ESTUDIO DEL MECANISMO GASTROPROTECTOR DE SOLIDAGENONA, ÁCIDO OLEANÓLICO Y SUS DERIVADOS MEDIANTE CULTIVOS CELULARES

MARIANELA SÁNCHEZ
DOCTOR EN CIENCIAS, MENCIÓN INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO DE PRODUCTOS NATURALES

RESUMEN

Investigaciones farmacológicas realizadas con plantas medicinales han permitido identificar a varios terpenos como los compuestos responsables de su efecto antiulcerogénico in vivo. Esta actividad, en la mayoría de los casos, involucra una mejoría en los factores defensivos de la mucosa gástrica más que una supresión de los factores agresivos de la misma. Recientemente se ha reportado que el diterpeno solidagenona y sus derivados obtenidos por semisíntesis y biotransformación, poseen efecto gastroprotector en modelos animales de úlcera inducida. Se ha establecido que la hidroxilación en C-3 o C-6 conduce a productos que presentan diferente actividad, lo que se relaciona con su estereoquímica. Se observa así que solidagen-6 β-ol y 3 α-hidroxisolidagenona son más activos que solidagenona, mientras que sus epímeros son inactivos. En estudios previos, se ha reportado la actividad gastroprotectora del triterpeno ácido oleanólico (AO) y derivados, obtenidos mediante semisíntesis, en diferentes modelos animales de úlcera gástrica. Es más, el AO ha demostrado poseer capacidad curativa de lesiones previamente inducidas. Si bien estos compuestos poseen una buena actividad gastroprotectora, sus mecanismos de acción continúan siendo desconocidos. Por esta razón, y teniendo en cuenta que los mismos presentan baja toxicidad en animales, resulta de gran interés determinar dichos mecanismos. Para lograr este objetivo se obtuvieron 10 derivados de solidagenona mediante reacciones químicas y biotransformación. La modificación química del esqueleto del ácido oleanólico condujo a la obtención de 8 compuestos. Para evaluar la actividad gastroprotectora in vitro de estos compuestos se realizaron diferentes

ensayos implementando cultivos de células epiteliales gástricas humanas (AGS) y fibroblastos (MRC-5), evitando así el empleo de animales de experimentación debido a consideraciones éticas y económicas. Se determinó el efecto de los compuestos sobre el contenido celular de prostaglandina E2, glutation reducido (GSH), producción de mucus gástrico y la protección frente al daño inducido por taurocolato de sodio (NaT) en cultivo de células AGS. También se evaluó la capacidad de los compuestos como atrapadores del radical anión superóxido y su efecto sobre la proliferación de células AGS y fibroblastos MRC-5. La citotoxicidad basal de los compuestos, expresada como viabilidad celular, se determinó utilizando tres puntos finales independientes: captación de rojo neutro, reducción de la sal bromuro de [3-(4,5-dimetiltiazol- 2-il)-2,5-difeniltetrazolio] (MTT) y contenido de DNA en fibroblastos MRC-5 y captación de rojo neutro en células AGS. El tratamiento previo de las células AGS con 3β-hidroxisolidagenona o 19-hidroxisolidagenona provocó una reducción significativa del daño inducido por NaT. Solidagen-6α-ol, solidagen-6β-ol, 19-hidroxisolidagenona, 15,16-epoxi-8(9),13(16),14- labdatrien-6 β,7 β-diol y solidagan-6 α-ol mostraron aumentar significativamente el contenido de GSH en células AGS. Ninguno de los derivados evaluados fue activo como atrapador del radical anión superóxido ni estimuló la producción de mucus en células AGS. 15,16-Epoxi- 8(9),13(16),14-labdatrien-7 β-metoxi-6 β-ol (ELMO) y solidagen-6 β-ol incrementaron significativamente el contenido celular de prostaglandina E2. El tratamiento con 3β-hidroxisolidagenona, 15,16-epoxi-8(9),13(16),14-labdatrien-6 β,7 β-diol y solidagan-6 α-ol estimuló la proliferación de células AGS en cultivo, mientras que solidagen-6 β-ol, solidagolactona, 15,16-epoxi-8(9),13(16),14-labdatrien-6 β,7 β-diol, ELMO y solidagan-6 α-ol estimularon la proliferación de fibroblastos MRC-5. Solidagenona fue el compuesto con mayor citotoxicidad, mientras que solidagen-6 α-ol y solidagolactona fueron los menos tóxicos. Adicionalmente ELMO mostró capacidad gastroprotectora in vivo en el modelo de lesión gástrica inducido por HCl:EtOH en ratones. A 20 mg/kg ELMO exhibió una inhibición similar (63%) a aquella producida por lansoprazol a la misma dosis (56%), mientras que el efecto más fuerte se evidenció a 40 mg/kg (69%).El pretratamiento de las células AGS

