

R-11474

T-917

FACULTAD DE FARMACIA

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

**EFICACIA DE HESPERIDINA
Y NEOHESPERIDINA DIHIDROCHALCONA
EN LA ULCERA GASTRICA EXPERIMENTAL
Y MECANISMOS RELACIONADOS CON SU ACTIVIDAD**

TESIS DOCTORAL

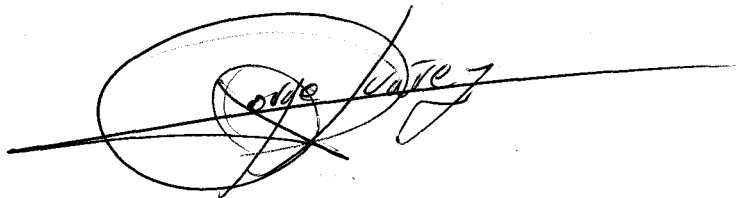
JORGE SUAREZ ABUJAS

UNIVERSIDAD DE SEVILLA, FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE FARMACIA Y TECNOLOGIA FARMACEUTICA
LABORATORIO DE FARMACOGNOSIA Y FARMACODINAMIA

EFICACIA DE HESPERIDINA
Y NEOHESPERIDINA DIHIDROCHALCONA
EN LA ULCERA GASTRICA EXPERIMENTAL
Y MECANISMOS RELACIONADOS CON SU ACTIVIDAD

TESIS PARA ASPIRAR AL GRADO DE
DOCTOR EN FARMACIA QUE PRESENTA

JORGE SUAREZ ABUJAS

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Jorge Suarez', is written over a large, stylized circular scribble. A long horizontal line extends from the right side of the signature across the page.

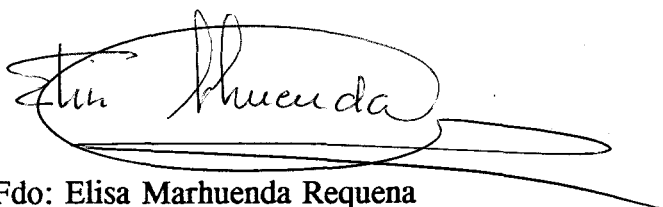
SEVILLA, ENERO 1996

ELISA MARHUENDA REQUENA, Catedrática de Farmacodinamia y Directora del Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Sevilla

CERTIFICA: Que la presente Tesis Doctoral titulada "EFICACIA DE HESPERIDINA Y NEOHESPERIDINA DIHIDROCHALCONA EN LA ULCERA GASTRICA EXPERIMENTAL Y MECANISMOS RELACIONADOS CON SU ACTIVIDAD" ha sido dirigida por mí y por la Doctora M^a Dolores Herrera González y realizada en los Laboratorios de Farmacognosia y Farmacodinamia de esta Facultad, cumpliendo todos los requisitos para este tipo de trabajo.

Y para que conste, firmo el presente.

En Sevilla, a 29 de Enero de 1996

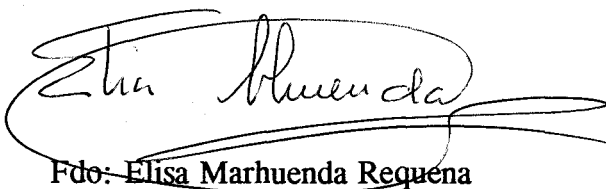
A handwritten signature in black ink, appearing to read "Elisa Marhuenda", is enclosed within a large, hand-drawn oval. A long horizontal line extends from the right side of the oval.

Fdo: Elisa Marhuenda Requena

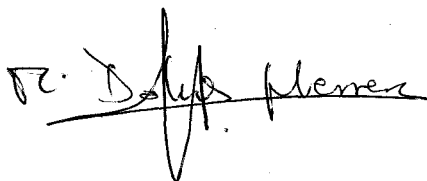
ELISA MARHUENDA REQUENA, Catedrática de Farmacodinamia y
M^a DOLORES HERRERA GONZALEZ, Profesora Ayudante del Departamento
de Farmacia y Tecnología Farmacéutica

CERTIFICAN: Que la presente Tesis Doctoral titulada "EFICACIA DE
HESPERIDINA Y NEOHESPERIDINA DIHIDROCHALCONA EN LA
ULCERA GASTRICA EXPERIMENTAL Y MECANISMOS RELACIONADOS
CON SU ACTIVIDAD" realizada por JORGE SUAREZ ABUJAS, para aspirar
al grado de Doctor, ha sido llevada a cabo bajo nuestra dirección.

En Sevilla, a 29 de Enero de 1996



Fdo: Elisa Marhuenda Requena



M^a Dolores Herrera Gonzalez

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a las Dras. Elisa Marhuenda Requena y M^a Dolores Herrera González por su dedicación al dirigir este trabajo, y por sus continuas orientaciones.

Agradecer a D. Angel M^a Villar del Fresno, que me haya permitido realizar parte de este proyecto en el Departamento de Farmacología de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid, y en su nombre, a todos los componentes de dicho Departamento, por la calurosa acogida que me dispensaron durante esa estancia.

A mis compañeros de Departamento, por la ayuda y ánimos que siempre me brindaron. Especial mención merecen la Dra. M^a Dolores Herrera, por su inestimable ayuda, incluso durante su maternidad; y la Dra. M^a Concepción Pérez por su colaboración tan eficaz como desinteresada.

Un recuerdo especial para mis padres, por ser quienes son, sin los cuales este trabajo tendría otro autor.

UNIVERSIDAD DE SEVILLA
SECRETARÍA GENERAL

Queda registrada esta Tesis Doctoral
al folio 224 número 163 del libro
correspondiente.

Sevilla,

15 MAR. 1936

El Jefe del Negociado de Tesis,

Sevilla de J. U.

