

DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA



ESTUDIO FARMACOGNÓSTICO DE *EUPHORBIA HIRTA* L.

TESIS DOCTORAL

**M^a Dolores Lorente Lamarca
2003**

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: María Dolores Lorente Lamarca
D.L.: Gr. 1519- 2006
ISBN: 978-84-338-4057-8

ABREVIATURAS

CFTR: Regulador de la conductancia transmembranal de la fibrosis quística (del inglés “cystic fibrosis transmembrane conductance regulator”)

CU: Colitis ulcerosa

DE₅₀: Dosis eficaz 50

DL₅₀: Dosis letal 50

DSS: Sulfato de dextrano sódico

EC: Enfermedad de Crohn

EII: Enfermedad inflamatoria intestinal

FA: Fosfatasa alcalina

GSH: Glutation reducido

GSSG: Glutation oxidado

IAE: Índice de actividad de la enfermedad

IL: Interleuquina

IFN- γ : Interferón- γ

iNOS: Óxido nítrico sintasa inducible

LTB₄: Leucotrieno B₄

MDA: Malonildialdehido

MPO: Mieloperoxidasa

NF-κB: Factor nuclear κB

NO: Óxido nítrico

NOS: Óxido nítrico sintasa

PAF: Factor activador plaquetario

PGE₂: Prostaglandina E₂

PKC: Protein kinasa C

PMA: 12-miristato, 13-acetato de forbol

RLO: Radicales libres derivados del oxígeno

TNBS: Ácido trinitrobencenosulfónico

TNF: Factor de necrosis tumoral

VIP: Péptido intestinal vasoactivo

<i>Abreviaturas</i>	2
Índice	4
<i>Índice de Figuras</i>	7
<i>Índice de Tablas</i>	8
Introducción	11
EUPHORBIA HIRTA	
I. Características botánicas	11
II. Farmacoquímica	13
III. Usos tradicionales y acciones farmacológicas.	13
FLAVONOIDES Y ALTERACIONES GASTROINTESTINALES	
I. Introducción.	16
II. Actividad antiulcerosa de los flavonoides	21
III. Actividad antidiarreica de los flavonoides.	33
III.1. Efectos de los flavonoides en los ensayos <i>in vitro</i> de motilidad gastrointestinal.	37
III.2. Efectos de los flavonoides en los ensayos <i>in vitro</i> de transporte hidroelectrolítico gastrointestinal.	39
IV. Actividad antiinflamatoria intestinal de los flavonoides.	41
Objetivos.	50
Material y métodos	52
I. Material Vegetal	52
II. Fraccionamiento químico de la droga	53
III. Ensayos farmacodinámicos.	55
III.1. Animales de experimentación.	55

III.2. Ensayos de toxicidad aguda	56
III.3. Modelos de diarrea inducida experimentalmente	57
III.4. Ensayos de tránsito intestinal	58
III.4.1. Tránsito intestinal total.	58
III.4.2. Tránsito en intestino delgado	59
III.5. Ensayos de transporte hidroelectrolítico colónico	59
III.6. Modelos de colitis experimental.	61
III.6.1. Colitis experimental inducida por sulfato de dextrano sódico..	61
III.6.2. Colitis experimental inducida por oxazolona.	63
III.6.3. Valoración del proceso inflamatorio intestinal.	64
III.6.3.1. Determinación de la actividad mieloperoxidasa	65
III.6.3.2. Determinación del contenido de glutatión total	66
III.6.3.3. Determinación de la biosíntesis colónica del LTB ₄	68
III.6.3.4. Determinación del contenido de malonildialdehído	68
III.6.3.5. Determinación de la actividad óxido nítrico sintasa	69
III.6.3.6. Determinación de la actividad fosfatasa alcalina	70
III.6.3.7. Determinación de la expresión iNOS.	71
III.6.3.8. Estudio histológico.	72
IV. Estudio estadístico	73
Resultados	75
I. Constatación de la actividad antidiarreica de <i>Euphorbia hirta</i> y aislamiento de un componente activo	75
I.1. Actividad antidiarreica del cocimiento liofilizado de <i>Euphorbia hirta</i> .75	
I.2. Efecto del cocimiento liofilizado de <i>Euphorbia hirta</i> sobre el tránsito intestinal	78

I.3. Fraccionamiento químico de <i>Euphorbia hirta</i> : aislamiento de un compuesto con actividad antidiarreica	81
II. Estudio del mecanismo de acción responsable de la actividad antidiarreica de la quercitrina	83
II.1. Actividad antidiarreica de la quercitrina.	83
II.2. Efecto de la quercitrina sobre el tránsito intestinal en intestino delgado	86
II.3. Efecto de la quercitrina sobre el transporte hidroelectrolítico colónico.	89
III. Actividad antiinflamatoria intestinal de la quercitrina	92
III.1. Modelo de colitis experimental mediante la administración de sulfato de dextrano sódico.	92
III.1.1. Caracterización del modelo.	92
III.1.2. Efecto antiinflamatorio intestinal de la quercitrina	97
III.2. Modelo de colitis experimental mediante la administración de oxazolona.	104
III.2.1. Caracterización del modelo.	104
III.2.2. Efecto antiinflamatorio intestinal de la quercitrina	109
Discusión	111
I. Constatación de la actividad antidiarreica de <i>Euphorbia hirta</i> y aislamiento de un componente activo	111
II. Actividad antiinflamatoria intestinal de la quercitrina	120
Conclusiones.	134
Bibliografía.	135

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. <i>Euphorbia hirta</i> L. (Euforbiáceas)	12
Figura 2. Estructuras químicas generales de los distintos grupos de flavonoides.	17
Figura 3. Representación esquemática de los distintos mecanismos de acción propuestos para justificar la actividad antiulcerosa de los flavonoides.	32
Figura 4. Esquema de fraccionamiento de la planta entera de <i>Euphorbia hirta</i> L.	54
Figura 5. Efecto del cocimiento liofilizado de <i>Euphorbia hirta</i> , a dosis de 350 y 700 mg/kg, frente al tránsito intestinal total en ratones.	79
Figura 6. Efecto del cocimiento liofilizado de <i>Euphorbia hirta</i> , a dosis de 350 y 700 mg/kg., frente al tránsito intestinal en el intestino delgado en ratas, tanto en condiciones normales como estimulado tras la administración oral de aceite de ricino	80
Figura 7. Efecto de la quercitrina, a dosis de 25 y 50 mg/kg., frente al tránsito intestinal en el intestino delgado en ratas, tanto en condiciones normales como estimulado tras la administración oral de aceite de ricino	87
Figura 8. Efecto de la quercetina, a dosis de 25 y 50 mg/kg., frente al tránsito intestinal en el intestino delgado en ratas, tanto en condiciones normales como estimulado tras la administración oral de aceite de ricino	88
Figura 9. Efecto de la quercitrina (QR), a concentraciones de 10, 100 y 1000 μ M, en el colon ligado de rata, tanto en condiciones normales como alterado tras la administración intraluminal de PGE ₂ (0,12 mM) o de picosulfato sódico (0,45 mM).	90
Figura 10. Efecto de la quercetina (Q), a concentraciones de 10 y 100 μ M., en el colon ligado de rata, tanto en condiciones normales como alterado tras la	

administración intraluminal de PGE ₂ (0,12 mM) o de picosulfato sódico (0,45 mM).....	90
Figura 11. Efecto de la quercitrina (QR), a la concentración de 100 µM, en el colon ligado de rata sin lavado previo de la preparación, tras la administración intraluminal de picosulfato sódico (0,45 mM).....	91
Figura 12. Efecto de la quercitrina (QR), a la dosis de 1 mg/kg, sobre la evolución del peso corporal en el modelo de colitis experimental inducida con sulfato de dextrano sódico	93
Figura 13. Efecto de la quercitrina (QR), a la dosis de 1 mg/kg, sobre el Índice de Actividad de la Enfermedad (IAE) en el modelo de colitis experimental inducida con sulfato de dextrano sódico	94
Figura 14. Cortes histológicos representativos de colon de animales sometidos a inflamación experimental con DSS teñidos con hematoxilina-eosina	98
Figura 15. Efecto de la quercitrina (QR), a la dosis de 1 mg/kg, sobre la actividad mieloperoxidasa colónica (MPO) en el modelo de colitis experimental inducida con sulfato de dextrano sódico.....	99
Figura 16. Efecto de la quercitrina (QR), a la dosis de 1 mg/kg, sobre la actividad fosfatasa alcalina colónica (FA) en el modelo de colitis experimental inducida con sulfato de dextrano sódico.....	100
Figura 17. Efecto de la quercitrina (QR), a la dosis de 1 mg/kg, sobre el contenido de glutatión colónico (GSH) en el modelo de colitis experimental inducida con sulfato de dextrano sódico	101
Figura 18. Efecto de la quercitrina (QR), a la dosis de 1 mg/kg, sobre la actividad óxido nítrico sintasa (NOS) colónica en el modelo de colitis experimental inducida con sulfato de dextrano sódico	102

Figura 19. Efecto de la quercitrina (QR), a la dosis de 1 mg/kg, sobre la expresión de iNOS en tejido colónico en el modelo de colitis experimental inducida con sulfato de dextrano sódico (Western blot)	102
Figura 20. Efecto de la quercitrina (QR), a la dosis de 1 mg/kg, sobre la producción colónica de LTB ₄ en el modelo de colitis experimental inducida con sulfato de dextrano sódico	103
Figura 21. Efecto de la quercitrina (QR), a la dosis de 1 mg/kg, sobre la evolución del peso corporal en el modelo de colitis experimental inducida con oxazolona en ratas previamente sensibilizados	105
Figura 22. Cortes histológicos representativos de colon de animales sometidos a inflamación experimental con oxazolona teñidos con hematoxilina-eosina	107

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Escala de valoración del índice de actividad de la enfermedad (IAE) en el modelo de colitis experimental inducida con sulfato de dextrano sódico.	62
Tabla 2. Escala de valoración del daño histológico en el modelo de colitis experimental inducida con sulfato de dextrano sódico	73
Tabla 3. Actividad antidiarreica del cocimiento liofilizado de <i>Euphorbia hirta</i> , a dosis de 350 y 700 mg/kg, frente a distintos modelos de diarrea experimental en ratones	76
Tabla 4. Efecto de los distintos extractos y fracciones obtenidos tras el fraccionamiento químico de la planta entera de <i>Euphorbia hirta</i> sobre el tiempo de excreción de las primeras heces diarreicas en el test del aceite de ricino	82
Tabla 5. Actividad antidiarreica de la quercitrina (12,5, 25, 50 y 100 mg/kg) frente a la diarrea experimental en ratones inducida con aceite de ricino.	84
Tabla 6. Actividad antidiarreica de la quercitrina (50 mg/kg) frente a la diarrea experimental en ratones inducida con sulfato magnésico (2 g/kg p.o.) o con prostaglandina E ₂ (1 mg/kg i.p.)	85
Tabla 7. Efecto del proceso inflamatorio intestinal inducido con el sulfato de dextrano sódico (DSS) sobre los distintos parámetros bioquímicos.	96
Tabla 8. Efecto de la quercitrina (1 mg/kg) sobre los distintos parámetros bioquímicos: actividad mieloperoxidasa (MPO), fosfatasa alcalina (FA), contenido de glutation (GSH), contenido en malonildialdehido (MDA) y producción de LTB ₄ , en el modelo de colitis experimental inducido con oxazolona en animales previamente sensibilizados	108

INTRODUCCIÓN

EUPHORBIA HIRTA

I. CARACTERÍSTICAS BOTÁNICAS

El entronque botánico de la especie *Euphorbia hirta* L. es el siguiente:

- División: ***SPERMATOPHYTA***
- Subdivisión: ***MAGNOLIPHYTINA (ANGIOSPERMAE)***
- Clase: ***MAGNOLIATAE (DICOTYLEDONEAE)***
- Subclase: ***ROSIDAE***
- Superorden: ***EUPHORBINAE***
- Orden: ***EUPHORBIALES***
- Familia: ***EUPHORBIACEAE***

Se trata de una planta anual, generalmente erecta o ascendente, densamente pubescente casi por todas partes (de donde le proviene la sinonimia de *Euphorbia pilulifera*), con pelos a menudo amarillentos y multicelulares. Los tallos, de aproximadamente 40 cm de largo, son generalmente dicotómicos. Presenta foliolos opuestos, en peciolos muy cortos, con forma ovada a oblonga-lanceolada, asimétricos, oscilando entre 1 y 3 cm de largo, frecuentemente manchados de rojo oscuro, agudos, muy oblicuos en la base, serrados por encima

de la mitad. Las estípulas son pequeñas, aristiformes y pubescentes. Los involucros, de pequeño tamaño, son muy numerosos y en su mayoría dispuestos en densas cabezuelas cimosas, las cuales están pedunculadas en la axila de la hoja. Las semillas son de color rosa salmón, ovoide-tetraedricas, con ángulos agudos y los lados transversales rugosos.

Esta planta se desarrolla generalmente en países tropicales, especialmente en selvas bajas caducifolias, laderas húmedas o secas, abiertas o con matorrales, así como en pastizales inducidos y campos de cultivo, entre los 200 y los 2,500 m sobre el nivel del mar. Se trata de una especie ampliamente distribuida, pudiéndose encontrar en África, América Central y del Sur, Asia y Australia.



Figura 1. *Euphorbia hirta* L. (Euforbiáceas)

II. FARMACOQUÍMICA

Los diversos estudios fitoquímicos realizados con *Euphorbia hirta* han revelado la presencia de diterpenoides, triterpenoides, esteroides, taninos, flavonoides y alcaloides (revisado por Chhabra *et al.*, 1990).

El primer estudio que aborda el aislamiento e identificación de los compuestos presentes en esta planta fue publicado por Krishna Rao y Ganapaty en 1983, y describe la existencia de n-octacosanol y beta-sitosterol en el extracto bencénico obtenido a partir de las hojas desecadas de *E pilulifera*, mientras que a partir del extracto de acetato de etilo consiguieron aislar e identificar el flavonoide rutina. El posterior fraccionamiento químico realizado por Yoshida *et al.*, (1988) a partir de las partes aéreas desecadas de *E. hirta*, permitió aislar e identificar distintos compuestos de naturaleza polifenólica, encontrándose en mayor proporción dos flavonoides (quercitrina y miricetina) y tres taninos hidrolizables del tipo de los elagitaninos (euforbina A, euforbina B y terchebina).

III. USOS TRADICIONALES Y ACCIONES FARMACOLÓGICAS

Euphorbia hirta ha sido ampliamente utilizada en la medicina tradicional de las diversas zonas del globo donde se encuentra para combatir distintas afecciones, generalmente en forma de extractos obtenidos tras la cocción de la sumidad florida. Las diferentes farmacopeas tradicionales recogen los usos atribuidos a esta planta desde tiempos inmemorables (Watt y Breyer-Brandwijk 1962; Ayensu 1978; Kokwaro 1976; Khan *et al.*, 1980; Wong Ting-Fook 1980). Así se ha reflejado la utilización de *E. hirta* en el tratamiento de infecciones

respiratorias y diversos trastornos del tracto respiratorio, como el asma, la tos, el catarro, la gripe y la bronquitis crónica; habiéndose descrito también su uso como expectorante. Igualmente, las alteraciones digestivas han sido un objetivo en la utilización de esta planta, incluyendo el tratamiento de molestias gástricas, dolores cólicos y diarreas, principalmente cuando estos procesos eran generados por infecciones bacterianas o víricas así como por parasitosis. Otras indicaciones también descritas para esta planta incluyen enfermedades del aparato urinario (para favorecer la eliminación de cálculos renales o como diurético) y del aparato genital (metrorragia, gonorrea), así como afecciones oculares (conjuntivitis, úlcera corneal) o de la piel y mucosas.

Han sido diversos los estudios que han intentado ratificar experimentalmente las numerosas propiedades terapéuticas atribuidas a esta planta. En este sentido, algunos estudios *in vitro* describen la actividad quimioterápica de extractos y compuestos aislados de *E. hirta* frente a distintas bacterias Gram positivas y negativas, así como frente a *Entamoeba histolytica*, justificando su actividad antidiarreica y antidisentérica (Khan *et al.*, 1980; Krishna Rao y Ganapaty, 1983; Ajao *et al.*, 1985; Vijaya *et al.* 1995). Mas recientemente, Tona *et al.* (2000, 2001), en un intento de sustentar científicamente la utilización antidiarreica de diversas plantas de la región de Kinshasa en Congo, han corroborado la actividad antibacteriana y antiamebiana de *E. hirta*. Estos mismos autores, también atribuyen su actividad antidiarreica a las propiedades antiespásmicas, evidenciadas en distintos ensayos *in vitro* con extractos de esta planta que contienen principios de naturaleza polifenólica. Esta actividad espasmolítica ya había sido descrita previamente por El-Naggar *et al.* (1978) al

ensayar distintos extractos de *E. hirta* en preparaciones de íleon aislado de cobaya.

Análogamente, distintos estudios realizados *in vivo* con animales de experimentación han corroborado otras de las posibles indicaciones atribuidas a esta planta, como son:

- Actividad sedante y ansiolítica (Lanhers *et al.* 1990)
- Actividad analgésica, antipirética y antiinflamatoria (Lanhers *et al.* 1991)
- Actividad diurética (Johnson *et al.*, 1999).

FLAVONOIDES Y ALTERACIONES GASTROINTESTINALES

I. INTRODUCCIÓN

Los flavonoides comprenden un amplio grupo de compuestos polifenólicos que aparecen de forma espontánea en casi todas las plantas superiores, y que desde un punto de vista químico están constituidos por dos anillos aromáticos conectados entre sí por una cadena de tres átomos de carbono, que generalmente constituyen un anillo heterocíclico con diferentes grados de oxidación. Los flavonoides se clasifican en distintas clases en función de su estructura química, incluyendo flavonoles, flavonas, flavanonas, catequinas (o flavanoles), isoflavonas, antocianidinas, dihidroflavonoles y chalconas (Figura 2). Las diferentes modificaciones químicas que tienen lugar dentro de cada una de estas clases, tales como hidrogenaciones, hidroxilaciones, sulfuraciones, metilaciones, acetilaciones, así como la incorporación de distintos restos azucarados, dan lugar a la gran diversidad de flavonoides que se pueden encontrar en la naturaleza, habiéndose descrito hasta el momento más de 4000 flavonoides diferentes. La mayoría de los flavonoides se encuentran en la naturaleza en forma de heterósidos, y entre los azúcares que entran a formar parte de su estructura se incluyen la D-glucosa, la L-ramnosa, la glucoramnosa, la galactosa y la arabinosa.

La presencia generalizada de los flavonoides en frutas, verduras, frutos secos, semillas, flores y cortezas así como en bebidas tales como el té o el vino tinto implican su consumo regular en una dieta normal (Kühau, 1976; Hertog *et al.* 1993). Sin embargo, el consumo diario de flavonoides es muy variable

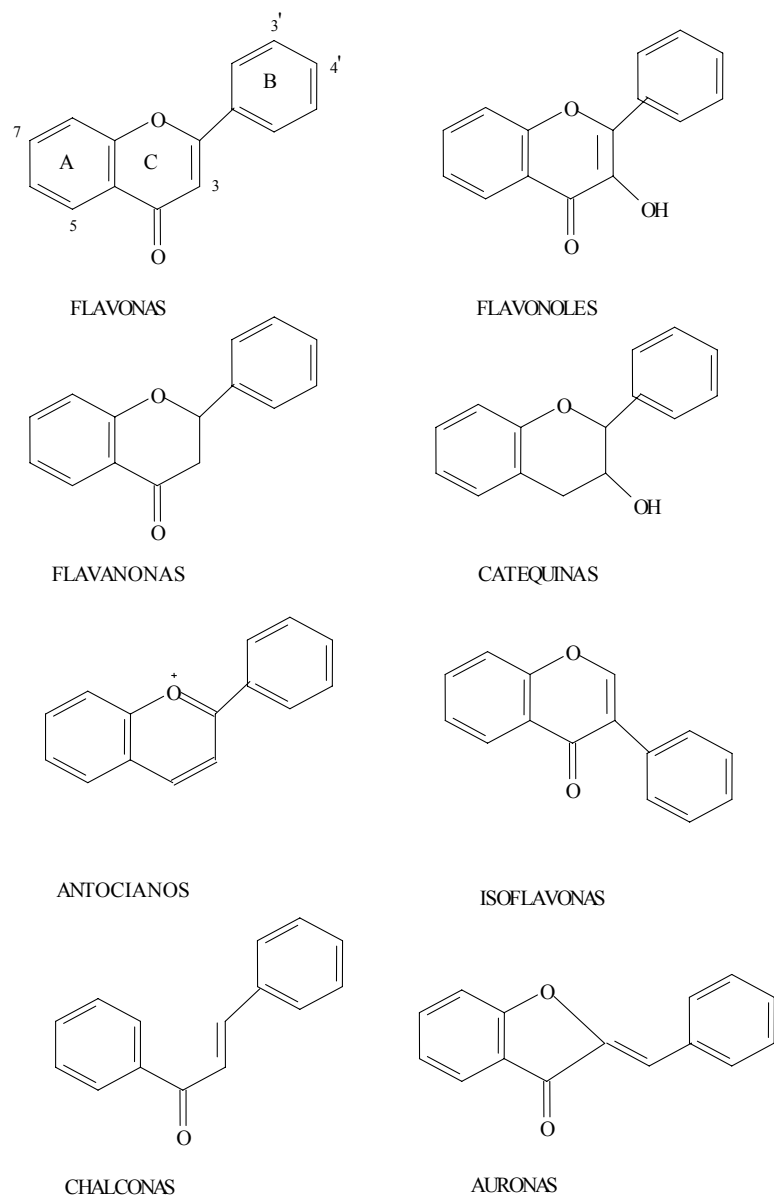


Figura 2. Estructuras químicas generales de los distintos grupos de flavonoides

dependiendo de los hábitos dietéticos de una población determinada. Uno de los primeros estudios que intentaron determinar el contenido en flavonoides de la dieta humana fue llevado a cabo por Kühau (1976), y estableció que el consumo total de flavonoides en los Estados Unidos era de aproximadamente 1 gramo diario, expresados en forma de heterósidos, o de unos 650 mg por día cuando se consideraba el consumo de geninas libres de la parte glucídica. La utilización de una metodología más precisa en el análisis de alimentos ha permitido establecer que esta primera estimación puede ser exagerada y que el consumo real de flavonoides es bastante menor. En este sentido, Hertog *et al.* (1995) realizaron un estudio en siete países, incluyendo Finlandia, Estados Unidos, Serbia/Croacia, Grecia, Italia, Holanda y Japón, comprobando que la ingesta media diaria de flavonoles y flavonas se encontraba en un margen comprendido entre los 6mg diarios para Finlandia y los 64 mg diarios para Japón. Posteriores estudios llevados a cabo en otros dos países europeos, Dinamarca y Alemania, ratificaron estos datos puesto que el consumo de flavonoides en estos países fue de 56 y 11 mg diarios, respectivamente (Justensen *et al.*, 1997; Böhm *et al.* 1998). Recientemente, Noroozi *et al.* (2000) han establecido que la ingesta media de flavonoles es de aproximadamente 35 mg por día, de los que el 91% estaba constituido por la quercetina. De hecho, la quercitrina y la rutina son los flavonoides mas comunes en forma de heterósidos en la dieta, los cuales tienen como genina común a la quercetina, el flavonoide mayoritario en alimentos vegetales (Hertog *et al.*, 1993).

Además de estar presentes en los alimentos, los flavonoides constituyen los principios activos de numerosas plantas medicinales utilizadas en el

tratamiento de distintas patologías que afectan a numerosos sistemas orgánicos, como el aparato digestivo, el aparato urinario, el sistema cardiovascular, el sistema nervioso central o la piel (Wollenweber 1988). Además, numerosos estudios describen los distintos efectos biológicos atribuidos a los flavonoides, incluyendo la actividad antibacteriana (Havsteen 1983), antiviral (Amoros *et al.*, 1992; Ohnishi y Bannai, 1993), antiinflamatoria (Moroney *et al.*, 1988; Emin *et al.*, 1994), espasmolítica (Capasso *et al.*, 1991a; 1991b), vasodilatadora (Duarte *et al.*, 1993a; 1993b), inhibición de la agregación plaquetaria (Landolfi *et al.*, 1984; Gryglewski *et al.*, 1987) y citotóxica (Edwards *et al.*, 1979; Cushman y Nagarathnam, 1991), entre otras. Muchos de estos efectos se relacionan principalmente con dos de las actividades biológicas que caracterizan a los flavonoides y que han sido ampliamente descritas en numerosos trabajos de investigación:

- a) Propiedades antioxidantes y/o captadores de radicales libres (Mora *et al.*, 1990; Cos *et al.*, 1998).
- b) Capacidad de interferir con la actividad de distintos sistemas enzimáticos (Middleton, 1998).

Es evidente que la ingestión de flavonoides, tanto a través de la dieta como en forma de principios activos de medicamentos, origina la presencia de estos compuestos biológicamente activos en el tracto gastrointestinal durante periodos de tiempo mas o menos prolongados, en donde pueden ejercer un efecto farmacológico. Sin embargo, son pocos los datos que se tienen en la actualidad sobre los procesos de absorción, metabolismo y excreción que tienen lugar con los flavonoides en humanos. Inicialmente se consideró que los flavonoides presentes

en la dieta no podían absorberse en el intestino puesto que se encontraban generalmente unidos a azúcares en forma de heterósidos (Kühau, 1976), y sólo las geninas podían atravesar la barrera intestinal. Aunque las distintas especies de mamíferos, incluida la humana, carecen de las enzimas necesarias para romper el enlace β -glucosídico de los flavonoides en forma heterosídica, las geninas podían ser liberadas en el lumen intestinal por acción de las glucosidasas de las bacterias de la flora intestinal, localizadas preferentemente en el intestino grueso (Griffiths, 1982; Bokkenheuser y Winter, 1988). Esta hipótesis se basaba en estudios previos realizados por Griffiths y Barrow (1972) en ratas libres de gérmenes las cuales excretaban en las heces la práctica totalidad de los flavonoides en forma heterosídica previamente administrados por vía oral sin modificación alguna; por el contrario, sólo una pequeña fracción de heterósidos era recuperada en heces cuando se utilizaban ratas con una flora bacteriana intestinal normal. En este sentido, Manach *et al.* (1997) describió que la quercetina, pero no la rutina, era absorbida por el intestino delgado. De acuerdo con este proceso, una vez que la genina era liberada en el lumen colónico, ésta podía ser absorbida, o eliminada junto a los contenidos fecales o sufrir una posterior degradación mediante la ruptura del anillo C, proceso este último también dependiente de la presencia de flora microbiana intestinal (Winter *et al.*, 1989; Hollman y Katan, 1998). Sin embargo, otros estudios han cuestionado el requisito previo de la hidrólisis del enlace heterosídico para la absorción previa de los flavonoides. Así, Hollman *et al.* (1995) estudiaron la absorción en el intestino delgado de flavonoides, tanto en forma de geninas como en forma heterosídica, en pacientes ileostomizados (en los que se evitaba la posible pérdida de flavonoide por la acción metabólica de las bacterias presentes en el colon). Los resultados que obtuvieron mostraban que

distintos heterósidos de la quercetina eran absorbidos en el intestino delgado, y que la velocidad de absorción era incluso superior a la de la quercetina en forma de genina. Estas observaciones han sido ratificadas en estudios posteriores realizados por este mismo grupo de investigadores (Hollman *et al.*, 1999).

II. ACTIVIDAD ANTIULCEROSA DE LOS FLAVONOIDES

Desde la Antigüedad, han sido numerosas las drogas utilizadas en la medicina popular para el tratamiento de distintas dolencias gástricas, especialmente la úlcera gastroduodenal. Esto ha llevado a la realización de numerosos estudios dirigidos a la validación del uso tradicional de estos remedios mediante la utilización de distintos modelos experimentales que intentan reproducir las lesiones gástricas que ocurren en humanos, bien mediante la administración de una sustancia lesiva para la mucosa gástrica (etanol absoluto, fármacos antiinflamatorios no esteroideos –AINE-, serotonina, reserpina...), bien mediante el sometimiento del animal a un ambiente estresante (frío, inmovilización, inmerso en agua...) o bien mediante un procedimiento de tipo quirúrgico (ligadura del píloro, isquemia-reperfusión). A raíz de estas investigaciones se ha podido relacionar la actividad antiulcerosa de muchas drogas vegetales con la presencia de flavonoides como principios activos responsables del efecto beneficioso.

En este sentido, estudios realizados con el ensayo del píloro ligado de rata o con el modelo de inmovilización de la rata en frío han permitido comprobar que distintos flavonoides, como el vexibinol (Yamahara *et al.*, 1990), la soforadina

(Kygoku *et al.*, 1979), la catequina (Reimann *et al.*, 1977), la silimarina (Alarcon de la Lastra *et al.*, 1992) o la rutina (Rao *et al.*, 1997), son capaces de atenuar el efecto lesivo que genera una excesiva secreción ácida sobre la mucosa gástrica. Este hecho que puede considerarse de gran interés dado que la secreción ácida es uno de los factores agresores involucrados en la úlcera péptica. Uno de los mecanismos que puede contribuir en este efecto inhibitorio de la secreción ácida puede ser el bloqueo de la enzima histidina descarboxilasa (Parmar y Ghosh, 1981; Parmar y Hennings, 1984; Bronner y Landry, 1985), enzima involucrada en la formación de la histamina a partir de la histidina, lo que generaría una menor liberación de histamina y, en consecuencia, una menor secreción gástrica dependiente de la activación de receptores de la histamina H₂ (Hill, 1990). De hecho, los fármacos antagonistas de los receptores de la histamina H₂, tales como la cimetidina, la ranitidina o la famotidina, han venido desempeñando un importante papel en el tratamiento de la úlcera péptica.

Otro de los mecanismos que se ha postulado contribuye en el efecto gastroprotector de los flavonoides estaría relacionado con la capacidad de estos principios de inhibir la ATPasa H⁺/K⁺, también denominada bomba de protones, que es clave en la etapa final del proceso de secreción ácida (Forte *et al.*, 1980). Así, la inhibición de esta actividad enzimática origina una reducción en la secreción ácida, constituyendo el mecanismo de acción de los fármacos denominados como inhibidores de la bomba de protones, como el omeprazol y lansoprazol, caracterizados por una potente capacidad antisecretora gástrica que justifica su utilización clínica en el tratamiento de la úlcera péptica. Inicialmente, distintos ensayos apoyaron esta hipótesis dado que diferentes tipos de flavonoides, como flavonoles, flavonas, flavanonas, chalconas, isoflavonas y catequinas, eran

capaces de inhibir esta enzima *in vitro* tras su activación por ATP (Beil *et al.*, 1995; Murakami *et al.*, 1990; 1991; 1992a; 1992b; 1999). Los estudios de cinética apuntaban a la existencia de un antagonismo competitivo entre la mayoría de los flavonoides estudiados y el ATP, dado que el efecto inhibitor se incrementaba a medida que se disminuía la concentración de ATP. Igualmente, los ensayos realizados por Murakami *et al.*, (1999) permitieron establecer los requerimientos estructurales que condicionaban la capacidad de los flavonoides de inhibir la bomba de protones. Estos investigadores establecieron que un incremento en el número de grupos hidroxilos en la molécula se asociaba con una mayor potencia, si bien esto era cierto sólo hasta 4 grupos hidroxilos, ya que la incorporación de más grupos hidroxilos no se traducía en un incremento de la potencia del flavonoide. Estos mismos investigadores propusieron que además del número de grupos hidroxilos, el patrón de hidroxilación es determinante para obtener una alta potencia inhibitoria, de forma que la existencia de dos (tipo catecol) o de tres (tipo pirogalol) grupos hidroxilo adyacentes, o la hidroxilación en C-3, C-5 y C-7 constituían los requerimientos mínimos. No obstante, estas conclusiones no concuerdan con las obtenidas previamente por Beil *et al.*, (1995), que demostraron que la flavanona, flavonoide que carece de grupos hidroxilos en su molécula, presentaba un valor de IC₅₀ inferior al de la quercetina, un flavonol con cinco grupos hidroxilos, para inhibir la actividad ATPasa H⁺/K⁺. Sin embargo, aunque la inhibición de la bomba de protones pudiera contribuir en el efecto gastroprotector de los flavonoides, esta acción no sería clave. Esto es así puesto que el efecto inhibitor que ejercen estos compuestos sobre la secreción ácida depende en gran medida del agente utilizado para estimular dicha secreción (histamina, pentagastrina, carbacol) (Yamahara *et al.*, 1990; Beil *et al.*, 1995),

mientras que en el caso de los fármacos inhibidores de la bomba de protones, que interfieren selectivamente el proceso final de la secreción ácida en la célula parietal, bloquean la producción ácida en respuesta a cualquier estímulo (Larsson *et al.*, 1983). Por tanto, otros mecanismos deben participar en el efecto antiulceroso de los flavonoides manifestado *in vivo*.

