 μM Na₂S.

Data analysis

All results are presented as the mean \pm SEM over 6–8 repetitions. Experimental data were analyzed using one-way analysis of variance followed by Tukey's post hoc test. Significance was recognized when $p < 0.05$.

Results

Participation of H₂S in the action of DLG

Using Na₂S as an exogenous source of H₂S, net damage was decreased in a dose-dependent manner. At the highest concentration, 150 μM , gastric hemorrhage in the stomach was completely prevented (Fig. 1). Interestingly, when DLG was co-administered with 15 μM Na₂S, DLG activity was lost, yet when it was co-administered with either 50 or 150 μM Na₂S, its activity was maintained. This suggests

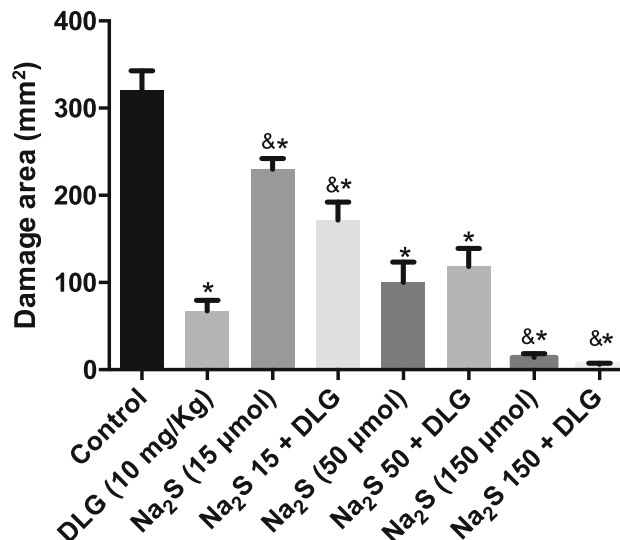


Fig. 1 Regulation of Na₂S on the effect of DLG. The concentration of Na₂S 15 μM completely abolishes the activity of DLG, well higher concentrations only exert additive effect between DLG and Na₂S. Data are represented as mean \pm SEM of six experiments. The statistical analysis was performed using a one-way ANOVA followed by a Tukey's test. * $p < 0.05$ compared with control, & $p < 0.05$ compared with DLG

that lower concentrations of H₂S regulate the gastroprotective activity of DLG.

Effects of PAG and HA on the gastroprotective effects of DLG

Inhibiting H₂S synthesis using 12.5, 25 or 50 mg/kg of PAG, an irreversible inhibitor of CSE, reduced gastric damage in a dose-dependent manner, but the gastroprotective effects of DLG were not modified (Fig. 2a). Additionally, HA, an inhibitor of CBS (Vandiver and Snyder 2012), prevented ethanol-induced damage and also did not modify the gastroprotective effects of DLG (Fig. 2b).

The effects of DLG on H₂S production

To corroborate whether DLG directly regulates H₂S liberation, this gasotransmitter was quantified using a microelectrode selective for H₂S on animals that were anaesthetized after being pretreated with a single 10 mg/kg oral dose of DLG. Results show increased basal concentrations of H₂S (13.1 \pm 3.01 ppm) almost double the amount found in the control group (7.8 \pm 0.81 ppm; Fig. 3a). 25 min after ethanol administration, the control group showed decreased H₂S levels, whereas in the group pretreated with DLG, the levels did not decrease (Fig. 3a). Comparing areas under the curves, greater total H₂S production due the DLG administration is clear (Fig. 3b).

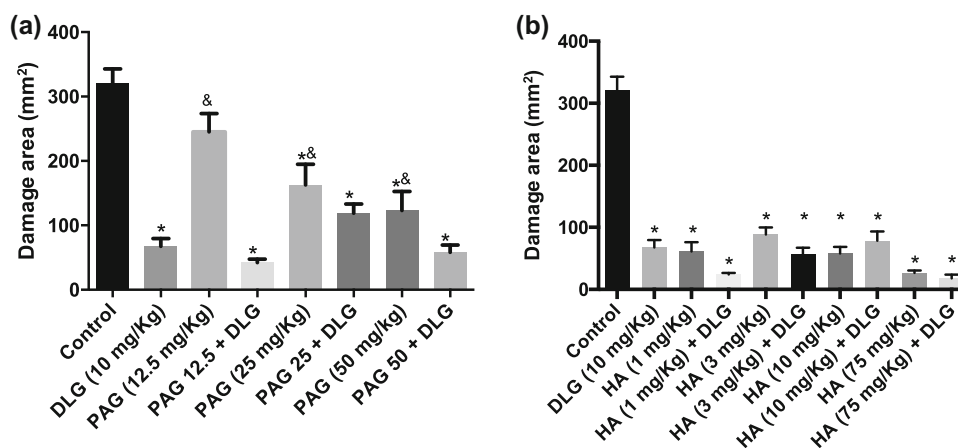


Fig. 2 **a** Blocking the activity of the enzyme CSE by PAG shows a dose–response behavior, but the gastroprotective effect of DLG was intact. The blockade of CBS by hydroxylamine (**b**) also did not modify the gastroprotective activity of DLG. Data are represented as