A mi familia

ABREVIATURAS

Ach	=	Acetilcolina
ADP	=	Adenosin difosfato
AMP _c	=	Adenosin monofosfato cíclico
ATP	=	Adenosin trifosfato
BHT	=	Butilhidroxitolueno
CI50	=	Concentración inhibitoria del 50%
-C=O-	=	Grupo carbonilo
COMT	=	Catecol-orto-metil transferasa
DI50	=	Dosis inhibitoria del 50%
DL50	=	Dosis letal del 50%
DMSO	=	Dimetilsulfóxido
EDTA	=	Etilendiaminotetraacético
HESP	=	Hesperidina
H ₂ O ₂	=	Peróxido de hidrógeno
HPLC	=	Cromatografía líquida de alta resolución
5-HT	=	Serotonina
i.p.	=	Vía intraperitoneal
i.v.	=	Vía intavenosa
λ	=	Longitud de onda
LT	=	Leucotrienos
NA	=	Noradrenalina
NHDC	=	Neohesperidina dihidrochalcona
PAF	=	Factor activador de plaquetas
PGI ₂	=	Prostaciclina
p.o.	=	Vía oral
O ₂ ⁻	=	Radical superóxido
OH	=	Radical hidroxilo
-OH	=	Grupo hidroxilo
RIA	=	Radioinmunoanálisis
RLO	=	Radicales libres derivados del oxígeno
s.c.	=	Vía subcutánea
S.N.C.	=	Sistema nervioso central
SOD	=	Superóxido dismutasa
S.S.F.	=	Solución salina fisiológica
SRS-A	=	Sustancia reactiva lenta de la anafilaxis
TBA	=	Acido tiobarbitúrico
XO	=	Xantina oxidasa

INDICE

I. OBJETO

1

II. PARTE BIBLIOGRAFICA

II.1. FARMACOLOGIA DE PRINCIPIOS FLAVONICOS

II.1.1. INTRODUCCION.....	4
II.1.2. MECANISMOS GENERALES DE ACCION.....	7
II.1.3. ACTIVIDAD FARMACOLOGICA	
II.1.3.1. ACCION VITAMINICA P.....	10
II.1.3.2. ACCION ANTIAGREGANTE PLAQUETARIA.....	12
II.1.3.3. ACCION HIPOTENSORA.....	14
II.1.3.4. ACCION ANTIOXIDANTE.....	15
II.1.3.5. ACCION ANTIINFLAMATORIA.....	17
II.1.3.6. ACCION ANTIULCEROSA.....	19
II.1.3.7. ACCION ANTIBACTERIANA.....	20
II.1.3.8. ACCION ANTIVIRASICA.....	22
II.1.3.9. ACCION ANTIPROTOZOARIA.....	23
II.1.3.10. ACCION ANTIMUTAGENICA.....	24

II.1.3.11. ACCION CITOSTATICA.....	25
II.1.3.12. ACCION ESTROGENICA Y ANTIFERTILIZANTE.....	26
II.1.3.13. ACCION ANALGESICA Y ANTIPIRETICA.....	27
II.1.3.14. OTRAS ACCIONES FARMACOLOGICAS.....	28
II.1.4. INDICACIONES TERAPEUTICAS	30

II.2. HESPERIDINA

II.2.1. LOCALIZACION Y OBTENCION.....	31
II.2.2. ESTRUCTURA QUIMICA.....	32
II.2.3. PROPIEDADES FISICO-QUIMICAS.....	33
II.2.4. INDICACIONES TERAPEUTICAS.....	33

II.3. NEOHESPERIDINA DIHIDROCHALCONA

II.3.1. SINTESIS.....	35
II.3.2. ESTRUCTURA QUIMICA.....	36
II.3.3. PROPIEDADES FISICO-QUIMICAS.....	37
II.3.4. APLICACIONES.....	37

III. MATERIAL Y METODOS

III.1 CONDICIONES EXPERIMENTALES

III.1.1. ANIMALES DE EXPERIMENTACION.....	39
III.1.2. SUSTANCIAS ENSAYADAS.....	39
III.1.3. ANALISIS ESTADISTICO DE RESULTADOS.....	41

III.2. TECNICAS Y DESARROLLO DE LAS EXPERIENCIAS

III.2.1. ULCERAS GASTRICAS AGUDAS EXPERIMENTALES.....	42
III.2.1.1. ULCERA AGUDA INDUCIDA POR INMOVILIZACION Y FRIO..	44
III.2.1.2. ULCERA AGUDA INDUCIDA POR ETANOL ABSOLUTO.....	47
III.2.1.2.a. Protección crónica sobre la úlcera gástrica aguda inducida por etanol absoluto.....	49
III.2.1.2.b. Modificaciones provocadas en la úlcera inducida por etanol: Pretratamiento con indometacina.....	50
III.2.1.3. ESTUDIO BIOQUIMICO DEL MOCO GASTRICO	
III.2.1.3.a. Determinación de proteínas totales.....	51
III.2.1.3.b. Determinación de hexosaminas.....	52
III.2.1.3.c. Determinación de prostaglandinas.....	54

III.2.2. ACCION SOBRE LA PERMEABILIDAD VASCULAR.....	57
III.2.3. ACCION ANTIOXIDANTE IN VITRO.....	59
III.2.3.1. ACCION ANTIRRADICALARIA SUPEROXIDO.....	59
III.2.3.2. ACCION ANTIRRADICALARIA HIDROXILO.....	62
III.2.3.3. ACCION ANTILIPOPEROXIDANTE.....	64
III.2.4. ACCION ANTIINFLAMATORIA.....	67
III.2.5. ACCION SOBRE EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL	
III.2.5.1. PRUEBAS NEUROFARMACOLOGICAS.....	69
III.2.5.2. ACTIVIDAD MOTORA: ACTIVIDAD MOTORA ESPONTANEA....	73
III.2.5.3. CONDUCTA EXPLORATORIA: TEST DE LA CURIOSIDAD.....	73
III.2.5.4. CURIOSIDAD RESIDUAL: TEST DE LA EVASION.....	74
III.2.5.5. COORDINACION MOTORA: TEST DEL ROTA-ROD.....	74
III.2.5.6. RELAJACION MUSCULAR: TEST DE LA TRACCION.....	74
III.2.6. ENSAYOS SOBRE ORGANO AISLADO	
III.2.6.1. EFECTO SOBRE DUODENO DE RATA.....	75
III.2.6.2. EFECTO SOBRE UTERO DE RATA.....	77
III.2.6.3. EFECTO SOBRE CONDUCTO DEFERENTE DE RATA.....	79
III.2.6.4. EFECTO SOBRE FUNDUS DE RATA.....	80