En este sentido, los distintos trabajos publicados muestran un creciente interés sobre el papel que los flavonoides puedan ejercer promoviendo los factores protectores de la mucosa gástrica, los cuales intentan contrarrestar los efectos perjudiciales que ejerce la secreción ácida. Esta actividad ha sido estudiada con numerosos flavonoides en distintos modelos experimentales de daño gástrico inducido mediante la administración oral a los animales de experimentación de agentes necrotizantes, como el alcohol absoluto (Robert, 1979), o de fármacos antiinflamatorios no esteroideos, como la indometacina (Satoh *et al.*, 1981) o la aspirina (Guth *et al.*, 1979). Entre los flavonoides que han demostrado actividad protectora de la mucosa gástrica se incluyen la quercetina (Alarcon de la Lastra *et al.*, 1994), la naringenina (Motilva *et al.*, 1994), la naringina (Martín *et al.*, 1994), la ternatina (Rao *et al.*, 1997), la rutina (Rao *et al.*, 1997) y el derivado de la cianidina IdB 1027 (Magistretti *et al.*, 1988). Además, el conocimiento de los distintos procesos fisiopatológicos involucrados en estos tipos de lesiones, han permitido proponer algunos de los mecanismos que participan en el efecto gastroprotector de los flavonoides. En este sentido, la exposición inicial al etanol produce una rápida necrosis de las células de la mucosa, que origina la liberación de mediadores vasoactivos, seguido de vasoconstricción y dilatación arteriolar, que se traduce en la aparición de hiperemia, edema y hemorragia (Oates y Hakkinen, 1988). Se ha propuesto que los metabolitos reactivos derivados del

oxígeno pueden actuar como agentes citotóxicos que pueden desencadenar esta secuencia de sucesos, desempeñando un papel clave en el daño gástrico mediado por el etanol (Ligumsky *et al.*, 1996). Si esto es así, sería lógico pensar que las propiedades antioxidantes y/o captadoras de radicales libres que caracterizan a los flavonoides puedan contribuir en su actividad gastroprotectora. No obstante, y sorprendentemente, los diferentes estudios que ponen de manifiesto la actividad antiulcerosa de los flavonoides no han descrito ninguna evidencia directa de que esto sea así; aunque algunos ensayos apunten en esta dirección. Este es el caso del efecto gastroprotector manifestado por la silimarina en el modelo de daño gástrico inducido mediante isquemia-reperfusión (Alarcon de la Lastra *et al.*, 1995), en cuya patogénesis se ha descrito que participa la producción inicial de radicales libres derivados del oxígeno. Estas especies reactivas promueven el reclutamiento de neutrófilos tras la activación de las moléculas de adhesión, lo que se traduce posteriormente en una mayor generación de estos radicales libres que, en consecuencia, desencadenan la aparición de procesos de peroxidación lipídica en la mucosa gástrica (Andrews *et al.*, 1992). Por tanto, el efecto gastroprotector de la silimarina podía ser atribuido, al menos parcialmente, a las propiedades antioxidantes descritas para este flavonoide (Valenzuela *et al.*, 1985; 1986). Además, diferentes estudios han descrito la capacidad de la silimarina de incrementar el contenido de glutatión en distintos tejidos, como el hígado, el estómago y el intestino (Valenzuela *et al.*, 1989), efecto que puede contribuir en sus propiedades protectoras frente a una situación de estrés oxidativo, ya que el glutatión desempeña un papel clave en la defensa antioxidante tisular (Harris *et al.*, 1992). Esto puede explicar el que la silimarina proteja la célula de compuestos que promueven la depleción de glutatión, como el etanol (Valenzuela *et al.*, 1985)

o el paracetamol (Campos *et al.*, 1989), y que se caracterizan por inducir procesos de peroxidación lipídica. En consecuencia, este mecanismo puede contribuir en los efectos terapéuticos del flavonoide en distintas patologías hepáticas e intestinales, incluida la úlcera péptica. De hecho, esta acción restauradora del contenido de glutatión se ha propuesto como un mecanismo involucrado en la actividad gastroprotectora de la quercetina (Martin *et al.*, 1998). Sin embargo, es difícil establecer una relación entre las propiedades antioxidantes de los flavonoides y su efecto gastroprotector. En este sentido, los estudios en modelos experimentales como el del etanol absoluto, ponen de manifiesto que las flavonas, que presentan una menor potencia como inhibidores de la peroxidación lipídica que los flavonoles como la quercetina o la rutina (Mora *et al.*, 1990), presentan una mayor potencia como agentes gastroprotectores, requiriendo aproximadamente dosis 10 veces inferiores para obtener un efecto más pronunciado (Ares *et al.*, 1998) que los flavonoles (Alarcon de la Lastra *et al.*, 1994; Motilva *et al.*, 1994). Esta podría ser la razón que justificara por qué estos estudios no se han centrado en la actividad antioxidante de los flavonoides. No obstante, la participación de un mecanismo antioxidante en el efecto gastroprotector ejercido por los flavonoides no puede ser completamente descartado por el momento.

Otro de los mediadores cuya producción se puede ver afectada por los flavonoides es el factor activador plaquetario (PAF), mediador que está involucrado en el daño gástrico de la mucosa generado por la administración de etanol a ratas (Izzo 1996), habiéndose descrito que compuestos antagonistas del PAF son capaces de reducir las lesiones gástricas inducidas por este agente necrotizante (Braquet *et al.*, 1988). De hecho, el PAF es considerado como uno de

los agentes ulcerógenicos más potentes conocidos (Izzo, 1996), habiéndose propuesto que la inhibición en la producción PAF desempeña un importante papel en la actividad antiulcerogénica de distintos flavonoides, incluidos la flavona, la quercetina, la naringina, la rutina y el kampferol, en el modelo de daño gástrico inducido en rata con etanol acidificado. Así, la administración intraperitoneal de quercetina, rutina y kampferol (25-50 mg/kg) y naringina (200-400 mg/kg) produjo una disminución del daño gástrico, y que este efecto se acompañó de un descenso en la formación gástrica de PAF. Uno de los mecanismos responsables de este efecto podría ser la inhibición de la actividad lisoPAF-acetiltransferasa, enzima involucrada en la síntesis de PAF. Sin embargo, estudios *in vitro* realizados con distintos flavonoides demostraron que sólo la luteolina y la quercetina inhibían de forma significativa esta actividad enzimática (Yanoshita *et al.*, 1996), por lo que es poco probable que la inhibición en la síntesis de PAF desempeñe un importante papel en el efecto gastroprotector de los flavonoides. En consecuencia, la reducción en los niveles de PAF descrito previamente (Izzo, 1996) probablemente sea el resultado de un efecto diferido en la cascada de señales intracelulares.

El efecto gastroprotector de los flavonoides se ha relacionado con una inhibición en la producción de eicosanoides en la mucosa gástrica, dada la capacidad inhibitoria que estos compuestos ejercen sobre las enzimas involucradas en la síntesis de estos mediadores: fosfolipasa A₂, ciclooxigenasa y lipooxigenasa (Lindahl y Tagesson, 1993; Laughton *et al.*, 1991; Kim *et al.*, 1998; You *et al.*, 1999). En este sentido, la inhibición de la actividad lipooxigenasa, con el consiguiente descenso en la producción de leucotrieno B₄, puede contribuir en su actividad antiulcerosa, ya que los leucotrienos son considerados como

mediadores agresivos que se liberan en respuesta a agentes necrotizantes como el alcohol absoluto y el HCl (Boughton-Smith, 1989; Osada *et al.*, 1990), al actuar como importantes compuestos quimiotácticos para los neutrófilos. Desgraciadamente, hasta el momento no existen evidencias directas que apoyen esta hipótesis.

Un aspecto interesante es que el efecto inhibitor de los flavonoides sobre la actividad ciclooxygenasa puede ser considerado paradójico si se considera su efecto gastroprotector. Teóricamente, un compuesto supuestamente gastroprotector debería facilitar la síntesis y liberación de prostaglandinas endógenas, dado el papel clave que desempeñan este tipo de eicosanoides, especialmente los de la serie E, en el mantenimiento de la integridad de la mucosa gastroduodenal (Robert, 1979). No obstante, los efectos descritos para los flavonoides sobre la producción gástrica de prostaglandinas han sido controvertidos en función del estudio considerado. Así, Beil *et al.* (1995) demostraron que la flavona y la flavanona eran capaces de incrementar la liberación basal de prostaglandina E₂ (PGE₂) en células de la mucosa gástrica en ensayos realizados *in vitro*; pero no cuando eran estimuladas por ácido araquidónico. Por el contrario, la quercetina no incrementó la liberación de PGE₂, confirmando las observaciones previas obtenidas por Alcaraz y Hoult (1985) en segmentos de ciego de rata. Otros estudios apoyan el papel de las prostaglandinas en los efectos gastroprotectores de los flavonoides basándose en el hecho de que inhibidores de la síntesis de prostaglandinas, como la indometacina, revierten parcialmente el efecto beneficioso de estos compuestos (Alarcon de la Lastra *et al.*, 1994; Motilva *et al.*, 1994), si bien no se alcanzaron conclusiones definitivas. Por otra parte, se ha descrito que flavonoides como la quercetina y la naringenina

(Alarcon de la Lastra *et al.*, 1994; Motilva *et al.*, 1994), incrementan la producción de moco gástrico, mientras que la antocianidina IdB 1027 incrementaba la secreción gástrica de bicarbonato (Cristoni *et al.*, 1989), efectos que se han asociado con la producción de prostaglandinas. Estudios posteriores con IdB 1027 demostraron su elevada capacidad de incrementar la liberación de PGE₂ por la mucosa gástrica, tras su administración oral a diez individuos sanos (Mertz-Nielsen *et al.*, 1990).

De todo lo expuesto, se puede concluir que los flavonoides han demostrado actividad antiulcerosa en distintos modelos de lesiones gástricas inducidas experimentalmente, y que este efecto beneficioso probablemente se consiga mediante la combinación de distintos mecanismos. Sin embargo, la mayoría de los ensayos han estudiado tratamientos de tipo agudo, que no reproducen lo que habitualmente ocurre en la úlcera gastroduodenal en humanos. Han sido pocos los ensayos que describen el efecto regenerador de los flavonoides en tratamiento crónico, quizás debido a la carencia de modelos experimentales apropiados. Uno de los métodos propuestos consiste en la inyección de ácido acético (5% o 20%) en la zona antral del estómago de la rata, originando lesiones gástricas que comparten muchas de las características de la úlcera péptica en humanos, tanto macroscópicamente como histológicamente (Okabe y Pfeiffer, 1972). Diversos estudios han demostrado que flavonoides como la quercetina, la naringenina (Motilva *et al.*, 1992), o la antocianidina IdB 1027 (Magistretti *et al.*, 1988) ejercen un efecto cicatrizante en este modelo experimental de lesión gástrica crónica. Este efecto se acompañó de una estimulación en la proliferación de vasos gástricos, lo que podría atribuirse a la mayor liberación de

prostaglandinas endógenas con acción citoprotectora, facilitando de esta forma la secreción de moco.

Finalmente, en la actualidad se acepta el importante papel que desempeña el microorganismo *Helicobacter pylori* en la etiopatogenia de la úlcera péptica, de manera que su erradicación es uno de los principales objetivos en la terapéutica antiulcerosa. Hasta la fecha, el tratamiento de elección consiste en la instauración de una triple terapia, mediante la administración de un fármaco inhibidor de la bomba de protones (como el omeprazol) junto a dos antibióticos: claritromicina y amoxicilina o claritromicina y metronidazol. Sin embargo, distintos estudios han descrito la aparición de resistencia bacteriana a estos antibióticos, originando el fracaso terapéutico en la erradicación de *Helicobacter pylori* (Graham, 1998; Megraud, 1998), lo que sustenta la búsqueda de nuevas estrategias terapéuticas. Los flavonoides, además de sus efectos gastroprotectores previamente descritos, son capaces de inhibir *in vitro* el crecimiento de *Helicobacter pylori*. En este sentido, Beil *et al.* (1995) describieron el efecto bactericida de la flavona, la flavanona y la quercetina, siendo el primero ligeramente más potente, con una actividad similar al descrito para el subcitrate de bismuto coloidal, fármaco también empleado en la terapia de erradicación del microorganismo. Más recientemente, Bae *et al.* (1999) han investigado el efecto de algunos flavonoides sobre *Helicobacter pylori*, incluyendo diferentes heterósidos (hesperidina, ponciredina, naringina y diosmina) y sus correspondientes geninas (hesperetina, ponciretina, naringenina y diosmetina), así como diferentes ácidos fenólicos, que podrían ser generados tras el metabolismo de los flavonoides por la microflora intestinal humana. Las principales conclusiones del estudio fueron que las geninas inhibían el crecimiento de *Helicobacter pylori*, mientras que los heterósidos o los

ácidos fenólicos mostraban un efecto mucho más débil. La relación estructura-actividad establecida por estos autores reveló que la mayor actividad era ejercida por aquellos flavonoides que presentaban un núcleo flavanona, y que esta actividad era incrementada cuando existía un grupo metoxi en posición *para*; de hecho, las flavonas y flavonoles presentaron una actividad mucho más débil. En cualquier caso, esta actividad descrita para los flavonoides abre un nuevo campo en el estudio de sus usos terapéuticos en el tratamiento de la úlcera gastroduodenal, sobre todo si estos compuestos se consideran como estructuras químicas susceptibles de ser modificados químicamente y obtener nuevos compuestos con una actividad mayor y mas selectiva frente a *Helicobacter pylori*.

En conclusión, los diferentes estudios experimentales han demostrado la capacidad de los flavonoides de prevenir la formación de úlceras y de facilitar su regeneración una vez que se hayan instaurado. Es probable que este efecto esté relacionado, mas que a la actuación sobre un único factor, a la conjunción de distintos mecanismos que se manifiesten de forma simultánea, permitiendo justificar el efecto beneficioso de los flavonoides en estas afecciones gástricas (Figura 3).

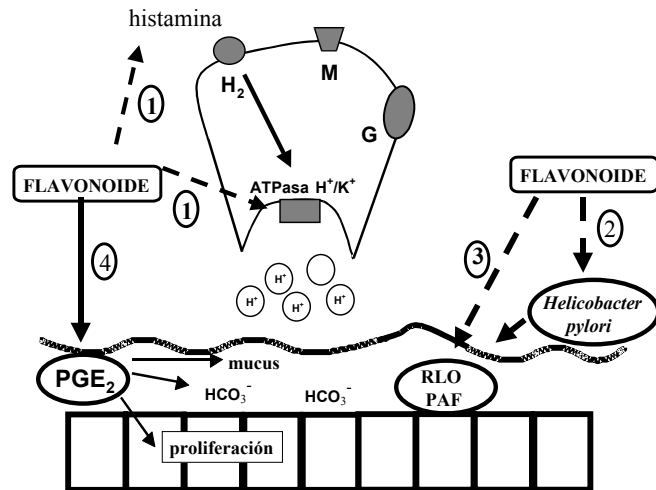


Figura 3. Representación esquemática de los distintos mecanismos de acción propuestos para justificar la actividad antiulcerosa de los flavonoides. 1) bloqueo de la secreción ácido por disminución de la producción de histamina o inhibición de la bomba de protones. 2) Efecto bactericida sobre *Helicobacter pylori*. 3) Actividad antioxidante previniendo la formación de radicales libres derivados del oxígeno (RLO). 4) Potenciación de los factores protectores de la mucosa. PAF: Factor activador plaquetario; H₂: Receptor de la histamina; M: Receptor muscarínico; G: receptor de la gastrina.

III. ACTIVIDAD ANTIDIARREICA DE LOS FLAVONOIDES

Han sido numerosas las drogas vegetales utilizadas por su actividad antidiarreica en la medicina tradicional. Esta actividad ha sido empíricamente atribuida a la presencia de otros compuestos polifenólicos distintos de los flavonoides, como son los taninos. Sin embargo, diversos estudios han propuesto que, además de los taninos, los flavonoides pueden también colaborar en la actividad antidiarreica de estas drogas utilizadas en la medicina tradicional. Las primeras investigaciones que sugirieron esta posibilidad fueron realizadas por Lutterodt (1989; 1992), quien propuso que la presencia de quercetina en los extractos de las hojas de *Psidium guajava* podía justificar su utilización en el tratamiento de procesos diarreicos agudos. Efectivamente, estudios posteriores describieron que la actividad antidiarreica de esta droga podía atribuirse a la presencia de distintos heterósidos de la quercetina, tales como la guajavarina, la isoquercitrina, hiperina, quercitrina y la 3-getobiosil-quercetina (Lozoya *et al.*, 1994). Otros estudios han corroborado el papel que los flavonoides desempeñan en la actividad antidiarreica de distintas drogas; este es el caso de la ternatina, tetrametoxiflavona presente en *Egletes viscosa*, o del 7-metileriditiol, flavanona aislada de *Artemisia monosperma*, o la cirsimiaritina, flavona aislada de *Artemisia judaica* (Rao *et al.*, 1997; Abu-Niaaj *et al.*, 1993).

De hecho, distintos estudios han establecido la capacidad antidiarreica de los flavonoides en el test del aceite de ricino (consistente en la administración de aceite de ricino a ratones): quercetina, kampferol, morina, miricetina, rutina y ternatina (Rao *et al.*, 1997; di Carlo *et al.*, 1993), mostrando una actividad dosis-dependiente en el rango entre 25 y 100 mg/kg (administrados por vía

intraperitoneal). No obstante, los flavonoides no ejercen sólo un efecto preventivo en este modelo experimental de diarrea aguda, sino que también lo hacen en modelos de diarrea crónica. Así, la quercitrina mostró efecto beneficioso en un modelo de diarrea crónica inducida con lactosa en ratas, reduciendo la producción de heces diarreicas y facilitando la recuperación de la mucosa colonica dañada en las ratas alimentadas con una dieta en la que todos los azúcares absorbibles fueron sustituidos por lactosa (Galvez *et al.*, 1995).

La diarrea es considerada como aquella situación patológica en la que existe una expulsión anormalmente frecuente de heces de baja consistencia. En esencia, este proceso es debido a una alteración en el transporte hidroelectrolítico a través de la mucosa y/o a una alteración en la motilidad. De acuerdo con esto, el estudio de las acciones por las que los flavonoides ejercen el efecto antidiarreico se ha centrado en conocer como afectan a ambas funciones intestinales, las cuales evidentemente se encuentran íntimamente relacionadas. Distintos ensayos *in vivo* han demostrado que los flavonoides inhiben la secreción y la motilidad intestinal, retrasando en consecuencia el tránsito intestinal y contrarrestando la acumulación de fluidos en el lumen intestinal generado en presencia de compuestos secretagogos como el aceite de ricino (Rao *et al.*, 1997; Di Carlo *et al.*, 1993; Meli *et al.*, 1990). Estos estudios revelaron que el efecto se encontraba influenciado en gran medida por la estructura de la molécula. De hecho, los flavonoles (quercetina, kampfrol, morina, miricetina y rutina) fueron los inhibidores más potentes *in vivo*, de manera que las modificaciones en la estructura flavonol (como la ausencia de grupo hidroxilo en C3 y/o la saturación del doble enlace C2-C3, ausencia de grupo carbonilo en C4 o la apertura del anillo B) se traducen en disminución, e incluso pérdida, de la actividad. Además, se

observó igualmente que la incorporación de un azúcar, para formar un heterósido, incrementaba la actividad biológica de estos compuestos.

Los estudios realizados *in vitro* han aportado mas información sobre los mecanismos involucrados en los efectos de los flavonoides sobre la motilidad y el transporte hidroelectrolítico intestinal. Así, estos compuestos inhiben las contracciones inducidas en el íleon aislado de cobaya, tanto eléctricamente como mediante la adición de compuestos contractores (Capasso *et al.*, 1991a; Lutterodt 1992; Herrera *et al.*, 1992; Macander 1986; Abdalla *et al.*, 1989; Gambhir y Banerjee 1992; Galvez *et al.*, 1996; Trute *et al.*, 1997). Es importante señalar que el efecto inhibitor ejercido por los flavonoides fue reversible tras el lavado de la preparación, sugiriendo que la acción inhibitoria no estaba relacionada con un efecto lesivo sobre la maquinaria energética celular del músculo liso intestinal. Gambhir y Banerjee (1992), mediante la comparación de los efectos espasmolíticos ejercidos por los distintos flavonoides frente a las contracciones inducidas con histamina o con acetilcolina en el íleon aislado de cobaya, intentaron establecer la correspondiente relación estructura-actividad. Comprobaron que la quercetina, un flavonol con cinco grupos hidroxilo, era el más potente; la reducción del número de hidroxilos en la estructura flavonol se asociaba con una reducción progresiva de la actividad: desde la fisetina (con cuatro grupos hidroxilos) al flavonol (con un grupo hidroxilo) se observa una reducción progresiva en la potencia de uno y dos órdenes de magnitud en comparación con la quercetina, respectivamente. Por otra parte, la flavona mostró una potencia similar a la fisetina; y aunque la presencia de uno o dos grupos hidroxilos en la estructura de la flavona reducía su actividad, la incorporación de más grupos hidroxilos se traducía en una recuperación de la misma. Estos

requerimientos estructurales confirmaron observaciones previas realizadas en la misma preparación por otros autores (Macander 1986; Capasso *et al.*, 1991b), y están de acuerdo con la mayor actividad observada *in vivo* para los flavonoles como inhibidores del tránsito intestinal en el intestino delgado (Di Carlo *et al.*, 1993). Sin embargo, la introducción de un azúcar en la estructura del flavonoide, obteniendo el correspondiente heterósido, se traduce en una pérdida de la actividad *in vitro*, en contraposición con los resultados obtenidos *in vivo*. Esto sugiere que, aunque la genina es la parte responsable de la actividad del heterósido, la presencia del azúcar hace al flavonoide más accesible al órgano diana que cuando la genina es administrada como tal *in vivo*. Estudios posteriores realizados en cámara de Üssing han confirmado estas observaciones, de manera que la rutina, un heterósido de la quercetina, a diferencia de la quercetina, carecía de efecto alguno sobre el transporte hidroelectrolítico en preparaciones de colon aislado de rata (Cermak *et al.*, 1998).

Distintos ensayos *in vitro* han permitido profundizar en los mecanismos de acción involucrados en los efectos de los flavonoides sobre estas dos funciones intestinales: motilidad y transporte hidroelectrolítico a través de la mucosa. No obstante, es importante indicar que la mayoría de estos estudios se han llevado a cabo con la quercetina, que es el flavonoide mayoritario en la naturaleza.

III.1.- Efectos de los flavonoides en los ensayos *in vitro* de motilidad gastrointestinal

El hecho de que los flavonoides, tal y como se ha indicado anteriormente, sean capaces de inhibir las contracciones del íleon aislado de cobaya, inducidas tanto eléctricamente como farmacológicamente (acetilcolina, prostaglandina E₂, histamina), hace pensar que la actividad espasmolítica manifestada por estos compuestos no esté relacionada con su interacción con receptores específicos. De hecho, la inhibición por parte de la quercetina de las contracciones inducidas con carbacol en el íleon aislado de cobaya se ha comprobado que es de tipo no competitivo (Galvez *et al.*, 1996). Por tanto, es probable que los flavonoides actúen en una de las procesos intracelulares que tienen lugar tras la activación del correspondiente receptor, y que además se caracteriza por ser común a la respuesta de distintos estímulos. En este sentido, la actividad espasmolítica de distintos flavonoides es potenciada tras la disminución del calcio extracelular en la preparación o tras la adición de nifedipina, compuesto que bloquea los canales de Ca²⁺ voltaje-dependientes tipo L (Macander, 1986). La respuesta mecánica bifásica generada en el músculo liso intestinal del íleon de cobaya por la acción de la acetilcolina esta bien caracterizada, y corresponde con una movilización inicial de Ca²⁺ de los depósitos intracelulares, seguida de la entrada de este ion al interior de la célula a través de sus canales correspondientes (Hurwitz y Wessinger, 1980; Rasmussen y Barret, 1984; Karaki y Weiss, 1984). Los estudios realizados en nuestro laboratorio con la preparación del íleon aislado de cobaya, han demostrado que la incubación previa con quercetina inhibe los dos componentes de la respuesta contráctil bifásica generada por de carbacol (Galvez *et al.*, 1996). Es probable que en este efecto contribuya el bloqueo por parte de la quercetina de

la entrada de calcio al interior de la célula a través de sus canales correspondientes ya que:

- a) la quercetina presenta un comportamiento similar al manifestado el verapamilo, fármaco antagonista del calcio (Galvez *et al.*, 1996).
- b) el efecto inhibidor de la quercetina es revertido tras la administración del ionóforo del calcio A23187 (Abdalla *et al.*, 1989).
- c) la quercetina inhibe las curvas dosis-respuesta a CaCl_2 en un medio despolarizante rico en potasio (Galvez *et al.*, 1996; Morales *et al.*, 1994).

Por otra parte, la quercetina es también capaz de inhibir la contracción del músculo liso inducida por acetilcolina o histamina en una solución libre de calcio conteniendo EDTA (Abdalla *et al.*, 1989; Galvez *et al.*, 1996), sugiriendo que o bien afecta a la liberación de calcio de los depósitos intracelulares o bien que previene la unión del calcio liberado con la correspondiente proteína efectora (calmodulina, kinasa de la cadena ligera de miosina...), procesos responsables de la respuesta contráctil en estas condiciones (Brading y Sneddon 1980).

Además de sus efectos sobre las vías intracelulares mediadas por Ca^{2+} en la célula muscular lisa, otros mecanismos pueden también contribuir en el efecto espasmolítico de la quercetina. En este sentido, la quercetina es capaz de inhibir la fosfodiesterasa de AMPc, generando un incremento en los niveles intracelulares de AMPc, como se ha podido demostrar en otros tejidos (Beretz *et al.*, 1986; Kuppusamy y Das, 1992; Nikaido *et al.*, 1982). Por tanto, este mecanismo podría contribuir en el efecto de la quercetina ya que la elevación de los niveles

intracelulares de este segundo mensajero genera relajación del músculo liso (Makhlouf y Murthy 1997). Otro mecanismo que puede estar involucrado es la inhibición de la actividad de la protein kinasa C (PKC) (Ferriola *et al.*, 1989), que se ha postulado que contribuye en el efecto relajante de los flavonoides en otros tejidos, como el músculo liso vascular (Duarte *et al.*, 1993b).

III.2.- Efectos de los flavonoides en los ensayos *in vitro* de transporte hidroelectrolítico gastrointestinal.

La mayoría de los estudios encaminados a estudiar el mecanismo de acción antisecretor de los flavonoides, fundamentalmente de la quercetina, se han realizado utilizando segmentos intestinales procedentes de animales de experimentación o líneas celulares epiteliales humanas (células T₈₄) montadas en cámara de Üssing (Dharmasathaphorn y Madara, 1990), dispositivo que permite la monitorización continua del transporte electrolítico a través de las células epiteliales. Estos estudios revelaron que la quercetina ejercía un efecto secretagogo (Cermak *et al.*, 1998; Nguyen *et al.*, 1991; Sánchez de Medina *et al.*, 1997), efecto inicialmente atribuido a la capacidad de este flavonoide de actuar como inhibidor de la fosfodiesterasa y generar un incremento de los niveles intracelulares de AMPc (Kuppusamy y Das, 1992), análogamente a como actúan otros agentes secretagogos como la forskolina (Nguyen *et al.*, 1991). Sin embargo, estudios posteriores han propuesto que el incremento de la secreción electrogénica de cloruros generado por la quercetina en el intestino delgado y grueso de la rata es independiente del aumento en la producción intracelular de AMPc, y diferente del mostrado por la genisteína, una isoflavona que actúa como

inhibidor de la tirosin kinasa y que induce la secreción de cloruros tanto en preparaciones de colon de rata (Diener y Hug, 1996) como en células T₈₄ (Sears *et al.*, 1995; Illek *et al.*, 1996), mediante la estimulación directa del canal CFTR (Wang *et al.*, 1998; Randak *et al.*, 1999). Otros flavonoides, como la tangeritina o la nobiletina, estimulan también la secreción electrogénica de ion cloruro en células T₈₄ (Nguyen y Canada 1993). Análogamente a lo demostrado en otros estudios *in vitro*, la introducción de un azúcar en la estructura del flavonoide genera una pérdida en la actividad (Cermak *et al.*, 1998; Nguyen *et al.*, 1991; Nguyen y Canada 1993). La actividad secretagoga manifestada por la quercetina puede ser considerada paradójica con relación a su actividad antidiarreica anteriormente comentada. En este sentido, en ensayos realizados cámara de Üssing se ha comprobado que la quercetina inhibe la respuesta secretagoga inducida con carbacol tanto en células T₈₄ (Sánchez de Medina *et al.*, 1997) como en el colon de la rata (Cermak *et al.*, 1998); sin embargo, no mostró efecto alguno cuando la respuesta secretora era inducida con péptido intestinal vasoactivo (VIP) (Sánchez de Medina *et al.*, 1997). Estos resultados sugieren a que la quercetina puede inhibir la vía intracelular mediada por calcio en el enterocito, de forma similar al mecanismo propuesto anteriormente para explicar su efecto espasmolítico. No obstante, no se pueden descartar otros mecanismos; en este sentido la quercetina inhibe la secreción de cloruros inducida por el éster del forbol PMA (Sánchez de Medina *et al.*, 1997), un efecto que puede estar relacionado con la capacidad de este flavonoide de inhibir la actividad de la enzima PKC (Ferriola *et al.*, 1989).

IV. ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA INTESTINAL DE LOS FLAVONOIDES

Bajo la denominación de Enfermedad Inflamatoria Intestinal (EII) se engloban fundamentalmente dos patologías: la enfermedad de Crohn (EC) y la colitis ulcerosa (CU). Ambas se caracterizan por ser enfermedades inflamatorias de evolución crónica en las que se alternan períodos de exacerbación de los síntomas con intervalos más o menos prolongados de remisión de los mismos (Obrador y Riera, 1994).

Aunque la etiología de estas patologías no se conoce con exactitud en la actualidad, se ha propuesto que se generan como consecuencia de una respuesta inmune exacerbada y descontrolada ante un estímulo que, en condiciones normales, o bien sería inocuo o bien desarrollaría una respuesta limitada (Fiocchi, 1998). La activación del sistema inmune intestinal genera un incremento en la síntesis y liberación de diferentes mediadores proinflamatorios, incluyendo citoquinas, eicosanoides y metabolitos reactivos del oxígeno y del nitrógeno, junto con un incremento en la permeabilidad vascular y reclutamiento de células inflamatorias. Todos estos procesos contribuyen de forma activa en la cascada de sucesos que generan y perpetúan la respuesta inflamatoria en el intestino (Sartor, 1997).