con AO, ácido 3β-acetoxioleanólico, metil éster del ácido oleanólico, metil éster del ácido 3β-acetoxioleanólico, ácido 12-en-3,11- dioxooleanólico, 3,12-dioxo-28,13-oleananólido y 3,12-dihidroxi-28,13-oleananólido provocó una reducción significativa del daño inducido por NaT. Ninguno de los derivados triterpénicos evaluados mostró un aumento de la producción de mucus ni del contenido celular de GSH en células AGS. El tratamiento de estas células con AO, ácido 3β-acetoxioleanólico, metil éster del ácido 3β-acetoxioleanólico y con 3,12-dioxo-28,13-oleananólido aumentó el contenido celular de PGE2. Ninguno de los compuestos investigados fue efectivo como atrapador del radical anión superóxido. El AO fue el único que estimuló la proliferación de fibroblastos MRC-5, mientras que el metil éster del ácido 3β-acetoxioleanólico y el 3,12-dihidroxi-28,13-oleananólido estimularon la proliferación de células AGS. El metil éster del ácido 3β- acetoxioleanólico y los ácidos oleanónico y 12-en-3,11-dioxooleanólico fueron más tóxicos que el compuesto original. Los demás derivados presentaron menor citotoxicidad que el AO. Los resultados obtenidos indican que, en su mayoría, los derivados de solidagenona tienen actividad gastroprotectora in vitro al aumentar los niveles celulares de GSH, mientras que los derivados del AO protegen a las células AGS frente al daño inducido por NaT y aumentan el ontenido celular de PGE2. En ambos grupos de terpenos algunos compuestos poseen actividad curativa in vitro, pues estimulan la proliferación de fibroblastos y/o células AGS.

Palabras claves: Gastroprotección, Citotoxicidad, Células AGS, Solidagenona, Diterpenos tipo Labdano, Ácido Oleanólico, Triterpenos Pentacíclicos, Semisíntesis, Biotransformación.

ABSTRACT.

Pharmacological research on medicinal plants has allowed the identification of several terpenes as the compounds responsible for their antiulcerogenic effect in vivo. In most cases, this activity, involves an improvement in the gastric defensive factors of gastric mucosa rather than a suppression of aggressive factors.