IV. RESULTADOS

IV.1. ULCERAS GASTRICAS AGUDAS EXPERIMENTALES

IV.1.1. ULCERA INDUCIDA POR INMOVILIZACION Y FRIO.....	82
IV.1.2. ULCERA INDUCIDA POR ETANOL ABSOLUTO.....	91
IV.1.3. PROTECCION CRONICA SOBRE LA ULCERA INDUCIDA POR ETANOL ABSOLUTO.....	101
IV.1.4. MODIFICACIONES PROVOCADAS EN LA ULCERA INDUCIDA POR ETANOL: PRETRATAMIENTO CON INDOMETACINA.....	108
IV.1.5. DISCUSION DE RESULTADOS.....	111
IV.2. <u>ACCION SOBRE LA PERMEABILIDAD VASCULAR</u>.....	114
IV.2.1. DISCUSION DE RESULTADOS.....	117
IV.3. <u>ACCION ANTIOXIDANTE IN VITRO</u>.....	118
IV.3.1. DISCUSION DE RESULTADOS.....	121

IV.4. <u>ACCION ANTIINFLAMATORIA</u>	123
IV.4.1. DISCUSION DE RESULTADOS.....	126
IV.5. <u>ACCION SOBRE EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL</u>	127
IV.5.1. DISCUSION DE RESULTADOS.....	139
IV.6. <u>ENSAYOS SOBRE ORGANO AISLADO</u>	
IV.6.1. EFECTO SOBRE DUODENO DE RATA.....	140
IV.6.2. EFECTO SOBRE UTERO DE RATA.....	142
IV.6.3. EFECTO SOBRE CONDUCTO DEFERENTE DE RATA.....	144
IV.6.4. EFECTO SOBRE FUNDUS DE RATA.....	146
IV.6.5. DISCUSION DE RESULTADOS.....	148
V. CONCLUSION	151
VI. BIBLIOGRAFIA	154

OBJETO

En el conjunto de los avances científicos de la moderna Medicina, hay que contar de forma preferente con el progreso de la investigación farmacológica que ha producido y está produciendo día a día nuevos medicamentos.

Buscando la especificidad, se ha recorrido un largo camino, lleno de errores y aciertos, que va desde el puro empirismo hasta el conocimiento actual de su exacta estructura, acciones y efectos, y su forma de actuar en el organismo.

Los "productos de origen natural" ocuparon y siguen ocupando una amplia parcela de la Terapéutica, ya que la eficacia de un fármaco, no depende exclusivamente de su potente actividad biológica sino también de su capacidad para provocar efectos secundarios.

Por ello, hemos seleccionado para nuestras experiencias **hesperidina** y **neohesperidina dihidrochalcona**, a fin de dar una base científica y enriquecer el campo de los flavonoides, principios dotados de una marcada variedad de acciones farmacológicas y caracterizados por un escaso poder para provocar reacciones adversas.

PARTE BIBLIOGRAFICA

II.1. FARMACOLOGIA DE PRINCIPIOS FLAVONICOS.

II.1.1. INTRODUCCION.

Los **flavonoides** constituyen el grupo más amplio de los fenoles naturales. En su mayoría son pigmentos responsables de la coloración de numerosas flores y algunos frutos.

Se encuentran ampliamente distribuidos en el reino vegetal, siendo más frecuentes en plantas superiores de las familias Poligonaceae, Rutaceae, Leguminosae, Umbelliferae, Compositae (Evans, 1991a).

El pericarpio de los frutos del género Citrus (fam. Rutaceae) es fuente de flavonoides, denominados **citroflavonoides**, y son principalmente flavanonas como hesperidina, neohesperidina, narirutina, naringina, 7-ramnosil eriodictiol; acompañadas de flavonas como diosmina y rutina (Bruneton, 1991).

Sintetizados probablemente a nivel de los plastidios citoplasmáticos, se acumulan en el jugo vacuolar. Se encuentran en el mesófilo y epidermis de las hojas, en la cutícula epidérmica de los frutos y en otros órganos preferentemente jóvenes.

Las funciones de estos principios en el vegetal son:

- **Antioxidante:** Contrarrestan la acción oxidante de lípidos y poliacetilenos de los tejidos vegetales. Además son potentes captadores de radicales libres, así como inhibidores de su formación, por quelación de iones metálicos catalizadores de su síntesis.

- **Reguladores del crecimiento:** Cofactor de la enzima ácido indolacético oxidasa, inhibidora de la hormona del crecimiento de las plantas, el ácido indolacético.

- **Resistencia a las enfermedades:** Sobre todo a las infecciones fúngicas, así como pantalla frente a las radiaciones nocivas.

- **Pigmentación de flores:** Guías de néctar, motivos visibles sólo para los insectos, que atraen a los polinizadores para favorecer la reproducción de la especie.

- **Inhibición de enzimas.**

- **Participación en la respiración y fotosíntesis:** Actúan como transportadores de electrones, o bien como reguladores de canales de iones relacionados con la fosforilación.

Desde el punto de vista estructural, los flavonoides poseen como núcleo básico, dos grupos bencénicos unidos por un eslabón de tres carbonos (Ar-C3-Ar), y como sustituyentes, diversos agrupamientos químicos en diferentes carbonos. Se pueden encontrar tanto en estado libre como heterosídico.

Son metabolizados fundamentalmente por las células hepáticas, aunque se han detectado en orina distintos metabolitos procedentes de su degradación. En el organismo no se acumulan restos de estos principios.

Son generalmente solubles en agua y alcohol, aunque hay algunos con solubilidad poco marcada en agua (hesperidina, y rutina). Las geninas son solubles en disolventes orgánicos apolares, y por su carácter fenólico serán solubles en soluciones acuosas de hidróxidos alcalinos (Bruneton, 1991).

Los flavonoides no carecen de interés terapéutico y continúan siendo un campo frecuente de investigación.

Su toxicidad es muy pequeña, la DL50 en rata oscila entre 2 y 10 g/Kg de peso, para la mayoría de los flavonoides. En humanos se recomienda dosis inferiores a 1 g por adulto y día (Havsteen, 1983).

Aunque se han llegado a determinar propiedades carcinógenas en células de mamífero y mutágenas en Salmonella typhimurinum (MacGregor, 1986), en estudios llevados a cabo por Fujiki y cols. (1986) y Wall y cols. (1988), se comprueba la capacidad de numerosos flavonoides de inhibir el inicio y desarrollo de procesos quimio-carcinogénicos, así como sus propiedades antimutagénicas.

Neohesperidina dihidrochalcona en un suministro diario de 750 mg/Kg durante 91 días no produce ningún efecto tóxico, como determinan Lina y cols. (1990) en sus investigaciones.

II.1.2. MECANISMOS GENERALES DE ACCION.

Los principios de naturaleza flavónica presentan una gran afinidad por las enzimas, a las que modifican su actividad. Estas interacciones provocan en la mayoría de los casos la inactivación de éstas, salvo en el caso de la enzima prolina hidroxilasa, a la que activan.