Aunque estas enfermedades inflamatorias crónicas han sido objeto de un gran esfuerzo por parte de la comunidad científica en los últimos años, su terapia sigue siendo paliativa más que curativa, asociándose con una elevada incidencia de reacciones adversas. Por este motivo, existe en la actualidad un gran interés en el desarrollo de nuevos agentes aplicables en el tratamiento de la EII que

combinen eficacia con pocos efectos adversos, con la consiguiente mejora en su calidad de vida. Este puede ser el caso de los flavonoides, compuestos que además de estar dotados de una baja toxicidad (Middleton *et al.*, 2000), presentan unas características idóneas para ser considerados como compuestos antiinflamatorios aplicables en la EII:

- a) inhiben distintas enzimas cuya expresión y/o actividad se encuentran incrementadas en los procesos inflamatorios (Wollenweber, 1988)
- b) disminuyen la actividad de diversas células del sistema inmune, tal y como se ha podido comprobar en distintos ensayos *in vitro* (Middleton, 1998; Middleton *et al.*, 2000)
- c) son compuestos que presentan propiedades antioxidantes y/o antirradicalarias *in vitro* (Mora *et al.*, 1990); habiéndose incluso demostrado para algunos de ellos la capacidad de incrementar el contenido intestinal de glutatión cuando se administran a ratas normales por vía oral, protegiendo el intestino del daño de tipo lipoperoxidativo que puede generarse cuando existe una sobreproducción de radicales libres (Valenzuela *et al.*, 1989; Galvez *et al.*, 1994).

El primer estudio que apuntó el potencial efecto beneficioso de los flavonoides en la EII fue realizado por Galsanov *et al.* (1976). En él se describe la actividad antiinflamatoria presentada por la quercitrina, a las dosis de 25 y 100 mg/kg, en un modelo de inflamación intestinal de tipo alérgico en rata. Mas recientemente se ha valorado la actividad de los flavonoides en dos modelos bien

establecidos de inflamación intestinal en rata, el modelo del ácido acético y el del ácido trinitrobenzenosulfónico (TNBS), que presentan algunas similitudes con la EII en humanos (Elson 1995). Distintos flavonoides han mostrado actividad antiinflamatoria intestinal en estos modelos, incluyendo heterósidos como la quercitrina (Sánchez de Medina *et al.*, 1996), la rutina (Galvez *et al.*, 1997; Cruz *et al.*, 1998), la diosmina y la hesperidina (Crespo *et al.*, 1999), y geninas como la morina o la silimarina (Ocete *et al.*, 1998; Cruz *et al.*, 2000; Galvez *et al.*, 2001). Estos efectos beneficiosos se han puesto de manifiesto tanto en las fases aguda y crónica del proceso inflamatorio intestinal. Así, los flavonoides previenen el daño colónico agudo cuando se administran antes de la administración del agente lesivo (ácido acético o TNBS), y facilitan la recuperación del tejido colónico dañado en la fase crónica del proceso inflamatorio cuando se inicia la administración del flavonoide una vez inducido el daño. Es difícil establecer una relación estructura-actividad, ya que el número de flavonoides ensayado hasta el momento es bajo. No obstante, diferentes tipos de flavonoides, incluyendo flavonoles (en forma de heterósidos como la quercitrina y la rutina o como geninas como la morina), un heterósido de flavona (la diosmina), un heterósido de flavanona (la hesperidina) y un flavanolignano (la silimarina) han mostrado actividad. De todos los flavonoides ensayados hasta el momento, la quercitrina es el más potente, al ejercer su actividad ‘preventiva’ o ‘curativa’ a las dosis de 1 y 5 mg/kg, mientras que el resto de los flavonoides ejercen su actividad antiinflamatoria intestinal en un rango de dosis entre 10 y 25 mg/kg, cuando se trata de los heterósidos, y entre 10 y 200 mg/kg cuando se estudiaron las geninas.

Se ha propuesto la participación de distintos mecanismos en la actividad antiinflamatoria intestinal de los flavonoides:

- a) Propiedades antioxidantes y/o antirradicalarias. Todos los flavonoides estudiados mejoran el estado de estrés oxidativo asociado al proceso inflamatorio intestinal inducido experimentalmente (Loguercio *et al.*, 1996; Galvez *et al.*, 2000), ya que o bien preservaban la depleción de glutatión o reducían el contenido colónico de malondialdehído (MDA), dos de los marcadores bioquímicos indicativos del grado de peroxidación lipídica en el tejido intestinal. Este efecto puede considerarse de gran interés dado que los radicales libres, incluyendo los derivados del oxígeno y los del nitrógeno, desempeñan un papel clave en la etiopatogénesis de la EII en humanos (Yamada y Grisham, 1994).
- b) Actuación sobre el metabolismo del óxido nítrico (NO). Es importante señalar el creciente interés que ha suscitado en la última década el NO en la patogénesis de la EII (Grisham *et al.*, 1999). En condiciones fisiológicas, se generan pequeñas cantidades de NO por parte de la isoforma constitutiva de la óxido nítrico sintasa (cNOS), que ejerce un efecto protector directo en las fases iniciales del proceso inflamatorio intestinal, principalmente al inhibir la interacción entre el leucocito y el endotelio vascular así como al reducir la permeabilidad epitelial (Lefter y Lefter 1999). Por el contrario, la síntesis de NO se incrementa en situaciones de inflamación crónica, principalmente como consecuencia de la expresión de la isoforma inducible de la óxido nítrico sintasa (iNOS). La sobreproducción de NO da lugar a un efecto lesivo como consecuencia de su interacción con el anión superóxido, generando especies reactivas como el peroxinitrito, que ocasiona una situación de

estrés oxidativo y daño tisular (Miller y Sandoval, 1999). De acuerdo con esto, es probable que las propiedades biológicas de los flavonoides puedan interferir con el metabolismo del NO. En primer lugar, los flavonoides pueden preservar las funciones beneficiosas del NO al captar directamente aniones superóxido (Sichel *et al.*, 1991); en segundo lugar, los flavonoides son capaces de inhibir la iNOS (Chan *et al.*, 1997); y, por último, actúan como potentes captadores de radicales peroxinitrito (Haenen *et al.*, 1997). En consecuencia, los flavonoides pueden prevenir los efectos perjudiciales generados por el NO en situaciones de inflamación intestinal. De hecho, se ha podido comprobar que el tratamiento con morina a animales con inflamación intestinal inducida con TNBS se traduce en una disminución en la actividad de la NOS en explantes intestinales procedentes de animales colíticos (Galvez *et al.*, 2001).

- c) Inhibición de la actividad lipooxigenasa y reducción en la producción de leucotrieno B₄ (LTB₄). Distintos estudios han postulado que el LTB₄ es un mediador inflamatorio con una importante función en la EII; de hecho, la inhibición de su síntesis (Bertran *et al.*, 1996) o el bloqueo de su receptor (Fretland *et al.*, 1996) se traduce en efectos beneficiosos en la colitis experimental. Aunque la mayoría de los flavonoides estudiados reducen la producción de LTB₄ colónico, no se ha podido establecer una relación directa entre la inhibición en los niveles colónicos del eicosanoide y el efecto antiinflamatorio intestinal (Sánchez de Medina *et al.*, 1996, Ocete *et al.*, 1998). En cualquier caso, se puede pensar que la combinación de la acción inhibitoria de la

síntesis de LTB₄ colónico con la actividad antioxidante contribuya en el efecto beneficioso manifestado por los flavonoides en los modelos de colitis experimental. Así, el LTB₄ facilita la quimiotaxis de los neutrófilos, su adherencia y degranulación en el colon inflamado por el TNBS (Fretland *et al.*, 1996). Como consecuencia de la actividad metabólica de estos granulocitos se genera la sobreproducción de radicales libres responsables de fenómenos de citotoxicidad directos en el tejido intestinal, que facilita la liberación adicional de distintos mediadores proinflamatorios (Yamada y Grisham 1994). De hecho, en la mayoría de los estudios con los flavonoides en modelos de colitis experimental se observa una reducción significativa en la actividad mieloperoxidasa colónica, enzima que se encuentra predominantemente en los gránulos azurofílicos de los neutrófilos. Por tanto, esta actividad enzimática es considerada como un marcador sensible de la infiltración de estos leucocitos, por lo que su determinación es utilizada para valorar la actividad antiinflamatoria de un compuesto dado (Veljaca *et al.*, 1995).

- d) Inhibición en la producción de citoquinas proinflamatorias. Esta actuación se deriva fundamentalmente de los resultados obtenidos con ensayos *in vitro* realizados con los flavonoides. En este sentido, Manthey *et al.*, (2001) revisaron la capacidad de distintos flavonoides presentes en los cítricos de inhibir la expresión de la citoquina TNF α en monocitos humanos, como distintas polimetoxiflavonas, el kampferol, la apigenina y la quercetina, siendo la más potente la heptametoxiflavona, que era capaz de inhibir la producción de IL-10

pero no la de IL-1 β , IL-6 o IL-8. Estos autores establecieron la hipótesis de que, entre otros mecanismos, la capacidad manifestada por estos flavonoides de inhibir la actividad fosfodiesterasa podía estar relacionada con la inhibición en la producción de citoquinas. Posteriormente, Xagorari *et al.* (2001) describieron que los flavonoides luteolina, 7-glucósido de luteolina, la quercetina y la genisteína inhibían la liberación de TNF α y de IL-6 en células RAW 264.7 estimuladas con LPS, mientras que el eriodictiol y la hesperetina sólo inhibían la producción de TNF α . Estos mismos autores concluyeron que el compuesto más potente fue la luteolina, y que en su acción estaba involucrada su capacidad de inhibir la fosforilación de residuos de tirosina en proteínas, y en consecuencia la expresión génica mediada por el factor de transcripción NF- κ B y la subsiguiente producción de citoquinas proinflamatorias. Esta capacidad de interferir con la vía de activación del NF- κ B fue previamente descrita para la quercetina, como consecuencia de una inhibición en la actividad de las quinasas de las I κ B, proteínas que cuando se encuentra fijadas al NF- κ B en el citoplasma celular previenen su traslocación al núcleo, pero que cuando son fosforiladas por las correspondientes quinasas son degradadas, liberando el NF- κ B que es capaz de dirigirse al núcleo donde activa la transcripción de los correspondientes genes diana, promoviendo la formación de citoquinas proinflamatorias, como el TNF α (Peet y Li, 1999). Además de reducir la producción y liberación de estos mediadores, se ha descrito que flavonoides como la apigenina, la luteolina y la quercetina son capaces de inhibir las acciones que las

citoquinas ejercen sobre los distintos tipos celulares tras la actuación sobre sus correspondientes receptores (Panés *et al.*, 1996; Habtemariam, 1997; Ishikawa *et al.*, 1999). Con relación a los estudios *in vivo*, hasta el momento, únicamente se ha descrito que el tratamiento con morina es capaz de inhibir la producción de IL-1 β en la fase crónica de la inflamación intestinal inducida con TNBS (Gálvez *et al.*, 2001). La IL-1 β es una citoquina producida principalmente por los macrófagos activados, y que se ha implicado en la patogénesis de la EII, tanto en humanos (Ligumsky *et al.*, 1990) como en modelos experimentales (Rachmilewitz *et al.*, 1989; va Dijk *et al.*, 1995).

- e) Preservación de la función absortiva colónica. La función absortiva colónica se encuentra profundamente alterada en la inflamación intestinal (Sánchez de Medina *et al.*, 2002), de forma que su restauración puede contribuir, conjuntamente con las acciones comentadas anteriormente, en los efectos beneficiosos manifestados por los flavonoides en los modelos de colitis experimental. De hecho se ha propuesto que una alteración en la permeabilidad intestinal puede ser un factor desencadenante del proceso inflamatorio intestinal (Brandzaeg *et al.*, 1999), ya que un epitelio ‘fácilmente permeable’ puede permitir la entrada en la *lamina propria* de antígenos bacterianos o procedentes de la dieta, que no sean convenientemente anulados por el sistema inmune de la mucosa intestinal pudiendo desencadenar la respuesta inflamatoria descontrolada. Se ha podido comprobar que la absorción colónica de fluidos *in vivo* se encuentra profundamente comprometida en diferentes modelos experimentales de inflamación

intestinal, siendo una de las funciones que más tarda en recuperarse como consecuencia del proceso inflamatorio (Sánchez de Medina *et al.*, 1996), habiéndose descrito que se encuentra incluso alterada cuando la recuperación histológica es prácticamente completa (Asfaha *et al.*, 2001). De los distintos flavonoides estudiados, la quercitrina (Sánchez de Medina *et al.*, 1996), la rutina (Galvez *et al.*, 1997), la hesperidina (Crespo *et al.*, 1999) y la morina (Ocete *et al.*, 1998) han demostrado su capacidad de promover la mejora de la funcionalidad absortiva colónica en los animales colíticos. No obstante, únicamente la quercitrina fue capaz de restaurar completamente el transporte hidroelectrolítico colónico, lo que se tradujo en una reducción de la incidencia de diarrea en comparación con el correspondiente grupo control (sin tratamiento con el flavonoide), siendo éste uno de los síntomas que caracterizan la inflamación intestinal. Es importante tener en cuenta que la mejora en esta funcionalidad colónica puede ser una consecuencia, más que una causa, de la recuperación más rápida de la mucosa sometida al proceso inflamatorio. En cualquier caso, anteriormente ya se describió la capacidad de los flavonoides de actuar sobre el transporte hidroelectrolítico alterado y que permitía justificar su actividad antidiarreica.

OBJETIVOS

Este trabajo de Tesis Doctoral surgió como consecuencia de una ayuda solicitada al Departamento de Farmacología de la Universidad de Granada por la Organización Medicus Mundi Granada. La colaboración solicitada consistía en constatar científicamente el uso empírico de una serie de plantas utilizadas con fines terapéuticos en la región de Pama en Burkina Faso (Africa). Entre estas plantas llamó la atención a los médicos de la Organización establecidos en la zona la clara actividad antidiarreica de la sumidad de *Euphorbia hirta* L.

El objeto de esta Tesis Doctoral consiste en investigar los efectos de esta droga en patologías intestinales. Para llevar a cabo este estudio, nos planteamos las siguientes líneas de actuación:

- 1) Constatación de la actividad antidiarreica, acción por la que se viene empleando de forma tradicional y empírica en su región de origen.
- 2) Aislamiento e identificación de un principio activo responsable de su actividad y estudio del mecanismo de acción que justifique su efecto antidiarreico
- 3) Ampliar los estudios farmacológicos del principio aislado, con la búsqueda de nuevas actividades farmacológicas frente a otras patologías en las que los fenómenos diarreicos constituyan una alteración clave, como es la enfermedad antiinflamatoria intestinal.

La consecución de estos objetivos específicos nos permitirán, por una parte, establecer las bases terapéuticas para ampliar el arsenal terapéutico

existente en la actualidad en el tratamiento de patologías del tracto gastrointestinal y, por otra parte, ayudar al Tercer Mundo mediante la potenciación de los recursos naturales en estos países en vías de desarrollo.

MATERIAL Y MÉTODOS

I. MATERIAL VEGETAL

El material objeto de nuestro estudio estaba constituido por la planta entera de la especie *Euphorbia hirta* L. (Euphorbiaceae), que fue suministrada por la Organización *Medicus Mundi*, del que se utilizaba con fines terapéuticos en la región de Pama en Burkina Faso (antiguo Alto Volta). La identificación de la planta fue verificada por el Profesor Dr. Oswaldo Socorro del Departamento de Biología Vegetal de la Universidad de Granada. La muestra, una vez en nuestro laboratorio, fue pulverizada con un molino de martillo marca 'Bauknecht' provisto de tamiz con un diámetro de luz de malla de 5 mm. La droga pulverizada fue almacenada en arcón frigorífico a 2–4 °C hasta el momento de la preparación de los correspondientes extractos objeto de estudio.

Para la realización de los ensayos farmacodinámicos encaminados a poner de manifiesto la actividad antidiarreica de la planta, se preparó un cocimiento de la droga pulverizada de acuerdo con Farmacopea Española (IX edición). Este cocimiento fue liofilizado, obteniéndose un rendimiento del 29,8 % (p/p), y posteriormente almacenado en cámara frigorífica a 4°C hasta el momento de su utilización.

II. FRACCIONAMIENTO QUIMICO DE LA DROGA

Una vez constatada la actividad antidiarreica de la droga, se procedió a la realización de un fraccionamiento químico guiado de la muestra objeto de estudio, utilizando el test del aceite de ricino (Doherty y Hancock, 1983) para determinar cuáles eran las fracciones activas. El fraccionamiento se realizó siguiendo el procedimiento descrito previamente por Yoshida *et al.* (1988) (Figura 4). Para ello, 350 g de la droga pulverizada se interpuso en una mezcla de acetona:agua (7:3 v/v), macerándose durante 12 h a 4°C con agitación, filtrándose seguidamente el extracto resultante. A continuación, se evaporó la acetona a presión reducida en rotavapor, y la solución acuosa remanente fue extraída sucesivamente con éter etílico (rendimiento = 1,98 %), acetato de etilo (rendimiento = 1,65 %) y n-butanol saturado con agua (rendimiento = 3,43 %). Los ensayos farmacológicos revelaron que la fracción activa fue la de acetato de etilo, fracción con la que se continuó el fraccionamiento químico de la muestra. Tras la eliminación del acetato de etilo a presión reducida, una parte del residuo (2,84 g) fue sometido a cromatografía en columna con Sephadex LH-20 (Pharmacia) (39,0 x 2,7 cm) como fase estacionaria, que fue desarrollada con etanol al 50 %. Las distintas fracciones obtenidas fueron analizadas mediante cromatografía en capa fina y reunidas en siete fracciones principales (I – VII). De ellas, la fracción V (260 mg) fue la activa farmacológicamente, por lo que fue sometida a una nueva cromatografía en columna de Sephadex LH-20 (22,0 x 1,7 cm), utilizando etanol al 99 % como fase móvil, consiguiendo el aislamiento de un compuesto, la quercitrina (punto de ebullición: 176-179 °C), que fue identificado en función de sus características espectrales y mediante comparación directa con él producto puro adquirido comercialmente (Extrasynthèse, Genay, Francia).

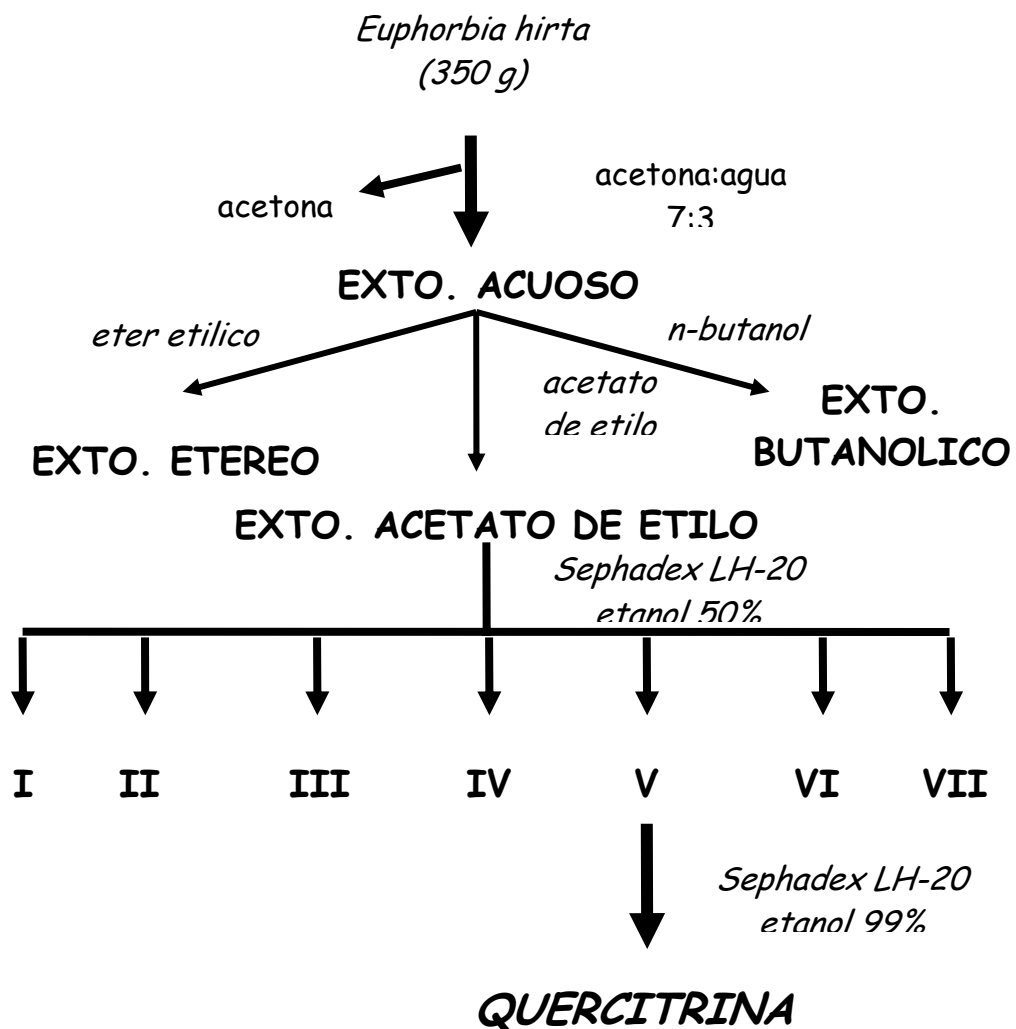


Figura 4. Esquema de fraccionamiento de la planta entera de *Euphorbia hirta* L.

III. ENSAYOS FARMACODINAMICOS

Los distintos ensayos in vivo se realizaron conforme a las directivas de la Convención para la protección de los animales vertebrados usados en experimentación y con otros fines científicos establecidas por la Unión Europea (85/ETS123; 86/609/EEC)

III.1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Los animales utilizados en este estudio fueron suministrados por el Servicio de Animales de Laboratorio de la Universidad de Granada:

- Ratones albinos hembra de la cepa Swiss Offi (20–25g de peso)
- Ratas albinas hembra de la cepa Wistar (180-200 g de peso)

Una vez en el Laboratorio, se mantuvieron en el estabulario del Departamento de Farmacología de la Facultad de Farmacia al menos 5 días antes de iniciar los experimentos, a una temperatura de 22 ± 2 °C y con un ciclo de luz-oscuridad de 12 horas. Los animales fueron alojados en cubetas de makrolon con lecho de viruta, y dispuestas en rack de acero inoxidable, en grupos de hasta 4-5 por jaula, y alimentados con una dieta estándar para roedores (Panlab A04) y agua corriente *ad libitum*.

III.2. ENSAYOS DE TOXICIDAD AGUDA.

Los ensayos de toxicidad aguda se realizaron mediante la determinación de la Dosis Letal 50 (DL₅₀), de acuerdo con el método descrito por Miller y Tainter (1944). Para ello, distintos grupos de ratones (n=8) fueron sometidos a un ayuno previo de 18 h y administrados por vía oral con dosis crecientes del cocimiento liofilizado disuelto en agua, con un volumen constante de 0,5 ml. Una vez administrados los animales, se colocan en sus jaulas respectivas provistas de agua, y se observaron durante las primeras tres horas los fenómenos que pudieran producirse en los animales. Transcurrido este tiempo, se les suministró comida y, a las 24 horas, se realiza el último control de los animales estableciéndose la relación final entre los animales vivos y muertos para cada grupo.

Los datos obtenidos para cada dosis se transforman en porcentaje de muertos y estos, a su vez, en 'probits'. En los casos en los que las dosis administradas generen un 0% o un 100% de mortalidad, los probits no tendrían un valor finito, calculándose en consecuencia sus valores aproximados mediante la siguiente transformación:

$$\text{Probits (0\% mortalidad)} = [(1/n)/n \times 100]$$

$$\text{Probits (100\% mortalidad)} = [(n-1/n)/n \times 100]$$

Se realiza la representación gráfica llevando a ordenadas los probits calculados y a abscisas los logaritmos de las dosis utilizadas. El valor de la DL₅₀ se obtiene directamente al interpolar en la recta el valor 50 % de mortalidad (correspondiente con el probit 5), y su error estándar aplicando la siguiente fórmula: $E = (DL_{84\%} - DL_{16\%}) / (2 \times 2n)$

III.3. MODELOS DE DIARREA INDUCIDA EXPERIMENTALMENTE

Los distintos modelos de diarrea experimental se fundamentaron en la administración a ratones de distintos compuestos capaces de inducir un proceso diarreico en los animales. Los agentes utilizados fueron:

- aceite de ricino (Acofarma, Madrid, España) (0,5 ml/ratón *p.o.*) (Doherty y Hancock, 1983)
- sulfato magnésico (Merck, Barcelona, España) (2 g/kg *p.o.*) (Galvez *et al.* 1991)
- ácido araquidónico (Sigma, Madrid, España) (15 mg/kg *i.p.*) (Galvez *et al.* 1993)
- prostaglandina E₂ (Sigma, Madrid, España) (1 mg/kg *i.p.*) (Galvez *et al.* 1993)

Tras la administración del compuesto, los animales fueron dispuestos individualmente en jaulas de makrolon con papel de filtro en el fondo, que fue sustituido cada 30 minutos. La valoración del proceso diarreico se realizó mediante:

- a) determinación del tiempo transcurrido entre la administración del agente inductor de la diarrea y la excreción de las primeras heces diarreicas,

- b) determinación del porcentaje de heces diarreicas respecto al total de heces excretadas durante las siguientes 4 horas tras la inducción del proceso diarreico.

En estos ensayos el material objeto de estudio (liofilizado del cocimiento de la droga, fracción resultante del fraccionamiento químico de la droga, o el flavonoide quercitrina) fue administrado por vía oral, a las dosis correspondientes, a distintos grupos de ratones (n = 10) 60 minutos antes de la administración del agente inductor del proceso diarreico. Los resultados obtenidos con cada grupo tratado fueron comparados con los del grupo control, que recibió el vehículo utilizado en la administración del correspondiente compuesto objeto de estudio.

III.4. ENSAYOS DE TRÁNSITO INTESTINAL

III.4.1. Tránsito intestinal total

En estos ensayos se utilizaron distintos grupos de ratones (n=5), que se colocaron individualmente en jaulas de makrolon con papel de filtro en la base. Dos grupos de animales recibieron por vía oral la dosis correspondiente de cocimiento liofilizado (350 o 700 mg/kg) disuelta en 0,5 ml de agua junto con rojo carmín (1%), mientras que un grupo de animales control sólo recibió la suspensión de rojo carmín. A continuación se determinó el tiempo transcurrido entre la administración del marcador y la excreción de las primeras heces coloreadas

III.4.2. Tránsito en intestino delgado

Estos ensayos se realizaron mediante la técnica descrita por Leng-Peschlow (1986) utilizando ratas sometidas a ayuno durante las 24 horas previas al inicio del experimento. Éste consistió en la administración por vía oral de 1 ml de una suspensión formada por carbón activo (10%) interpuesto en una solución acuosa de goma arábica (1,5 % p/v). La administración de esta suspensión utilizada como marcador del tránsito intestinal se realizó 60 minutos después de la administración oral del compuesto (quercitrina) o extracto (liofilizado del cocimiento) objeto de estudio. Los animales correspondientes al grupo control recibieron el vehículo utilizado (1 ml de agua destilada). Transcurridos 30 minutos de la administración del marcador se procedió al sacrificio de los animales mediante dislocación cervical, y el intestino delgado extraído rápidamente, teniendo la precaución de no desplazar los contenidos intestinales en el proceso. Seguidamente se determinó la distancia recorrida por el carbón activo, y se expresó como porcentaje de la longitud total del intestino delgado de la rata.

En algunos experimentos, este tránsito intestinal fue estimulado mediante la administración oral de aceite de ricino (1 ml/rata) conjuntamente con la suspensión del carbón activo/goma arábica.

III.5. ENSAYOS DE TRANSPORTE HIDROELECTROLÍTICO COLÓNICO

Se utilizó el método del colon ligado de la rata propuesto por Beubler y Juan (1979), con algunas modificaciones. Para ello, tras un ayuno previo de 24

horas las ratas se anestesiaron con nembutal (40 mg/kg i.p.), y, tras realizar una laparotomía media abdominal, el colon fue limpiado de sus contenidos lumbinales utilizando 50 ml de solución Tyrode templada (37 °C) con la ayuda de una jeringa, seguido de la inyección de aire para eliminar todo resto de líquido colónico. Inmediatamente después de limpiar el colon, éste fue llenado con 2,5 ml de solución Tyrode, y ligado en ambos extremos. Seguidamente, las ratas se disponen en una superficie caliente a 37 °C y, transcurridos 30 minutos, son sacrificadas mediante dislocación cervical, siendo el volumen de líquido colónico determinado gravimétricamente. El transporte de fluido neto colónico se obtuvo mediante el cálculo de la diferencia entre el volumen final y el introducido inicialmente, expresando los resultados como ml/30 min/g de tejido. La absorción neta se indica por un valor negativo mientras que la secreción neta lo es por un valor positivo.

Para valorar el efecto que la quercetina o la quercitrina tenían sobre los procesos de absorción hidroelectrolítica colónicos, los flavonoides fueron incorporados a diferentes concentraciones en los 2,5 ml de solución Tyrode introducidos en el colon de la rata. En algunos experimentos, y con objeto de inhibir la absorción de agua e iones en el colon y estimular su secreción, se incorporó en la solución Tyrode o bien PGE₂ (0,12 mM) o bien picosulfato sódico (0,45 mM). En otros experimentos, para poder valorar el papel de la flora colónica, los ensayos se realizaron sin el lavado previo del lumen colónico con la solución Tyrode, de acuerdo con el método propuesto por Beubler y Badhri (1990).

III.6. MODELOS DE COLITIS EXPERIMENTAL

III.6.1. Colitis experimental inducida por sulfato de dextrano sódico

La colitis se indujo utilizando el método descrito por Stucchi *et al.* (2000), consistente en la incorporación de sulfato de dextrano sódico (DSS) (Biolink, Barcelona, España) al 5 % (p/v, preparada diariamente, peso molecular: 36.000-50.000) en el agua de bebida de las ratas, las cuales fueron alojadas en jaulas individuales durante el desarrollo de la experiencia.

Los animales fueron distribuidos de forma aleatoria en tres grupos experimentales:

- a) Grupo blanco (n = 8), animales a los que no se les indujo el proceso inflamatorio intestinal y a los que se les administró por vía oral y diariamente el mismo vehículo utilizado para administrar el flavonoide (agua destilada; vol = 1 ml).
- b) Grupo control (n = 8), constituido por los animales a los que se les suministró el DSS en el agua de bebida, y a los que se les administró por vía oral y diariamente el mismo vehículo utilizado para administrar el flavonoide (agua destilada; vol = 1 ml).
- c) Grupo tratado con quercitrina (n = 8), compuesto por los animales a los que se les indujo el proceso inflamatorio intestinal y que recibieron el tratamiento de quercitrina diariamente, a las dosis de 1 mg/kg, interpuesta en agua destilada (vol = 1 ml).

El tratamiento con el flavonoide se inició el mismo día en el que se incorporó el DSS en el agua de bebida, y se mantuvo hasta el día antes del sacrificio de los animales, que tuvo lugar 8 días después de iniciada la experiencia. Durante este periodo de tiempo se controló diariamente el peso y el consumo de comida de los animales, la consistencia de las heces, y la presencia o no de sangre en las mismas. Estos parámetros permitieron asignar diariamente a cada animal un índice de actividad de la enfermedad (IAE), de acuerdo con los criterios propuestos por Cooper *et al.* (1993) (Tabla 1).

Tabla 1. Escala de valoración del índice de actividad de la enfermedad (IAE) en el modelo de colitis experimental inducida con sulfato de dextrano sódico

<i>IAE</i>	<i>Pérdida de peso</i>	Consistencia de las heces	Presencia de sangre en las heces
0	No	Normal	No
1	1 – 5 %		
2	5 – 10 %	Blanda	
3	10 – 20 %		
4	> 20 %	Diarrea	Sí

El valor de IAE para cada animal combina el valor de la pérdida de peso, la consistencia de las heces y la presencia o no de sangre en las heces dividido por tres.

III.6.2. Colitis experimental inducida por oxazolona

La colitis por oxazolona se indujo en ratas previamente sensibilizadas utilizando el método descrito por Ekstrom (1998). Para ello, los animales fueron anestesiados con halotano y se procedió a su sensibilización mediante la administración tópica de 12 mg de oxazolona disueltos en acetona/etanol 95% (1/4, v/v) durante dos días consecutivos. Transcurridos 7 días de la primera administración tópica de oxazolona, los animales tras ayuno previo de 24 horas, fueron anestesiados con halotano y recibieron por vía intracolónica 6 mg de oxazolona interpuestos en 0,2 ml de una emulsión compuesta por una mezcla, a partes iguales, de metilcelulosa (1%, p/v) y aceite de oliva virgen. La instilación se realizó introduciendo un catéter de teflón (2 mm de grosor) 8 cm desde el ano, manteniendo a los animales en posición supina hasta la recuperación de la anestesia.