mean \pm SEM of six experiments. The statistical analysis was performed using a one-way ANOVA followed by a Tukey's test. * $p < 0.05$ compared with control, & $p < 0.05$ compared with DLG

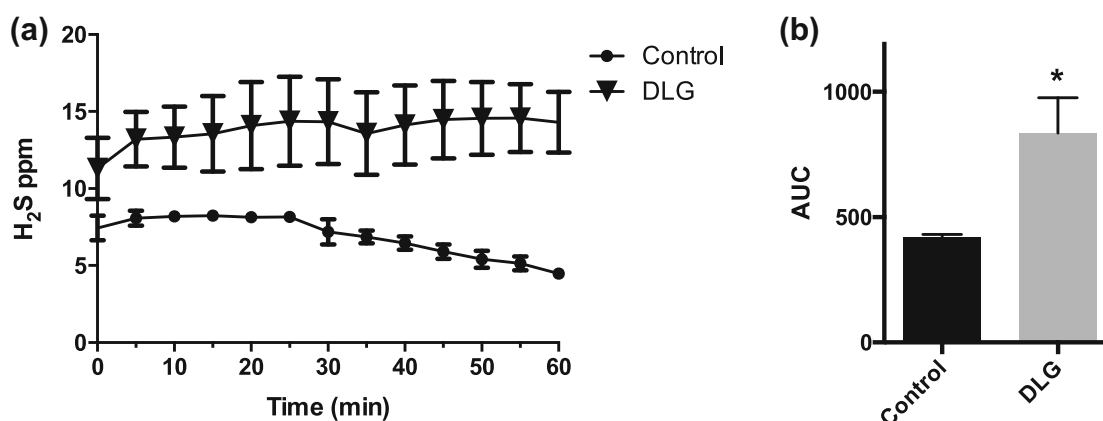


Fig. 3 **a** Temporal course of H_2S released in vivo by the stomach in fasted animals treated with saline solution (filled circle) shows a basal concentration of H_2S , 30 min later 0.2 mL of absolute ethanol was injected directly in the organ showing a decrease of the total amount of H_2S due to the necrotoxic damage of ethanol. When animals were pretreated with DLG (filled inverted triangle) the basal concentration

of H_2S increases, and even with the administration of absolute ethanol at the time of 30 min the total amount of H_2S was maintained. **b** Area under curve of the total amount of H_2S produced by the stomach corroborates the formation of the gasotransmitter as a result of the pretreatment with DLG. Data are represented as mean \pm SEM of six experiments. The statistical analysis performed was a Student t test

Effect of DLG on total production of GSH and nitrites

It is well known that ethanol depletes glutathione; this is evidenced by the oxidative conditions during gastric ulcer development. By itself, DLG did not modify the levels of this antioxidant, but it maintained the levels during ethanol-induced gastric ulcer development. The GSH precursor, L-cysteine, significantly increased total GSH, as expected (Fig. 4a). Nitric oxide can be indirectly studied by quantifying its metabolic products, the nitrite–nitrate compounds (Bhattacharyya et al. 2014), using the Griess reaction to quantify total nitrates. The action of DLG on animals with or without gastric ulcers (Fig. 4b) pre-

gavaged with a single 100 mg/kg dose of L-arginine, the precursor of NO^{\cdot} , to enrich NO^{\cdot} production was analyzed. Ethanol acts as an oxidative agent, depleting NO^{\cdot} . As expected, NO_2^- was greater in animals with gastric ulcers, but pretreatment with DLG prevented damage and the depletion of NO^{\cdot} (Fig. 4b).