Son diversos los sistemas enzimáticos que se ven afectados por la acción de estos principios: A nivel de la cascada araquidónica, la ciclo y lipooxigenasa (Swies y cols., 1984); la aldosa-reductasa (Okuda y cols., 1982); hidrolasas como β -glucoronidasa, hialuronidasa, fosfatasa alcalina (Iio y cols., 1980), arilsulfatasa, H^+ -ATPasa de membranas lisosomales y granulares, (Na^+-K^+) ATPasa de la membrana plasmática, β -galactosidasa, AMPc fosfodiesterasa; lipasas; liasas como DOPA decarboxilasa; transferasas como COMT; hidroxilasas como arilhidroxilasa; oxidoreductasas como aldosa-reductasa; y quinasas como la hexoquinasa (Havsteen, 1983; Iio y cols., 1983, 1984a, 1984b)

La acción de los flavonoides se puede ejercer a distintos niveles:

- **Ahorro de vitamina C**, por reducción del ácido dehidroascórbico (forma oxidada de la vitamina C) a ácido ascórbico (forma reducida) vía glutathione (Gil Muñoz, 1983), según el poder reductor del flavonoide. Así como evitando la oxidación de la vitamina al formar quelatos con los metales (Baleriola, 1979).

- **Efecto captador de radicales libres** originados en procesos inflamatorios, estados de hipoxia, o por irradiaciones, evitándose así los procesos peroxidativos sobre los fosfolípidos, que alteran las membranas (Baumann y cols., 1980). Asimismo suprimen la formación de radicales libres por unión a los catalizadores.

- Aumento de **estabilidad de las fibras de colágeno** por estimulación de la prolina hidroxilasa, que favorece la creación de puentes de unión entre las distintas fibras, oponiéndose a su desnaturalización. También mediante la supresión de su degradación no enzimática causada por radicales superóxido (Monboisse y cols., 1983).

- **Disminución de la síntesis de prostaglandinas** por inhibición de la enzima ciclo y lipooxigenasa, que además de provocar cierto efecto analgésico y antipirético, fortalece el tejido conectivo al evitarse la estimulación que las prostaglandinas provocan sobre la elastasa y otras hidrolasas catabólicas.

- **Acción antihialuronidasa**, manteniéndose la sustancia fundamental de la vaina perivascular y por tanto disminuyendo la permeabilidad (Berezouskaga, 1967).

- **Inhibición de la enzima histidina decarboxilasa** (Lorenz y cols., 1983), disminuyendo la formación de histamina, autacoide implicado en la regulación de la permeabilidad capilar y en la liberación de la secreción ácida gástrica, así como en procesos alérgicos.

- **Aumento de la duración de acción de las catecolaminas** (Clark y Geissman, 1949), que son responsables del mantenimiento del tono y resistencia vascular, mediante inhibición de la enzima COMT; así como por estimulación del eje pituitaria-capsula adrenal, que aumenta la síntesis de adrenalina.

- **Disminución de la agregación y la adhesividad plaquetaria** por inhibición de la síntesis del PAF (Izzo y cols., 1994), y por potenciación de PGI₂, acción a nivel de AMP_c (Bruneton, 1991).

II.1.3. ACTIVIDAD FARMACOLOGICA.

II.1.3.1. ACCION VITAMINICA P.

El mayor auge en el conocimiento farmacodinámico de los flavonoides se alcanza en 1936 cuando Szent-Gyorgy y Rusznyak estudiando un complejo extraído de ciertos frutos cítricos, la denominada **citrina**, descubrieron su acción vitamínica P, con propiedades venotónicas y vasculoprotectoras (Gabor, 1974). Este complejo resultó ser una mezcla de dos flavanonas: hesperidina y metil-eriodictiol (hesperetina).

La propiedad más importante atribuida a los flavonoides es la "vitamínica P", por la que aumentan el tono venoso, controlando la permeabilidad y aumentando la resistencia capilar (Labrid y Perdrix, 1992).

Su mecanismo de acción consiste en:

- **Quelación de metales**, lo que evita la oxidación del ácido ascórbico, que interviene en la síntesis correcta del colágeno.
- **Estimulación de la enzima prolina hidroxilasa**, que por el aumento en la síntesis de hidroxiprolina e hidroxilisina favorece la estabilidad de las fibras de colágeno.
- **Inhibición de la enzima ciclo y lipooxigenasa**, suprimiendo la síntesis de prostaglandinas.

- **Inhibición de la enzima hialuronidasa.**
- **Inhibición de la enzima COMT (Baraboi, 1967).**
- **Estimulación del eje pituitaria-capsula adrenal.**

Flavonas, flavanoles, flavanonas y flavandioles poseen entre otras acciones la capacidad para disminuir la permeabilidad capilar y elevar su índice de resistencia (Makarou y Litituinenko, 1968; Gabor, 1974).

Flavonas glicosiladas excepto brasilin y morin presentan una acción estabilizadora capilar en estado de asfixia repentina por bajada de presión, como se desprende de las investigaciones de Teiji (1960).

Trastornos vasculares, inflamatorios y con deficiencias de factor vitamínico P son tratados con administración de flavonas (Gazave, 1967).

Hesperidina vía oral inhibe la permeabilidad vascular en ratas según determinan Kubo y Matsuda (1992), presentando la misma capacidad que metilhesperidina. En cambio el aumento de la resistencia capilar es menor que para esta última (Asao Sasahara y cols., 1957).

Hesperidina, rutina y naringina 20 mg/día coadyuvan junto a la vitamina C para disminuir la agregación celular, y para aumentar la resistencia capilar alteradas por la deficiencia de vitamina C en la dieta (Robbins, 1966).

Entre los flavonoides con actividad vitamínica P destacan rutina, quercetina, hesperidina, así como diosmina.

II.1.3.2. ACCION ANTIAGREGANTE PLAQUETARIA.

Existen distintos mecanismos por los que los flavonoides pueden reducir la agregación plaquetaria y por tanto su repercusión en trombosis y arteriosclerosis:

- Por incremento de los niveles de AMP_c en plaquetas, mediante potenciación de PGI₂ o inhibición de la enzima AMP_c fosfodiesterasa. La actividad inhibidora sobre esta enzima se potencializa en las siguientes condiciones (Kuppusamy y Das, 1992):

- Grupo no heterosídico con doble enlace C₂=C₃.
- Grupo carbonilo (-C=O-) en C₄.
- Grupo hidroxilo (-OH) en C₃ y/o C₄.