Recently, it has been reported the gastroprotective activity of solidagenone, a labdane iterpene and its semisynthetic and biotransformation derivatives in different experimentallyinduced gastric lesions in animals. Hidroxylation in C-3 or C-6 leads to products that present different activities related with their stereochemistry. Solidagen-6 β-ol and 3 α- hydroxysolidagenone were more active than solidagenone, while their epimers were inactive. Previous studies have reported the gastroprotective activity of the triterpene oleanolic acid (AO) and some semisynthetic derivatives in different models of induced gastric ulcer in animals. Aditionally, AO has demonstrated an ability to heal ulcers in previously induced lesions. Although the gastroprotective activity of these terpenes has been determined, its mechanism remains poorly understood, thus worth of study. To achieve this objective some 10 solidagenone derivatives were obtained by means of chemical reactions and biotransformation. Chemical modification of oleanolic acid led to 8 compounds. Human gastric epithelial cells (AGS) and fibroblasts (MRC-5) were used to evaluate the in vitro gastroprotective activity of these compounds, thus avoiding the use of experimentation animals due to ethical and economic considerations. The effects of the compounds on the prostaglandin E2 content, cellular reduced glutathione (GSH), gastric mucus production and protection against sodium taurocholate (NaT)-induced damage were assessed using AGS cells. The effect of the compounds on AGS and fibroblast culture growth, as well as the superoxide anion scavenging capacity were also studied. The cytotoxicity of the compounds, expressed as cell viability, was assessed using three independent endpoints: neutral red uptake (NRU), reduction of 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)- 2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) and DNA content in MRC-5 fibroblasts and NRU in AGS cells. A significant reduction of cell damage

after NaT incubation was observed when the AGS cells were pretreated with 3β-hydroxysolidagenone or 19-hydroxysolidagenone. Treatment with solidagen-6α-ol, solidagen-6β-ol, 19-hydroxysolidagenone, 15,16-epoxy-8(9),13(16),14- labdatrien-6β,7β-diol or solidagan-6 α-ol significantly stimulated the GSH content in AGS cell.
None of the studied compounds was active as a superoxide anion scavenger neither stimulated the mucus production in AGS cells culture. 15,16-Epoxy-8(9),13(16),14-labdatrien-7β- methoxy-6β-ol (ELMO) and solidagen-6 β-ol increased the cellular content of prostaglandin E2. Concerning the proliferation assays, a significant stimulating effect was observed for 3β- hydroxysolidagenone, 15,16-epoxy-8(9),13(16),14-labdatrien-6β,7β-diol and solidagan-6 α-ol on AGS cells, while solidagen-6 β-ol, solidagolactone, 15,16-epoxy-8(9),13(16),14-labdatrien- 6β,7β-diol, ELMO and solidagan-6 α-ol stimulated the MRC-5 fibroblast proliferation. Solidagenone showed the highest cytotoxicity value while solidagen-6 α-ol and solidagolactone were the less toxic compounds. Additionally, ELMO showed gastroprotective activity on the HCl:EtOH-induced gastric lesion
model in mice. A single oral dose of ELMO (20 mg/kg) inhibited the appearance of gastric lesions in mice displaying a similar effect than lansoprazole at the same dose, while the strongest effect was evidenced with 40 mg/kg.
Treatment with oleanolic acid and its acetylated and methoxylated derivatives, as well as 12-en-3,11-dioxooleanolic acid, 3,12-dioxo-28,13-oleananolide and 3,12-dihydroxy-28,13- oleananolide seemed to protect AGS cells against NaT-induced damage. None of the evaluated triterpenes derivatives increased mucus production or the GSH cellular content in AGS cells. Oleanolic acid, its acetate, the methoxylated oleanolic acid acetate and 3,12-dioxo- 28,13-oleananolide increased the PGE2 cellular content. None of the investigated compoundsstimulated the MRC-5 fibroblast proliferation, while the methoxylated oleanolic acid acetate and 3,12-dihydroxy-28,13-oleananolide stimulated the AGS cell proliferation. Methoxylated oleanolic acid as well as oleanonic and 12-en-3,11-dioxooleanolic acids were more toxic than the parent compound. The other derivatives showed lower cytotoxicity values than oleanolic acid. Our results showed that most of the olidagenone derivatives act as gastroprotectors in vitro increasing the cellular GSH

content, while most of the oleanolic acid derivatives protect the AGS cells against NaT-induced damage and increase the PGE2 cellular content. In both terpenes groups some derivatives exhibited in vitro ulcer healing effect stimulating cell proliferation.
Keywords: Gastroprotection, Cytotoxicity, AGS Cells, Solidagenone, Labdane Diterpenes, Oleanolic acid, Pentacyclic Triterpenes, Semisynthesis, Biotransformation