Exogenous RSNO protects the gastric mucosa

Formation of RSNOs by the reaction of SNP, an NO^{\cdot} donor, with Na_2S , a donor of H_2S (Whiteman et al. 2006a), yielded a gastroprotective effect preventing the damage induced by absolute ethanol (Fig. 5). Disruption of RSNO formation by $CuCl_2$, forming H_2S and NO^{\cdot} , increased the

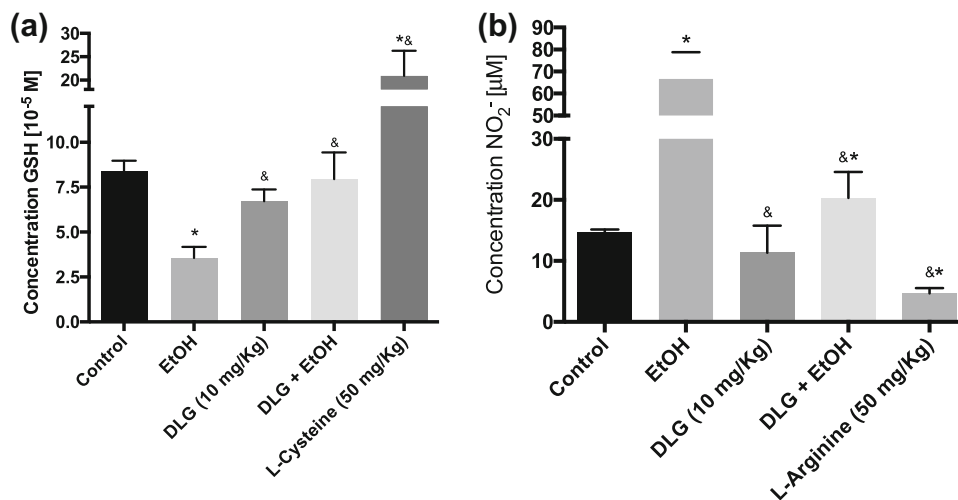


Fig. 4 a Glutathione concentrations present on gastric tissue homogenates on animals pretreated with saline (control), ulcerated (EtOH) depletes the total amount of GSH due to its oxidative and necrotic effects on the mucosa, DLG 10 mg/Kg did not modify the concentration of GSH but prevents its depletion caused by the damage of absolute ethanol, L-cysteine was used as a positive control.

b Nitrite concentrations on gastric tissue were increased in animals with gastric damage caused by ethanol, DLG 10 mg/Kg prevents the formation of nitrites on animals with gastric ulcer, here we used L-arginine as a positive control. Data are represented as mean ± SEM of 5–6 experiments. The statistical analysis performed was a Tukey’s test. **p* < 0.05 vs control, &*p* < 0.05 vs EtOH

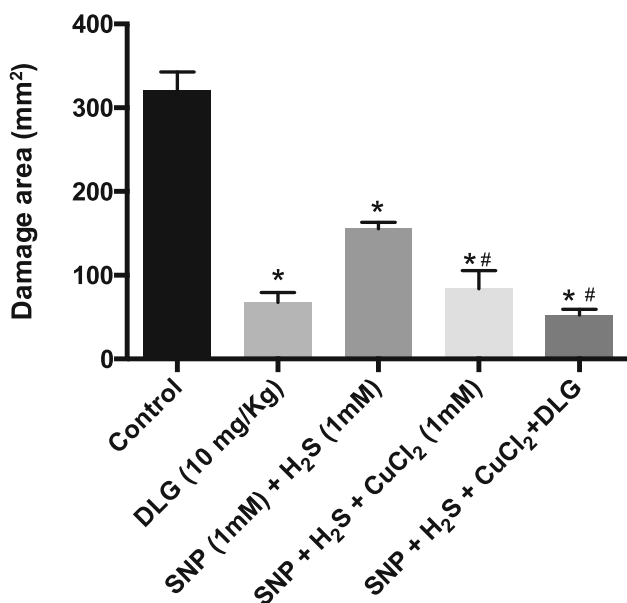


Fig. 5 In vitro formation of S-nitrosothiols prevents gastric damage induced by ethanol; using CuCl₂ enhances the liberation of NO[•] from HSNO formed by the reaction of H₂S and SNP, DLG gastroprotective effect remains. Data are represented as mean ± SEM of six experiments. The statistical analysis performed was a one-way ANOVA followed by a Tukey’s test. **p* < 0.05 compared with control, #*p* < 0.05 compared with SNP + H₂S

protective effect compared to RNSO-treated animals, and DLG maintained its gastroprotective effect, leaving these conditions unchanged (Fig. 5).

Effect of DLG on RSNO formation

To investigate the participation of DLG in RSNO formation, GSH and nitrite levels were quantified in the presence and absence of CuCl₂, used to disrupt RSNO stability. Formation of RSNOs did not prevent GSH from decreasing as a result of absolute ethanol contacting the gastric mucosa (Fig. 6a). However, disruption of RSNO production by CuCl₂ maintains normal levels of GSH because both GSH and NO[•] formed. In addition, combining DLG with SNP, Na₂S or both did not prevent depletion of GSH (Fig. 6a).