Todos los animales fueron sensibilizados con oxazolona, como se ha indicado, y se distribuyeron de modo aleatorio en tres grupos experimentales:

- a) Grupo blanco (n = 8), animales sin inflamación a los que se les administró por vía rectal 0,2 ml de la emulsión de metilcelulosa y aceite de oliva virgen utilizada para interponer la oxazolona; mientras que por vía oral recibieron diariamente el mismo vehículo utilizado para administrar el flavonoide (agua destilada; vol = 1 ml).
- b) Grupo control (n = 8), ratas a las que se les indujo la colitis con oxazolona y que recibieron diariamente el mismo vehículo utilizado para administrar el flavonoide (agua destilada; vol = 1 ml).

- c) Grupo tratado con quercitrina (n = 8), animales a los que se les indujo el proceso inflamatorio intestinal con oxazolona y que recibieron el tratamiento de quercitrina diariamente, a las dosis de 1 mg/kg, interpuesta en agua destilada (vol = 1 ml).

El tratamiento con el flavonoide se inició dos horas antes de la administración intracolónica de oxazolona. Durante el desarrollo de estas experiencias se controló diariamente el peso y el consumo de comida de los animales, así como la aparición de diarrea por visualización de restos perianales una vez inducida la colitis con la oxazolona. Todos los animales fueron sacrificados a los tres días de la instilación intracolónica del agente inflamatorio intestinal.

III. 6. 3. Valoración del proceso inflamatorio intestinal.

Las alteraciones intestinales se caracterizaron macroscópica, histológica y bioquímicamente.

Una vez sacrificados los animales mediante una sobredosis de halotano, se les extrajo el colon en su totalidad, observándose la existencia o no de adhesiones entre el intestino grueso y los órganos adyacentes. Seguidamente se procedió a la limpieza de los distintos segmentos intestinales de sus contenidos luminales con solución salina isotónica y, tras colocarlos sobre una placa Petri con hielo, se eliminaron los restos de grasa y las adhesiones mesentéricas. Seguidamente se determinó su longitud bajo una tensión constante de 2 g, así como su peso. El colon se abrió longitudinalmente y un observador ajeno al desarrollo del

experimento caracterizó el daño macroscópico, poniéndose de manifiesto las distintas características del proceso inflamatorio en cuestión.

Por último, el colon se dividió en distintos fragmentos longitudinales que, a excepción de uno, fueron congelados inmediatamente a -80°C para la realización posterior de las determinaciones bioquímicas. El segmento destinado a la determinación de glutatión total, se congeló en 1 ml de ácido tricloroacético (TCA) (Fluka, Madrid, España) al 5 % (p/v), con objeto de inhibir su degradación por la γ -glutamil transpeptidasa (Anderson, 1985). El fragmento no congelado fue procesado en el momento de su obtención para la determinación de la producción colónica de LTB_4 . Todas las determinaciones se realizaron en las dos semanas siguientes al sacrificio de los animales.

III.6.3.1 Determinación de la actividad mieloperoxidasa.

La determinación de la actividad mieloperoxidasa (MPO) se realizó por el método descrito por Krawisz *et al.* (1984). Esta enzima se utiliza como marcador de la infiltración de neutrófilos, aunque no es una enzima estrictamente específica de estos fagocitos.

Los fragmentos de colon se disponen sobre una placa Petri enfriada con hielo y se pican con tijeras durante aproximadamente 15 segundos. A continuación, se homogeneizan en tampón de bromuro de hexadeciltrimetilamonio (HTAB) al 0,5 % (p/v) en tampón fosfato salino (50 mM, pH=6), a una dilución final de 1:20 (p/v) en un homogeneizador Heidolph durante

aproximadamente 45 segundos. El HTAB actúa como detergente, lo cual facilita la liberación de la enzima MPO de los gránulos azurófilos de los neutrófilos, donde se encuentra almacenada. Seguidamente, el homogeneizado es sonificado durante 10 segundos y se somete a un triple proceso de congelación-descongelación, procesos que facilitan la ruptura de estructuras celulares, favoreciendo también de este modo la liberación de la enzima. Tras la última descongelación se centrifuga el homogeneizado a 7000 G durante 10 minutos a 4°C y se procede a la determinación de la actividad MPO siguiendo la cinética de la reacción frente al agua oxigenada. Para ello se añaden 100 µl del sobrenadante a 3 ml del reactivo de coloración preparado de forma extemporánea, y compuesto por clorhidrato de o-dianisidina (0,167 mg/ml) y peróxido de hidrógeno al 0,0005 % (p/v) en tampón fosfato (50 mM, pH=6). El incremento de absorbancia se determina a 450 nm en un espectrofotómetro GBC 916. La actividad MPO se calcula por interpolación en una curva patrón, realizada con mieloperoxidasa procedente de neutrófilos humanos. Una unidad de MPO (U) se define como la cantidad necesaria para degradar 1 mmol/min de peróxido de hidrógeno a 25°C. Los resultados se expresan como U/g tejido fresco.

III.6.3.2 Determinación del contenido de glutatión total.

La determinación del contenido colónico de glutatión total se realizó de acuerdo con el método de la reducción cíclica DTNB-GSSG (Anderson *et al.*, 1985). Se basa en la oxidación del glutatión reducido (GSH) presente en una muestra a su forma oxidada (GSSG) mediante su incubación con el ácido 5,5'-ditiobisnitrobenzoico (DTNB), el cual es reducido y adquiere una coloración

amarillenta que puede ser determinada espectrofotométricamente. El GSSG generado es reducido por acción de la enzima glutathion reductasa en presencia de NADPH. El GSH formado se oxida de nuevo, dando lugar a un ciclo continuo en el cual la velocidad de reducción del DTNB (con el consiguiente incremento de la absorbancia) es proporcional a la cantidad total de glutathion (GSH + GSSG).

Para efectuar esta determinación se utilizaron los fragmentos de colon congelados en solución de TCA al 5 % (p/v). Se pican con tijeras durante 15 segundos aproximadamente, sobre una placa Petri con hielo y posteriormente se homogeneizan en la solución de TCA en una proporción 1:20 (p/v) en un homogeneizador automático Heidolph. A continuación, se centrifuga el homogeneizado a 2000 G, durante 5 minutos a 4°C, y se recoge el sobrenadante que se somete a una segunda centrifugación a 10000 G durante 5 minutos a 4°C. Para la determinación del glutathion total se mezclan 100 µl de sobrenadante, 100 µl de PBS-EDTA (solución acuosa de fosfato sódico 143 mM y EDTA 6,3 mM, pH=7,5), 700 µl de solución de β-NADPH (0,289 mM) en PBS-EDTA y 100 µl de DTNB (6 mM) en PBS-EDTA, en una cubeta semimicro, que se incuba a 30°C durante 5 minutos. Tras adicionar 25 µl de solución de glutathion reductasa (Boehringer-Mannheim, Barcelona) (266 UI/ml) en PBS-EDTA, se agita por inversión y se registra el incremento de absorbancia a 412 nm en un espectrofotómetro GBC 916. La concentración de glutathion se calcula por interpolación en la curva patrón realizada con GSH. Los resultados se expresan como nmoles de glutathion total/g tejido fresco.

III.6.3.3 Determinación de la biosíntesis colónica del LTB₄.

Para la determinación de la producción de este eicosanoide se realizó un procedimiento simple de extracción de forma inmediata (<1 h) a la obtención del órgano (McCafferty *et al.*, 1992). Los fragmentos de colon se pican con unas tijeras sobre una placa Petri con hielo durante 15 segundos y se incuban en tampón fosfato sódico 10 (mM, pH=7,4) en proporción 1:5 (p/v) a 37°C durante 20 minutos con agitación constante. A continuación se centrifugan las muestras a 9000 G durante 30 segundos a 4°C y se congela el sobrenadante obtenido a -80°C. Para la determinación de la concentración de LTB₄, se utilizaron kits comerciales de enzimoimmunoensayo suministrados por Amersham Pharmacia Biotech (Little Chalfont, Reino Unido). Los resultados se expresan como ng de LTB₄ /g tejido fresco.

III.6.3.4. Determinación del contenido de malonildialdehído.

Esta determinación se llevó a cabo según el método descrito por Zingarelli *et al.* (1999). Una vez descongelado el tejido colónico, se pica con tijeras y se homogeneiza en frío durante 15 segundos en una solución de KCl al 1,15 % en proporción 1:5 (p/v). El homogenado se centrifuga a 9000 G a 4°C durante 10 minutos. En un tubo de vidrio con tapón de rosca se adicionan 100 µl de sobrenadante, 200 µl de una solución de lauril sulfato sódico al 8,1 %, 1,5 ml de ácido acético al 20 % (pH 3,5), 1,5 ml de una solución de ácido tiobarbitúrico al 0,8 % en ácido acético al 20 % y 700 µl de agua destilada. Se incuban durante 1 hora a 95°C y se centrifugan a 3000 G a 4°C durante 10 minutos. La absorbancia

de los sobrenadantes se mide espectrofotométricamente a 532 nm en Microplate Reader Bechmark. El cálculo del contenido en malonildialdehído (MDA) en las muestras se realiza por interpolación en la curva patrón correspondiente realizada con distintas concentraciones de 1,1,3,3-tetrametoxipropano en solución de KCl. Los resultados se expresan en $\mu\text{mol MDA/g}$ tejido fresco.

III.6.3.5. Determinación de la actividad óxido nítrico sintasa.

Esta determinación se llevó a cabo siguiendo el método descrito por Chiesi y Schwaller (1995), basado en medir la formación de citrulina tritiada (^3H -citrulina) producida por la actividad óxido nítrico sintasa (NOS) procedente del segmento colónico tras su incubación con L-arginina tritiada (L- ^3H -arginina).

Tras descongelar el trozo de colon se pica con tijeras durante 15 segundos aproximadamente sobre una placa Petri con hielo, y posteriormente se homogeneizan en tampón de homogeneización compuesto por: ácido N-[2-hidroxietil] piperazina-N'-[2-etanosulfónico] (HEPES) (10 mM, pH 7,4), sacarosa (0,32 M), EDTA (100 μM), ditiotreitól (1 mM), metilfenilsulfonil fluoruro (5,7 mM) y leupeptina (22 μM); en una proporción 1:5 (p/v) en un homogeneizador automático Heidolph. El homogenado se centrifuga a 20000 G durante 30 minutos a 4°C, tras lo cual se recoge el sobrenadante donde se mide el contenido en proteínas por el método de Bradford (1976) y la actividad NOS.

Para la determinación de la actividad NOS, 80 μl de muestra o de tampón de homogeneización se incuban a temperatura ambiente durante 30 minutos con 10 μl de una solución de L-arginina; preparada con 100 μl de arginina 100 μM y

10 μ l de solución de clorhidrato de L-[2,3,4,5- 3 H] arginina (Amersham Ibérica, Barcelona) (14,7 mM, 1,0 mCi/ml) y en presencia de solución de β -NADPH (10 mM), calmodulina (0,3 μ M), tetrahidrobiopterina (10 μ M), CaCl₂ (2 mM), L-valina (10 mM), este último para inhibir la actividad arginasa inespecífica (Rachmilewitz *et al*, 1995). La incubación se termina añadiendo 1 ml de tampón de parada: HEPES (20 mM, pH 5,5) con EGTA (1 mM) y EDTA (1 mM). Seguidamente se adicionan 1,5 ml de resina Dowex[®] 50W previamente activada, en forma sódica, que adsorbe la L-arginina. Se agitan vigorosamente y se centrifugan a 3000 G durante 5 minutos. Se recogen 800 μ l de sobrenadante, donde estará la citrulina que se ha formado por la acción de la NOS presente en la muestra, y se adicionan 4 ml de líquido de centelleo Optiphase “HiSafe” 2 (Wallac, Turku, Finlandia). Tras agitar se procede a la medición de la radioactividad en un contador de centelleo líquido Beckman modelo LS6000 del Laboratorio de Análisis Radiactivo del Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada. La actividad NOS se expresa como pmoles de L-citrulina/ μ g proteína/30 min.

III.6.3.6. Determinación de la actividad fosfatasa alcalina.

La determinación de esta actividad enzimática en el colon de rata se llevó a cabo por el método de Bessey *et al*. (1946). Este método se fundamenta en que la fosfatasa alcalina presente en la muestra cataliza la hidrólisis del grupo fosfato de un reactivo coloreado, el *p*-nitrofenilfosfato sódico, generando *p*-nitrofenol, molécula que presenta un máximo de absorción a 405 nm.

Para realizar el ensayo, tras descongelar el trozo de colon se pica con tijeras durante 15 segundos aproximadamente sobre una placa Petri con hielo, y posteriormente se homogeneizan en solución salina de ClNa isotónica en proporción 1:20 (p/v). El homogenado se centrifuga a 15000 G durante 30 minutos a 4°C, tras lo cual se recoge el sobrenadante donde se mide el contenido en proteínas por el método de Bradford (1976) y la actividad fosfatasa alcalina.

Para la determinación de la actividad fosfatasa alcalina, 50 µl de muestra o de tampón de homogeneización se incuban a 37°C durante 30 minutos con 500 µl de una solución que contiene *p*-nitrofenilfosfato sódico (5,5 mM) en tampón glicina (50 mM, pH=10,5) que incorpora MgCl₂ (0,5 mM). Transcurrido el tiempo de incubación, se adicionan 10 ml de una solución de NaOH (1 M), determinándose la absorbancia de la solución resultante a 405 nm. La actividad enzimática se calcula por interpolación en una curva patrón realizada con *p*-nitrofenol. Los resultados se expresan como mU/mg de proteína (unidades internacionales).

III.6.3.7. Determinación de la expresión iNOS.

La determinación de la expresión de iNOS se realizó mediante Western blot. Para ello, los fragmentos colónicos fueron descongelados, picados y homogeneizados en proporción 1:3 (p/v) durante 1 min en tampón RIPA (SDS al 0,1%, desoxicolato sódico al 0,1% y Tritón X-100 al 1% en tampón fosfato salino) conteniendo inhibidores de proteasas (aprotinina, 1,10-fenantrolina, iodoacetamida, fluoruro de fenilmetilsulfonilo). Seguidamente, los homogenados

fueron centrifugados a 10000 G durante 10 minutos. Tras determinar el contenido en proteínas (Smith *et al.* 1985), los sobrenadantes fueron hervidos durante 4 minutos en tampón Laemli y sometidos a SDS-PAGE al 7%, transferidos a una membrana de nitrocelulosa durante una noche, y expuestos al correspondiente anticuerpo frente a iNOS (Transduction Laboratories, Becton Dickinson Biosciences, Madrid, España). Las bandas resultantes fueron detectadas por quimioluminiscencia (NEM Life Science Products, Zaventem, Bélgica).

III.6.3.8. Estudio histológico

Para la realización de los correspondientes estudios histológicos, se obtuvieron las muestras de colon (0,5 cm de longitud) a una distancia de 2-3 cm del recto, antes de obtener las distintas tiras longitudinales utilizadas en las correspondientes determinaciones bioquímicas. Se fijaron en una solución tamponada de formaldehído (al 4% en tampón fosfato, pH 7,2) durante tres días. Luego se deshidrataron con alcohol a concentraciones crecientes hasta alcohol absoluto y se incluyeron en parafina. Con ayuda de un microtomo se realizaron cortes de 3-5 μm de grosor que fueron posteriormente teñidos con hematoxilina-eosina para su evaluación histológica mediante microscopía óptica.

Los cortes histológicos se evaluaron según el criterio establecido por Stucchi *et al.* (2000) (Tabla 2).

Tabla 2. Escala de valoración del daño histológico en el modelo de colitis experimental inducida con sulfato de dextrano sódico

Epitelio de la mucosa
Ulceración: ninguna (0); leve (1); moderada (2); intensa transmural (3)
Criptas
Actividad mitótica en: tercio inferior (0); tercio medio leve (1); tercio medio moderada (2); tercio superior (3).
Infiltrado leucocitario (neutrófilos)
Depleción de moco
Lamina propia
Infiltrado plasmocítico
Infiltrado leucocitario (neutrófilos)
Vascularización
Deposición de fibrina: ninguna (0); mucosa (1); submucosa (2); transmural (3)
Submucosa
Infiltrado leucocitario (neutrófilos)
Edema

Escala de valoración: 0, ninguno; 1, leve; 2, moderado; 3, severo.
Puntuación máxima:30

IV. ESTUDIO ESTADÍSTICO

Todos los resultados están expresados como la media aritmética \pm error estándar de la media, excepto los datos no paramétricos (índice de daño macroscópico y microscópico, valoración de las características de las heces), que se expresan como mediana (rango). La significancia estadística de las diferencias

entre las medias se determinó realizando un análisis de varianza de una vía (ANOVA). Los datos no paramétricos se evaluaron mediante el test de Mann-Whitney. Las diferencias entre porcentajes se analizaron con el test de χ^2 . El umbral de significación se estableció en $p < 0,05$. El programa estadístico utilizado fue SIGMA STAT.

RESULTADOS

I. CONSTATACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIDIARREICA DE *EUPHORBIA HIRTA* Y AISLAMIENTO DE UN COMPONENTE ACTIVO

El cocimiento liofilizado de la sumidad de *Euphorbia hirta* se caracterizó por una baja toxicidad cuando se administró por vía oral, tal y como revelaron los correspondientes ensayos realizados en ratones. En este sentido, no se pudo calcular el valor de la DL₅₀ por vía oral puesto que ninguna de las dosis ensayadas (hasta 15 g/kg) generaron la muerte animal alguno. En función del buen perfil de seguridad manifestado por el extracto ensayado, se seleccionaron las dosis de 350 y 700 mg/kg de cocimiento liofilizado para realizar los correspondientes ensayos farmacodinámicos para constatar la actividad antidiarreica de la droga.

I.1. ACTIVIDAD ANTIDIARREICA DEL COCIMIENTO LIOFILIZADO DE *EUPHORBIA HIRTA*.

Los resultados obtenidos en los distintos modelos de diarrea experimental utilizados demuestran que las dos dosis del cocimiento de *Euphorbia hirta* ensayadas (350 y 700 mg/kg) mostraron actividad antidiarreica frente a aceite de ricino, ácido araquidónico y PGE₂, careciendo de efecto significativo cuando la diarrea fue inducida con el sulfato magnésico (Tabla 3).

Tabla 3. Actividad antidiarreica del cocimiento liofilizado de *Euphorbia hirta*, a dosis de 350 y 700 mg/kg, frente a distintos modelos de diarrea experimental en ratones.

Agente inductor de la diarrea	Dosis cocimiento liofilizado	Tiempo excreción (min)	Número de heces totales	Número de heces diarreicas
Sulfato Magnésico	--	100 ± 11	21,5 ± 3,3	13,3 ± 2,8
	350 mg/kg	150 ± 25	30,6 ± 1,8	23,3 ± 3,2
	700 mg/kg	133 ± 22	30,3 ± 4,5	23,2 ± 5,4
Aceite de ricino	--	47 ± 6	17,2 ± 1,0	14,0 ± 0,9
	350 mg/kg	78 ± 8**	11,4 ± 2,1**	7,6 ± 0,9**
	700 mg/kg	134 ± 17**	11,2 ± 0,9**	6,7 ± 1,8**
Ácido araquidónico	--	40 ± 4	5,6 ± 0,7	3,6 ± 0,6
	350 mg/kg	--	4,6 ± 0,4	0,0 ± 0,0**
	700 mg/kg	--	3,0 ± 0,7	0,0 ± 0,0**
PGE ₂	--	3 ± 0,5	14,9 ± 1,0	12,0 ± 0,8
	350 mg/kg	9 ± 2**	15,6 ± 1,0	9,6 ± 0,9**
	700 mg/kg	11 ± 3**	13,2 ± 0,4	9,6 ± 0,9**

Los datos están expresados como la media ± error estándar de la media (n=10). * P<0,05; ** P<0,01 frente al grupo control sin tratamiento con el cocimiento.

El aceite de ricino comenzó a manifestar su efecto diarreico en la primera hora tras su administración a los ratones, evidenciado con la visualización de heces de baja consistencia con elevado contenido de agua, que dejaban un ‘halo’ en el papel de filtro alrededor de las heces excretadas por los animales. Cuando el cocimiento de *Euphorbia hirta* se administró 60 minutos antes de administrar el agente diarreico, el tiempo transcurrido hasta la excreción de las primeras heces diarreicas se incrementó significativamente con las dos dosis estudiadas en comparación con el grupo control sin tratamiento. Análogamente, el cocimiento de la droga fue capaz de reducir de forma significativa tanto el número de heces totales, como el número de heces de consistencia diarreica excretadas en las siguientes cuatro horas tras la administración del aceite de ricino. En este sentido, el porcentaje de heces diarreicas descendió de 81,4% en el grupo control, a 59,8% y 64,3% a las dosis de 350 y 700 mg/kg de cocimiento liofilizado, respectivamente ($P < 0,01$ frente al grupo control a ambas dosis). Transcurridas cuatro horas de la administración de este agente diarreico no hubo excreción de heces diarreicas en ninguno de los grupos experimentales.

El ácido araquidónico ejerció su efecto diarreico durante las dos horas siguientes a su administración intraperitoneal, tal y como se puso de manifiesto en los animales del grupo control. Sin embargo, los ratones que recibieron el tratamiento previo con el cocimiento no excretaron heces de consistencia diarreica durante las siguientes cuatro horas tras la administración del ácido araquidónico.

Cuando la PGE₂ fue utilizada como agente inductor del proceso diarreico, en el grupo control la excreción de las primeras heces diarreicas tuvo lugar en los primeros cinco minutos tras su administración intraperitoneal, efecto que persistió

sólo durante la primera hora. La administración oral del cocimiento de *Euphorbia hirta* prolongó significativamente el tiempo de aparición de las primeras heces diarreicas a las dos dosis estudiadas ($P < 0,01$ frente al grupo control). Aunque el tratamiento no ejerció efecto alguno sobre el número total de heces excretadas en el periodo de tiempo de observación de los animales, sí que redujo el número de heces de consistencia diarreica, disminuyendo su porcentaje desde el 80,5% en el grupo control, a 61,5% y 56,6% a las dosis de 350 y 700 mg/kg de cocimiento liofilizado, respectivamente ($P < 0,01$ frente al grupo control a ambas dosis).

I.2. EFECTO DEL COCIMIENTO LIOFILIZADO DE *EUPHORBIA HIRTA* SOBRE EL TRÁNSITO INTESTINAL.

Los resultados obtenidos con el cocimiento de *Euphorbia hirta* en los ensayos de tránsito intestinal total revelaron que éste no se vio afectado por las dos dosis ensayadas, ya que las medias en el tiempo transcurrido entre la administración del marcador (rojo fenol) y la aparición de las primeras heces coloreadas no presentó diferencias significativas en ninguno de los grupos experimentales: 472 ± 19 min para el grupo control frente a 395 ± 45 min y 509 ± 34 para las dosis de 350 y 700 mg/kg de cocimiento liofilizado, respectivamente ($P > 0,5$ frente al grupo control) (Figura 5).

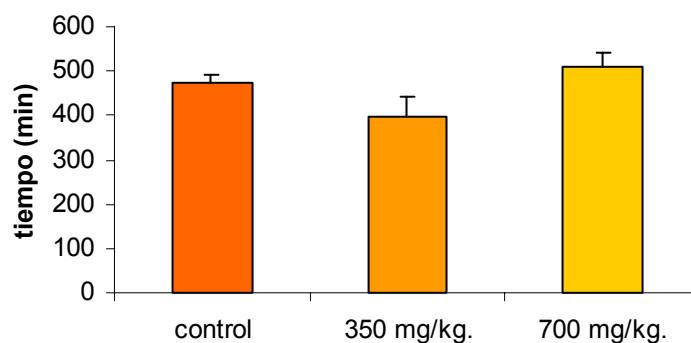


Figura 5. Efecto del cocimiento liofilizado de *Euphorbia hirta*, a dosis de 350 y 700 mg/kg, frente al tránsito intestinal total en ratones. Los datos están expresados como la media \pm error estándar de la media (n=10).

De forma similar al tránsito intestinal total, la administración oral del cocimiento no modificó de forma significativa el porcentaje de intestino delgado recorrido por el carbón activo en condiciones normales ($58,0 \pm 3,3$ % y $61,7 \pm 7,9$ % a las dosis de 350 y 700 mg/kg, respectivamente) en comparación con el grupo control ($57,9 \pm 4,5$ %; $P < 0,5$) (Figura 3). Cuando las ratas del grupo control recibieron aceite de ricino con el objetivo de estimular el tránsito en el intestino delgado, la suspensión marcadora recorrió el $78,3 \pm 1,6$ % de la longitud total del

intestino delgado ($P < 0,01$ frente al grupo control en condiciones normales). En estas circunstancias, las dos dosis de cocimiento de *Euphorbia hirta* redujeron de forma significativa la distancia recorrida por la suspensión marcadora en comparación con el correspondiente grupo control, siendo del $70,8 \pm 3,1$ % para la dosis de 350 mg/kg ($P < 0,05$ frente al control) y del $67,0 \pm 0,8$ para la dosis de 700 mg/kg ($p < 0,01$ frente al control) (Figura 6).

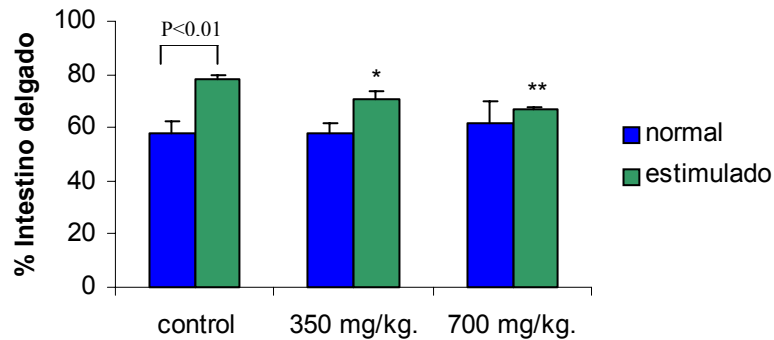


Figura 6. Efecto del cocimiento liofilizado de *Euphorbia hirta*, a dosis de 350 y 700 mg/kg., frente al tránsito intestinal en el intestino delgado en ratas, tanto en condiciones normales como estimulado tras la administración oral de aceite de ricino. Los datos están expresados como la media \pm error estándar de la media ($n=10$). * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ frente al grupo control sin tratamiento con el cocimiento.

I.3. FRACCIONAMIENTO QUÍMICO DE LA *EUPHORBIA HIRTA*: AISLAMIENTO DE UN COMPUESTO CON ACTIVIDAD ANTIDIARREICA.

El fraccionamiento guiado de la sumidad de *Euphorbia hirta* se realizó con el objeto de identificar y aislar un principio responsable de su actividad antidiarreica. Para ello se siguió el procedimiento previamente utilizado por Yoshida *et al.* (1988) para esta misma droga. El ensayo utilizado para determinar la actividad de los extractos o fracciones obtenidas fue el de la diarrea experimental inducida en ratones con aceite de ricino. La selección de la dosis de cada extracto o fracción se realizó en función del rendimiento respecto a la droga total de partida, considerando como la dosis de droga activa la de 1 g por kg de peso del animal. En la Tabla 4 se indica el efecto que presentaron los distintos extractos y fracciones sobre el tiempo transcurrido entre la administración del aceite de ricino y la aparición de las primeras heces diarreicas. Como resultado de este fraccionamiento se consiguió aislar e identificar, en función de los datos cromatográficos y espectrofotométricos, un flavonoide, la quercitrina, heterósido de la quercetina (3-ramnosil quercetina) como uno de los principios responsables de la actividad antidiarreica de la droga objeto de estudio.

Tabla 4. Efecto de los distintos extractos y fracciones obtenidos tras el fraccionamiento químico de la sumidda de *Euphorbia hirta* sobre el tiempo de excreción de las primeras heces diarreicas en el test del aceite de ricino.

EXTRACTO o FRACCIÓN	TIEMPO (min)
GRUPO CONTROL	51 ± 9
EXTRACTO ACUOSO	90 ± 5*
EXTRACTO ETER ETILICO	60 ± 7
EXTRACTO ACETATO ETILO	120 ± 12*
EXTRACTO BUTANOL	65 ± 7
FRACCIÓN I	55 ± 8
FRACCIÓN II	46 ± 7
FRACCIÓN III	59 ± 4
FRACCIÓN IV	62 ± 10
FRACCIÓN V	45 ± 5
FRACCIÓN VI	132 ± 15*
FRACCIÓN VII	63 ± 9

Los datos están expresados como la media ± error estándar de la media (n=10). * P<0,05 frente al grupo control.

II. ESTUDIO DEL MECANISMO DE ACCION RESPONSABLE DE LA ACTIVIDAD ANTIDIARREICA DE LA QUERCITRINA

II.1. ACTIVIDAD ANTIDIARREICA DE LA QUERCITRINA

La quercitrina, a partir de la dosis de 25 mg/kg, incrementó significativamente, y de forma dosis dependiente, el tiempo transcurrido entre la administración del aceite de ricino a los ratones y la excreción de las primeras heces con elevado contenido acuoso ($r=0,97$) (Tabla 5). Igualmente, el tratamiento con el flavonoide produjo una disminución del número de heces totales excretadas durante las cuatro horas siguientes a la administración del agente diarreico, así como una reducción del porcentaje de heces diarreicas, de un 72,8% en el grupo control a 58,6%, 56,6% y 58% en los grupos de animales que recibieron las dosis de 25, 50 y 100 mg/kg, respectivamente.

Tabla 5. Actividad antidiarreica de la quercitrina (12,5, 25, 50 y 100 mg/kg) frente a la diarrea experimental en ratones inducida con aceite de ricino.

Quercitrina (mg/kg)	Tiempo excreción (min)	Número de heces totales	Número de heces diarreicas
0	53,5 ± 10,6	18,4 ± 0,7	13,4 ± 1,0
12,5	79,5 ± 11,5	16,2 ± 1,1	12,2 ± 0,8
25	97,5 ± 16,5*	15,2 ± 1,6**	9,5 ± 1,0**
50	115,0 ± 11,4**	15,0 ± 0,5**	8,5 ± 1,5**
100	136,2 ± 21,1**	12,4 ± 0,5**	7,2 ± 0,6**

Los datos están expresados como la media ± error estándar de la media (n=10). *

P<0,05; ** P<0,01 frente al grupo control sin tratamiento con el cocimiento.

Además la quercitrina fue ensayada, a la dosis de 50 mg/kg, en otros dos modelos de diarrea experimental utilizados previamente para constatar la actividad antidiarreica de la droga: sulfato magnésico y PGE₂. Los resultados obtenidos en estos ensayos demuestran que la quercitrina manifiesta actividad antidiarreica cuando la diarrea era inducida a los ratones con la PGE₂, al

incrementar de forma significativa el tiempo que transcurre para que los ratones excreten las primeras heces diarreicas, pero no cuando se utilizó el agente osmótico sulfato magnésico como inductor de la diarrea (Tabla 6).

Tabla 6. Actividad antidiarreica de la quercitrina (50 mg/kg) frente a la diarrea experimental en ratones inducida con sulfato magnésico (2 g/kg p.o.) o con PGE₂ (1 mg/kg i.p.)

Agente diarreico	Tiempo excreción (min)	Número de heces totales	Número de heces diarreicas
Sulfato magnésico			
Control	144 ± 9	24 ± 3	17 ± 2
Quercitrina	114 ± 30	24 ± 2	17,5 ± 1,5
PGE ₂			
Control	7 ± 1	14,5 ± 1,5	12 ± 1,5
Quercitrina	12 ± 2*	12 ± 2	9 ± 1

Los datos están expresados como la media ± error estándar de la media (n=10). * P<0,05 frente al grupo control.

