

Actividad gastroprotectora de *Equisetum giganteum* L. n.v. cola de caballo y *Cortaderia selloana* (Schult & Schult. f.) n.v. cortadera en ratones sometidos a estrés e indometacina

Toso, F.¹; Lara, M.B.¹; Mondino, M. A.¹; Marron, Y.¹; Pombar, A.S.¹; Toso, R.E.¹

¹ Cátedra de Farmacología - CIDEF, Facultad de Ciencias Veterinarias, UNLPam.
Calle 5 y 116. General Pico, La Pampa. República Argentina (6360)

Correo electrónico: retoso@vet.unlpam.edu.ar

RESUMEN

Estudios previos determinaron que extractos hidroalcohólicos de *Equisetum giganteum* (EE) y *Cortaderia selloana* (ECo) previenen el daño gástrico inducido por estrés en ratones *Mus musculus* sometidos a hipotermia e inmovilización. En este trabajo se empleó Indometacina (ID), un antiinflamatorio no esteroide (AINE), para determinar si el efecto protector sobre la mucosa gástrica está mediado por prostaglandinas. Los animales se dividieron en 6 grupos de 5 ratones cada uno. El Grupo Testigo (GT) fue administrado con el vehículo (Ex) compuesto por Carboximetilcelulosa y Tween 80 vía oral (VO), el Grupo Control (GC) con el Ex y una dosis de ID de 5 mg/kg vía subcutánea (SC), el Grupo Equisetum (GE) con EE, el Grupo Equisetum Indometacina (GEI) con EE e ID, el Grupo Cortadera (GCo) con ECo y el Grupo Cortadera Indometacina (GCoI) con ECo e ID. Las dosis de extractos utilizadas por animal corresponden al residuo seco obtenido a partir de 1 g de partes aéreas desecadas de las plantas por extracción con etanol:agua (1:1, v/v) resuspendidas con el Ex hasta un volumen de 0,5 ml. Los Grupos GC, GEI y GCoI fueron administrados con ID 1 h antes de iniciar el ensayo. Todos los grupos recibieron los tratamientos indicados y fueron inmediatamente sometidos a estrés durante 4 h a 22°C. Para calcular el porcentaje de inhibición de úlceras se empleó la fórmula $[(AU_{\text{Grupo Control o Testigo}} - AU_{\text{Grupo Tratado}} / AU_{\text{Grupo Control o Testigo}}) \times 100]$

donde AU es el Área Ulcerada. El GT fue comparado respecto a los GE y GCo y el GC con respecto a los GEI y GCoI. Para evaluar el efecto de la administración de ID se comparó el GC con respecto al GT. Los resultados mostraron que la administración de ID indujo mayor daño gástrico en el GC respecto al GT ($p \leq 0,05$). La administración de EE previno el daño gástrico en los ratones del GE y ECo ($p \leq 0,05$). Todos los ratones del GEI presentaron úlceras en forma similar al GE ($p \leq 0,05$) evidenciando que el EE no muestra efecto gastroprotector cuando es administrado en forma conjunta con ID. El ECo mostró efectos gastroprotectores significativos cuando se administró en forma conjunta con ID ($p \leq 0,05$), sugiriendo que las prostaglandinas endógenas no tendrían un papel preponderante en la protección de la mucosa gástrica. El hallazgo de drogas vegetales con estas acciones son de interés para el reemplazo de antagonistas H2 y de los inhibidores de la bomba de protones, compuestos, que presentan efectos indeseables durante usos prolongados y son empleados rutinariamente en forma conjunta con los AINEs para evitar las lesiones que producen sobre la mucosa gastroduodenal.