On the other hand, nitrite formation indicates the total amount of NO[•] oxidized. Nitrosothiols prevented an increase in nitrite formation in ethanol-induced damaged tissues (Fig. 6b), suggesting that NO[•] is not transformed into nitrate. When CuCl₂ was added, nitrate concentration increased, but not at levels high enough to unprotect the gastric mucosa (Fig. 6b). Oral administration of DLG with Na₂S or SNP increased total nitrate concentration on mucosa damaged by ethanol, but when RSNOs and CuCl₂ were co-administered with DLG, nitrate concentrations decreased to levels similar to that seen with only RSNOs (Fig. 6b). The final result suggests that DLG prevents NO[•] oxidation and RSNO disruption. Additionally, CuCl₂ decreased nitrite concentrations in ethanol-induced damaged gastric mucosa.

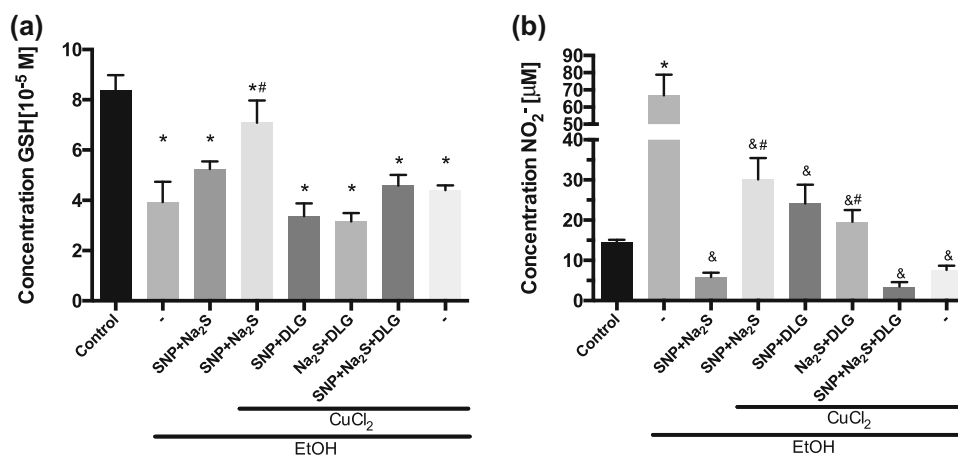


Fig. 6 **a** Glutathione and **b** nitrite concentrations present on gastric tissue homogenates. The formation of nitrosothiols was performed between the reaction of SNP + Na₂S, while the degradation was made by the addition of CuCl₂. DLG was substituted by one of the sources for the formation of RNSO compounds. Glutathione is reduced in all groups probably because of the formation of

Discussion

This work demonstrated that DLG increases H₂S levels in the gastric mucosa and stabilizes RSNO while inhibiting the oxidation of NO[•] to nitrites in ethanol-induced damaged gastric mucosa. These results provide additional information on the gastroprotective effects of this phthalide. Blocking cysteine residues using N-ethylmaleimide, a Michael acceptor, was shown to completely abolish the gastroprotective activity of DLG (Velázquez-Moyado et al. 2015); however, in this work, two of the most important gasotransmitters, H₂S and NO[•], were explored. The former regulates various functions, maintaining homeostasis in the cardiovascular (Nishida et al. 2012), neuronal (Dawe et al. 2008), renal (Ge et al. 2014) and gastrointestinal (Takeuchi et al. 2012) systems. Its physiological and pathophysiological effects are concentration dependent. Small amounts of the H₂S donor could not exert the anti-necrotic effects of ethanol on the gastric mucosa. More interestingly, the gastroprotective effects of DLG were lost with the addition of 15 μ M H₂S, suggesting that the gasotransmitter must be present to allow DLG to be effective (Fig. 1). This result agrees with previous reports that H₂S acts in a concentration-dependent manner on gastric lesions (Medeiros et al. 2009). Additionally, H₂S reportedly prevents the gastric mucosa against ischemic and reperfusion damage (Magierowski et al. 2017). It is synthesized by the linking of homocysteine and cysteine (Chen et al. 2004), whereby CSE and CBS are regulated. The latter is the predominant enzyme in the liver, kidneys, brain and nervous system, whereas the former is the enzyme in charge of regulating H₂S in vascular and non-vascular tissues (Fiorucci et al.