II.2. EFECTO DE LA QUERCITRINA SOBRE EL TRÁNSITO INTESTINAL EN INTESTINO DELGADO.

La quercitrina, administrada por vía oral a dosis de 25 y 50 mg/kg, no modificó significativamente el tránsito intestinal normal en el intestino delgado, ya que el porcentaje de la distancia recorrida por el carbón activo respecto de la longitud total del segmento intestinal, fue similar en los animales tratados con el flavonoide, a las dosis de 25 y 50 mg/kg, frente al valor obtenido en el grupo control ($P > 0,1$; Figura 7).

Sin embargo, la quercitrina, a las mismas dosis, redujo significativamente la distancia recorrida por la suspensión marcadora cuando el tránsito del intestino delgado fue estimulado mediante la administración oral de aceite de ricino. El porcentaje de intestino delgado recorrido por el marcador en el grupo control fue de $71,8 \pm 1,9 \%$, reduciéndose a $52,3 \pm 3,5 \%$ y a $53,1 \pm 3,2 \%$ en los grupos de animales tratados con el flavonoide a dosis de 25 y 50 mg/kg, respectivamente ($P < 0,01$; Figura 7).

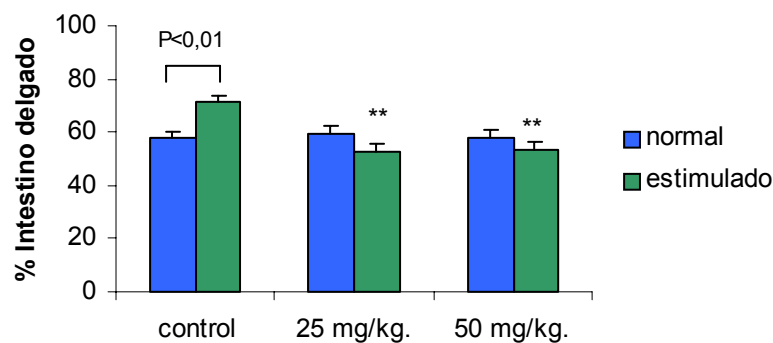


Figura 7. Efecto de la quercitrina, a dosis de 25 y 50 mg/kg., frente al tránsito intestinal en el intestino delgado en ratas, tanto en condiciones normales como estimulado tras la administración oral de aceite de ricino. Los datos están expresados como la media \pm error estándar de la media (n=10). * P<0,05; ** P<0,01 frente al grupo control sin tratamiento.

Se realizaron ensayos adicionales con la quercetina, la genina del flavonoide aislado de *Euphorbia hirta*, en este mismo ensayo de tránsito intestinal en intestino delgado. Los resultados obtenidos revelaron que la administración oral de la genina, a las dosis de 25 y 50 mg/kg, no afectó de forma significativa el

tránsito intestinal, tanto en condiciones normales ($58,9 \pm 1,1$ % y $62,0 \pm 3,8$ %, respectivamente; $P > 0,1$ frente al correspondiente grupo control), o cuando éste fue estimulado con el aceite de ricino ($75,5 \pm 3,8$ % y $75,8 \pm 2,9$ %, respectivamente; $P > 0,1$ frente al correspondiente grupo control) (Figura 8).

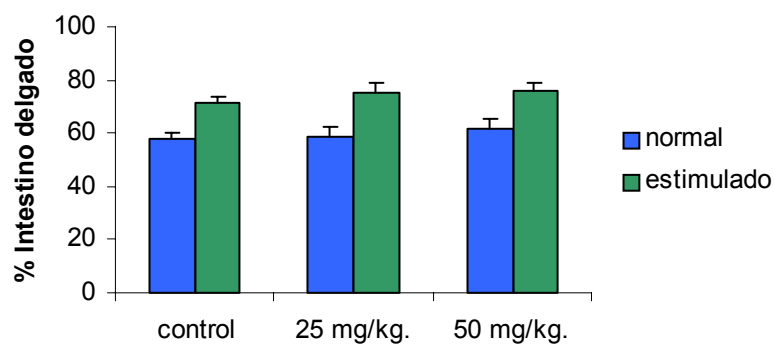


Figura 8. Efecto de la quercetina, a dosis de 25 y 50 mg/kg, frente al tránsito intestinal en el intestino delgado en ratas, tanto en condiciones normales como estimulado tras la administración oral de aceite de ricino. Los datos están expresados como la media \pm error estándar de la media (n=10).

II.3. EFECTO DE LA QUERCITRINA SOBRE EL TRANSPORTE HIDROELECTROLÍTICO COLÓNICO.

Los resultados obtenidos al ensayar la quercitrina en la técnica del colon ligado de rata revelaron que su administración intraluminal, a las concentraciones de 10, 100 y 1.000 μM en la solución Tyrode utilizada para llenar el segmento colónico, no afecta de forma significativa el transporte de fluidos ni en condiciones basales ni cuando éste es alterado por la administración de PGE_2 o picosulfato sódico (Figura 9).

Cuando la quercetina fue administrada intraluminalmente a las concentraciones de 10 y 100 μM se comprobó que la genina fue capaz de incrementar la absorción de fluido por parte del segmento intestinal cuando este proceso era alterado por la presencia en el lumen colónico de los agentes secretagogos PGE_2 o picosulfato sódico, aunque no mostró efecto alguno en condiciones basales (Figura 10).

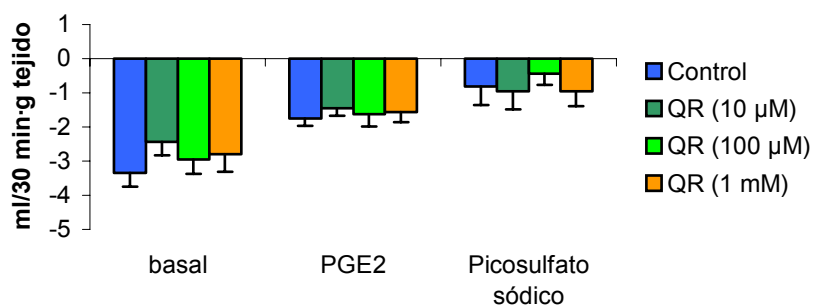


Figura 9. Efecto de la quercitrina (QR), a concentraciones de 10, 100 y 1000 µM, en el colon ligado de rata, tanto en condiciones normales como alterado tras la administración intraluminal de PGE₂ (0,12 mM) o de picosulfato sódico (0,45 mM). Los datos están expresados como la media ± error estándar de la media (n=8).

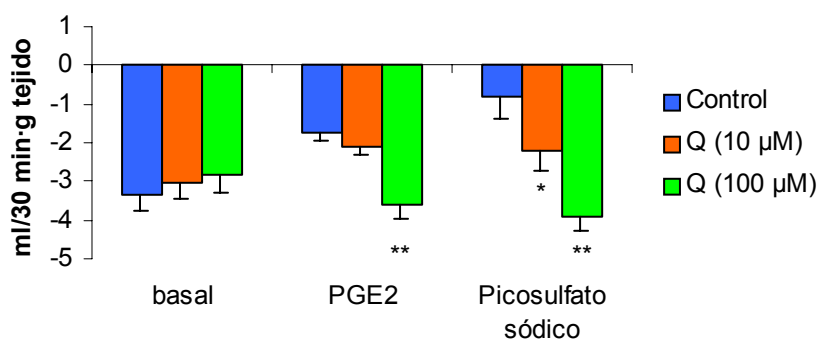


Figura 10. Efecto de la quercetina (Q), a concentraciones de 10 y 100 µM, en el colon ligado de rata, tanto en condiciones normales como alterado tras la administración intraluminal de PGE₂ (0,12 mM) o de picosulfato sódico (0,45 mM). Los datos están expresados como la media ± error estándar de la media (n=8). * P<0,05; ** P<0,01 frente al grupo control.

En aquellos experimentos en los que el interior del colon no fue previamente lavado con solución Tyrode, la absorción basal de fluido se tornó en secreción neta cuando se administraba intracolónicamente picosulfato sódico. En estas situaciones, la quercitrina, a la concentración de 100 μM incrementó de forma significativa la absorción neta de fluido cuando éste era inhibido por la acción del picosulfato sódico administrado intraluminalmente, sin mostrar diferencias significativas con la absorción observada en condiciones basales (Figura 11).

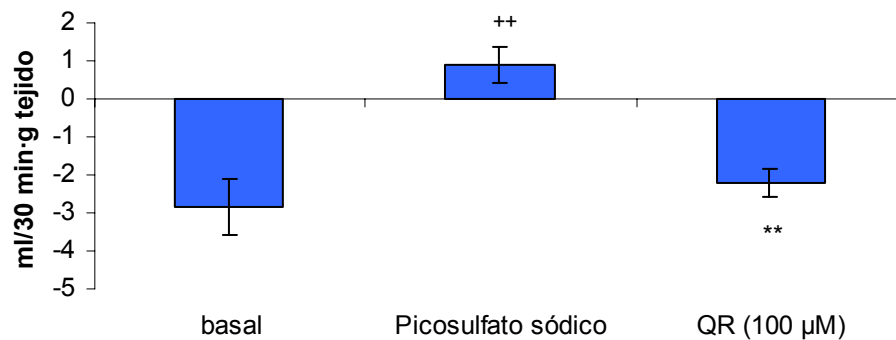


Figura 11. Efecto de la quercitrina (QR), a la concentración de 100 μM , en el colon ligado de rata sin lavado previo de la preparación, tras la administración intraluminal de picosulfato sódico (0,45 mM). Los datos están expresados como la media \pm error estándar de la media (n=8). ** $P < 0,01$ frente a basal; ** $P < 0,01$ frente al grupo que recibió picosulfato sódico únicamente.

III. ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA INTESTINAL DE LA QUERCITRINA

III.1. MODELO DE COLITIS EXPERIMENTAL MEDIANTE LA ADMINISTRACION DE SULFATO DE DEXTRANO SÓDICO

III.1.1. Caracterización del modelo

La incorporación del sulfato de dextrano sódico (DSS) a las ratas en el agua de bebida (al 5%) durante siete días indujo un proceso inflamatorio intestinal de características similares a las descritas previamente por otros autores (Stucchi *et al.* 2000; Kullmann *et al.* 2001). En este sentido, la mitad de los animales presentaron un ablandamiento en la consistencia de las heces al día siguiente del comienzo de la administración del sulfato de dextrano, desarrollando signos evidentes de diarrea la mayoría de los animales (90-100%) transcurridos cuatro o cinco días. A partir del sexto día, la presencia de sangre en la zona perianal fue evidente el 70% de los animales colíticos del grupo control. El proceso inflamatorio se manifestó también por una pérdida progresiva de peso en todos los animales (Figura 12), asociada con anorexia, y que fue evidente desde el siguiente día del inicio del ensayo, y que progresivamente se fue agravando en el curso del experimento (datos no mostrados). De acuerdo con estas características del proceso inflamatorio, y como se expuso en la Tabla 1 (ver Material y Métodos, pag. 49), a cada animal se le asignó un valor de Índice de Actividad de la Enfermedad (IAE), valor que se vio incrementado de forma progresiva en los animales colíticos del grupo control durante el tiempo que duró el ensayo (Figura

13). No obstante, no se observaron diferencias en el consumo de agua entre los distintos grupos de animales durante todo el tiempo que duró el experimento.

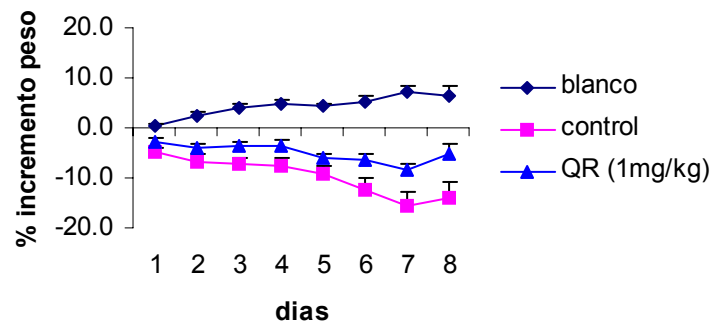


Figura 12. Efecto de la quercitrina (QR), a la dosis de 1 mg/kg, sobre la evolución del peso corporal en el modelo de colitis experimental inducida con sulfato de dextrano sódico. Los dos grupos de animales colíticos presentaron diferencias significativas frente al grupo blanco ($P < 0,01$) durante toda la experiencia. El grupo tratado con quercitrina presentó diferencias significativas frente al grupo control ($P < 0,05$) a partir del tercer día.

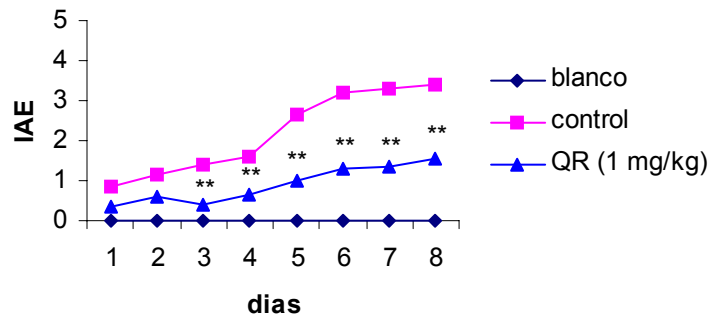


Figura 13. Efecto de la quercitrina (QR), a la dosis de 1 mg/kg, sobre el Índice de Actividad de la Enfermedad (IAE) en el modelo de colitis experimental inducida con sulfato de dextrano sódico. ** $P < 0,01$ frente al grupo control. Los dos grupos de animales colíticos presentaron diferencias significativas frente al grupo blanco ($P < 0,01$) durante toda la experiencia.

La valoración macroscópica de los segmentos colónicos tras sacrificar los animales a los siete días del inicio de la administración del sulfato de dextrano, reveló la existencia de un engrosamiento en la pared intestinal, con el consiguiente incremento en la relación peso/longitud de aproximadamente un 60% en comparación con el grupo de ratas sin daño intestinal ($112,1 \pm 7,1$ mg/cm frente a $76,2 \pm 1,9$ mg/cm; $P < 0,01$). El daño colónico también se caracterizó por

la existencia una zona de hiperemia en el colon distal, que aproximadamente se extendía entre 1 y 3 cm, conjuntamente con la existencia de úlceras lineales.

El análisis microscópico de las distintas secciones obtenidas de la muestras de colon ratificó la presencia de un proceso de tipo inflamatorio. En este sentido, fue notable la existencia de importantes cambios en la mucosa que incluían ulceraciones y pérdida de la citoarquitectura normal de las criptas con necrosis y abscesos de las criptas; las células caliciformes aparecían vacías de su contenido mucoso. Por otra parte, se apreció la presencia de un importante infiltrado inflamatorio en las distintas capas intestinales, que estaba principalmente compuesto por neutrófilos y macrófagos, aunque también estaban presentes linfocitos y células plasmáticas. Además, se observó la existencia de edema en la submucosa e hiperplasia vascular en todas las muestras del grupo control sometido a inflamación intestinal, mientras que en la mitad de las muestras se detectó la existencia de deposición de fibrina junto con la presencia de proteínas residuales en la zona de necrosis epitelial (Figura 14). De acuerdo con los criterios establecidos en la tabla 2 (ver Material y Métodos, en pág. 59), las ratas colíticas del grupo control se le asignó una valoración de daño histológico de $19,4 \pm 1,4$.

El daño colónico inducido en las ratas tras la administración del DSS se caracterizó igualmente por una alteración en los distintos parámetros bioquímicos estudiados (Tabla 7). Así, como consecuencia del proceso inflamatorio colónico se originó un marcado incremento en la actividad mieloperoxidasa, aproximadamente 30 veces superior en comparación con los animales no colíticos ($p < 0,01$), así como de la actividad fosfatasa alcalina, que se duplicó al compararla con la de los animales sanos ($p < 0,01$). Análogamente, el daño intestinal se asoció

con una depleción colónica de glutathion, cuyo contenido se redujo en un 38 % en comparación con el grupo sin inflamación intestinal, conjuntamente con una elevación de aproximadamente 2 veces en la producción colónica de LTB₄. Por último, la administración del DSS a las ratas originó un incremento en 4,6 veces de la actividad óxido nítrico sintasa, proceso que se acompañó de un incremento en la expresión de la enzima, tal y como revelan los análisis por Western blot realizados en los correspondientes segmentos intestinales (ver Figura 19).

Tabla 7. Efecto del proceso inflamatorio intestinal inducido con el sulfato de dextrano sódico (DSS) sobre los distintos parámetros bioquímicos: actividad mieloperoxidasa (MPO), fosfatasa alcalina (FA), contenido de glutathion (GSH), actividad óxido nítrico sintasa (NOS) y producción de LTB₄.

Grupo	MPO (U/g tejido)	FA (mU/mg proteína)	GSH (nmol/g tejido)	NOS (pmol citr. /mg proteína)	LTB₄ (ng/g tejido)
Blanco	5,6 ± 0,3	6,7 ± 0,3	1665 ± 47	44,3 ± 4,5	2,4 ± 0,3
Control	158,8 ± 22,0 ⁺⁺	15,1 ± 1,6 ⁺⁺	1028 ± 66 ⁺⁺	205,3 ± 9,8 ⁺⁺	5,5 ± 0,4 ⁺⁺

Los datos están expresados como la media ± error estándar de la media (n=8). ⁺⁺ P<0,01 frente al grupo blanco.

III.1.2. Efecto antiinflamatorio intestinal de la quercitrina

El tratamiento con el flavonoide quercitrina, a la dosis de 1 mg/kg, redujo de forma significativa el proceso inflamatorio intestinal inducido por DSS. Este efecto antiinflamatorio intestinal se manifestó en el transcurso del experimento, ya que los animales tratados fueron asignados con menores valores de IAE (Figura 13), que fueron significativos desde el tercer día de iniciada la experiencia. Una vez que se sacrificaron los animales, la evaluación macroscópica de los segmentos colónicos mostraron que el tratamiento con quercitrina redujo de forma significativa la relación peso/longitud colónica en comparación con los animales que no recibieron el flavonoide ($84,9 \pm 7,1$ frente a $112,1 \pm 7,1$ $P < 0,05$), llegando incluso a normalizarla en comparación con los valores correspondientes a los animales no colíticos ($76,2 \pm 1,9$; $P > 0,1$).

El análisis histológico de las muestras confirmó el efecto beneficioso ejercido por el flavonoide en este modelo de inflamación experimental (Figura 14). En este sentido, la mayoría de las muestras procedentes de animales tratados con la quercitrina (cinco de ocho) mostraron una reducción del grado de ulceración de la mucosa, afectando únicamente al 25% de la superficie de la misma, sin la existencia de deposición de fibrina en las áreas necrosadas del colon. Las criptas mostraron una estructura casi normal, con las células caliciformes repletas de moco, en contraposición a lo que sucedía con los animales colíticos del grupo control. Aunque la infiltración de neutrófilos fue evidente en la lamina propria, ésta fue de carácter leve o moderado en la mayoría de las secciones analizadas. No obstante, es de destacar la práctica ausencia de macrófagos y células plasmáticas en lámina propia y submucosa. En

consecuencia, el tratamiento con quercitrina en los animales colíticos redujo el valor del daño microscópico aproximadamente en un 35 % en comparación con las ratas colíticas sin tratamiento ($12,6 \pm 2,5$ frente a $19,4 \pm 1,4$; $P < 0,05$).

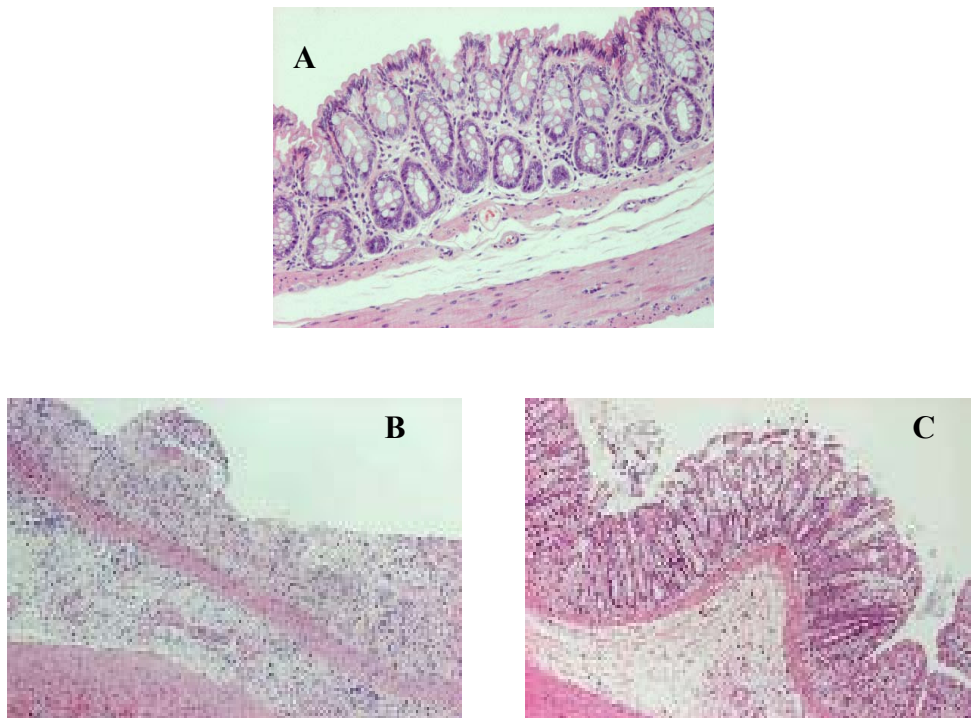


Figura 14. Cortes histológicos representativos de colon de animales sometidos a inflamación experimental con DSS teñidos con hematoxilina-eosina. (A) Grupo Blanco (x40); (B) Grupo Control (x40); (C) Grupo tratado con quercitrina (1 mg/kg) (x40).

El efecto antiinflamatorio intestinal manifestado por la quercitrina se tradujo en una mejora significativa en la mayoría de los parámetros bioquímicos analizados en el tejido colónico. En este sentido, el tratamiento redujo significativamente las actividades MPO y fosfatasa alcalina en un 54 % y 57 %, respectivamente, cuando se compara con las obtenidas en el grupo colítico control (Figuras 15 y 16). La reducción en la actividad MPO confirma la reducción en la infiltración de neutrófilos en la mucosa colónica evidenciada microscópicamente dado que la MPO es considerado como un marcador bioquímico de la infiltración de neutrófilos (Krawisz et al., 1984).

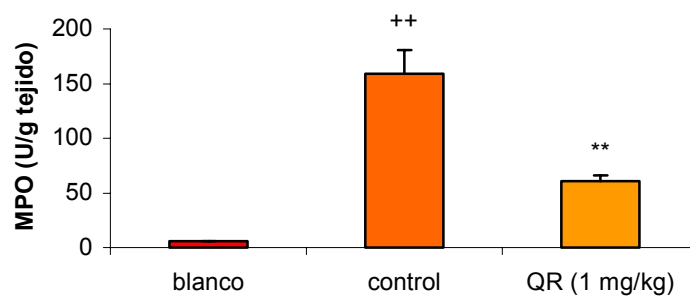


Figura 15. Efecto de la quercitrina (QR), a la dosis de 1 mg/kg, sobre la actividad mieloperoxidasa colónica (MPO) en el modelo de colitis experimental inducida con sulfato de dextrano sódico. Los datos están expresados como la media \pm error estándar de la media (n=8). ++ P<0,01 frente al grupo blanco; ** P<0,01 frente al grupo control.

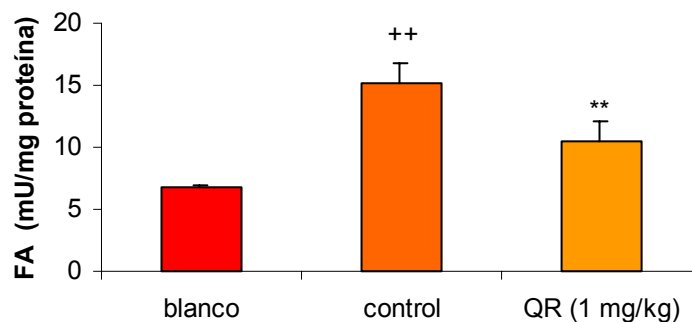


Figura 16. Efecto de la quercitrina (QR), a la dosis de 1 mg/kg, sobre la actividad fosfatasa alcalina colónica (FA) en el modelo de colitis experimental inducida con sulfato de dextrano sódico. Los datos están expresados como la media \pm error estándar de la media (n=8). ++ P<0,01 frente al grupo blanco; ** P<0,01 frente al grupo control.

Además, la administración de quercitrina a las ratas sometidas a inflamación colónica contrarrestó la depleción de glutathion (Figura 17), preservando al tejido colónico del daño oxidativo que caracteriza al proceso inflamatorio intestinal. Por último, la actividad óxido nítrico sintasa (NOS) se redujo en un 45% en los animales tratados en comparación con el grupo control sin tratamiento (Figura 18), efecto que se acompañó de una reducción en la

expresión de la enzima óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) (Figura 19), tal y como se revela tras la realización de los correspondiente estudios mediante Western blot. Sin embargo, el tratamiento con el flavonoide no modificó de forma significativa la producción colónica de LTB₄, la cual se encuentra incrementada en el tejido inflamado (Figura 20).

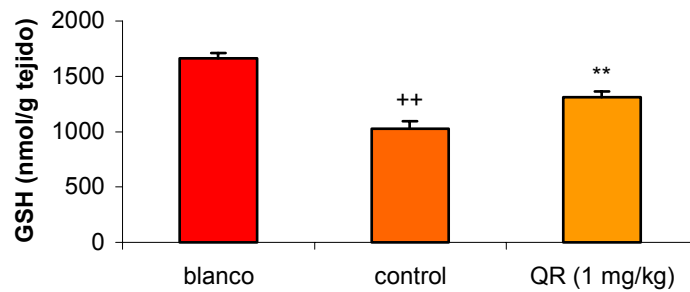


Figura 17. Efecto de la quercitrina (QR), a la dosis de 1 mg/kg, sobre el contenido de glutathion colónico (GSH) en el modelo de colitis experimental inducida con sulfato de dextrano sódico. Los datos están expresados como la media \pm error estándar de la media (n=8). ++ P<0,01 frente al grupo blanco; ** P<0,01 frente al grupo control.

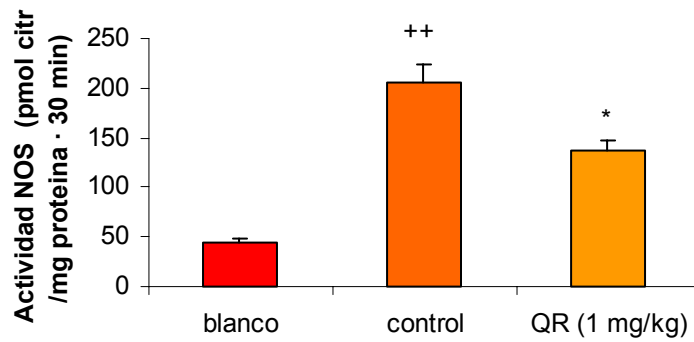


Figura 18. Efecto de la quercitrina (QR), a la dosis de 1 mg/kg, sobre la actividad óxido nítrico sintasa (NOS) colónica en el modelo de colitis experimental inducida con sulfato de dextrano sódico. Los datos están expresados como la media \pm error estándar de la media (n=8). ++ P<0,01 frente al grupo blanco; * P<0,05 frente al grupo control.

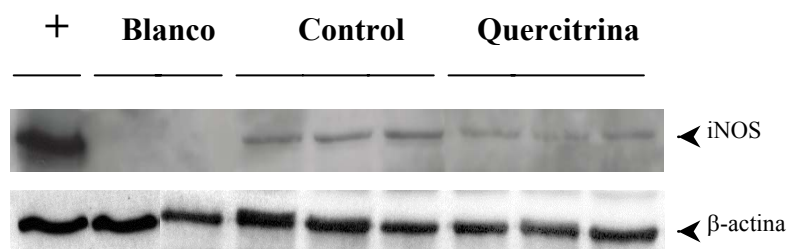


Figura 19. Efecto de la quercitrina (QR), a la dosis de 1 mg/kg, sobre la expresión de iNOS en tejido colónico en el modelo de colitis experimental inducida con sulfato de dextrano sódico (Western blot)

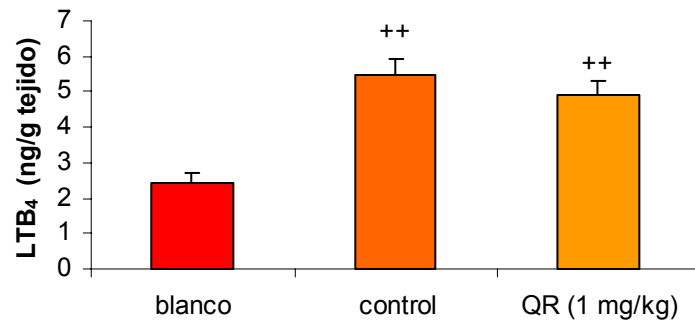


Figura 20. Efecto de la quercitrina (QR), a la dosis de 1 mg/kg, sobre la producción colónica de LTB₄ en el modelo de colitis experimental inducida con sulfato de dextrano sódico. Los datos están expresados como la media \pm error estándar de la media (n=8). ⁺⁺ P<0,01 frente al grupo blanco.

III.2. MODELO DE COLITIS EXPERIMENTAL MEDIANTE LA ADMINISTRACION DE OXAZOLONA

III.2.1. Caracterización del modelo

La administración tópica de oxazolona a las ratas durante dos días consecutivos, con el objeto de inducir una sensibilización en los animales, no generó cambio alguno en los parámetros de seguimiento utilizados, es decir, consumo de comida (datos no mostrados) y peso corporal (Figura 21). De igual forma, durante los tres días siguientes a la administración intracolónica de la oxazolona no se observaron modificaciones en el estado general de los animales, al no modificarse de forma significativa ni el consumo de comida ni la evolución en el peso corporal, en comparación con los animales a los que no se les administró la oxazolona (Figura 21). Únicamente se detectó la presencia de manchas en la zona perianal en uno de los ocho animales del grupo control, no mostrando el resto signo alguno de existencia de procesos de tipo diarreico. Tras su sacrificio, el análisis macroscópico de los segmentos colónicos del grupo control únicamente reveló la existencia de hiperemia leve en la práctica totalidad de las muestras del grupo control (7 de 8), sin que existiera engrosamiento aparente del tejido colónico. En este sentido, no se observaron modificaciones significativas en la relación peso/longitud en comparación con los animales normales que no recibieron oxazolona ($70,3 \pm 5,7$ mg/cm en el grupo blanco frente a $61,1 \pm 2,1$ mg/cm en el grupo control; $P > 0,1$).

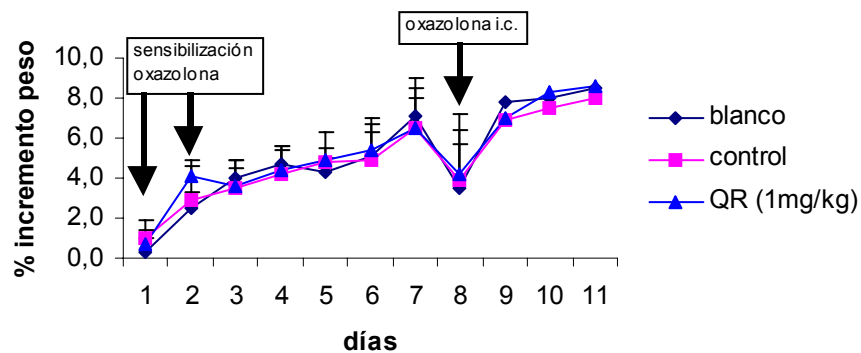


Figura 21. Efecto de la quercitrina (QR), a la dosis de 1 mg/kg, sobre la evolución del peso corporal en el modelo de colitis experimental inducida con oxazolona en ratas previamente sensibilizados. Los dos grupos de animales colíticos no presentaron diferencias significativas frente al grupo blanco ($P > 0,1$) durante toda la experiencia.