Palabras clave: *Equisetum giganteum*, *Cortaderia selloana*, gastroprotector, indometacina

Gastroprotective effect of Equisetum giganteum L. n.v. cola de caballo and Cortaderia selloana (Schult & Schultz. f.) n.v. cortadera in mice submitted to stress and indomethacin

ABSTRACT

Previous studies have determined that hydro-alcoholic extracts of *Equisetum giganteum* (EE) and *Cortaderia selloana* (ECo) prevent gastric harm induced by stress in *Mus musculus* mice expose to hypothermia and immobilization. The aim of this study was to determine if the protective effect of indomethacin (ID), a non-steroid anti-inflammatory drug, on the gastric mucosa, is mediated by prostaglandin. The animals were assigned into one of the six groups of five animals each. The Blank Group (BG) received an oral dose (OD) of an excipient (Ex) composed of hydroxyl methyl cellulose and tweed 80; the Control Group (CG) received excipient plus 5 mg/kg subcutaneously of ID; the *Equisetum* Group (EG) with EE; the *Equisetum* Indomethacin Group (EIG) with EE and ID; the *Cortaderia* Group (CoG) with Eco and the *Cortaderia* Indomethacin Group (CoIG) with Co and ID. The doses

utilized in the animals were obtained from 1 gram of dried aerial plant parts extracted with ethanol-water (1:1; v/v) and re-suspended with Ex until 0.5 ml. The ID groups (CG, EIG, CoIG) received the doses 1 hour before the beginning of the trial, and thereafter all the groups were subjected to stress during 4 hours at 22 °C. In order to assess the gastric harm, the percentage of ulcer inhibition was calculated as follow [(AUControl or Blank Groups – AUTreated Group/AUControl or Blank Group) x 100] where AU is the Ulcerated Area . The administration of ID induced a higher degree of gastric damage in the CG than in the BG ($p \leq 0.01$). The EE administration prevented the gastric damage in four mice of the EG, but the administration of ECo prevented the damage in all the animals of the CoG ($p \leq 0.01$), demonstrating no gastroprotective effect of EE when was given concomitantly with ID. The ECo showed significant gastroprotective effects when was administered simultaneously with ID ($p \leq 0.01$) suggesting that prostaglandin would have no effect in the protection of the gastric mucosa. The findings of vegetable drugs with the observed actions are of interest in order to both replace drugs with an antagonist of H_2 and inhibitors of protons pump actions, because of its side effects when are prescribed during an extended period of time.

Key words: *Equisetum giganteum*, *Cortaderia selloana*, gastroprotective, indometacin

Fecha de recepción artículo original: 10-02-2018

Fecha de aceptación para su publicación: 20-09-2018

Introducción

Los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) producen lesiones ulcerosas en la mucosa gástrica al bloquear la biosíntesis de las prostaglandinas (PG). Éstas, fisiológicamente actúan estimulando la secreción de bicarbonato y glicoproteínas además de exhibir propiedades tróficas sobre las células de la mucosa gástrica.⁽¹⁾

El estrés, reduce los factores citoprotectores produciendo lesiones gástricas. Estas lesiones son encontradas con frecuencia en animales que son sometidos a exceso de ejercicio, reciben dietas inadecuadas o permanecen en ambientes adversos.⁽²⁾

Los AINEs, además de producir úlceras gástricas y hemorragias gastroduodenales producen otros efectos colaterales. Entre otros, pueden mencionarse trastornos hemostáticos, hepáticos y renales.⁽³⁾

Para reducir el daño gástrico durante los tratamientos prolongados con AINEs se administran bloqueadores de los receptores H2, inhibidores de la bomba de protones, prostaglandinas antisecretoras ácidas y protectores de la mucosa gástrica como sucralfato y bismuto coloidal.^(4,5) Los fármacos más empleados son los inhibidores de los receptores H2 y de la bomba de protones cuyos efectos colaterales se asocian con un incremento de la susceptibilidad a infecciones secundarias gastrointestinales y pulmonares, dispepsias, vómitos y mala absorción de nutrientes.⁽⁶⁾

Estos antecedentes determinan la importancia de hallar compuestos alternativos para prevenir las lesiones gástricas que provocan los AINEs, cuya acción no esté mediada por PG y que no produzcan los efectos colaterales de los fármacos empleados para reducir la secreción gástrica.