S-nitrosoglutathione. On the other hand, when SNP, Na₂S and DLG are present, the total concentration of NO₂⁻ is completely abolished. These results suggest this condition prevents the oxidation of S-nitrosothiols. Data are represented as mean \pm SEM of five experiments. The statistical analysis performed was a Tukey's test. * p < 0.05 vs control, & p < 0.05 vs EtOH, # p < 0.05 vs SNP + Na₂S

2006). Blocking CSE using PAG, an irreversible inhibitor of this enzyme, did not modify the gastroprotective effects of DLG; however, HA, a CBS inhibitor, showed gastroprotective effects (Fig. 2b) and depleted GSH concentration (Fig. 7). All these effects can be explained because H₂S regulates the inflammatory pain and PAG reverts the nociceptive action of formalin. However, use of inhibitors did not modify DLG activity. Further analyses are required because several groups report that during an inflammatory response, H₂S inhibitors and the reduction of

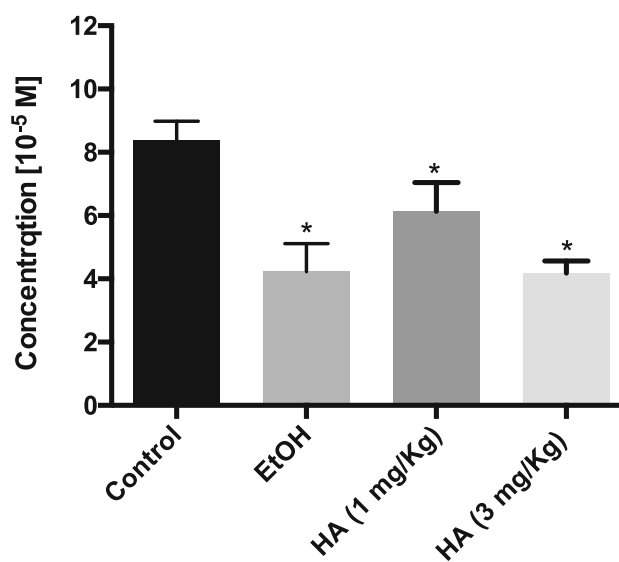


Fig. 7 HA decreases the total concentration of GSH, on animals treated with saline. Data are represented as mean \pm SEM of six experiments. The statistical analysis was performed using a one-way ANOVA followed by a Tukey's test. * p < 0.05 compared with control

H₂S protect against inflammation in animals (Sidhapuriwala et al. 2012).

S-Sulfhydration is a modification to proteins generated by H₂S, such as glutathionylation (-SSG), sulfenylation (-SOH), persulfidation (-SSH) and nitrosation (-SNO). S-Nitrosation is one of the most common post-translational modifications of proteins. Several authors state that nitrosation regulates many cellular functions, such as host defense, apoptosis (Foster et al. 2009; Hess and Stamler 2012) and modifications to NMDA (N-methyl-D-aspartate) receptors and transitory receptor potential vanilloid-1 (TRPV1) channels. These functions are also modified via nitrosylation (Yoshida et al. 2006). The smallest RSNO reported is thionitrous acid (HSNO), formed by the reaction between GSNO and H₂S (Filipovic et al. 2012). Evidence shows that it is an NO[•] source, thus explaining its protective effects. These results show that HSNO prevents ethanol-induced damage in the gastric mucosa (Fig. 6). To assess the participation of DLG in the formation of RSNO, we administered SNP, an NO[•] donor, and Na₂S, an exogenous source of H₂S, the components necessary to form HSNO (Whiteman et al. 2006a). Results show that DLG prevents NO[•] liberation from HSNO although it is well known at cellular level they can be metabolized to afford NO⁺, NO, and NO⁻, we cannot detect the formation of nitrites suggesting the stabilization of HSNO or the formation of other nitrogen species is also possible. In addition, GSH concentrations decreased after adding H₂S or NO[•] with DLG. This effect can be explained by the formation of an intermediate, GSNO, a powerful vascular smooth muscle vasorelaxant (Ondrias et al. 2008) that also works as an intermediate carrier (Fig. 8). Phthalides from other *Ligusticum* species reportedly act as agonists at the PGI₂ prostaglandin receptor, leading to vasodilatory effects increasing blood flow in several tissues (Sitbon and Morrell 2012). We propose that DLG induces the formation of de novo H₂S in the absence of a damage factor such as ethanol and that it induces and stabilizes HSNO formation in the