El análisis microscópico de las muestras en el grupo de animales sometidos a colitis experimental reveló que el epitelio de la mucosa se encontraba preservado sin la existencia de zonas de ulceración. Sin embargo, la

administración de oxazolona en animales previamente sensibilizados modificó la citoarquitectura normal de las criptas observándose la existencia de un menor número de células caliciformes con reducción patente de su contenido mucoso. También se observó la existencia de un infiltrado leucocitario, que afectó principalmente a la lamina propria, si bien éste fue de carácter leve en todas las muestras analizadas (Figura 22).

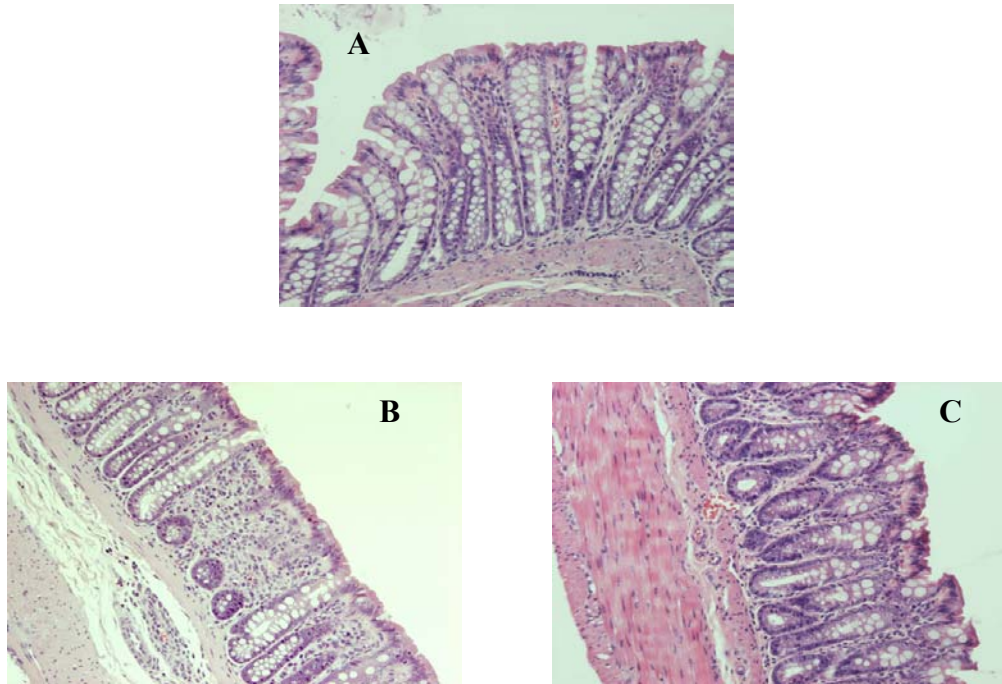


Figura 22. Cortes histológicos representativos de colon de animales sometidos a inflamación experimental con oxazolona teñidos con hematoxilina-eosina. (A) Grupo Blanco (x40); (B) Grupo Control (x40); (C) Grupo tratado con quercitrina (1 mg/kg) (x40).

El proceso inflamatorio intestinal generado por la oxazolona sólo se manifestó bioquímicamente por un incremento significativo en la actividad mieloperoxidasa colónica, que aumentó aproximadamente 2,5 veces en comparación con el grupo de ratas normal ($p < 0,05$; Tabla 5). Sin embargo, el resto de los parámetros analizados, incluyendo la actividad fosfatasa alcalina, el contenido en glutation, los niveles de malonildialdehido o la producción colónica de LTB_4 no mostraron diferencias significativas en comparación con el grupo que no recibió la oxazolona por vía intracolónica (Tabla 8).

Tabla 8. Efecto de la quercitrina (1 mg/kg) sobre los distintos parámetros bioquímicos: actividad mieloperoxidasa (MPO), fosfatasa alcalina (FA), contenido de glutatión (GSH), contenido en malonildialdehído (MDA) y producción de LTB₄, en el modelo de colitis experimental inducido con oxazolona en animales previamente sensibilizados.

Grupo	MPO (U/g tejido)	FA (mU/mg proteína)	GSH (nmol/g tejido)	MDA (nmol /g tejido)	LTB₄ (ng/g tejido)
Blanco	9,9 ± 2,3	7,7 ± 0,9	1795 ± 77	28,3 ± 4,3	1,4 ± 0,3
Control	22,9 ± 3,8 ⁺	8,9 ± 1,9	1867 ± 105	34,5 ± 3,8	1,5 ± 0,4
QR (1 mg/kg)	15,6 ± 2,3	6,9 ± 2,9	1769 ± 87	32,5 ± 1,8	1,2 ± 0,5

Los datos están expresados como la media ± error estándar de la media (n=8). ⁺ P<0,05 frente al grupo blanco.

III.2.2. Efecto antiinflamatorio intestinal de la quercitrina

Dado que el proceso inflamatorio intestinal generado por la oxazolona en animales previamente sensibilizados era de carácter leve y no afectaba de forma

significativa ni a la evolución del peso corporal, ni al consumo de comida, ni a la relación peso/longitud colónica, el tratamiento oral con quercitrina a estos animales no se tradujo en una modificación significativa en ninguno de estos parámetros. La caracterización macroscópica del daño colónico en los animales del grupo tratado con el flavonoide no presentó diferencias significativas con el grupo control, de forma que la mayoría de los animales (6 de 8) mostró la existencia de hiperemia leve, y ausencia de engrosamiento del tejido colónico, de forma similar con el grupo colítico sin tratamiento.

No obstante, el estudio histológico de las muestras sí que reveló un efecto beneficioso de la quercitrina frente a este modelo de colitis experimental en rata. Así, el tratamiento con quercitrina a las ratas sometidas a colitis con oxazolona se tradujo en la recuperación de la citoarquitectura colónica en la mayoría de los animales de este grupo (5 de 8 ratas), que se manifestó por una elongación de las criptas, junto con un incremento en el número de células caliciformes. Esto se asocia con la existencia de zonas de inflamación focal, en contraposición con la distribución homogénea que presentaba en todo el segmento intestinal en las muestras del grupo control, caracterizado por la existencia en estas zonas de un infiltrado leucocitario de carácter leve (Figura 22). Esto último se ratificó bioquímicamente por una reducción en la actividad mieloperoxidasa colónica en comparación con el grupo control, que si bien no mostró diferencias significativas, tampoco las presentó frente al grupo blanco (Tabla 8). El resto de los parámetros bioquímicos no se modificó significativamente tras el tratamiento con quercitrina en comparación con el grupo colítico control sin tratamiento (Tabla 8).

DISCUSIÓN

I. CONSTATACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIDIARREICA DE *EUPHORBIA HIRTA* Y AISLAMIENTO DE UN COMPONENTE ACTIVO

Euphorbia hirta L. (Euphorbiaceae) es una pequeña hierba anual, utilizada con frecuencia en la medicina tradicional de distintas partes de Africa y Asia para el tratamiento de diferentes afecciones, entre las que se pueden citar los trastornos gastrointestinales (diarrea, disentería, parasitosis intestinales...), las enfermedades respiratorias y bronquiales (asma, bronquitis, fiebre del heno...), y las enfermedades oculares. Además de estas indicaciones, otras propiedades terapéuticas han sido atribuidas a esta planta como acción hipotensora, antipirética, antiinflamatoria, hipoglucemiante y sedante (Mitchel y Gerdina, 1962; Kokwaro, 1976; Ayensu, 1978; El-Naggar *et al.*, 1978; Some *et al.*, 1983; Chhabra *et al.*, 1990).

El material objeto de nuestro estudio, constituido por la sumidad de esta especie, fue suministrado por la Organización *Medicus Mundi* del que se utilizaba con fines terapéuticos en la región de Pama en Burkina Faso (antiguo Alto Volta). Los médicos de la organización establecidos en esta zona nos informaron que la planta era usada tradicionalmente para distintas afecciones gastrointestinales, principalmente diarreas de etiología desconocida, incluidas las producidas por distintas parasitosis. Igualmente, estos médicos nos informaron que la planta era administrada por vía oral en forma de un cocimiento.

Teniendo en cuenta las informaciones recibidas por los médicos de la Organización *Medicus Mundi*, y en un intento de reproducir la forma de utilización de la planta en el lugar de origen, se preparó un cocimiento de la droga pulverizada de acuerdo con Farmacopea Española (IX edición) (1959) para realizar los distintos ensayos farmacodinámicos. Una vez obtenido este extracto, éste se liofilizó y almacenó a 4°C hasta el momento de su utilización. El rendimiento obtenido en este proceso extractivo fue del 29,8 % (p/p).

Antes de iniciar los estudios dirigidos a constatar la actividad antidiarreica de la droga, procedimos a la realización de los ensayos para determinar la DL₅₀ por vía oral en ratones con un doble objetivo: en primer lugar, establecer la posible toxicidad de la planta; y, en segundo lugar, seleccionar las dosis que posteriormente podríamos utilizar en los correspondientes ensayos *in vivo*, y que no presentaran ningún efecto tóxico. Los resultados obtenidos nos revelaron que la droga era muy poco tóxica, ya que la administración por vía oral de dosis de hasta 15 g de droga por kg de peso a ratones no generó la muerte de ningún animal, ni manifestó la existencia de signos de toxicidad relevantes durante el periodo de tiempo en el que se observaron los animales.

En función de la baja toxicidad manifestada, seleccionamos las dosis de 350 y 700 mg de cocimiento por kg de peso para la realización de los estudios farmacodinámicos dirigidos a valorar la actividad antidiarreica de la planta. Estas dosis del liofilizado del cocimiento equivalen, en función del rendimiento obtenido con el extracto, aproximadamente 1,2 y 2,4 g de droga por kg de peso de animal.

Estas dosis del cocimiento liofilizado de la sumidad de *Euphorbia hirta* ejerció una marcada actividad antidiarreica en ratones en tres de los modelos de diarrea experimental utilizados en este estudio: aceite de ricino, ácido araquidónico y prostaglandina E₂. Sin embargo, no mostró efecto alguno cuando la diarrea fue inducida con el sulfato magnésico.

Por otra parte, las dosis de cocimiento liofilizado ensayadas no alteraron la defecación normal en ratones, ya que no modificaron de forma significativa el tiempo transcurrido entre la administración del marcador utilizado (rojo carmín) y la excreción de las primeras heces coloreadas, en comparación con el grupo control. Igualmente, el cocimiento no inhibió de forma significativa el tránsito intestinal en el intestino delgado en rata. Sin embargo, ambas dosis redujeron significativamente este tránsito cuando fue acelerado por la administración de aceite de ricino, al disminuir la distancia recorrida por el marcador (carbón activo) en el intestino delgado de la rata.

Analizando en conjunto estos resultados sobre el tránsito intestinal, podemos resaltar que el cocimiento de *Euphorbia hirta*:

- 1) no modificó el tránsito intestinal en condiciones normales
- 2) retrasó el tránsito en el intestino delgado cuando éste se aceleró con aceite de ricino
- 3) mostró actividad antidiarreica frente a aquellos modelos de diarrea que están relacionados con modificaciones activas en el transporte hidroelectrolítico a través de la mucosa intestinal

- 4) no ejerció efecto antidiarreico cuando un agente osmóticamente activo, el sulfato de magnesio, se utilizó para inducir la diarrea.

Es bien conocido el importante papel que las prostaglandinas desempeñan en la fisiopatología del tracto gastrointestinal (Bennet y Sanger, 1982; Diener *et al.*, 1988). En este sentido, tanto el aceite de ricino como el ácido araquidónico incrementan la actividad peristáltica intestinal e inducen cambios en la permeabilidad de la mucosa intestinal al agua y electrolitos, por mecanismos relacionados con la liberación de prostaglandinas (Luderer *et al.*, 1980; Capasso *et al.*, 1986). En consecuencia, uno de los mecanismos involucrados en la actividad antidiarreica de *Euphorbia hirta* puede estar relacionado con la inhibición en la producción y liberación de prostaglandinas. No obstante, un efecto directo frente a las acciones inducidas por estos mediadores también puede participar, dado que presenta actividad cuando la diarrea es inducida directamente con prostaglandina E₂.

Una vez constatada la actividad antidiarreica del liofilizado del cocimiento de la sumidad de *Euphorbia hirta*, nos propusimos aislar un compuesto activo responsable de esta actividad. Para ello procedimos a la realización de un fraccionamiento guiado de la droga pulverizada de acuerdo con el esquema propuesto por Yoshida *et al.* (1988) para esta misma planta (ver Figura 4), ensayando los distintos extractos y fracciones obtenidos frente a la diarrea inducida con aceite de ricino en ratones. El extracto acuoso inicial mostró actividad antidiarreica al incrementar de forma significativa el tiempo de aparición de las primeras heces diarreicas, análogamente a lo ejercido por el liofilizado del cocimiento utilizado para constatar la actividad de la droga.

Seguidamente se procedió a fraccionar este extracto sucesivamente con éter etílico, acetato de etilo y *n*-butanol saturado con agua. De estos tres extractos, únicamente el de acetato de etilo mostró actividad antidiarreica, por lo que fue nuevamente fraccionado mediante cromatografía en columna. El resultado fue el aislamiento de una fracción, la fracción VI, que incrementó de forma significativa el tiempo de aparición de las primeras heces diarreicas. Esta fracción contenía un único compuesto, la 3-ramnósido quercetina o quercitrina, cuya estructura fue determinada mediante análisis espectrofotométrico y cromatográfico, y fue ratificada mediante comparación directa con una muestra de este flavonoide proporcionada por Extrasynthése. Estudios previos han demostrado la presencia de la quercitrina en la sumidad florida de *Euphorbia hirta* (Blanc y de Saqui-Sannes, 1972; Krishna y Ganapaty, 1983; Yoshida *et al.*, 1988).

Una vez aislado este componente, nos propusimos investigar el mecanismo de acción responsable de la actividad antidiarreica. Para ello, inicialmente procedimos a valorar la actividad de distintas dosis del flavonoide frente a la diarrea inducida con aceite de ricino. Los resultados obtenidos en estos ensayos revelaron que la quercitrina mostró efecto significativo a partir de la dosis de 25 mg/kg. La disminución en el porcentaje de heces de consistencia diarreica fue similar en todas las dosis activas ensayadas, pero el incremento en el tiempo de aparición de las primeras heces diarreicas fue dosis dependiente ($r = 0,97$).

Seguidamente, estudiamos el efecto que el flavonoide podía ejercer en otros dos modelos de diarrea experimental en ratones: sulfato de magnesio y prostaglandina E₂. Pudimos comprobar que, al igual que ocurría con el liofilizado del cocimiento de *Euphorbia hirta*, la quercitrina no ejerció efecto alguno sobre la

diarrea inducida con el agente osmóticamente activo, el sulfato magnésico, pero sí cuando utilizamos la prostaglandina para promover la diarrea, si bien en este último modelo sólo ejerció actividad incrementando el tiempo de aparición de las primeras heces diarreicas sin modificar de forma significativa ni el número total de heces ni el de heces de elevada consistencia acuosa. En consecuencia, el flavonoide presentó una actividad antidiarreica análoga a la descrita anteriormente para la droga de la que se aisló este componente, de forma que sólo es efectivo frente a aquellos modelos en los que existe una alteración activa del transporte hidroelectrolítico a través de la mucosa intestinal, mediante mecanismos relacionados con un incremento en la producción y liberación de mediadores como las prostaglandinas, careciendo de efecto significativo si la diarrea era debida a la actuación de un agente osmóticamente activo desde el lumen intestinal, como es el caso del sulfato magnésico. Este perfil de actividad es diferente del que caracteriza a los compuestos antidiarreicos opiáceos como la loperamida que, al actuar como inhibidores de la motilidad intestinal son activos en cualquier situación, independientemente de la causa que genere el proceso diarreico; esto condiciona igualmente las reacciones adversas que pueden generar, como es el caso del estreñimiento (Ruppin, 1987; Schiller *et al.* 1988). Estas observaciones fueron ratificadas al estudiar el efecto que ejercía la quercitrina sobre el tránsito intestinal en el intestino delgado. Así, el flavonoide únicamente ejercía un retraso en este tránsito cuando era acelerado con aceite de ricino, pero no en condiciones normales. En consecuencia, el efecto antidiarreico manifestado por la quercitrina puede deberse a un incremento en la absorción de fluidos y electrolitos a través de la mucosa intestinal, pero únicamente cuando los procesos

fisiológicos involucrados en este transporte están alterados por mediadores como las prostaglandinas.

Previamente se ha comentado que las prostaglandinas contribuyen en la funcionalidad intestinal, tanto en condiciones fisiológicas como patológicas (Bennet y Sanger, 1982; Diener *et al.*, 1988), y que participan tanto en el incremento de la actividad peristáltica intestinal como en las modificaciones en el transporte hidroelectrolítico generadas por el aceite de ricino (Luderer *et al.*, 1980; Capasso *et al.*, 1986). En este sentido, se ha demostrado que los flavonoides pueden modular el metabolismo del ácido araquidónico gracias a su capacidad de inhibir las actividades de enzimas involucradas en esta ruta metabólica, como la fosfolipasa A₂, la ciclooxigenasa y la lipooxigenasa (Ferrandiz y Alcaraz, 1991; Lindahl y Tagesson, 1993; Laughton *et al.* 1991; Kim *et al.* 1998; You *et al.* 1999). De hecho, Capasso *et al.* (1988) demostraron el efecto inhibitorio de la quercitrina sobre la actividad lipooxigenasa. En consecuencia, estos efectos sobre el metabolismo del ácido araquidónico pueden justificar la actividad antidiarreica manifestada por la quercitrina. Además de esta capacidad inhibitoria directa sobre las actividades de estas enzimas, los flavonoides se caracterizan por sus propiedades antioxidantes (Mora *et al.*, 1990; Cos *et al.*, 1998), que igualmente pueden contribuir en el efecto inhibitorio que los flavonoides en general, y la quercitrina en particular, pueden ejercer sobre la producción de compuestos derivados del ácido araquidónico (Gryglewski *et al.*, 1987).

Con el objeto de caracterizar el efecto que la quercitrina podía ejercer sobre el transporte hidroelectrolítico a través de la mucosa intestinal, procedimos a valorar el efecto de este compuesto en la técnica del colon ligado de rata. Los

resultados obtenidos revelaron que el flavonoide, a concentraciones de 10, 100 y 1000 μM , no modificaba de forma significativa el transporte de agua a través de la mucosa colónica ni en condiciones normales ni cuando el transporte era alterado por la incorporación de PGE_2 o de picosulfato sódico en la solución Tyrode con la que se llenaba el segmento colónico. La ausencia de efecto alguno por parte del flavonoide en estos experimentos nos llevó a pensar que, al igual que ocurre con otros heterósidos como son las antraquinonas, fuera necesario que se produjera la liberación de la genina tras la hidrólisis del azúcar para que se manifestara la actividad. En este sentido, cuando la quercetina, la genina de la quercitrina, fue ensayada en la preparación del colon ligado de rata en las mismas condiciones utilizadas para la quercitrina, pudimos comprobar que fue capaz de incrementar la absorción colónica de agua cuando ésta era inhibida por la PGE_2 o de picosulfato sódico, pero no en condiciones normales. Por otra parte, cuando la quercitrina fue ensayada en esta misma preparación pero sin lavar previamente el lumen colónico de sus contenidos con solución Tyrode, el heterósido fue capaz de revertir el proceso secretor inducido por el picosulfato sódico en absorción. En este sentido, Goldhill *et al.* (1989) y Beubler y Badhri (1990) han descrito que determinados compuestos tienen que ser reducidos por los contenidos intestinales para generar un efecto determinado en estas preparaciones intestinales, y que esto depende de que se eliminen o no los contenidos colónicos lumbales. Análogos requerimientos pueden ser necesarios en el caso de la quercitrina para que pueda ejercer su efecto. Esta hipótesis se puede ver apoyada por el hecho observado en distintos estudios *in vitro* que ponen de manifiesto que las geninas son más potentes como antioxidantes que sus correspondientes heterósidos (Mora *et al.*, 1990), sobre todo si consideramos que, como se ha comentado anteriormente, el

efecto antioxidante que caracteriza a estos compuestos puede participar en la actividad antidiarreica manifestada por la quercitrina.

II. EFECTO ANTIINFLAMATORIO INTESTINAL DE LA QUERCITRINA

La Enfermedad Inflamatoria Intestinal (EII) incluye entre otras patologías la colitis ulcerosa y la Enfermedad de Crohn. Se trata de trastornos del tracto digestivo en el que se alternan periodos de exacerbación de la enfermedad con otros mas o menos prolongados de remisión de los síntomas. Aunque su etiología no es conocida con exactitud, los diferentes estudios apuntan a que la enfermedad se produce como consecuencia de una respuesta inmune intestinal anormalmente exagerada frente a un estímulo presente en el lumen intestinal, el cual, en condiciones normales, o bien no sería capaz de generar esta respuesta inmune o bien sería convenientemente suprimida por los mecanismos de regulación responsables de este cometido (Fiocchi, 1998). Al igual que ocurre en otros procesos inflamatorios, la EII se caracteriza por el incremento en la producción y liberación de numerosos mediadores de carácter proinflamatorio, tales como los eicosanoides, el factor activador plaquetario (PAF), metabolitos reactivos derivados del oxígeno y del nitrógeno, los cuales afectan a la integridad de la mucosa y generan un importante daño tisular (Katz *et al.*, 1999; Podolsky y Fiocchi, 2000). Es importante tener en cuenta que la mayoría de estos mediadores pueden inducir la biosíntesis y liberación de los otros mediadores, generando un ‘círculo vicioso’ que puede contribuir en la propagación y perpetuación de la respuesta inflamatoria.

Desde un punto de vista histológico, la EII se caracteriza por alteraciones en la disposición de las criptas y disminución de células caliciformes, así como por la infiltración de linfocitos, macrófagos, eosinófilos y células plasmáticas

(Geller, 1994). Las células T CD4⁺ representan la gran mayoría de las células mononucleares activadas infiltradas en el tejido intestinal. Una gran mayoría de las células T posee características fenotípicas similares a los linfocitos circulantes, por lo que proceden del reclutamiento desde la sangre hacia la mucosa intestinal, probablemente como resultado del incremento en la expresión de moléculas de adhesión y citoquinas en el intestino inflamado (Fiocchi, 1998). Como resultado del estado de activación de las células T, éstas sintetizan una gran cantidad de citoquinas que contribuyen directa o indirectamente al desarrollo del proceso inflamatorio intestinal. Se ha demostrado que en la mucosa de pacientes con EC existe un predominio de células CD4⁺ con fenotipo Th1, que se caracterizan por la producción de interferón- γ (IFN- γ) e IL-2. En contraste, en la mucosa de pacientes con CU predominan las células CD4⁺ con fenotipo Th2, caracterizadas por la producción de TGF β y de IL-5 (Fuss *et al.*, 1996).

En función de todo lo anteriormente expuesto, en la actualidad no existe un tratamiento específico que actúe sobre la causa responsable de la EII, por lo que la mejor estrategia para contrarrestar la respuesta inmune exacerbada que caracteriza a esta patología es interferir con el mayor número posible de etapas de la cascada inflamatoria, preferiblemente con un único tratamiento farmacológico (Kho *et al.* 2001). De hecho, distintos fármacos utilizados actualmente en el control de la EII, como los derivados del ácido 5-aminosalicílico y los glucocorticoides, sistémicos o de acción local, ejercen sus efectos beneficiosos mediante la combinación de distintos mecanismos (Travis y Jewel, 1994; Bratts y Linden, 1996). Desgraciadamente, estos fármacos no están exentos de reacciones adversas, algunas de ellas graves, que limitan en mayor o menor medida su uso (Enns y Sutherland, 1998; Stein y Hanauer, 2000). En consecuencia, el desarrollo

de nuevos tratamientos farmacológicos que combinen eficacia y seguridad es un objetivo importante en la terapia de la EII.

Este puede ser el caso de los flavonoides, productos naturales que como se ha venido comentado a lo largo de esta Tesis Doctoral están dotados de distintas actividades biológicas, principalmente relacionadas con su capacidad de inhibir actividades enzimáticas o con sus propiedades antioxidantes, habiéndose también descrito que son capaces de modular la respuesta inmune (Middleton *et al.* 2000). Estas actividades podrían justificar el que los flavonoides puedan ser considerados como fármacos potencialmente aplicables en el tratamiento farmacológico de la EII. De hecho, estudios previos realizados por nuestro grupo de investigación han demostrado la eficacia de distintos flavonoides, como la quercitrina, la rutina, la diosmina, la hesperidina y la morina, en el modelo de colitis experimental en ratas del ácido trinitrobencenosulfónico (TNBS) (Sánchez de Medina *et al.* 1996; Cruz *et al.* 1998; Crespo *et al.* 1999; Galvez *et al.* 2001). Aunque el mecanismo de acción de los flavonoides para ejercer el efecto antiinflamatorio intestinal no es conocido con exactitud, una característica común en todos los casos estudiados es su capacidad de mejorar el estado oxidativo colónico que caracteriza al proceso inflamatorio intestinal, probablemente relacionada con sus bien conocidas propiedades antioxidantes y captadoras de radicales libres atribuidas a estos compuestos. No obstante, mecanismos adicionales contribuyan probablemente en sus efectos beneficiosos. En este sentido, se ha podido comprobar que la morina disminuye la producción de mediadores involucrados en la respuesta inmune, tales como citoquinas (IL-1 β) y el óxido nítrico (NO) (Galvez *et al.* 2001). Recientemente, se ha descrito que los efectos de la quercitrina en la colitis crónica experimental inducida con TNBS puede resultar de una inhibición en los procesos

iniciales de la cascada inflamatoria, que se asocia con una mejora en las alteraciones del transporte hidroelectrolítico a través de la mucosa colónica (Sánchez de Medina *et al.* 2002). El objetivo de esta segunda parte de la Tesis fue estudiar con mayor profundidad los mecanismos responsables del efecto antiinflamatorio intestinal de la quercitrina en dos modelos diferentes de colitis experimental en ratas: el modelo del sulfato de dextrano sódico (DSS) y el modelo de la oxazolona, modelos que se ha propuesto que presentan una similitud a lo que ocurre en la colitis ulcerosa en humanos (Gaudio *et al.*, 1999; Kullmann *et al.*, 2001; Boirivant *et al.*, 1998).

Nuestro grupo de investigación ya ha estudiado previamente el efecto de la quercitrina sobre las fases aguda y crónica en el modelo de colitis experimental inducido mediante la administración intracolónica de una solución de TNBS en etanol al 50%, método inicialmente descrito por Morris *et al.* (1989). Este modelo es, sin lugar a dudas, uno de los más utilizados para conocer los mecanismos involucrados en el proceso inflamatorio intestinal, así como para valorar nuevos tratamientos potencialmente útiles en el tratamiento de la EII en humanos (Elson *et al.* 1995). La mayoría de los estudios indican que este modelo presenta una gran similitud con la enfermedad de Crohn en humanos, tanto con relación a las modificaciones histomorfológicas, como al perfil de citoquinas que se genera en el colon de los animales. De hecho, los estudios llevados a cabo en el colon de ratones con colitis inducida con TNBS, demuestran que existe un predominio de células T con fenotipo Th1, que se caracterizan por la producción de grandes cantidades de IFN- γ y pequeñas cantidades de IL-4 (Neurath *et al.*, 1995; Elson *et al.*, 1996); este tipo de respuesta está promovida por una hipersecreción de IL-12 que actúa como un potente inductor del desarrollo de células tipo Th1,

productoras de IFN- γ (Trinchieri, 1994), al igual que ocurre con la enfermedad de Crohn (Breese *et al.*, 1993; Fuss *et al.*, 1993; Monteleone *et al.*, 1997). Análogamente, el modelo del TNBS genera lesiones transmurales en el colon de las ratas con características patológicas similares a la enfermedad de Crohn (Fuss *et al.*, 1999).

El modelo del sulfato de dextrano utilizado en el presente estudio produce una inflamación restringida a la mucosa que está más relacionada con la colitis ulcerosa en humanos (Gaudio *et al.*, 1999; Kullmann *et al.*, 2001), a diferencia de lo comentado anteriormente con el modelo del TNBS. El mecanismo por el que el DSS genera el proceso inflamatorio intestinal no es conocido con exactitud, y se piensa que es causado por la conjunción de distintas acciones, entre las que se incluyen un efecto tóxico directo, una alteración en la normal interacción entre los linfocitos intestinales, las células epiteliales y la matriz extracelular, una modificación en la expresión de los receptores de integrinas y cambios en la población de la microflora intestinal (Okayasu *et al.*, 1990; Ni *et al.*, 1996). Más recientemente, se ha descrito que el DSS activa el factor de transcripción nuclear NF- κ B (Marrero *et al.*, 2000), que es considerado como un componente clave en la inducción de la transcripción de citoquinas proinflamatorias en la enfermedad inflamatoria intestinal (French y Pettersson, 2000).

Los resultados obtenidos en el presente estudio demuestran que la administración de DSS al 5% en el agua de bebida genera en la rata un proceso inflamatorio intestinal que, a la semana del inicio del experimento, presenta unas características similares a las descritas previamente para este mismo modelo por otros autores (Stucchi *et al.* 2000; Kullmann *et al.* 2001). Así los animales

manifestaron los síntomas clínicos propios de un proceso inflamatorio colónico como diarrea y presencia de sangre en las heces, que al final del experimento se tornó en pérdida masiva de la misma por el recto, con la consiguiente alteración en el estado general de los animales: pérdida de peso, anorexia, anemia... Tras sacrificar los animales pudimos comprobar que el daño intestinal se limitaba casi exclusivamente al colon, evidenciándose el proceso inflamatorio por un engrosamiento del tejido acompañado de hiperemia y zonas de ulceración en la región distal. El estudio microscópico confirmó la existencia de este daño inflamatorio en el tejido colónico. Estas preparaciones nos permitieron comprobar que la lesión inducida con el DSS se restringía fundamentalmente a la mucosa, lo que confirma que este modelo de colitis experimental se asemeja en mayor medida a lo que ocurre con la colitis ulcerosa en humanos. Los cambios en la mucosa incluían la presencia de ulceraciones y pérdida de la citoarquitectura normal de las criptas con necrosis y abscesos; las células caliciformes aparecían vacías de su contenido mucoso. También se observó la presencia de un importante infiltrado inflamatorio en las distintas capas intestinales, que estaba principalmente compuesto por neutrófilos y macrófagos, aunque estaban presentes linfocitos y células plasmáticas. La existencia de este importante infiltrado en la mucosa colónica se corroboró bioquímicamente por el incremento en la actividad MPO colónica, dado que éste es considerado como un marcador de este proceso (Krawisz *et al.* 1984), y que se encuentra incrementado en distintos modelos experimentales de inflamación intestinal (Yamada *et al.* 1992). Todas estas características histopatológicas están de acuerdo con las descritas por otros autores para este mismo modelo (Cooper *et al.* 1993; Kullmann *et al.* 2001).

La administración diaria de quercitrina por vía oral, a la dosis de 1 mg/kg, inhibió de forma significativa la progresión del proceso inflamatorio intestinal inducido por la ingestión del DSS por las ratas, tal y como se evidenció clínicamente por una menor pérdida del peso corporal de los animales, una reducción en la incidencia de diarrea y pérdida de sangre. Igualmente, este efecto se manifestó macroscópicamente por una disminución significativa en la relación peso/longitud de los segmentos intestinales en los animales tratados en comparación con el grupo control. Finalmente, el beneficio de la quercitrina sobre la lesión colónica fue también evidenciado histológicamente por una preservación en la citoarquitectura intestinal gravemente afectada por el proceso inflamatorio inducido con el DSS. Esto se puso de manifiesto por una reducción del grado de ulceración de la mucosa, afectando en la mayoría de las muestras únicamente al 25% de la superficie de la misma en contraposición con la afectación casi total en los animales control. Además, las criptas mostraron una estructura casi normal, con las células caliciformes repletas de moco, en contraposición a lo que sucedía con los animales colíticos del grupo control. Aunque la infiltración de neutrófilos fue evidente en la lamina propria, ésta fue de carácter leve o moderado en la mayoría de los animales, junto con la práctica ausencia de macrófagos y células plasmáticas en lámina propria y submucosa.

