



**EFFECTO GASTROPROTECTOR Y CITOTOXICIDAD DEL DITERPENO
FERRUGINOL, SUS DERIVADOS SEMISINTETICOS Y DE LOS DITERPENOS
DEL TIPO ABIETANO AISLADOS DE SPHACELE CHAMAEDRYODES.
ESTUDIO DEL MECANISMO GASTROPROTECTOR DE FERRUGINOL IN VIVO**

**CARLOS ALBERTO ARECHE MEDINA
DOCTOR EN CIENCIAS, MENCIÓN INVESTIGACIÓN Y
DESARROLLO DE PRODUCTOS NATURALES**

RESUMEN

El diterpeno ferruginol ha demostrado poseer efecto gastroprotector en el modelo de ulcera gastrica inducido por HCl:EtOH en ratones, con alta toxicidad celular hacia fibroblastos y celulas AGS. A partir de ferruginol fueron preparados 18 derivados semisinteticos con la finalidad de aumentar el efecto gastroprotector y disminuir la citotoxicidad. El diterpeno totarol fue incluido con fines comparativos. Se evaluo la participacion de NO, PGs, SHs y receptores vanilloides en el efecto gastroprotector de ferruginol, mediante el uso de antagonistas de NO, PGs, GSH y receptores vanilloides en el modelo de ulcera gastrica inducido por HCl:EtOH en ratones. El mecanismo de accion gastroprotectora de ferruginol fue evaluado en ratas, en el modelo de ulcera gastrica inducido por etanol. La secrecion de acido gastrico se determino en el modelo de ligadura de piloro en ratas, produccion de mucus, contenido de glutation y prostaglandina gastrica. En la serie de los derivados de ferruginol (2-19) evaluados a 20 mg/kg, los compuestos 2-cloropropanoato de 8,11,13-abietatrien-12-ilo (8) y propenoato de 8,11,13-abietatrien-12-ilo (9), presentaron un efecto gastroprotector comparable a lansoprazol, reduciendo las lesiones gastricas en 76 y 67 % con fuerte citotoxicidad hacia celulas AGS y fibroblastos. Los derivados 10-15 (esteres aromaticos) fueron los mas lipofilicos dentro de toda la serie, con igual o menor actividad gastroprotectora que su precursor, con la menor citotoxicidad hacia ambas lineas celulares (CI50 > 1000 μ M). El mejor efecto gastroprotector asociado con baja citotoxicidad (CI50 > 1000 μ M) se observo en el derivado 12-(2,3,4,6-

tetraacetil- β -Dglucopiranosiloxi)- abieta-8,11,13-trieno (16), siendo tan activo como lansoprazol a 20 mg/kg y reduciendo las lesiones gastricas en 72 %. Los derivados o-metilbenzoato de 8,11,13- abietatrien-12-ilo (11), p-metilbenzoato de 8,11,13-abietatrien-12-ilo (12) y 3-nitrobenzoato de 8,11,13-abietatrien-12-ilo (14) presentaron efecto gastroprotector en el rango de 47-59 % con baja citotoxicidad hacia celulas AGS y fibroblastos (CI50 > 1000). El pre-tratamiento de los animales con N-nitro-L-arginina metil ester (L-NAME) o rojo de rutenio no disminuyo el efecto gastroprotector de ferruginol en las lesiones gastricas inducida por HCl:EtOH en ratones. Estos resultados explican que NO y las neuronas sensoriales sensibles a capsaicina via los receptores vanilloides no participan en el efecto gastroprotector de ferruginol. El pre-tratamiento con indometacina (I), un antagonista de PGs y con Netilmaleimida (NEM), un bloqueador de grupos sulfhidrilo, redujo significativamente el efecto gastroprotector de ferruginol. Estos resultados explican que las PGs y SHs endogenos participan en el efecto gastroprotector de ferruginol. Ferruginol a la dosis oral de 25 mg/kg, inhibio en 58 % la aparicion de lesiones gastricas inducidas por etanol con efectos similares a lansoprazol a 20 mg/kg (62 %). En el modelo de la ligadura de piloro, ferruginol disminuyo significativamente la liberacion de acido gastrico, incremento el volumen y el pH gastrico, indicando una propiedad antisecretora. A 25 y 50 mg/kg, ferruginol incrementa el contenido de glutation (68 y 90 % con respecto al control) y PGE2 (78 y 123 % con respecto al control) en la mucosa gastrica de ratas, sin aumento en la produccion de mucus gastrico. Estos resultados indican que el efecto gastroprotector de ferruginol, se debe al incremento del contenido de PGs y GSH asociado a un efecto antisecretor, con baja toxicidad oral aguda hacia ratones (LD50 > 2 g/kg). Estos resultados hacen de ferruginol un candidato para ser desarrollado como nueva droga gastroprotectora. A partir de las hojas de *Sphacele chamaedryodes* (Lamiaceae) se aislaron 7 diterpenos del tipo abietano, los flavonoides (S)-5,7-dihidroxi-flavanona y 5-hidroxi-4',7-dimetoxi-flavona y el sesquiterpeno spatulenol. A la dosis de 5, 10 y 20 mg/kg, carnosol mostro efecto

gastroprotector significativo comparable al lansoprazol a 20 mg/kg. Los diterpenos (23-29) a la dosis de 5 mg/kg (p.o.) presentaron efecto gastroprotector relevante en el modelo de ulcera gastrica inducido por HCl:EtOH en ratones.