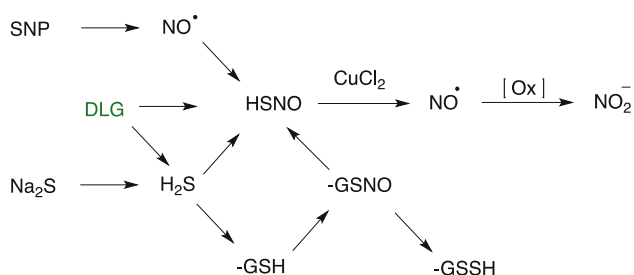


Fig. 8 An overview of the formation of S-nitrosothiols using the Saville reaction. as a possible mechanism for DLG, first we demonstrated the formation of H₂S caused by this metabolite and then we observed the stabilization of S-nitrosothiols probably in part of the antioxidant properties of DLG. These results provide an approach to the action mechanism in the gastric mucosa

tissue, the latter of which agrees with other reports; several phthalides have demonstrated antioxidant activities (Dietz et al. 2008). *Ligusticum chuanxiong* is another specie from the *Apiaceae* family; reports indicate that butylidenephthalide, a major compound in its rhizomes, elevates the activities of superoxide dismutase and catalase, activating the phosphorylation of ERK1/2 and increasing the expression of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) (Hou et al. 2004). S-Nitrosothiols also regulate the activities of these enzymes (Oliveira et al. 2008). Although further experiments are needed to corroborate this proposed mechanism, this is the first attempt to elucidate the action of DLG, a dimeric phthalide isolated from *L. porteri*.

Conclusions

Diligustilide has a significant gastroprotective effect *in vivo*, regulating two of the most important gasotransmitters, NO[•] and H₂S, increasing the total concentration of H₂S and by the stabilization of RSNOs. These findings suggest that DLG may be useful as an alternative treatment for gastric ulcers, although further experimental support is needed.

Acknowledgements Josué A. Velázquez-Moyado acknowledges fellowship from CONACyT México (244989) to carry out graduate studies. José Carlos Tavares-Carvalho acknowledges to Programa de Estancias de Investigación en la UNAM (PREI-2016). Elizabeth A. Pineda acknowledges to DGAPA-UNAM for postdoctoral fellowship. This work was supported by the Grants PAIP5000-9143, from Facultad de Química and DGAPA-UNAM IN216516 from Dirección General de Asuntos del Personal Académico, Universidad Nacional Autónoma de México.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest There are no conflicts of interest related to the present investigation.

References

- Bhattacharyya A, Chattopadhyay R, Mitra S, Crowe SE (2014) Oxidative stress: an essential factor in the pathogenesis of gastrointestinal mucosal diseases. *Physiol Rev* 94:329–354. doi:10.1152/physrev.00040.2012
- Brindis F, Rodriguez R, Bye R, Gonzalez-Andrade M, Mata R (2011) (Z)-3-butylidenephthalide from *Ligusticum porteri*, an alpha-glucosidase inhibitor. *J Nat Prod* 74:314–320. doi:10.1021/np100447a
- Bulbul M, Tan R, Gemici B, Ongut G, Izgut-Uysal VN (2008) Effect of orexin-a on ischemia-reperfusion-induced gastric damage in rats. *J Gastroenterol* 43:202–207. doi:10.1007/s00535-007-2148-3
- Chen X, Jhee KH, Kruger WD (2004) Production of the neuromodulator H₂S by cystathionine beta-synthase via the condensation of cysteine and homocysteine. *J Biol Chem* 279:52082–52086. doi:10.1074/jbc.C400481200