En este trabajo se empleó el modelo de estrés para inducir úlceras y se administró indometacina⁽⁷⁾. La administración previa de este AINE en ratones sometidos a estrés permite determinar el papel de las prostaglandinas en la respuesta gastroprotectora de los extractos a ensayar.

En estudios anteriores realizados en ratones, utilizando un modelo de estrés por hipotermia e inmovilización,⁽⁸⁾ se determinó que los extractos hidroalcohólicos de *Equisetum giganteum* y *Cortaderia selloana*, previenen el daño gástrico.⁽⁹⁾

Materiales y métodos

Animales de experimentación: se utilizaron ratones *Mus musculus* de 28 – 30 g de peso provistos por el Bioterio de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Pampa (FCV, UNLPam). Los animales fueron trasladados al Laboratorio del Centro de Investigación y Desarrollo de Fármacos de la FCV, UNLPam donde tuvieron un período de adaptación de 7 días a una temperatura de 20 a 22°C, con período de luz/oscuridad de 12 h, dieta balanceada y agua ad libitum. Para los ensayos se formaron grupos al azar de cinco animales cada uno y fueron colocados en cajas de plástico para crianza con fondo de malla galvanizada para evitar la coprofagia. Fueron privados de alimentos 12 h antes del ensayo con acceso *ad libitum* al agua. El protocolo del ensayo fue aprobado por el Comité de Ética para Investigación en Ciencias Biológicas, Dependencia de la Secretaría de Ciencia, Técnica y Posgrado de la Facultad de Ciencias Veterinarias, UNLPam.

Material vegetal: los extractos hidroalcohólicos de *Equisetum giganteum* (E) y *Cortaderia selloana* (Co) fueron provistos por el Banco de Extractos de Plantas Nativas y Naturalizadas de la Provincia de La Pampa (BEV) del Centro de Investigaciones y Desarrollo de Fármacos (CIDEF) – FCV – UNLPam.

Preparación de Drogas y Dosis: para la administración, los extractos vegetales de E provenientes de 10 g de material vegetal desecado de partes aéreas de las plantas, fueron resuspendidos con el vehículo (Ex), compuesto por Carboximetilcelulosa al 0,5% y Tween 80 0,05% (1:1, v/v) hasta un volumen de 5 ml para (EE). Se procedió del mismo modo con el extracto de Co (ECo). Se administraron dosis de 0,5 ml de los extractos vía oral con ayuda de una sonda gástrica. La obtención de los extractos, su acondicionamiento para la administración y las dosis, se realizó según el protocolo descrito por Toso et al., (2006)⁽¹⁰⁾.

Los ratones pertenecientes a los grupos que fueron administrados con Indometacina (ID), recibieron una dosis de 5 mg/kg vía subcutánea.

MODELO EXPERIMENTAL

Los animales fueron divididos en 6 grupos de 5 ratones cada uno. El Grupo Testigo (GT) fue administrado con el Ex, el Grupo Control (GC) con el Ex y una dosis de ID, el Grupo Equisetum (GE) con EE, el Grupo Equisetum Indometacina (GEI) con EE e ID, el Grupo Cortadera (GCo) con ECo y el Grupo Cortadera Indometacina (GCoI) con ECo e ID.

Los Grupos GC, GEI y GCoI fueron administrados con ID 1 h antes de iniciar el ensayo. Todos los grupos recibieron los tratamientos indicados y fueron inmediatamente sometidos a estrés por hipotermia e inmovilización durante 4 h empleando el método descrito por Yesilada et al., (1993)⁽¹¹⁾ en ratas, con adaptaciones introducidas por Toso y Skliar, (2000)⁽¹²⁾ para adecuar el ensayo a ratones.