El efecto antiinflamatorio de la quercitrina se asoció con una reducción significativa en las actividades enzimáticas MPO y fosfatasa alcalina. Como se ha comentado anteriormente, la actividad MPO es un marcador de infiltración de neutrófilos, por lo que ha sido ampliamente utilizado para valorar el proceso inflamatorio intestinal, de forma que una reducción en la actividad de esta enzima puede ser considerado como una manifestación de la actividad antiinflamatoria

intestinal de un compuesto dado (Veljaca *et al.* 1995). Análogamente, y basándonos en estudios previos de nuestro grupo de investigación, la actividad fosfatasa alcalina puede ser también considerada como un marcador sensible del proceso inflamatorio intestinal, dado que esta actividad enzimática se encuentra siempre incrementada en distintos modelos experimentales de inflamación intestinal (Sánchez de Medina *et al.* 1996; Galvez *et al.* 1997). En consecuencia, una reducción en esta actividad enzimática puede ser considerada indicativo del efecto antiinflamatorio intestinal ejercido por la quercitrina en este modelo de colitis experimental.

Los resultados obtenidos con los distintos ensayos bioquímicos realizados con las muestras de tejido colónico nos informan sobre los mecanismos involucrados en el efecto antiinflamatorio intestinal ejercido por la quercitrina. Así, el efecto beneficioso de la quercitrina puede estar relacionado con una inhibición en la generación de radicales libres, como consecuencia de la capacidad antioxidante descrita tanto para la quercitrina como para su genina la quercetina, en ensayos *in vivo* e *in vitro* (Bors *et al.* 1990; Galvez *et al.* 1994). Esta actividad antioxidante puede desempeñar un papel clave en el efecto antiinflamatorio intestinal de la quercitrina ya que esta situación de estrés oxidativo intestinal es una característica común compartida por la enfermedad inflamatoria intestinal en humanos (Grisham, 1994; McKenzie *et al.* 1996) y por diferentes modelos de colitis experimental en ratas, incluyendo el del TNBS (Sánchez de Medina *et al.*, 1996; Galvez *et al.*, 2001) y el del DSS (Stucchi *et al.*, 2000), siendo además un importante mecanismo de daño tisular durante la inflamación crónica intestinal. De hecho, estudios previos llevados a cabo por nuestro grupo de investigación han demostrado que las propiedades antioxidantes y/o captadoras de radicales libres

de la quercitrina podría contribuir en los efectos beneficiosos ejercidos por este flavonoide en las fases iniciales del daño colónico inducido con el TNBS (Sánchez de Medina *et al.*, 1996; Sánchez de Medina *et al.*, 2002). Análogamente, en el presente estudio, el tratamiento con quercitrina a ratas sometidas a colitis experimental con DSS fue capaz de contrarrestar la depleción del contenido en glutatión que tiene lugar en los animales colíticos del grupo control sin tratamiento. Este efecto antioxidante puede igualmente colaborar en la menor infiltración de neutrófilos que se genera en respuesta a la administración del DSS, tal y como hemos demostrado bioquímicamente por una reducción en la actividad MPO colónica, y que se confirma en los estudios histológicos. La generación de radicales libres se ha propuesto que es clave en las fases tempranas del proceso inflamatorio intestinal, contribuyendo de forma decisiva en la patogénesis de la EII (Pavlick *et al.*, 2002), participando en los procesos iniciales relacionados con la infiltración de neutrófilos en la mucosa colónica inflamada. El reclutamiento y la posterior activación de estas células generan una producción masiva de radicales libres que supera a los mecanismos antioxidantes tisulares de carácter protector, dando lugar a una situación de estrés oxidativo, responsable en gran medida del mantenimiento de la inflamación colónica (Grisham, 1994). Por tanto, una rápida inhibición en la generación de radicales libres podría contribuir a una reducción en la infiltración de neutrófilos en el tejido inflamado, protegiéndolo del proceso inflamatorio. No obstante, es importante resaltar que la quercitrina puede disminuir la infiltración leucocitaria mediante la inhibición en la producción de otros mediadores con actividad quimiotáctica, dada la bien conocida capacidad de los flavonoides de modular la respuesta inmune gracias a sus propiedades inhibitorias de distintas actividades enzimáticas, como las

relacionadas con el metabolismo del ácido araquidónico (Middleton *et al.*, 2000). Entre los compuestos con actividad quimiotáctica podemos citar al LTB₄, un eicosanoide cuya producción se ha descrito que está incrementada en la enfermedad inflamatoria intestinal (Sharon y Stenson, 1984). No obstante, se puede descartar que la inhibición del flavonoide sobre la producción de LTB₄ contribuya en su efecto antiinflamatorio intestinal, dado que no se observó efecto significativo alguno sobre la producción colónica de este eicosanoide tras el tratamiento con quercitrina de los animales colíticos. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en estudios previos en los que demostramos que no existía una relación entre la capacidad de la quercitrina de inhibir la producción de LTB₄ y su efecto antiinflamatorio en la fase aguda del modelo de colitis experimental con TNBS (Sánchez de Medina *et al.*, 1996).

Durante la última década han sido numerosos los estudios que han establecido una relación entre la inflamación colónica crónica y un incremento en la producción de óxido nítrico (NO), generado fundamentalmente como consecuencia de la actividad de la enzima óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), tanto en humanos como en modelos experimentales con distintos roedores (Rachmilewitz *et al.*, 1995; Hogaboam *et al.*, 1995; Kimura *et al.*, 1997; Salas *et al.*, 2002). Aunque son bien conocidas las propiedades homeostáticas del NO en la funcionalidad intestinal (Moncada *et al.*, 1991), presentando incluso propiedades antiinflamatorias (Kiss *et al.*, 1997; Lefer y Lefer, 1999), se ha sugerido que la sobreproducción de NO por la actividad iNOS es nociva para la funcionalidad intestinal, contribuyendo de forma significativa en los procesos inflamatorios de carácter crónico que tienen lugar en la EII (Rachmilewitz *et al.*, 1995; Hogaboam *et al.*, 1995; Grisham *et al.*, 2002). El importante papel atribuido

al NO en estas patologías intestinales nos hizo estudiar si los efectos beneficiosos ejercidos por la quercitrina en el modelo de colitis con DSS podían estar relacionados con un efecto sobre la producción colónica de NO. Con este objetivo valoramos la actividad NOS y su expresión en los diferentes grupos experimentales ensayados. Como era de esperar, los resultados obtenidos en el presente estudio revelan que la inflamación colónica se asocia con una mayor actividad NOS colónica así como con una mayor expresión de la iNOS, puesta de manifiesto mediante análisis de Western blot, en comparación con los animales sanos del grupo blanco. La administración de quercitrina a los animales colíticos disminuye significativamente la actividad NOS incrementada, al mismo tiempo que reduce la expresión de la iNOS. En principio, la menor actividad NOS podría también estar relacionada con una inhibición directa de esta enzima por parte del flavonoide, dada la capacidad de estos compuestos polifenólicos de inhibir distintas actividades enzimáticas, incluida la actividad NOS (Middleton *et al.*, 2000). Sin embargo, un estudio *in vitro* realizado con distintos flavonoides en una línea celular de macrófagos (RAW 264.7) demuestra que tanto la quercetina como sus heterósidos carecen de un efecto inhibitor directo sobre la actividad iNOS (Kim *et al.*, 1999). Por tanto, y de acuerdo con los resultados obtenidos en el presente estudio, el efecto mostrado por la quercitrina está más probablemente relacionado con un efecto inhibitor sobre la expresión de esta enzima como consecuencia del proceso inflamatorio colónico. De hecho, la inhibición en la expresión de la iNOS por parte de los flavonoides ha sido descrita en esta misma línea celular de macrófagos, habiéndose sugerido que este efecto estaba relacionado con la capacidad de los flavonoides de interferir en el proceso de activación-traslación del factor de transcripción NF- κ B (Kim *et al.*, 1999; Tsai

et al., 1999). Los mecanismos moleculares que participan en la acción inhibitoria de los flavonoides sobre el NF- κ B son en la actualidad desconocidos, habiéndose postulado distintas posibilidades. La primera de ellas es que los flavonoides pueden inhibir la activación del NF- κ B al actuar como antioxidantes (Bors *et al.*, 1990), ya que el NF- κ B es un factor de transcripción sensible al estado 'redox' celular que es activado por la situación de estrés oxidativo existente en la mucosa intestinal inflamada (Rogler *et al.*, 1998). La segunda posibilidad es que los flavonoides inhiban la activación del NF- κ B mediante el bloqueo del proceso de fosforilación necesario para la degradación de la proteína I κ B, proceso clave para que tenga lugar la traslocación del NF- κ B al núcleo y su posterior activación (Tsai *et al.*, 1999). Independientemente del mecanismo involucrado, la inhibición en la producción de NO puede contribuir en el efecto beneficioso demostrado por este flavonoide en el modelo de colitis experimental inducida con el DSS, y así previniendo, al menos en parte, el efecto perjudicial atribuido al NO cuando este es generado en cantidades elevadas por la enzima iNOS. De hecho, similares efectos beneficiosos han sido descritos tras la inhibición de la actividad de esta enzima en diferentes modelos de inflamación intestinal (Miller *et al.*, 1993; Rachmilewitz *et al.*, 1995; Hogaboam *et al.*, 1995; Salas *et al.*, 2002).

Por último, en esta segunda parte de la presente Tesis Doctoral valoramos el efecto de la quercitrina en otro modelo de colitis experimental, mediante la administración intracolónica de un hapteno, la oxazolona, a ratas previamente sensibilizadas. Este modelo fue desarrollado inicialmente en ratones por Boirivant *et al.* (1998), que lo caracterizaron como un modelo de colitis experimental mediado por la activación de linfocitos T CD4⁺ con fenotipo Th2, en función de

las alteraciones histológicas observadas en el intestino grueso de los animales así como por el perfil de citoquinas generadas por el tejido intestinal inflamado. Los resultados obtenidos en el presente estudio demuestran que la administración de oxazolona a ratas previamente sensibilizadas genera un proceso inflamatorio intestinal con características similares a las descritas anteriormente por otros autores (Ekstrom, 1998). El daño colónico fue caracterizado principalmente por la existencia de alteraciones histológicas limitadas fundamentalmente a la mucosa, en donde se observaba abundante hiperemia sin ulceración evidente, menor número de células caliciformes con reducción de su contenido mucoso, y un infiltrado leucocitario de carácter leve. Esto último fue confirmado bioquímicamente por el incremento en la actividad MPO colónica en comparación con los animales del grupo blanco. No obstante, el daño intestinal generado fue cuantitativamente menor al obtenido con otros modelos de inflamación intestinal como el del TNBS o el del DSS. De hecho, no pudo ponerse de manifiesto la existencia de una situación de estrés oxidativo en el tejido colónico dado que ninguno de los dos marcadores bioquímicos analizados con tal finalidad, el contenido colónico de glutathion y los niveles de MDA, se encontraron significativamente modificados en los animales que recibieron la oxazolona. Análogamente, no se modificaron de forma significativa los otros dos parámetros bioquímicos estudiados: la actividad fosfatasa alcalina y la producción de LTB₄.

En cualquier caso, el tratamiento con quercitrina sí que manifestó un efecto beneficioso en este modelo de colitis experimental, tal y como se evidenció por la mejora histológica del tejido colónico como por la reducción en la actividad MPO colónica.

En conclusión, el presente estudio ha permitido poner de manifiesto el efecto antiinflamatorio intestinal de la quercitrina en dos modelos de inflamación intestinal, DSS y oxazolona, corroborando el efecto beneficioso demostrado previamente por nuestro grupo de investigación en el modelo del TNBS. Probablemente, las propiedades antiinflamatorias intestinales de la quercitrina estén íntimamente relacionadas con su actividad antioxidante y captadora de radicales libres, de forma similar a lo descrito para otros fármacos de reconocida eficacia en el tratamiento de estas patologías intestinales, como son los derivados del ácido 5-aminosalicílico (Keshavarzian *et al.*, 1990; Grisham *et al.*, 1994). Todo esto hace que este flavonoide sea un candidato potencial para ser desarrollado en la terapia de la EII en humanos, sobre todo si consideramos la baja toxicidad que se asocia con el consumo de este tipo de compuesto, ya que son normalmente ingeridos en la dieta normal en cantidades significativas sin que haya sido descrito hasta el momento efecto nocivo alguno derivado de su consumo (Middleton *et al.* 2000).

CONCLUSIONES

- 1) El cocimiento de la sumidad de *Euphorbia hirta* presenta actividad antidiarreica en distintos modelos experimentales, constatándose la utilización empírica de esta droga en su zona de origen.
- 2) Un principio responsable de la actividad antidiarreica de esta droga es un flavonoide, la 3-ramnósido quercetina o quercitrina. Este compuesto normaliza el tránsito intestinal alterado en los animales de experimentación mediante una restauración de la capacidad absortiva intestinal, cuando se produce una inhibición por agentes secretagogos. Para que esto tenga lugar, es necesaria la hidrólisis del heterósido en el lumen intestinal y posterior liberación de su genina, la quercetina.
- 3) La quercitrina ejerce un efecto antiinflamatorio intestinal en dos modelos de colitis experimental: modelo del sulfato de dextrano y modelo de la oxazolona. Este efecto beneficioso puede estar asociado con sus propiedades antioxidantes.

BIBLIOGRAFÍA

Abdalla S, Zarga MA, Afifi F, Al-Khalil S, Mahasneh A, Sabri S (1989) Effects of 3,3'-di-O-methylquercetin on guinea-pig isolated smooth muscle. *J Pharm Pharmacol* 41, 138-141.

Abu-Niaaj L, Abu Zarga M, Sabri S, Abdalla S (1993) Isolation and biological effects of 7-O-methyleriodictyol, a flavanone isolated from *Artemisia monosperma*, on rat isolated smooth muscles. *Planta Med* 59, 42-45.

Ajao AO, Emele F, Femionadero B. (1985) Antibacterial activity of *Euphorbia hirta*. *Fitoterapia* 56, 165-167.

Alarcon de la Lastra C, Martin MJ, Marhuenda E. (1992) Gastric anti-ulcer activity of silymarin, a lipoxygenase inhibitor, in rats. *J Pharm Pharmacol* 44, 929-931.

Alarcon de la Lastra C, Martin MJ, Motilva V, Jimenez M, La Casa C, Lopez A. (1995) Gastroprotection induced by sylimarin, the hepatoprotective principle of *Sylimbum marianum* in ischemia reperfusion mucosal injury: role of neutrophils. *Planta Med* 61, 116-119.

Alarcon de la Lastra C, Martin MJ, Motilva V. (1994) Antiulcer and gastroprotective effects of quercetin: a gross and histologic study. *Pharmacology* 48, 56-62.

Alcaraz MJ, Hoult JR. (1985) Actions of flavonoids and the novel anti-inflammatory flavone, hypolaetin-8-glucoside, on prostaglandin biosynthesis and inactivation. *Biochem Pharmacol* 34, 2477-2482.

Amoros M, Simoes CM, Girre L, Sauvager F, Cormier M (1992) Synergistic effect of flavones and flavonols against herpes simplex virus type 1 in cell culture. Comparison with the antiviral activity of propolis. *J Nat Prod* 55, 1732-1740.

Anderson ME (1985) Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples. *Meth Enzymol* 113, 548-555.

Andrews FJ, Malcontenti BS, O'Brien PE. (1992) Sequence of gastric mucosal injury following ischemia and reperfusion. Role of reactive oxygen metabolites. *Dig Dis Sci* 37, 135-1361.

Ares JJ, Outt PE. (1998) Gastroprotective agents for the prevention of NSAID-induced gastropathy. *Curr Pharm Des* 4, 16-36.

Asfaha S, Macnaughton WK, Appleyard CB, Chadee K, Wallace JL (2001) Persistent epithelial dysfunction and bacterial translocation after resolution of intestinal inflammation. *Am J Physiol* 281, G635-G644.

Ayensu ES (1978) *Medicinal Plants of West Africa*. Reference Publications Inc. Michigan (USA) p.125.

Bae EA, Han MJ, Kim DH. (1999) In vitro anti-*Helicobacter pylori* activity of some flavonoids and their metabolites. *Planta Med* 65, 442-443.

Beil W, Birkholz C, Sewing K (1995) Effects of flavonoids on parietal cell acid secretion, gastric mucosal prostaglandin production and *Helicobacter pylori* growth. *Arzneimittelforschung* 6, 697-700.

Bell CJ, Gall DG, Wallace JL (1995) Disruption of colonic electrolyte transport in experimental colitis. *Am J Physion* 268, G622-G630.

Bennet A, Sanger GJ (1982) Acid lipids: prostaglandins. En: *Mediators and Drugs in Gastrointestinal Motility*. Vol II. Bertacini G (ed.). Springer Verlag, Berlin. pp. 219-238.

Beretz A, Anton R, Cazenave JP. (1986) En: *Plant Flavonoids in Biology and Medicine: Biochemical, Pharmacological, and Structure-Activity Relationships*.

Cody V, Middleton E, Harborne JB, Beretz A (eds.). AR Liss, New York, pp. 281-296.

Bertran X, Mañe J, Fernandez-Bañares E, Castella R, Bartoli I, Ojanguren M, Esteve M, Gassull MA (1996) Intracolonic administration of zileuton, a selective 5-lipoxygenase inhibitor, accelerates healing in a rat model of chronic colitis. *Gut* 38, 899-904.

Bessey OA, Lowry OH, Brook MJ (1946) Rapid colorimetric method for the determination of alkaline phosphatase in five cubic milliliters of serum. *J Biol Chem* 164, 321-329.

Beubler E, Badhri P (1990) Comparison of the antisecretory effects of loperamide and loperamide oxide in the jejunum and the colon of the rats in-vivo. *J Pharm Pharmacol* 42, 689-692.

Beubler E, Badhri P (1990) Comparison of the antisecretory effects of loperamide and loperamide oxide in the jejunum and the colon of rats in-vivo. *J Pharm Pharmacol* 72, 689-692.

Beubler E, Juan H (1979) Effect of ricinoleic acid and other laxatives on net water flux and prostaglandin E release by rat colon. *J Pharm Pharmacol* 31, 681-685.

Blanc P, de Saqui-Sannes G (1972) *Plant Med Phytother* 6, 106-109.

Böhm H, Boeing H, Hempel J, Raab B, Kroke AZ (1998) Flavonols, flavone and anthocyanins as natural antioxidants of food and their possible role in the prevention of chronic diseases. *Z Ernährungswiss* 37, 147-163.

Boirivant M, Fuss IJ, Chu A, Strober (1998) Oxazolone colitis: a murine model of T helper cell type 2 colitis treatable with antibodies to interleukin 4. *J Exp Med* 188, 1929-1939.

Bokkenheuser VD, Winter J (1988) En: *Plant Flavonoids in Biology and Medicine II: Biochemical, Cellular, and Medicinal Properties*. Cody V, Middleton E, Harborne JB, Beretz A (Eds). A.R. Liss; New York. pp. 143-145.

Bors W, Heller W, Michel C, Saran M (1990) Flavonoids as antioxidants: determination of radical-scavenging efficiencies. *Methods Enzymol* 186, 343-355.

Boughton-Smith NK. (1989) Involvement of leukotrienes in acute gastric damage. *Meth Find Exp Clin Pharmacol* 11, 53-59.

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254.

Brading AF, Sneddon P (1980) Evidence for multiple sources of calcium for activation of the contractile mechanism of guinea-pig taenia coli on stimulation with carbachol. *Br J Pharmacol* 76, 229-240.

Brandzaeg P, Haraldsen L, Baekkevold ES, Jahnsen FL, Nilsen EM (1999) En: *Intestinal Mucosa and its Diseases. Pathophysiology and Clinics*. Domschke W, Stoll R, Brasitus TA, Kagnoff MF (eds.). Kluwer Academic Publishers BV, Dordrecht, pp. 383-400.

Braquet P, Etienne A, Mencia-Huerta JM, Clostre F. (1988) Effects of the specific platelet-activating factor antagonists, BN 52021 and BN 52063, on various experimental gastrointestinal ulcerations. *Eur J Pharmacol* 150, 269-276.

Bratts R, Linden M (1996) Cytokine modulation by glucocorticoids: mechanisms and actions in cellular studies. *Aliment Pharmacol Ther* 10, 81-90.

Breese E, Braegger C, Corrigan C, Walker-Smith J, MacDonald T (1993) Interleukin-2 and interferon- γ secreting T cells in normal and diseased human intestinal mucosa. *Immunology* 78, 127-131.

Bronner C, Landry Y (1985) Kinetics of the inhibitory effect of flavonoids on histamine secretion from mast cells. *Agents Actions* 16, 147-151.

Campos R, Garrido A, Guerra R, Valenzuela A. (1989) Silybin dihemisuccinate protects against glutathione depletion and lipid peroxidation induced by acetaminophen on rat liver. *Planta Med* 55, 417-419.

Capasso A, Pinto A, Mascolo N, Autore G, Capasso F (1991b) Reduction of agonist-induced contractions of guinea-pig isolated ileum by flavonoids. *Phytother Res* 5, 85-87.

Capasso A, Pinto A, Sorrentino R, Capasso F (1991a) Inhibitory effects of quercetin and other flavonoids on electrically-induced contractions of guinea pig isolated ileum. *J Ethnopharmacol* 34, 279-281.

Capasso F, Mascolo N, Autore G, Romano V (1986) Laxatives and the production of autacoids by rat colon. *J Pharm Pharmacol* 38, 627-629.

Cermak R, Föllmer U, Wolfram S (1998) Dietary flavonol quercetin induces chloride secretion in rat colon. *Am J Physiol* 274, G1166-G1172.

Chan MM, Fong D, Ho CT, Huang HI (1997) Inhibition of inducible nitric oxide synthase gene expression and enzyme activity by epigallocatechin gallate, a natural product from green tea. *Biochem Pharmacol* 54, 1281-1286.

Chhabra SC, Mahunnan RLA, Mshiu EN (1990) Plants used in traditional medicine in eastern Tanzania. III. Angiosperms (Euphorbiaceae to Menispermaceae) *J Ethnopharmacol* 28, 255-283.

Chiesi M, Schwaller R (1995) Inhibition of constitutive endothelial NO-synthase activity by tannin and quercetin. *Biochem Pharmacol* 49, 495-501.

Cooper HS, Murthy SN, Shah RS, Sedergran DJ (1993) Clinicopathologic study of dextran sulfate sodium experimental murine colitis. *Lab Invest* 69, 238-249.

Cos P, Ying L, Calomme M, Hu JP, Cimanga K, Van Poel B, Pieters L, Vlietinck AJ, Vanden Berghe D. (1998) Structure-activity relationship and classification of flavonoids as inhibitors of xanthine oxidase and superoxide scavengers. *J Nat Prod* 61, 71-76.

Crespo ME, Galvez J, Cruz T, Ocete MA, Zarzuelo A (1999) Anti-inflammatory activity of diosmin and hesperidin in rat colitis induced by TNBS. *Planta Med* 65, 651-653.

Cristoni A, Malandrino S, Magistretti MJ. (1989) Effect of a natural flavonoid on gastric mucosal barrier. *Arzneimittelforschung* 39, 590-592.

Cruz T, Galvez J, Crespo ME, Ocete MA, Zarzuelo A (2001) Effects of sylimarin on the acute stage of the trinitrobenzenesulphonic acid model of rat colitis. *Planta Med* 67: 94-96

Cruz T, Galvez J, Ocete MA, Crespo ME, Sanchez de Medina F, Zarzuelo A (1998) Oral administration of rutoside can ameliorate inflammatory bowel disease in rats. *Life Sci* 62, 687-695.

Cushman M, Nagarathnam D (1991) Cytotoxicities of some flavonoid analogues. *J Nat Prod* 54, 1656-1660.

Dharmasathaphorn K, Madara JL (1990) Established intestinal cell lines as model systems for electrolyte transport studies. *Meth Enzymol* 192, 354-389.

Di Carlo G, Autore G, Izzo AA, Maiolino P, Mascolo N, Viola P, Diurno MV, Capasso F (1993) Inhibition of intestinal motility and secretion by flavonoids in mice and rats: structure-activity relationships. *J Pharm Pharmacol* 45, 1054-1059.

Diener M, Bridges RJ, Knobloch SF, Rummel W (1988) Neurally mediated and direct effects of prostaglandins on ion transport in rat colon descendens. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 337, 74-78.

Diener M, Hug F (1996) Modulation of Cl⁻ secretion in rat distal colon by genistein, a protein tyrosine kinase inhibitor. *Eur J Pharmacol* 299, 161-170.

Doherty NS, Hancock AA (1983) Role of alpha-2 adrenergic receptors in the control of diarrhea and intestinal motility. *J Pharm Exp Ther* 225, 269-273.

Duarte J, Perez Vizcaino F, Utrilla P, Jimenez J, Tamargo J, Zarzuelo A (1993a) Vasodilatory effects of flavonoids in rat aortic smooth muscle. Structure-activity relationships. *Gen Pharmacol* 24, 857-862.

Duarte J, Perez Vizcaino F, Zarzuelo A, Jimenez J, Tamargo J (1993b) Vasodilator effects of quercetin in isolated rat vascular smooth muscle. *Eur J Pharmacol* 239, 1-7.

Edwards JM, Raffauf RF, Le Quesne PW (1979) Antineoplastic activity and cytotoxicity of flavones, isoflavones, and flavanones. *J Nat Prod* 42, 85-91.

Ekstrom GM (1998) Oxazolone-induced colitis in rats: effects of budesonide, cyclosporin A, and 5-aminosalicylic acid. *Scand J Gastroenterol* 33, 174-179.

El-Naggar L, Beal JL, Parks LM, Schwarting AE (1978) Pharmacologically active constituents of *Euphorbia pilulifera*. *J Nat Prod* 41, 72-75.

Elson CO, Beagley KW, Sharmanov AT, Fujihashi K, Kiyono H, Tennyson GS, Cong Y, Black CA, Ridwan BW, McGhee JR (1996) Hapten-induced model of murine inflammatory bowel disease: mucosa immune responses and protection by tolerance. *J Immunol* 157, 2174-2185.

Elson CO, Sartor B, Tennyson GS, Riddell RH (1995) Experimental models of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 109, 1344-1357.

Emim JA, Oliveira AB, Lapa AJ (1994) Pharmacological evaluation of the anti-inflammatory activity of a citrus bioflavonoid, hesperidin, and the isoflavonoids, dauricin and claussequinone, in rats and mice. *J Pharm Pharmacol* 46, 118-122.

Enns R, Sutherland L (1998) Adverse events of medical therapy for treatment for inflammatory bowel disease. En: *Clinical Challenges in Inflammatory Bowel Disease. Diagnosis, Prognosis and Treatment*. Campieri M, Bianchi-Porro G, Fiocchi C, Schölmerich J (eds.). London: Kluwer Academic Publishers, pp. 113-123.

Ferrandiz ML, Alcaraz MJ (1991) Anti-inflammatory activity and inhibition of arachidonic acid metabolism by flavonoids. *Agents Action* 32, 627-629.

Ferriola PC, Cody V, Middleton E (1989) Protein kinase C inhibition by plant flavonoids. Kinetic mechanisms and structure-activity relationships. *Biochem Pharmacol* 38, 1617-1624.

Fiocchi C (1998) Inflammatory bowel disease: aetiology and pathogenesis. *Gastroenterology* 115, 182-205.

Forte JG, Machen T, Obrink KJ (1980) Mechanisms of gastric H⁺ and Cl⁻ transport *Ann Rev Physiol* 42, 111-126.

French N, Pettersson S (2000) Microbe-host interactions in the alimentary tract: the gateway to understanding inflammatory bowel disease. *Gut* 47, 162-163.

Fretland DJ, Widomski D, Tsai D-S, Zemaitis JM, Levin S, Djuric SW, Shone RL, Gaginella TS (1990) Effect of the leukotriene B₄ receptor antagonist SC-41930 on colonic inflammation in rat, guinea pig and rabbit. *J Pharmacol Exp Ther* 255, 572-576.

Fuss IJ, Marth T, Neurath MF, Pearlstein GR, Jain A, Strober W (1999). Anti-interleukin 12 treatment regulates apoptosis of Th1 T cells in experimental colitis in mice. *Gastroenterology* 117, 1078-1088.

Fuss IJ, Neurath M, Boirivant M, Klein JS, de la Motte C, Strong SA, Fiocchi C, Strober W (1996). Disparate CD4⁺ lamina propria (LP) lymphokine secretion profiles in inflammatory bowel disease. Crohn's disease LP cells manifest increased secretion of IFN- γ , whereas ulcerative colitis LP cells manifest increased secretion of IL-5. *J Immunol* 157, 1261-1270.

Galsanov SB, Turova AD, Klimenko ED (1976). Effect of quercitrin on structural changes in the large and small intestines during experimental enterocolitis. *Bull Eksp Biol Med* 81, 623-625.

Galvez J, Coelho G, Crespo ME, Cruz T, Rodríguez-Cabezas ME, Concha A, González M, Zarzuelo A (2001) Intestinal anti-inflammatory activity of morin on chronic experimental colitis in the rat. *Aliment Pharmacol Ther* 15, 2027-2039.

Galvez J, Crespo ME, Zarzuelo A, de Witte P, Spiessens C. (1993) Pharmacological activity of a procyanidin isolated from *Sclerocarya birrea* bark: antidiarrhoeal activity and effects on isolated guinea-pig ileum. *Phytother Res* 7,25-28.

Galvez J, Cruz T, Crespo ME, Ocete MA, Lorente MD, Sanchez de Medina F, Zarzuelo A (1997) Rutoside as mucosal protective in acetic-acid induced rat colitis. *Planta Med* 63, 409-414.

Galvez J, de la Cruz JP, Zarzuelo A, Sanchez de Medina F, Sanchez de la Cuesta F (1994) Oral administration of quercitrin modifies intestinal oxidative status in rats. *Gen Pharmacol* 25, 1237- 1243.

Galvez J, Duarte J, Sanchez de Medina F, Jiménez J, Zarzuelo A (1996) Inhibitory effects of quercetin on guinea-pig ileum contractions. *Phytother Res* 10, 66-69.

Galvez J, Garrido M, Merlos M, Torres MI, Zarzuelo A (2000) Intestinal anti-inflammatory activity of UR-12746, a novel 5-ASA conjugate, on acute and chronic experimental colitis in the rat. *Br J Pharmacol* 130, 1949-1959.

Galvez J, Sánchez de Medina F, Jiménez J, Torres MI, Fernández MI, Nuñez MC, Ríos A, Gil A, Zarzuelo A (1995) Effect of quercitrin on lactose-induced chronic diarrhoea in rats *Planta Med* 61, 302-306.

Galvez J, Zarzuelo A, Crespo ME, Utrilla MP, Jimenez J, Spiessens C, de Witte P. (1991) Antidiarrhoeic activity of *Sclerocarya birrea* bark extract and its active tannin constituent in rats *Phytother Res* 5, 276-278.

Gambhir SS, Banerjee RS (1992) Antispasmodic activity of flavonoids on guinea pig ileum *in vitro*: structure activity relationship. En: *Natural Drugs and the Digestive Tract*. Capasso F, Mascolo N (eds.) EMSI, Roma, pp. 89-97.

Gaudio E, Taddei G, Vetuschi A, Sferra R, Frieri G, Ricciardi G, Caprilli R (1999) Dextran sulfate sodium (DSS) colitis in rats: clinical, structural, and ultrastructural aspects. *Dig Dis Sci* 44, 1458-1475.

Geller SA (1994) Pathology of inflammatory bowel disease: a critical appraisal in diagnosis and management. En: *Inflammatory Bowel Disease: From Bench to Bedside*. Targan SR, Shanagan F (eds.). Williams and Wilkins, Baltimore, Maryland. pp. 336-351.

Goldhill J, Hardcastle J, Hardcastle PT (1989) Effect of loperamide oxide on PGE₂-stimulated fluid transport in rat small intestine. *Z Gastroenterol* 5, 292-295.