Los compuestos 12-hidroxi-8,12-abietadien-11,14-diona (27) y 7,20-epoxi-12-hidroxi-8,12-abietadien-11,14-diona (28) presentaron el mayor efecto gastroprotector dentro de esta serie protegiendo de las lesiones gastricas en 71 y 65,2 % respectivamente, siendo comparable a lansoprazol, pero con fuerte citotoxicidad hacia celulas AGS y fibroblastos. Lo mas notable fue que dos diterpenos (26 y 29) presentaron toxicidad celular selectiva. Los derivados de ferruginol 4-5, 7-8, 11-19 y el diterpeno 24 se describen por primera vez en este estudio. Los resultados de la presente tesis indican, el potencial gastroprotector de los derivados de ferruginol y de los diterpenos de *Sphacele chamaedryodes*. Estudios adicionales deberian establecer el mecanismo de accion gastroprotector de estos compuestos. Nuevos estudios deberian realizarse con ferruginol para determinar su efecto sobre las hormonas gastrointestinales.

ABSTRACT

The diterpene ferruginol has gastroprotective activity that, however, is accompanied by toxic effects toward fibroblast and AGS cells. To disclose some structure-activity relationships of this diterpene and to obtain active compounds with less cytotoxicity, around 18 ferruginol derivatives were prepared and assessed for gastroprotective effect on the HCl:EtOH-induced gastric lesions. Totarol was included in this study for comparative purposes toward ferruginol. In order to clarify the mechanism of action of ferruginol, the roles of NO, PGs, SHs and vanilloid receptors were evaluated using previously antagonists on the model of HCl:EtOH-induced gastric lesions in mice. In addition, the prostaglandin E2 content, pylorus ligated accumulation of gastric acid secretions, gastric wall mucus, reduced glutathione content and ethanol-induced gastric lesions were investigated in rats.

In the ferruginol derivatives series (2-19) at a single oral dose of 20 mg/kg, the best gastroprotective effect was observed for the compounds abieta-8,11,13-trien-12-yl-2-chloropropanoate (compound 8) and abieta-8,11,13-trien-12-yl propenoate (compound 9). Compound 8 and 9 were as active as lansoprazole at 20 mg/kg and reducing gastric lesions by 76 and 67 % respectively, with highest cytotoxicity toward AGS cells and fibroblasts. Compounds 10-15 showed gastroprotective effect similar or lower than ferruginol, which exhibited the highest lipophilicity values with the less cytotoxic ($IC_{50} > 1000 \mu M$). The compounds abieta-8,11,13-trien-12-yl-2'-methylbenzoate (compound 11), abieta-8,11,13-trien-12-yl-4'-methylbenzoate (Compound 12) and abieta-8,11,13-trien-12-yl-3'-nitrobenzoate (Compound 14) reduced gastric lesions by 47 to 59 % displaying IC_{50} values $>1000 \mu M$ on AGS cells and fibroblasts. The highest gastroprotective effect was provided by 12-(2,3,4,6-tetra-O-acetyl- β -D-glucopyranosyloxy)-abieta-8,11,13-triene (compound 16) being as active as lansoprazole and reducing gastric lesions

by 72 % with lowest cytotoxicity ($IC_{50} > 1000 \mu M$). No relation was observed between lipophilicity values and the gastroprotective effect.

Pretreatment with N-nitro-L-arginine methyl ester (NAME), an inhibitor of NO-synthase, and the pretreatment with ruthenium red (RR), a vanilloid receptor antagonist did not abolish the gastroprotective effects of ferruginol against HCl:EtOH-induced gastric lesions. At 25 mg/kg, the gastroprotection of ferruginol was attenuated by pretreatment with indomethacin (I) and Nethylmaleimide (NEM), a blocker of endogenous sulfhydryl group. These findings suggest that prostaglandins and sulfhydryl compounds may be involved in the gastroprotective effect of ferruginol.

At 25 mg/kg, ferruginol inhibited the appearance of gastric lesions by 58 % showing similar effects than lansoprazole at 20 mg/kg. In the pylorus ligation, ferruginol significantly decreased the acid output, significantly increased gastric volume and pH value indicating an antisecretory property. At 25 and 50 mg/kg, ferruginol increased significantly the prostaglandin E2 content (78 and 123 % with respect to control) and glutathione (68 and 90 % with respect to control), but no effect was observed on the mucus production on gastric wall.

These findings indicate that ferruginol acts as gastroprotective increasing the GSH and PGE2 content along with antisecretory effect (more assays should test to confirm this effect). Seven known diterpenes including the flavonoids (S)-5,7-dihydroxyflavanone and 5-hydroxy-4',7-dimethoxyflavone and a sesquiterpene spathulenol were isolated from the leaves of *Sphacele chamaedryode*.

A dose-response study of carnosol at 5, 10, 20 mg/kg showed gastroprotective effect being as active as lansoprazole at 20 mg/kg. The diterpenes (23-29) showed gastroprotective activity at 5 mg/kg (p.o.). The best gastroprotective effect was observed for the compounds 12-hydroxy-8,12-abietadien-11,14-dione (27) and 7,20-epoxy-12-hydroxy-8,12-abietadien-11,14-dione (28) being as active as lansoprazole at 20 mg/kg and reducing gastric lesions by 71 and 65,2 % respectively, with highest cytotoxicity toward AGS cells and fibroblasts. Regarding to lipophilicity and cytotoxicity, no correlation was found.

The ferruginol derivatives 4-5, 7-8, 11-19 and the diterpene 24 have not been described to date and are being reported for the first time.

Our results showed the gastroprotective potential of ferruginol derivatives and the diterpenoids isolated from *Sphacele chamaedryodes*. Further pharmacological studies will be necessary to investigate the possible mechanism(s) involved in the gastroprotective activity of these compounds.