EVALUACIÓN DE RESULTADOS

Inmediatamente finalizado el período de estrés, los animales fueron sacrificados con dióxido de carbono, se extrajeron los estómagos, se insuflaron con 1,5 ml de agua destilada y se colocaron durante 1 h en una solución de formol al 10 %. Los estómagos se abrieron por la curvatura mayor y se fotografiaron para medir la superficie ulcerada empleando el analizador de imágenes MOTIE Images Plus 2.0 que permite mensurar las lesiones en mm².

El porcentaje de inhibición de úlceras en los Grupos Tratados se calculó utilizando la fórmula $[(AU_{\text{Grupo Control o Testigo}} - AU_{\text{Grupo Tratado}} / AU_{\text{Grupo Control o Testigo}}) \times 100]$ donde AU es el Área Ulcerada expresada en mm². El GT fue comparado respecto a los GE y GCo y el GC con respecto a los GEI y GCoI. Para evaluar el efecto de la administración de ID se comparó el GT con respecto al GC. Para comparar las diferentes variables se utilizó la prueba ANOVA y el Test Tukey para las comparaciones entre grupos. Se consideró significativo un $p < 0,05$.

Resultados

Tabla 1. Efecto gastroprotector de *Equisetum giganteum* y *Cortaderia selloana* en ratones sometidos a estrés e indometacina.

Grupos	Area ulcerada ^a (Media ± DS)	(%) de Inhibición de úlceras
GT	1,29 ± 0,8	
GC	4,01* ± 1,1	
GE	0,03* ± 0,05	97
GEI	2,11 ± 1,3	43
GCo	0 ± 0	100
GCoI	0,14* ± 0,05	97

^a Área Ulcerada de la mucosa gástrica expresada en mm².

- GT: Grupo Testigo, GC: Grupo Control, GE: Grupo Tratado con *Equisetum giganteum* (E), GEI: Grupo Tratado con E + Indometacina (I), GCo; Grupo Tratado con *Cortaderia selloana* (Co), GCoI: Grupo Tratado con Co + I.

- El GT se comparó respecto a los GE y GCo y el GC respecto a los GEI y GCoI. El GC se comparó respecto al GT. * ($p \leq 0,05$).

Figuras 1a 6. Fotografías de estómagos pertenecientes a ratones de cada grupo.

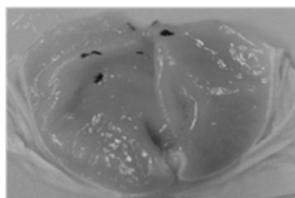


Fig.1: Grupo Testigo

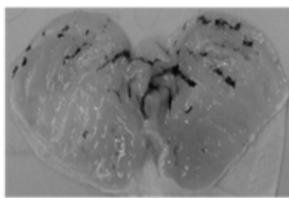


Fig. 2: Grupo Control

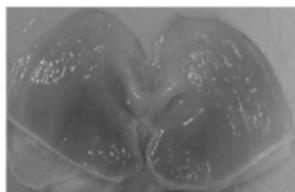


Fig. 3: Tratado con *Equisetum giganteum*

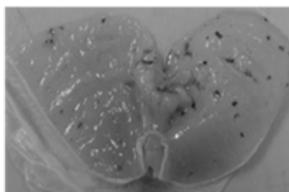


Fig. 4: Tratado con *Equisetum giganteum* + Indometacina

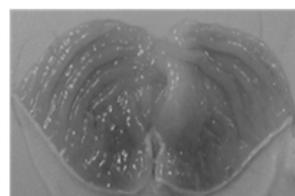


Fig. 5: Tratado con *Cortaderia selloana*

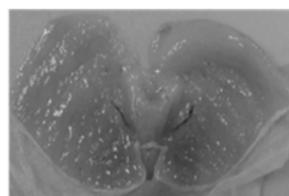


Fig. 6: Tratado con *Cortaderia selloana* + Indometacina

Nota: las Figuras de la izquierda muestran estómagos sometidos a estrés, las de la derecha a estrés e indometacina.