Quercetina y fisetina destacan por esta actividad (Beretz y cols., 1980).

- Por inhibición de las enzimas ciclo y lipooxigenasas, impidiendo de este modo la síntesis de tromboxanos, PAF, y prostaglandinas.

Rutina, quercetina, metilquercetina, y kanferol, actúan de este modo (Laekeman y cols., 1986; Izzo y cols., 1994).

- Por **interacción** del agrupamiento catecol 3'-4', con los **receptores adrenérgicos de las plaquetas**, ejerciendo un posible antagonismo competitivo con la adrenalina que pudiera prevenir las consecuencias de una hiperagregabilidad plaquetaria.

En los ensayos efectuados por Zaragoza y cols. (1985), se comprueba el efecto inhibitor in vitro de la mezcla de citroflavonoides solubles, eriodictina y hesperidina (0.08-2.58 mg/mL), sobre la agregación plaquetaria inducida por adrenalina 5.5 μ M o por adenosín 5' difosfato (ADP) 1-3 μ M. Asimismo se determina la capacidad antitrombótica *in vivo* de dicha mezcla (i.p., 20 mg/Kg y día durante 7 días) frente a la administración i.v., de 12.4 mg de ADP/Kg, en ratas. Disminuyendo significativamente el bloqueo respiratorio consecuencia de las embolias masiva pulmonar que se originan con el ADP, potente inductor de la agregación plaquetaria.

Hesperidina 1-5 g/Kg de dieta aumenta el tiempo de supervivencia de animales sometidos a dieta trombogénica (Robbins, 1967).

II.1.3.3. ACCION HIPOTENSORA.

Además de las acciones vasoprotectora y antitrombótica (Landoffi y cols., 1984), los flavonoides presentan otras acciones a nivel cardiovascular. Son estimulantes de la función cardiaca (Occhiuto y cols., 1986), vasodilatadores (Laekeman y cols., 1986), hipotensores y antianginosos (Gabor, 1985a).

En el trabajo realizado por Kubo Masayoshi y cols. (1992a), se comprueba que formulaciones para el tratamiento de la hipertensión, la angina de pecho, arritmias y desordenes circulatorios cerebrales contienen hesperidina como principio activo.

En otros estudios se determina la acción hipotensora de hesperidina que, administrada a ratas vía i.v., a la dosis de 1 mg/100 g de peso, disminuye significativamente la presión sanguínea (Son Heung y cols., 1992), así como también la disminuye en perros y sapos (Bonilla y cols., 1991).

II.1.3.4. ACCION ANTIOXIDANTE.

La acción antioxidante presente en la mayoría de los flavonoides y derivados, es conocida desde hace tiempo. Ya en 1966 Letan propone una serie de requisitos estructurales de estas moléculas para mostrar acción antioxidante:

- Un grupo -OH libre en C₃.
- Doble enlace entre C₂=C₃.
- Grupo -C=O- en C₄.
- Grupos -OH libres en C₅ y C₇.
- Grupos -OH libres en C₃ y C₄.

Posteriormente serán numerosos los autores que no estén de acuerdo con estas premisas (Afanas'ev y cols., 1989; Nagaratnam y Ratty, 1986; Robak y cols., 1986, 1988).

Según Deby (1982) la expresión acción "antioxidante", por ser indefinida e inespecífica, debe ser sustituida por tres diferentes:

- **Acción antirradicalaria:** por la que se eliminan o captan radicales libres.
- **Acción antilipoperoxidante:** por la que se interrumpe un ciclo químico de autooxidación sobre ácidos grasos insaturados iniciado por lipoperóxidos.

- **Acción antioxidante:** por la que se liga oxígeno basal o también denominado triplete (O_2 con espines desapareados pero paralelos) evitándose así la oxidación de otras moléculas.

La capacidad antirradicalaria de hesperidina sobre el radical hidroxilo (OH) es prácticamente nula (Iio y cols., 1986), incluso parece aumentar la producción del radical a concentraciones de 10^{-4} - 10^{-5} M (Pincemail y cols., 1985; Iio y cols., 1985). Sin embargo para el radical superóxido (O_2^-), Yuting y cols. (1990) sí le atribuyen cierta capacidad antirradicalaria o "scavenger" a hesperidina $5 \cdot 10^{-5}$ - 10^{-4} M. Confirmándose así la idea de Pincemail (1985) de que la actividad antirradicalaria depende de la naturaleza del radical a captar.

Los flavonoides pueden mostrar una débil (quercetina) o nula (rutina, kanferol) actividad antilipoperoxidante, e incluso, como en el caso de hesperidina, estimular la velocidad de autooxidación, debido a su capacidad de estimular la producción de radical OH. Sin embargo en estudios más recientes se demuestra que hesperidina inhibe totalmente la peroxidación lipídica con una IC50 de $2.5 \cdot 10^{-5}$ M (Kubo Masayoshi y cols., 1992b), y que junto a diosmina, como constituyentes del Daflon, son tan eficientes como la vitamina E en la inhibición de la peroxidación lipídica y en la estabilización de las membranas plasmáticas dañadas por radiaciones ultravioletas (Santus y cols., 1991).

La acción antioxidante de los flavonoides se puede determinar por su capacidad de proteger al ácido ascórbico frente a la oxidación del oxígeno molecular. Mientras que rutina y quercetina son capaces de disminuir la formación de ácido dehidroascórbico de forma significativa, hesperidina parece favorecer la autooxidación de la vitamina (Pincemall y cols., 1985).

II.1.3.5. ACCION ANTIINFLAMATORIA.

En un estudio realizado por Della Logia y cols. (1986) se valoraron un gran número de derivados de la benzo(γ)pirona con acción antiinflamatoria. Destacan por esta actividad hesperidina-metil-chalcona, gossipina, podoverinas A, B y C, nepritina, sideritoflavona (Barberán y cols., 1987), e hipolaetina-8-O- β -D-glucósido (Gabor, 1985b; Villar y cols., 1985a, 1985b; Arens y cols., 1986).

En general los flavonoides disminuyen la síntesis de prostaglandinas de la serie E_2 y $F_{2\alpha}$ (Villar y cols., 1982), que están involucradas en el desarrollo de la fase secundaria del edema, por inhibición de la fosfolipasa A_2 . (Somasundaran y Sadique, 1986).