Graham D. (1998) Antibiotic resistance in *Helicobacter pylori*: implications for therapy. *Gastroenterology* 115, 1272-1277.

Griffiths L (1982) En: *The Flavonoids: Advances in Research*. Harborne J, Mabry T (eds.). Chapman and Hall; London, pp. 681-718.

Griffiths LA, Barrow A (1972) Metabolism of flavonoid compounds in germ-free rats. *Biochem J* 130, 1161-1162.

Grisham MB (1994) Oxidants and free radicals in inflammatory bowel disease. *Lancet* 344, 859-861.

Grisham MB, Jourdeuil D, Wink DA (1999) Nitric oxide I. Physiological chemistry of nitric oxide and its metabolites: implications in inflammation. *Am J Physiol* 276, G315-G320.

Grisham MB, Pavlick KP, Laroux, FS, Hoffman J, Bharwani S, Wolf RE (2002) Nitric oxide and chronic gut inflammation: controversies in inflammatory bowel disease. *J Investig Med* 50, 272-283.

Gryglewski RJ, Korbut R, Robak J, Swies J (1987). On the mechanism of antithrombotic action of flavonoids. *Biochem Pharmacol* 36, 317-322.

Guth PH, Aures D, Paulsen G. (1979) Topical aspirin plus HCl gastric lesions in the rat. Cytoprotective effect of prostaglandin, cimetidine, and probanthine. *Gastroenterology* 76, 88-93.

Habtemariam S (1997) Flavonoids as inhibitors or enhancers of the cytotoxicity of tumor necrosis factor- α in L-929 tumor cells. *J Nat Prod* 60, 775-778

Haenen GR, Paquay JB, Korthouwer EM, Bast A (1997) Peroxynitrite scavenging by flavonoids. *Biochem Biophys Res Commun* 236, 591-593.

Harris ML, Schiller HJ, Reilly PM, Donowitz M, Grisham MB, Bulkley GB. (1992) Free radicals and other reactive oxygen metabolites in inflammatory bowel disease: cause, consequence or epiphenomenon? *Pharmacol Ther* 53, 375-408.

Havsteen B (1983) Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency. *Biochem Pharmacol* 32, 1141-1148.

Herrera MD, Marhuenda E, Gibson A (1992) Effects of genistein, an isoflavone isolated from *Genista tridentata*, on isolated guinea-pig ileum and guinea-pig ileal myenteric plexus. *Planta Med* 58, 314-316.

Hertog MGL, Hollman PCH, Katan MB, Kromhout D (1993) Intake of potentially anticarcinogenic flavonoids and their determinants in adults in The Netherlands. *Nutr Cancer* 20, 21-29.

Hertog MGL, Kromhout D, Aravanis C, Blackburn H, Buzina R, Fidanza F, Giampaoli S, Jansen A, Menotti A, Nedeljkovic S, et al. (1995) Flavonoid intake

and long-term risk of coronary heart disease and cancer in the seven countries study. *Arch Intern Med* 155, 381-386.

Hill SJ (1990) Distribution, properties, and functional characteristics of three classes of histamine receptor. *Pharmacol Rev* 42, 45-83.

Hogaboam CM, Jacobson K, Collins SM, Blennerhassett MG (1995). The selective beneficial effects of nitric oxide inhibition in experimental colitis. *Am J Physiol* 268, G673-G684.

Hollman PCH, Katan MB (1998) En: *Flavonoids in Health and Disease*. Rice-Evans CA, Packer L (Eds). Marcel Dekker, Inc; New York. pp. 483-522.

Hurwitz L, Weissinger J (1980) Effects of variations in extracellular acetylcholine and calcium ion concentration on the operational level of calcium channels in intestinal smooth muscle. *J Pharm Exp Ther* 214, 581-588.

Illek B, Fischer H, Machen TE (1996) Alternate stimulation of apical CFTR by genistein in epithelia. *Am J Physiol* 270, C265-C275.

Ishikawa Y, Sugiyama H, Stylianou E, Kitamura M (1999) Bioflavonoid quercetin inhibits interleukin-1-induced transcriptional expression of monocyte

chemoattractant protein-1 in glomerular cells via suppression of nuclear factor- κ B. *J Am Soc Nephrol* 10, 2290-2296.

Izzo AA (1996) PAF and the digestive tract. A review. *J Pharm Pharmacol* 48, 1103-1111.

Johnson PB, Abudurahman EM, Tiam EA, Abdu-Aguye I, Hussaini IM (1999) *Euphorbia hirta* leaf extracts increase urine output and electrolytes in rats. *J Ethnopharmacol* 65, 63-69.

Justesen U, Knuthsen P, Leth T (1997) Determination of plant polyphenols in Danish foodstuffs by HPLC-UV and LC-MS detection. *Cancer Lett* 117, 165-167.

Karaki H, Weiss GB (1984) Calcium channels in smooth muscle. *Gastroenterology* 87, 960-970.

Katz JA, Itoh J, Fiocchi C (1999) Pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Curr Opin Gastroenterol* 15, 291-297.

Keshavarzian A, Morgan G, Sedghi S, Gordon JH, Doria M (1990) Role of reactive oxygen metabolites in experimental colitis. *Gut* 31, 786-790.

Khan MR, Ndaolio G, Nkunya MHH, Wevers H, Sawhney A (1980) Studies on African medicinal plants. Part I. Preliminary screening of medicinal plants for antibacterial activity. *Planta Med Suppl*, 91-97.

Kho YH, Pool MO, Jansman FG, Harting JW (2001) Pharmacotherapeutic options in inflammatory bowel disease: an update. *Pharm World Sci* 23, 17-21.

Kim HK, Cheon BS, Kim YH, Kim SY, Kim HP (1999) Effects of naturally occurring flavonoids on nitric oxide production in the macrophage cell line RAW 264.7 and their structure-activity relationships. *Biochem Pharmacol* 58, 759-765.

Kim HP, Mani I, Iversen L, Ziboh VA. (1998) Effects of naturally-occurring flavonoids and biflavonoids on epidermal cyclooxygenase and lipoxygenase from guinea-pigs. *Prostag Leuk Essen Fatty Acids* 58, 17-24.

Kimura H, Miura S, Shigematsu T, Ohkubo N, Tsuzuki Y, Kurose I, Higuchi H, Akiba Y, Hokari R, Hirokawa M, Serizawa H, Ishii H (1997). Increased nitric oxide production and inducible nitric oxide synthase activity in colonic mucosa of patients with active ulcerative colitis and Crohn's disease. *Dig Dis Sci* 42, 1047-1054.

Kiss J, Lamarque D, Delchier JC, Whittle BJR (1997) Time-dependent actions of nitric oxide synthase inhibition on colonic inflammation induced by trinitrobenzene sulphonic acid in rats. *Eur J Pharmacol* 336, 219-224.

Kokwaro JO (1976) *Medicinal Plants of West Africa*. East African Literature Bureau. Nairobi (Kenya) p. 92.

Krawisz JE, Sharon P, Stenson WF (1984) Quantitative assay for acute intestinal inflammation based on myeloperoxidase activity. Assessment of inflammation in rat and hamster models. *Gastroenterology* 87, 1344-1350.

Krishna Rao CV, Ganapaty S (1983) Investigation on *Euphorbia pilulifera* L. *Fitoterapia* 54, 265-267.

Kühau J (1976) The flavonoids. A class of semi-essential food components: their role in human nutrition. *World Rev Nutr Diet* 24, 117-191

Kullmann F, Messmann H, Alt M, Gross V, Bocker T, Schölmerich J, and Ruschoff J (2001). Clinical and histopathological features of dextran sulfate sodium induced acute and chronic colitis associated with dysplasia in rats. *Int J Colorectal Dis* 16:238-246.

Kuppusamy UR, Das NP (1992) Effects of flavonoids on cyclic AMP phosphodiesterase and lipid mobilization in rat adipocytes. *Biochem Pharmacol* 44, 1307-1315.

Kyogoku J, Hatayama K, Yokomori S, Saziki R, Nakane S, Sasajima M, Sawada J, Ohzeki M, Tanaka I (1979). Anti-ulcer effect of isoprenyl flavonoids. II. Synthesis and anti-ulcer activity of new chalcones related to sophoradin. *Chem Pharm Bull* 27, 2943-2953.

Landolfi R, Mower RL, Steiner M (1984) Modification of platelet function and arachidonic acid metabolism by bioflavonoids. Structure-activity relations. *Biochem Pharmacol* 33, 1525-1530.

Lanthers MC, Fleurentin J, Cabalion P, Rolland A, Dorfman P, Misslin R, Pelt JM (1990) Behavioural effects of *Euphorbia hirta* L.: Sedative and anxiolytic properties. *J Ethnopharmacol* 29, 189-198.

Lanthers MC, Fleurentin J, Dorfman P, Mortier F, Pelt JM (1991) Analgesic, Antipyretic and anti-inflammatory properties of *Euphorbia hirta*. *Planta Med* 57, 225-231.

Larsson H, Carlsson E, Junggren U, Olbe L, Sjöstrand SE, Skanberg L, Sundell G. (1983) Inhibition of gastric acid secretion by omeprazole in the dog and rat. *Gastroenterology* 85, 900-907.

Laughton MJ, Evans PJ, Moroney MA, Hoult J, Halliwell B. (1991) Inhibition of mammalian 5-lipoxygenase and cyclo-oxygenase by flavonoids and phenolic dietary additives. *Biochem Pharmacol* 42, 1673-1681.

Lefter AM, Lefter DJ (1999) Nitric oxide protects in intestinal inflammation. *Am J Physiol* 276, G572-G575.

Lefter AM, Lefter DJ (1999) Nitric oxide. II. Nitric oxide protects in intestinal inflammation. *Am J Physiol* 276, G572-G575.

Leng-Peschlow E (1986) Acceleration of large intestine transit time in rats by sennosides and related compounds. *J Pharm Pharmacol* 38, 369-373.

Ligumsky M, Sestieri M, Okon E, Ginsburg I. (1995) Antioxidants inhibit ethanol-induced gastric injury in the rat. Role of manganese, glycine, and carotene. *Scand J Gastroenterol* 30, 854-860.

Ligumsky M, Simon PL, Karmeli F, Rachmilewitz D (1990) Role of interleukin-1 in inflammatory bowel disease-enhanced production during active disease. *Gut* 31, 686-689.

Lindahl M, Tagesson C. (1993) Selective inhibition of group II phospholipase A2 by quercetin. *Inflammation* 17, 573-582.

Loguercio C, D'Argenio G, Dell Cave M, Cosenza V, Della Valle N, Mazzacca G, del Vecchio Blanco C (1996) Direct evidence of oxidative damage in acute and chronic phases of experimental colitis in rats. *Dig Dis Sci* 41, 1204-1211

Lozoya X, Meckes M, Abu-Zaid M, Tortoriello J,- Nozzolillo C, Arnason JT. (1994) Quercetin glycosides in *Psidium guajava* L. leaves and determination of a spasmolytic principle. *Arch Med Res* 24, 11-15.

Luderer JR, Demers LM, Nomides CT, Hayes AH (1980) Mechanism of action of castor oil: a biochemical link to the prostaglandins. En: *Advances in Prostaglandin and Thromboxane Research* Vol. 8. Samuelsson B, Ramwell PW, Paoletti R (eds.). Raven Press, New York, pp. 1633-16635.

Lutterodt GD (1989) Inhibition of gastrointestinal release of acetylcholine by quercetin as a possible mode of action of *Psidium guajava* leaf extracts in the treatment of acute diarrhoeal disease. *J Ethnopharmacol* 25, 235-247.

Lutterodt GD (1992) Inhibition of Microlax-induced experimental diarrhoea with narcotic-like extracts of *Psidium guajava* leaf in rats. *J Ethnopharmacol* 37, 151-157.

Macander PJ (1986) En: *Plant Flavonoids in Biology and Medicine: Biochemical, Pharmacological, and Structure-Activity Relationships*. Cody V, Middleton E, Harborne JB, Beretz A (eds.). AR Liss, New York, pp. 489-492.

Magistretti MJ, Conti M, Cristoni A. (1988) Antiulcer activity of an anthocyanidin from *Vaccinium myrtillus*. *Arzneimittelforschung* 38, 686-690.

Makhlouf GM, Murthy KS (1997) Signal transduction in gastrointestinal smooth muscle. *Cell Signal* 9, 269-276.

Manach C, Morand MR, Demigne C, Texier O, Regerat F, Remesy C (1997) Bioavailability of rutin and quercetin in rats. *FEBS Letters* 409, 12-16.

Manthey JA, Grohmann K, Montanari A, Ash K, Manthey CL (1999) Polymethoxylated flavones derived from citrus suppress tumor necrosis factor- α expression by human monocytes. *J Nat Prod* 62, 441-444.

Marrero JA, Matkowskyj KA, Yung K, Hecht G, Benya RV (2000) Dextran sulfate sodium-induced murine colitis activates NF- κ B and increases galanin-1 receptor expression. *Am J Physiol* 278, G797-G804.

Martin MJ, La Casa C, Alarcon de la Lastra C, Cabeza J, Villegas I, Motilva V. (1998) Anti-oxidant mechanisms involved in gastroprotective effects of quercetin. *Z Naturforsch* 53, 82-88.

Martin MJ, Marhuenda E, Perez-Guerrero C, Franco JM. (1994) Antiulcer effect of naringin on gastric lesions induced by ethanol in rats. *Pharmacology* 49, 144-150.

McCafferty DM, Rioux K, Wallace JL (1992) Granulocyte infiltration in experimental colitis in the rat is interleukin-1 dependent and leukotriene independent. *Eicosanoids* 5, 121-125.

McKenzie SJ, Baker MS, Buffinton GD, Doe WF (1996) Evidence of oxidant-induced injury to epithelial cells during inflammatory bowel disease. *J Clin Invest* 98, 136-141.

Megraud F. (1998) Epidemiology and mechanism of antibiotic resistance in *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology* 115, 1278-1282.

Meli R, Autore G, Di Carlo G, Capasso F (1990) Inhibitory action of quercetin on intestinal transit time. *Phytother Res* 4, 201-202.

Mertz-Nielsen A, Munck LK, Bukhave K, Rask-Madsen J. (1990) A natural flavonoid, IdB 1027, increases gastric luminal release of prostaglandin E2 in healthy subjects. *Ital J Gastroenterol* 22, 288-290.

Middleton E (1998) Effect of plant flavonoids on immune and inflammatory cell function. *Adv Exp Med Biol* 439, 175-182.

Middleton E, Kandaswami C, Theoharides TC (2000). The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacol Rev* 52, 673-751.

Miller LC, Tainter ML (1944) Estimation of de DL50 and its error by means of logarithmic-probit graphpaper. *Proc Soc Exp Biol Med* 57, 261-264.

Miller MJ, Sadowska-Krowicka SH, Chotinaruemol S, Kakkis JL, Clark DA (1993) Amelioration of chronic ileitis by nitric oxide synthase inhibition. *J Pharm Exp Ther* 264, 11-16.

Miller MJS, Sandoval M (1999) Nitric oxide III. A molecular to intestinal prelude inflammatory. *Am J Physiol* 276, G795-G799.

Mitchel J, Gerdina M (1962) *The Medicinal Plants and Poisonous Plants of Southern and Eastern Africa*. 2^a ed. E & S Livingston Ltd. London, pp. 408-410.

Moncada SR, Palmer MJ, Higgs EA (1991). Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 43, 109-142.

Monteleone G, , Biancone L, Marasco R, Morrone G, Marrasco O, Luzzi F, Pallone F (1997) Interleukin 12 is expressed and actively released by Crohn's disease intestinal lamina propria mononuclear cells. *Gastroenterology* 112, 1169-1178.

Mora A, Paya M, Rios JL, Alcaraz MJ (1990) Structure-activity relationships of polymethoxyflavones and other flavonoids as inhibitors of non-enzymic lipid peroxidation. *Biochem Pharmacol* 36, 317-322.

Morales MA, Tortoriello J, Meckes M, Paz D, Lozoya X (1994) Calcium-antagonist effect of quercetin and its relation with the spasmolytic properties of *Psidium guajava* L. *Arch Med Res* 25, 17-21.

Moroney MA, Alcaraz MJ, Forder RA, Carey F, Holt RS (1988) Selectivity of neutrophil 5-lipoxygenase and cyclo-oxygenase inhibition by an anti-inflammatory flavonoid glycoside and related aglycone flavonoids. *J Pharm Pharmacol* 40, 787-792.

Morris GP, Beck PL, Herridge W, Depew W, Szewczuk MR, Wallace JL (1989) Hapten induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon. *Gastroenterology* 96, 795-803.

Motilva V, Alarcon de la Lastra C, Martin MJ, Torreblanca J. (1992) Effects of naringenin and quercetin on experimental chronic gastric ulcer in rat. Studies on the histological findings. *Phytother Res* 6, 168-170.

Motilva V, Alarcon de la Lastra C, Martin MJ. (1994) Ulcer-protecting effects of naringenin on gastric lesions induced by ethanol in rat: role of endogenous prostaglandins. *J Pharm Pharmacol* 46, 91-94.

Murakami S, Kijima H, Isobe Y, Muramatsu M, Aihara H, Otomo S *Baba K*, Kozawa M. (1990). Inhibition of gastric H⁺, K⁽⁺⁾-ATPase by chalcone derivatives, xanthoangelol and 4-hydroxyderricin, from *Angelica keiskei* Koidzumi. *J Pharm Pharmacol* 42, 723-726.

Murakami S, Muramatsu M, Aihara H, Otomo S (1991) Inhibition of gastric H⁺,K⁽⁺⁾-ATPase by the anti-ulcer agent, sofalcone. *Biochem Pharmacol* 42, 1447-1451.

Murakami S, Muramatsu M, Otomo S (1992) Gastric H⁺, K⁽⁺⁾-ATPase inhibition by catechins. *J Pharm Pharmacol* 44, 926-928.

Murakami S, Muramatsu M, Otomo S. (1992a). Inhibition of gastric H⁺, K⁽⁺⁾-ATPase by quercetin. *J Enzyme Inhib*.5, 293-8.

Murakami S, Muramatsu M, Tomisawa K (1999) Inhibition of gastric H⁺, K⁽⁺⁾-ATPase by flavonoids: a structure-activity study. *J Enzyme Inhib* 14, 151-166.

Neurath M, Fuss I, Kelsall B, Stuber E, Strober W (1995) Antibodies to interleukin 12 abrogate established experimental colitis in mice. *J Exp Med* 182, 1128-1140.

Nguyen TD, Canada AT (1993) Citrus flavonoids stimulate secretion by human colonic T84 cells. *J Nutr* 123, 259-268.

Nguyen TD, Canada AT, Heintz GG, Gettys TW, Cohn JA (1991) Stimulation of secretion by the T84 colonic epithelial cell line with dietary flavonols. *Biochem Pharmacol* 21, 1879-1886.

Ni J, Chen SF, Hollander D (1996) Effects of dextran sulfate sodium on intestinal epithelial cells and intestinal lymphocytes. *Gut* 39, 234-241.

Nikaido T, Ohmoto T, Sankawa U, Hamanka T, Totsuka K (1982) Inhibition of cyclic AMP phosphodiesterase by flavonoids. *Planta Med* 46, 162-166.

Noroozi M, Burns J, Crozier A, Kelly LE, Lean ME (2000) Prediction of dietary flavonol consumption from fasting plasma concentration or urinary excretion. *Eur J Clin Nutr* 54, 143-149.

Oates PJ, Hakkinen JP. (1988) Studies on the mechanism of ethanol-induced gastric damage in rats. *Gastroenterology* 94, 10-21.

Obrador A, Riera J (1994) Definitions. En: *Management of Inflammatory Bowel Disease*. Gassull MA, Obrador A, Chantar C (eds.). Prous Science, Barcelona, pp.1-6.

Ocete MA, Galvez J, Crespo ME, Cruz T, Gonzalez M, Torres MI, Zarzuelo A (1998) Effects of morin on an experimental model of acute colitis in rats. *Planta Med* 63, 261-270.

Ohnishi E, Bannai H (1993) Quercetin potentiates TNF-induced antiviral activity. *Antiviral Res* 22, 327-331.

Okabe S, Pfeiffer CJ. (1972) Chronicity of acetic acid ulcer in the rat stomach. *Am J Dig Dis* 17, 619-629.

Okayasu I, Hatakeyama S, Yamada M, Ohkusa T, Inagaki Y, Nakaya R (1990) A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice. *Gastroenterology* 98, 694-702.

Osada T, Goto H, Tsukamoto Y, Nakazawa S, Sugiyama S, Ozawa T. (1990) Role of leukotrienes in hydrochloric acid-induced gastric lesions in rats. *Dig Dis Sci* 35, 186-192.

Panes J, Gerritsen ME, Anderson DC, Miyasaka M, Granger DN (1996) Apigenin inhibits tumor necrosis factor-induced intercellular adhesion molecule-1 upregulation in vivo. *Microcirculation* 3, 279-286.

Parmar NS, Ghosh MN (1981) Gastric anti-ulcer activity of (+)-cyanidanol-3, a histidine decarboxylase inhibitor. *Eur J Pharmacol* 69, 25-32.

Parmar NS, Hennings G (1984) The gastric antisecretory activity of 3-methoxy-5,7,3'4'-tetrahydroxyflavan (ME)--a specific histidine decarboxylase inhibitor in rats. *Agents Actions* 15, 143-145.

Pavlick KP, Laroux FS, Fuseler J, Wolf RE, Gray L, Hoffman J, Grisham MB (2002) Role of reactive metabolites of oxygen and nitrogen in inflammatory bowel disease. *Free Radic Biol Med* 33, 311-322.

Peet GW, Li J (1999) I κ B kinases α and β show a random sequential kinetic mechanism and are inhibited by staurosporine and quercetin. *J Biol Chem* 274, 32655-32661.

Podolsky DK, Fiocchi C (2000) Cytokines, chemokines, growth factors, eicosanoids and other bioactive molecules in inflammatory bowel disease. En: *Inflammatory Bowel Disease* 5th ed. Kirsner JB (ed.). Philadelphia: WB Saunders, pp. 191-207.

Rachmilewitz D, Karmeli F, Okon E, Bursztyn M (1995) Experimental colitis is ameliorated by inhibition of nitric oxide synthase activity. *Gut* 37, 247-255.

Rachmilewitz D, Simon PL, Schawartz LW, Griswold DE, Fondacaro JD, Wasserman MA (1989) Inflammatory mediators of experimental colitis in the rats. *Gastroenterology* 97, 326-337.

Randak C, Auerswald EA, Assfalg-Machleidt I, Reenstra WW, Machleidt W (1999) Inhibition of ATPase, GTPase and adenylate kinase activities of the second nucleotide-binding fold of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator by genistein *Biochem J* 340, 227-235.

Rao VS, Santos FA, Sobreira TT, Souza MF, Melo CL, Silveira ER (1997) Investigations on the gastroprotective and antidiarrhoeal properties of ternatin, a tetramethoxyflavone from *Egletes viscosa*. *Planta Med* 63, 146-149.

Rasmussen H, Barrett PO (1984) Calcium messenger system: an integrated view. *Physiol Rev* 64, 934-984.

Reimann HJ, Lorenz W, Fischer M, Frölich R, Meyer HJ (1977) Histamine and acute haemorrhagic lesions in rat gastric mucosa: prevention of stress ulcer formation by (+)-catechin, an inhibitor of specific histidine decarboxylase in vitro. *Agents Actions* 7, 69-73.

Robert A. (1979) Cytoprotection by prostaglandins. *Gastroenterology* 77, 761-767.

Rogler G, Brand K, Vogl D, Page S, Hofmeister R, Andus T, Knuechel R, Baeuerle, PA, Schölmerich J, Gross V (1998) Nuclear factor kappaB is activated in macrophages and epithelial cells of inflamed intestinal mucosa. *Gastroenterology* 115, 357-369.

Ruppin H (1987) Review: loperamide - a potent antidiarrhoeal drug with actions along the alimentary tract. *Aliment Pharmacol Ther* 1, 179-190.

Salas A, Gironella M, Salas A, Soriano A, Sans M, Iovanna J, Pique JM, Panes J (2002). Nitric oxide supplementation ameliorates dextran sulfate sodium-induced colitis in mice. *Lab Invest* 82, 597-607.

Sanchez de Medina F, Galvez J, Gonzalez M, Zarzuelo A, Barrett K. (1997) Effects of quercetin on epithelial chloride secretion. *Life Sci* 61, 2049-2055.

Sanchez de Medina F, Galvez J, Romero JA, Zarzuelo A (1996) Effects of quercitrin on acute and chronic experimental colitis in the rat. *J Pharm Exp Ther* 278, 771-779.

Sánchez de Medina F, Perez R, Martínez-Augustin O, Gonzalez R, Lorente MD, Galvez J, Zarzuelo A (2002) Disturbances of colonic ion secretion in inflammation: role of enteric nervous system and cAMP. *Pflug Arch Eur J Physiol* 444, 378-288.

Sartor RB (1997) Pathogenesis and immune mechanisms of chronic inflammatory bowel diseases. *Am J Gastroenterol* 92 (Suppl.), 5S-11S.

Satoh H, Inada I, Hirata T, Maki Y. (1981) Indomethacin produces gastric antral ulcers in the refeed rat. *Gastroenterology* 81, 719-725.

Schiller LR, Santa Ana CA, Morawski SG, Fordtran JS (1988) Mechanism of the antidiarrheal effect of loperamide. *Gastroenterology* 86, 1475-1480.

Sears CL, Firoozmand F, Mellander A, Cahmbers FG, Eromar IG, Bot AG, Scholte B, Donowitz M (1995) Genistein and tyrphostin 47 stimulate CFTR-mediated Cl⁻ secretion in T84 cell monolayers. *Am J Physiol* 269, G874-G882.

Sharon P, Stenson WF (1984). Enhanced synthesis of leukotriene B₄ by colonic mucosa in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 86, 453-460.

Sichel G, Corsaro C, Scalia M, Di Bilio AJ, Bonomo RP (1991) In vitro scavenger activity of some flavonoids and melanins against O₂⁻(·). *Free Rad Biol Med* 11, 1-8.

Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 150, 76-85.

Some BL, Sawadogo JM, Chauvel F (1983) *La Phyotherapie dans le Courma*. Laafia Edition, p. 39.

Stein RB, Hanauer SB (2000) Comparative tolerability of treatments for inflammatory bowel disease. *Drug Saf* 23; 429-448.

Stucchi AF, Shofer S, Leeman S, Materne O, Beer E, McLung J, Shebani K, Moore F, O'Brien M, Becker JM (2000) NK-1 antagonist reduces colonic inflammation and oxidative stress in dextran sulfate-induced colitis in rats. *Am J Physiol* 279, G1298-G1306.

Tona L, Kambu K, Mesia K, Cimanga K, Apers S, De Bruyne T, Pieters L, Totte J, Vlietinck AJ (1999) Biological screening of traditional preparations from some

medicinal plantas used as antidiarrhoeal in Kinshasa, Congo. *Phytomedicine* 6, 59-66.

Tona L, Kambu K, Ngimbi N, Mesia K, Penge O, Lusakibanza M, Cimanga K, De Bruyne T, Apers S, Totte J, Pieters L, Vlietinck AJ (2000) Antiamoebic and spasmolytic activities of extracts from some antidiarrhoeal traditional preparations used in Kinshasa, Congo. *Phytomedicine* 7, 31-38.

Travis SPL, Jewel DP (1994) Salicylates for ulcerative colitis-their mode of action. *Pharmac Ther* 63, 135-161.

Trute A, Gross J, Mutschler E, Narhrstedt A (1997) In vitro antispasmodic compounds of the dry extract obtained from *Hedera helix*. *Planta Med* 63, 125-129.

Tsai SH, Lin-Shiau SY, Lin JK (1999) Suppression of nitric oxide synthase and the down-regulation of the activation of NF kappaB in macrophages by resveratrol. *Br J Pharmacol* 126, 673-680.

Valenzuela A, Aspigalla M, Vial S, Guerra R. (1989) Selectivity of silymarin on the increase of the glutathione content in different tissues of the rat. *Planta Med* 55, 420-422.

Valenzuela A, Guerra R, Videla LA. (1986) Antioxidant properties of the flavonoids silybin and (+)-cyanidanol-3: comparison with butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene. *Planta Med* 52, 438-440.

Valenzuela A, Lagos C, Schmidt K, Videla LA. (1985) Silymarin protection against hepatic lipid peroxidation induced by acute ethanol intoxication in the rat. *Biochem Pharmacol* 34, 2209-2212.

Van Dijk APM, Keuskamp ZJ, Wilson JHP, Zijlstra FJ (1995) Sequential release of cytokines, lipid mediators and nitric oxide in experimental colitis. *Mediators of Inflammation* 4, 186-190.

Veljaca M, Lesch CA, Pllana R, Sanchez B, Chan K, Guglietta A (1995) BPC-15 reduces trinitrobenzene sulphonic acid-induced colonic damage in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 272, 417-422.

Vijaya K, Anathan S, Nalini R (1995) Antibacterial effect of theaflavin, polyphenon 60 (*Camellia sinensis*) and *Euphorbia hirta* on *Shigella* spp.—a cell culture study. *J Ethnopharmacol* 49, 115-118.

Wang F, Zeltwanger S, Yang IC, Nairn AC, Hwang TC (1998) Actions of genistein on cystic fibrosis transmembrane conductance regulator channel gating. Evidence for two binding sites with opposite effects. *J Gen Physiol* 111, 477-490.

Watt JM, Breyer-Brandwijk MG (1962) *The Medicinal and Poisonous Plants of Southern and Eastern Africa*. E&S Livingstone Ltd. Edinburgh (UK) p.408.

Winter J, Moore LH, Dowell Jr VR, Bokkenheuser VD (1989) C-ring cleavage of flavonoids by human intestinal bacteria. *Appl Environ Microbiol* 55, 1203-1208.

Wollenweber E. (1988) En: *Plant Flavonoids in Biology and Medicine II: Biochemical, Cellular, and Medicinal Properties*. Cody V, Middleton E, Harborne JB, Beretz A (Eds). A.R. Liss; New York. pp. 45-55.

Wong Ting-Fook WTH (1980) *The Medicinal Plants of Mauritius*. ENDA Publications No. 10. Dakar (Senegal) p. 59.

Xagorari A, Papapetropoulos A, Mauromatis A, Economou M, Fotsis T, Roussos C (2001) Luteolin inhibits an endotoxin-stimulated phosphorylation cascade and proinflammatory cytokine production in macrophages. *J Pharm Exp Ther* 296, 181-187.

Yamada T, Grisham MB (1994) Pathogenesis of tissue injury: role of reactive metabolites of oxygen and nitrogen. En: *Inflammatory Bowel Disease: From Bench to Bedside*. Targan SR, Shanahan F (eds.), Williams and Wilkins, Baltimore, Maryland , pp. 133-150.

Yamada T, Marshall S, Specian RD, Grisham MB (1992) A comparative study of two models of experimental colitis in rats. *Gastroenterology* 102, 1524-1534.

Yamahara J, Mochizuki M, Chisaka T, Fujimura H, Tamai Y (1990) The antiulcer action of sophora and the active constituent in Sophora. II. The antiulcer action of vexibinol. *Chem Pharm Bull* 38, 1039-1044.

Yanoshita R, Chang HW, Son KH, Kudo I, Samejima Y. (1996) Inhibition of lysoPAF acetyltransferase activity by flavonoids. *Inflamm Res* 45, 546-549.

Yoshida T, Chen L, Shingu T, Okuda T (1988) Tannins and related polyphenols of euphorbiaceous plants. IV. Euphorbins A and B, novel dimeric dehydroellagitannins from *Euphorbia hirta* L. *Chem Pharm Bull* 36, 2940-2949.

You KM, Jong HG, Kim HP. (1999) Inhibition of cyclooxygenase/lipoxygenase from human platelets by polyhydroxylated/methoxylated flavonoids isolated from medicinal plants. *Arch Pharm Res* 22, 18-24.

Zingarelli B, Szabó C, Salzman AL (1999) Reduced oxidative and nitrosative damage in murine experimental colitis in the absence of inducible nitric oxide synthase. *Gut* 45, 199-209.