Los ratones sometidos a estrés y administrados con ID (GC) mostraron mayor daño gástrico con respecto a los sometidos solamente a estrés (GT) ($p \leq 0,05$). (Tabla 1, Fig. 1 y 2).

La administración de EE previno el daño gástrico significativamente en los ratones del GE con respecto al GT ($p \leq 0,05$). Los ratones pertenecientes al GCo no presentaron úlceras (Tabla1, Fig. 1, 3 y 5).

No se encontraron diferencias significativas entre los GEI y GC evidenciando que el EE no muestra efecto gastroprotector cuando es administrado en forma conjunta con ID (Tabla 1; Fig. 3 y 4).

El ECo mostró porcentaje de inhibición de úlceras significativo cuando se administró en forma conjunta con ID ($p \leq 0,05$), (Tabla 1; Fig. 5 y 6).

Discusión

El estrés inducido por hipotermia e inmovilización produjo daño gástrico en los animales del GT (Tabla 1). Las lesiones ulcerosas estarían relacionadas con una disminución de la microcirculación de la mucosa gástrica, provocando una disminución de la secreción de mucus y bicarbonato debilitando la barrera mucosa gástrica. Al mismo tiempo se produciría un aumento de la motilidad barriendo el mucus y permitiendo que el jugo gástrico lesione la mucosa. La localización de las úlceras en el estómago perteneciente al grupo control coincide con los pliegues gástricos. Esto podría explicarse por el efecto mecánico que facilitaría el desprendimiento del mucus en la porción más expuesta de los pliegues gástricos⁽¹³⁾

El aumento de las lesiones en el GC con respecto al GT, puede explicarse por la acción conjunta del daño gástrico causado por el estrés^(14,15) y la administración de ID. Este antiinflamatorio produce inhibición de la síntesis de prostaglandinas reduciendo la secreción de mucus, bicarbonato y otros factores reduciendo la barrera mucosa gástrica⁽¹⁶⁾.

Los extractos de *Equisetum giganteum* y *Cortaderia selloana* previnieron las lesiones ulcerosas en los grupos sometidos a estrés solamente (GE y GCo). Pero en los grupos tratados con los extractos y administrados con ID (GEI y GCoI) sólo se observó efecto gastroprotector en los animales tratados con el extracto de *Cortaderia selloana*.

Basados en los porcentajes de inhibición obtenidos en el modelo de úlcera gástrica inducida por AINEs (Tabla 1), pude inferirse que el extracto de *Cortaderia selloana* muestra efecto antiulcerogénico aún cuando las PG endógenas se encuentran inhibidas⁽¹⁷⁾.

Conclusiones

Los extractos de *Equisetum giganteum* y *Cortaderia selloana* previenen el daño gástrico inducido por estrés.

La administración previa de indometacina sugiere que la respuesta gastroprotectora expresada por los extractos de *Cortaderia selloana*, probablemente no estaría relacionada con los efectos de las prostaglandinas endógenas. Compuestos con estas propiedades resultan de interés para reemplazar fármacos antagonistas H₂ e inhibidores de la bomba de protones en tratamientos prolongados con AINEs ya que, eventualmente, evitarían sus efectos secundarios indeseables.