- Dawe GS, Han SP, Bian JS, Moore PK (2008) Hydrogen sulphide in the hypothalamus causes an ATP-sensitive K⁺ channel-dependent decrease in blood pressure in freely moving rats. *Neuroscience* 152:169–177. doi:10.1016/j.neuroscience.2007.12.008
- Deciga-Campos M, Gonzalez-Trujano E, Navarrete A, Mata R (2005) Antinociceptive effect of selected Mexican traditional medicinal species. *Proc West Pharmacol Soc* 48:70–72
- Deciga-Campos M, Rivero-Cruz I, Arriaga-Alba M, Castaneda-Corral G, Angeles-Lopez GE, Navarrete A, Mata R (2007) Acute toxicity and mutagenic activity of Mexican plants used in traditional medicine. *J Ethnopharmacol* 110:334–342. doi:10.1016/j.jep.2006.10.001
- Del-Angel M, Nieto A, Ramirez-Apan T, Delgado G (2015) Anti-inflammatory effect of natural and semi-synthetic phthalides. *Eur J Pharmacol* 752:40–48. doi:10.1016/j.ejphar.2015.01.026
- Dietz BM et al (2008) *Angelica sinensis* and its alkylphthalides induce the detoxification enzyme NAD(P)H: quinone oxidoreductase 1 by alkylating Keap1. *Chem Res Toxicol* 21:1939–1948. doi:10.1021/tx8001274
- Farrugia G, Szurszewski JH (2014) Carbon monoxide hydrogen sulfide, and nitric oxide as signaling molecules in the gastrointestinal tract. *Gastroenterology* 147:303–313. doi:10.1053/j.gastro.2014.04.041
- Filipovic MR et al (2012) Chemical characterization of the smallest S-nitrosothiol, HSNO; cellular cross-talk of H₂S and S-nitrosothiols. *J Am Chem Soc* 134:12016–12027. doi:10.1021/ja3009693
- Fiorucci S, Distrutti E, Cirino G, Wallace JL (2006) The emerging roles of hydrogen sulfide in the gastrointestinal tract and liver. *Gastroenterology* 131:259–271. doi:10.1053/j.gastro.2006.02.033
- Foster MW, Hess DT, Stamler JS (2009) Protein S-nitrosylation in health and disease: a current perspective. *Trends Mol Med* 15:391–404. doi:10.1016/j.molmed.2009.06.007
- Ge SN et al (2014) Hydrogen sulfide targets EGFR Cys797/Cys798 residues to induce Na⁺/K⁺-ATPase endocytosis and inhibition in renal tubular epithelial cells and increase sodium excretion in chronic salt-loaded rats. *Antioxid Redox Signal* 21:2061–2082. doi:10.1089/ars.2013.5304
- Hess DT, Stamler JS (2012) Regulation by S-nitrosylation of protein post-translational modification. *J Biol Chem* 287:4411–4418. doi:10.1074/jbc.R111.285742
- Hou YZ, Zhao GR, Yang J, Yuan YJ, Zhu GG, Hiltunen R (2004) Protective effect of *Ligusticum chuanxiong* and *Angelica sinensis* on endothelial cell damage induced by hydrogen peroxide. *Life Sci* 75:1775–1786. doi:10.1016/j.lfs.2004.05.005
- Kim E-Y, Rhyu M-R (2010) Synergistic vasorelaxant and antihypertensive effects of *Ligusticum wallichii* and *Angelica gigas*. *J Ethnopharmacol* 130:545–551. doi:10.1016/j.jep.2010.05.048
- Konturek SJ, Brzozowski T, Majka J, Pytko-Polonczyk J, Stachura J (1993) Inhibition of nitric oxide synthase delays healing of chronic gastric ulcers. *Eur J Pharmacol* 239:215–217
- Kuang X, Du J-R, Chen Y-S, Wang J, Wang Y-N (2009) Protective effect of Z-ligustilide against amyloid β -induced neurotoxicity is associated with decreased pro-inflammatory markers in rat brains. *Pharmacol Biochem Behav* 92:635–641. doi:10.1016/j.pbb.2009.03.007
- Leon A, Toscano RA, Tortoriello J, Delgado G (2011) Phthalides and other constituents from *Ligusticum porteri*; sedative and spasmolytic activities of some natural products and derivatives. *Nat Prod Res* 25:1234–1242. doi:10.1080/14786419.2010.534735
- Linares E, Bye RA Jr (1987) A study of four medicinal plant complexes of Mexico and adjacent United States. *J Ethnopharmacol* 19:153–183
- Magierowski M et al (2014) Exogenous asymmetric dimethylarginine (ADMA) in pathogenesis of ischemia-reperfusion-induced gastric lesions: interaction with protective nitric oxide (NO) and calcitonin gene-related peptide (CGRP). *Int J Mol Sci* 15:4946–4964. doi:10.3390/ijms15034946
- Magierowski M et al (2017) Exogenous and endogenous hydrogen sulfide protects gastric mucosa against the formation and time-dependent development of ischemia/reperfusion-induced acute lesions progressing into deeper ulcerations. *Molecules*. doi:10.3390/molecules22020295