Hesperidina y neohesperidina a la dosis de 100 mg/kg, reducen en 65 y 58% respectivamente el edema inducido por inyección de formaldehído en pata de ratón (Northover y Subramanian, 1962).

Del estudio llevado a cabo por Da Silva y cols., (1994) se desprende que el pretratamiento de ratas con hesperidina 50 y 100 mg/Kg vía s.c., reduce el edema de la pata inducido por carragenina en un 47 y 63% respectivamente a las 5 h de ser provocado, siendo semejante al efecto generado por indometacina 10 mg/kg administrada intragastricamente.

Asimismo, hesperidina (100 mg/Kg) reduce en un 33% el edema provocado por dextrano. Sin embargo, no influye en el edema inducido por histamina, así como tampoco es activo frente a la liberación de histamina de los basófilos inducida por ciertos secretagogos (Middleton y cols. 1987).

Hesperidina también inhibe la pleuresía inducida por carragenina, reduciendo el volumen de exudado y el número de leucocitos migratorios en un 48 y 34% respecto a los valores control (Da Silva y cols., 1994).

II.1.3.6. ACCION ANTIULCEROSA.

Varios flavonoides entre los que destacan quercetina, kanferol, rutina, silimarina, y la flavanona naringenina presentan una pronunciada actividad antiulcerosa en animales (Konturek y cols., 1986b; Martín y cols., 1988, 1993; Alarcón de la Lastra y cols., 1992; Motilva y cols., 1992, 1994; Di Carlo y cols., 1994; Pérez Guerrero y cols., 1994). Estos flavonoides inhiben la enzima histidina decarboxilasa (Konturek y cols., 1986a; Hayes y Foreman, 1987) reduciendo la formación de histamina en la mucosa gástrica. Sustancia que directamente estimula las células parietales y principales responsables de la secreción de ácido clorhídrico y pepsina respectivamente.

Los flavonoides también estimulan la síntesis de prostaglandinas (Konturek y cols., 1986b; Moroney y cols., 1988), sustancia endógena la cual posee acción citoprotectora, favoreciendo la secreción de moco (Lacy, 1985) y bicarbonato sódico (Takeuchi y Okabe, 1983), e incrementa el flujo de la microcirculación mucosal (Ito y cols., 1984).

Todo esto sugiere que el efecto antiulceroso de los flavonoides puede estar mediado al menos en parte por la inhibición de la formación de los autacoides leucotrienos e histamina, y la estimulación de prostaglandinas.

Un estudio reciente elaborado por Izzo y cols. (1994) relaciona el efecto gastroprotector de los flavonoides con la capacidad de inhibir la formación de otro autacoide, el PAF, fosfolípido endógeno con capacidad de producir úlceras gastrointestinales (Rosam y cols., 1986) y de predisponer al estómago al daño por aplicación tópica de etanol (Wallace y Whittle, 1986).

II.1.3.7. ACCION ANTIBACTERIANA.

La acción bacteriostática de los flavonoides presenta cierta controversia, pues en algunos casos se obtienen resultados positivos y en otros son negativos (Waage y Hedin, 1984; Aumente y cols., 1988; Marhuenda y García Giménez, 1986).

En un estudio realizado sobre Staphilococcus aureus, flavanonas naturales como 5,7-dihidroxi-flavanona y 7-hidroxi-flavanona presentan acción inhibitoria de las bacterias a las dosis respectivas de 100 y 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$, mientras que las flavanonas de síntesis 4-hidroxi-flavanona y flavanona dan resultados negativos (Pappano y cols., 1985).

Hesperidina, que es una dihidroxi-flavanona, y otros flavonoides como rutina, quercetina, y quercitrina, muestran efectos protectores significativos en ratones tanto con infección simple como combinada por virus de la encefalomiocarditis y bacterias de la especie S. aureus (Panasiak y cols., 1989).

Asimismo, soluciones acuosas de hesperidina y ácido ósmico se encuentran entre los agentes de tratamiento de procesos inmunológicos que cursan con inflamación cardiovascular por infección viral o bacteriana (Goertz, 1990).

Hesperidina, escopoletina, rutina, quercetina-7-O-ramnósido, extraídos de las partes aéreas de la planta *Werneria dactilophylla* presentan actividad bactericida *in vitro* frente a una serie de especies bacterianas (Bonilla y cols., 1991).

Hesperidina, hesperetina-metil-chalcona, D-catequina, al 0.2% de la dieta, inhiben la incidencia de caries dentales en ratas en un 30-40% (Robert y cols., 1965).

En un estudio llevado a cabo por Hedin y Waage (1986) sobre la acción antibacteriana de flavonoides frente a las especies *Pseudomona maltophilia* y *Enterobacter cloacae* se observó cierta relación estructura-actividad. Así, a mayor número de grupos -OH, mayor es la actividad frente a ambas especies. Las agliconas de flavonas y flavonoles precisan tener 2 o más grupos -OH para presentar actividad, de tal forma que, las orto-hidroxiladas inhiben el crecimiento de ambas especies. La sustitución por metilación generalmente disminuye la actividad. Todos los flavonoides glicosilados en posición C₃ inhiben el crecimiento de *P. maltophilia*, y solo los ramnósidos correspondientes inhiben a *E. cloacae*. De entre los C₇ glicosilados ninguno inhibe a *E. cloacae*.

II.1.3.8. ACCION ANTIVIRASICA.

Los flavonoides y compuestos relacionados inhiben las enzimas H^+ -ATPasa y fosfolipasa A_2 , necesarias para la difusión de la cápsula viral con la membrana lisosomal, en el proceso digestivo de la capa proteica que rodea al ácido nucleico viral y, que daría origen a la infección.

Para que las flavonas presenten actividad frente al rinovirus sus sustituyentes en C_3 y C_5 han de ser metoxi e hidroxilo respectivamente (Tsuchiya y cols., 1985). Cualquier grupo en otras posiciones puede afectar esta actividad.

La infección por virus del herpes simple podría ser tratada por administración de una fórmula que contiene 2 g L-lisina, 200 mg vitamina C, 150 mg hesperidina, 50 mg hesperidina-metil-chalcona y zumo de naranja, 4 veces al día (Wilkinson, 1992).

Hesperidina fosforilada muestra cierta actividad frente al virus causante de la poliomielitis, aunque más que reducir la incidencia lo que consigue es retrasar el comienzo de la parálisis generada (Cochran y Stahmann, 1961).