Bibliografía

1. Takeuchi, K.; Ogawa, Y.; Kagawa, S.; Ukawa, H. Gastric ulcerogenic responses following barrier disruption in knockout mice lacking prostaglandin EP1 receptors. *Aliment Pharmacol Ther.* 2002; 2 : 74-82.
2. Mönki, J.; Hewetson, M.; Virtala, A. M. Risk Factors for Equine Gastric Glandular Disease: A Case-Control Study in a Finnish Referral Hospital Population. *J Vet Intern Med.* 2016; 30 : 1270-5.
3. Dowling, P. Interacciones de los corticosteroides y los antiinflamatorios no esteroideos. *Revista Veterinaria Argentina.* 2011; 34 : 354. *Fuente: vetpraxis.net.*
4. Simpson, K. W. Diseases of the stomach. En: Ettinger SJ, Feldman EC, Eds. *Textbook of veterinary internal medicine: diseases of the dog and cat.* Séptima Edición. St. Louis, Mo: Saunders Elsevier 2010. pp. 1504-1526.
5. Iarushkina, N. I.; Bagaeva, T. R.; Filaretova, L. P. Somatic pain sensitivity under indometacin induced gastric and small intestinal injury in rats]. *Ross Fiziol Zh Im I M Sechenova.* 2014; 100 : 73-85
6. Freeman, D. E. Gastrointestinal pharmacology. *Vet Clin North Am Equine Pract.* 1999; 15 : 535 - 59.
7. Lee, Y. H.; Mollison, K.W.; Cheng, W. D. The effects of anti-ulcer agents on indomethacin-induced gastric ulceration in the rat. *Arch Int Pharmacodyn Ther.* 1971; 7: 191:370.
8. Jalilzadeh-Amin, G.; Najarnezhad, V.; Anassori, E.; Mostafavi, M.; Keshipour, H. Antiulcer properties of *Glycyrrhiza glabra* L. extract on experimental models of gastric ulcer in mice. *Iran J Pharm Res.* 2015; 14:1163-70.
9. Toso, F.; Alvarez, H. L.; Marron, Y. M.; Toso, R. E. Efecto gastroprotector de *Equisetum giganteum* L. (cola de caballo) y *Cortaderia selloana* (schult). (cortadera) en ratones. *Revista Ciencia Veterinaria.* 2016; 18: 29 - 38.
10. Toso, R.; Steibel, P. E.; Troiani, H. O.; Oriani, D. S.; Ardoino, S.; Toribio, M.; Boeris, M. Búsqueda sistematizada de plantas con actividad farmacológica utilizando el Banco de Extractos Vegetales de Plantas Nativas y Naturalizadas de La Provincia de La Pampa. *Ciencia Veterinaria.* 2006; 8: 25 – 30.
11. Yesilada, E.; Sezik, E.; Fujita, T.; Tanaka, S.; Tabata, M. Screening of some Turkish medicinal plants for their antiulcerogenic activities. *Phytotherapy Research.* 1993; 7: 263-265.
12. Toso, R. E.; Skliar, M.I. Efecto de la indometacina sobre la citoprotección de extractos de *Centaurea solstitialis* contra úlceras gástricas inducidas por estrés en ratones. *Ciencia Veterinaria.* 2000; 2: 16-20.
13. Takeuchi, K.; Suzuki, K.; Araki, H.; Mizoguchi, H.; Sugamoto, S.; Umeda. Roles of endogenous prostaglandins and nitric oxide in gastroduodenal ulcerogenic responses induced in rats by hypothermic stress. *J Physiol.* 1999; 93: 423 - 431.
14. Jacobson, E. D. Circulatory mechanisms of gastric mucosal damage and protection. *Gastroenterology.* 1992; 102: 1788 - 1800.

-
15. Zhu, M.; Lew, T. H.; Luk, C. T. Gastric protective effect of *Lentinus edodes* against ethanol-induced ulceration. *Fitoterapia*. 1997; 68: 537 - 442.
 16. Murakami, M.; Lam, S. K.; Inada, M. Pathophysiology and pathogenesis of acute gastric mucosal lesions after hypothermic restraint stress in rats. *Gastroenterology*. 1985; 88: 660 - 665.
 17. Brzozowski, T.; Konturek, P. C.; Konturek, S. J.; Brzozowska, I.; Pawlik, T. Role of prostaglandins in gastroprotection and gastric adaptation. *J PhysiolPharmacol*. 2005; 5:33-55.