- Medeiros JV et al (2009) Hydrogen sulfide prevents ethanol-induced gastric damage in mice: role of ATP-sensitive potassium channels and capsaicin-sensitive primary afferent neurons. *J Pharmacol Exp Ther* 330:764–770. doi:10.1124/jpet.109.152801
- Moshage H, Kok B, Huizenga JR, Jansen PL (1995) Nitrite and nitrate determinations in plasma: a critical evaluation. *Clin Chem* 41:892–896
- Motawi TK, Abd Elgawad HM, Shahin NN (2008) Gastroprotective effect of leptin in indomethacin-induced gastric injury. *J Biomed Sci* 15:405–412. doi:10.1007/s11373-007-9227-6
- Nishida M et al (2012) Hydrogen sulfide anion regulates redox signaling via electrophile sulfhydration. *Nat Chem Biol* 8:714–724. doi:10.1038/nchembio.1018
- Oliveira CJ, Curcio MF, Moraes MS, Tsujita M, Travassos LR, Stern A, Monteiro HP (2008) The low molecular weight S-nitrosothiol, S-nitroso-N-acetylpenicillamine, promotes cell cycle progression in rabbit aortic endothelial cells. *Nitric Oxide Biol Chem* 18:241–255. doi:10.1016/j.niox.2008.02.001
- Ondrias K et al (2008) H₂S and HS⁻ donor NaHS releases nitric oxide from nitrosothiols, metal nitrosyl complex, brain homogenate and murine L1210 leukaemia cells. *Pflugers Arch* 457:271–279. doi:10.1007/s00424-008-0519-0
- Papapetropoulos A, Foresti R, Ferdinandy P (2015) Pharmacology of the ‘gasotransmitters’ NO, CO and H₂S: translational opportunities. *Br J Pharmacol* 172:1395–1396. doi:10.1111/bph.13005
- Ptak-Belowska A, Brzozowski T, Pajdo R, Pawlik M, Kwiecien S, Drozdowicz D, Pawlik WW (2008) Protective role of leptin in acute gastric ulcers. *Folia Med Cracov* 49:23–35
- Saville B (1958) A scheme for the colorimetric determination of microgram amounts of thiols. *Analyst* 83:670–672. doi:10.1039/AN9588300670
- Sibilia V et al (2008) Central ghrelin gastroprotection involves nitric oxide/prostaglandin cross-talk. *Br J Pharmacol* 154:688–697. doi:10.1038/bjp.2008.120
- Sidhapuriwala JN, Hegde A, Ang AD, Zhu YZ, Bhatia M (2012) Effects of S-propargyl-cysteine (SPRC) in caerulein-induced acute pancreatitis in mice. *PLoS One* 7:e32574. doi:10.1371/journal.pone.0032574
- Singh RJ, Hogg N, Joseph J, Kalyanaraman B (1996) Mechanism of nitric oxide release from S-nitrosothiols. *J Biol Chem* 271:18596–18603
- Sitbon O, Morrell N (2012) Pathways in pulmonary arterial hypertension: the future is here. *Eur Respir Rev* 21:321–327. doi:10.1183/09059180.00004812
- Takeuchi K, Aihara E, Kimura M, Dogishi K, Hara T, Hayashi S (2012) Gas mediators involved in modulating duodenal HCO₃⁻ secretion. *Curr Med Chem* 19:43–54
- Vandiver M, Snyder SH (2012) Hydrogen sulfide: a gasotransmitter of clinical relevance. *J Mol Med* 90:255–263. doi:10.1007/s00109-012-0873-4
- Velazquez-Moyado JA, Martinez-Gonzalez A, Linares E, Bye R, Mata R, Navarrete A (2015) Gastroprotective effect of dilligustilide isolated from roots of *Ligusticum porteri* coulter & rose (*Apiaceae*) on ethanol-induced lesions in rats. *J Ethnopharmacol* 174:403–409. doi:10.1016/j.jep.2015.08.030

- Velázquez-Moyado JA, Navarrete A (2017) Detection and quantification in vivo and in real time of hydrogen sulfide in the ethanol-induced lesions in rat stomach using an ion sensitive electrode. *J Pharmacol Toxicol Methods* (in press)
- Wallace JL (2012) Hydrogen sulfide: a rescue molecule for mucosal defence and repair. *Dig Dis Sci* 57:1432–1434. doi:[10.1007/s10620-012-2119-2](https://doi.org/10.1007/s10620-012-2119-2)
- Whiteman M, Li L, Kostetski I, Chu SH, Siau JL, Bhatia M, Moore PK (2006) Evidence for the formation of a novel nitrosothiol from the gaseous mediators nitric oxide and hydrogen sulphide. *Biochem Biophys Res Commun* 343:303–310. doi:[10.1016/j.bbrc.2006.02.154](https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.02.154)
- Yoshida T et al (2006) Nitric oxide activates TRP channels by cysteine S-nitrosylation. *Nat Chem Biol* 2:596–607. doi:[10.1038/nchembio821](https://doi.org/10.1038/nchembio821)