Flavonoides con grupos $-OH$ en C_5 y C_7 y con doble enlace entre los carbonos $C_2=C_3$ son inhibidores más potentes del crecimiento del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) que aquellos con sustituyentes $-OH$ o halógeno

en el anillo B que lo que realmente tienen aumentado es la toxicidad (Hu Chang y cols., 1994).

II.1.3.9. ACCION ANTIPROTOZOARIA.

En un estudio llevado a cabo por Laliberte y cols. (1967) se comprueba, que moléculas que contienen dos grupos fenilos unidos por una cadena corta de 3 átomos de carbono, muestran en ratón mayor actividad frente a helmintos que si la cadena posee mayor número de átomos. El grado de insaturación en el único enlace posible C-C de la cadena propanona (Ar-CO-C-C-Ar) también influye en esta actividad. Cuanto mayor es el grado insaturación, mayor es la actividad antihelmíntica.

El estudio frente a amebas, muestra que las chalconas no deben tener más de un sustituyente -OH en cada grupo fenilo, para presentar actividad. Asimismo, las chalconas suelen ser efectivas frente a la lombriz intestinal en ratones, especialmente aquellas con grupos -OH como sustituyentes (Harbone y cols., 1975).

II.1.3.10. ACCION ANTIMUTAGENICA.

Edenharder y cols. (1993), estudiando el efecto antimutagénico de flavonoides y compuestos relacionados, frente a aminas heterocíclicas, determinan que la polaridad de las moléculas influye de manera negativa en su potencia antimutagénica. De este modo, la introducción de funciones -OH reduce la acción antimutagénica de éstas. Los flavonoides C₆ o C₂, hidroxilados son considerablemente menos potentes.

La mayoría de los flavonoides glicosilados son inactivos o débilmente antimutagénicos.

Los anillos A y C no son esenciales para esta actividad, así, las chalconas son comparables a las flavonas correspondientes. Las dihidrochalconas son inactivas. Una estructura plana en la proximidad del grupo -C=O- puede ser importante para la actividad antimutagénica.

Las flavanonas son menos potente que las correspondientes flavonas.

El mecanismo inhibitor es concentración dependiente, siendo competitivo a concentraciones bajas y no competitivo, o ambos, a concentraciones próximas a la DI50.

Los flavonoides, dentro de su amplio espectro de actividades biológicas, incluyen frecuentemente actividad mutagénica (MacGregor, 1986), y con menos frecuencia antimutagénica (Mischer y cols., 1985). En el estudio realizado por Wall y cols. (1988) se comprueba que hesperidina inhibe hasta un 13% la actividad mutagénica de 2-aminoantraceno sobre Salmonella typhimurinum.

II.1.3.11. ACCION CITOSTATICA.

Algunos flavonoides presentan ciertos efectos citotóxicos sobre sistemas celulares normales y tumorales (Larocca y cols., 1990).

Ramnetina, galantina, fisetina, y quercetina tienen marcada actividad citostática (Harbone y cols., 1975; Joly y cols., 1980).

Del estudio realizado por Konoshima y cols. (1989), se desprende que, los flavonoides presentan distinta actividad antitumoral según los grupos funcionales. Las flavonas trihidroxiladas tienen mayor efecto inhibitor de la activación del virus Epstein-Barr en células portadoras de su genoma.

La presencia del doble enlace $C_2=C_3$ aumenta la actividad inhibitora, de ahí que las flavanonas presenten menor actividad que sus correspondientes flavonas.

La metilación o glucosilación de los grupos -OH, disminuyen la actividad antitumoral. Así la hidroxilación del C₇ origina efectos beneficiosos en cuanto aumento de actividad, de ahí que hesperidina presente menos efecto antitumoral que su genina hesperetina.

Hesperidina genera cierta controversia, pues si para Scambia y cols. (1990) ésta es inefectiva en la inhibición de la proliferación de células cancerígenas de ovario humano, para otros autores como Tanaka y cols. (1994) hesperidina inhibe, aunque de forma suave, la carcinogénesis oral inducida en rata con 4-nitroquinolina-1-óxido.

II.1.3.12. ACCION ESTROGENICA Y ANTIFERTILIZANTE.

Los flavonoides según Bhargava (1984) son suaves agentes estrogénicos e inhiben la implantación del cigoto en el útero, produciendo la interrupción del embarazo.

Sin embargo, en estudios previos, se comprueba que hesperidina administrada durante 2 semanas a ratas jóvenes no presenta actividad estrogénica (Frank y cols., 1963). Tampoco disminuye la fertilidad de conejos de ambos sexos, ni inhibe la implantación del embrión a la dosis de 100 mg/Kg/día (Friz, 1959).

II.1.3.13. ACCION ANALGESICA Y ANTIPIRETICA.

Los flavonoides, por inhibición de las enzimas ciclo y lipooxigenasa, disminuyen el dolor local y la temperatura corporal (Havsteen, 1983), consecuencias de la quimiotaxis de leucotrienos provocada por la liberación de prostaglandinas en los procesos inflamatorios.

En un estudio reciente llevado a cabo por Da Silva (1994) se determina que el pretratamiento de ratones con hesperidina 100 mg/Kg s.c., redujo en un 50% las contracciones abdominales inducidas por ácido acético. Sin embargo no se ven afectados los parámetros característicos en el "tail flick test".

En ese mismo estudio, hesperidina disminuye levemente la hipertermia inducida en rata por la administración de levadura.

II.1.3.14 OTRAS ACCIONES FARMACOLOGICAS.

Además de las ya expuestas, a los principios flavónicos se les atribuye otras acciones:

- **Acción espasmolítica:** Por inhibición no competitiva y no específica de la respuesta a agonistas (acetilcolina, histamina, L-noradrenalina) que estimulan específicamente los receptores. También inhiben la respuesta a agentes, como el $BaCl_2$, cuyas acciones no son mediadas vía receptor. Se trata pues, de agentes que originan una relajación muscular por mecanismo directo (Van Der Broucke y Lemly, 1983; Marhuenda y cols., 1988; Herrera y Marhuenda, 1991).

- **Acción antialérgica:** Mientras baicaleina muestra una inhibición inmediata de las reacciones de hipersensibilización (Gabor, 1981), Hope y cols. (1983) demuestran que quercetina origina inhibición de la biosíntesis de la SRS-A.

- **Acción diurética:** Presentan esta acción compuestos flavónicos de estructura no necesariamente idéntica: Silimarina, flavonoles como quercetina y sus glucósidos quercetrina y rutina, flavonas como luteolina y apigenina, flavanonas como hesperidina y naringenina, así como flavonoides de estructura no precisada (Hiller, 1965; Paris y Moyse, 1976; Alarcón de la Lastra y cols., 1991).

Flavonoides glicosilados como hesperidina, rutina, miricetina, y miricetrina, originan un aumento en la excreción de ácido úrico (Teiji, 1960).

- **Acción hepatoprotectora:** Silimarina (Bindoli y cols., 1977) y (+)-cianidol-3 (Gabor, 1981) ejercen efecto protector sobre las alteraciones hepáticas inducidas por etanol, faloidina, Cl₄C, y otros agentes tóxicos del parénquima hepático.

- **Acción antihipercolesterolémica:** Varios estudios han demostrado la acción antihipercolesterolémica y estimulante de la actividad lipolítica del suero, de numerosos principios de naturaleza flavónica, lo que les confiere cierto efecto protector frente a la arteriosclerosis (Gabor, 1981).

- **Acción antidiabética:** Por inhibición de la enzima aldosa-reductasa, que reduce glucosa a galactitol, principal responsable de trastornos oculares a nivel de drenaje y circulación, así como de deficiencia de la absorción intestinal en casos de diabetes mellitus (Palomino, 1995).

II.1.4. INDICACIONES TERAPEUTICAS.

La principal indicación terapéutica de este grupo está relacionada con el sistema venoso. Frecuentemente se utiliza el "totum" flavónico, subproducto de la industria de zumos de frutas, en asociación con otros protectores vasculares o con vitamina C (Robbins, 1966), en las siguientes situaciones:

- **Fragilidad capilar.**
- **Alteraciones venosas**, ya que se trata de principios venotónicos y vasculoprotectores, también indicados en mujeres embarazadas.
- **Trastornos tróficos:** Ulceras.
- **Proctología:** Crisis hemorroidales, para lo que se precisa de dosis mayores que en patología venosa.
- **Metrorragias** consecuentes al uso de métodos anticonceptivos tales como dispositivos intra-uterinos.
- **Trastornos ligados a la circulación retiniana y coroidiana.**
- **Parodontosis:** Inflamación y destrucción del tejido conectivo.
- **Latirismo:** Enfermedades del colágeno.
- **Profilaxis de arteriosclerosis** (actualmente en fase de investigación).

II.2. HESPERIDINA.

II.2.1. LOCALIZACION Y OBTENCION.

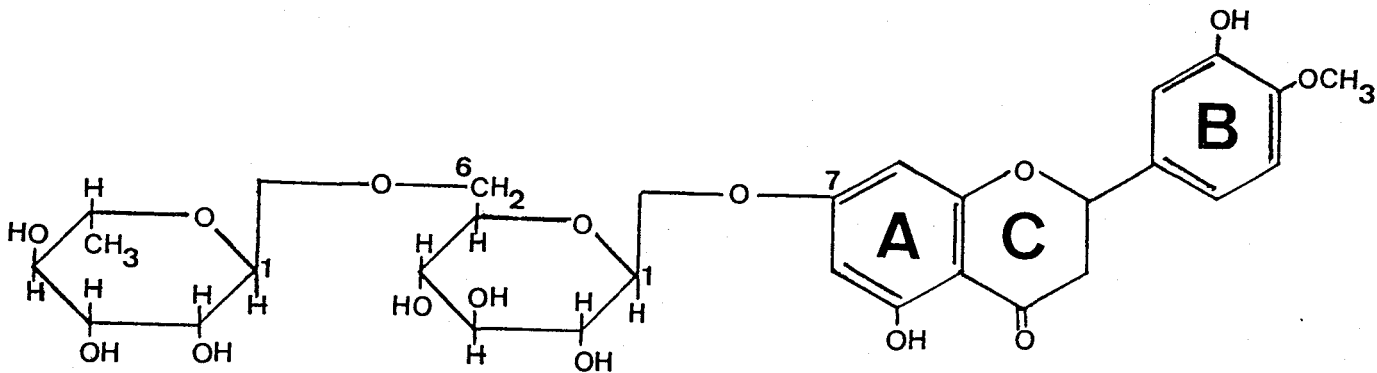
Hesperidina, aislado por primera vez en 1828, es el flavonoide mayoritario en la naranja dulce, *Citrus sinensis* y *C. unshiu* (Arriaga y Rumbero, 1990); también presente en la naranja agria, *C. aurantiun*, y el limón, *C. limon* (Evans, 1991b).

Se obtiene del pericarpio liofilizado de los frutos del género *Citrus*, según estudio realizado por Son Heung y cols. (1992), por medio de extractos metanólicos y butanólicos. Posteriormente, se purifica por filtración en gel y HPLC. Por cada gramo de extracto flavónico extraído de la cáscara liofilizada de *C.sinensis*, se obtiene 530 mg de hesperidina.

II.2.2. ESTRUCTURA QUIMICA.

Hesperidina, 7-rutinosil-hesperidol o hesperetina-7-rannglucosil (Horowitz y Gentili, 1963a) es una flavanona O-glucosilada de peso molecular 610.55 y fórmula $C_{28}H_{34}O_{15}$. El enlace O-glucosídico entre la genina y la parte glucídica se realiza a través de los grupos -OH en C_7 y C_1 respectivos de cada parte. El grupo azucarado es el disacárido rutinosa, α -L-ramnosil(1 \rightarrow 6) β -D-glucosa.

La estructura química de hesperidina, responde a la siguiente secuencia: 7-[[6-O-(6-Deoxy- α -L-mannopyranosyl)- β -D-glucopyranosyl]oxy]-2,3-dihydro-5-hydroxy-2-(3-hydroxy-4-methoxyphenyl)-4H-1-benzopyran-4-one .



HESPERIDINA

II.2.3. PROPIEDADES FISICO-QUIMICAS.

Hesperidina es prácticamente insoluble en acetona, benceno y cloroformo; poco soluble en agua (1 g en 50 L), metanol y ácido acético glacial caliente; soluble en formamida y dimetilformamida a 60° C y muy soluble en álcalis y piridina.

Precipita a pH 6-7 en forma de finas y dendríticas agujas.

Punto de fusión: 258-262° C.

Poder rotatorio: $[\alpha]_D^{20}$ -76° en piridina (Windholz, 1992a).

II.2.4. INDICACIONES TERAPEUTICAS.

Hesperidina por sus propiedades vitamínicas P, aumenta el tono venoso, controla la permeabilidad e incrementa la resistencia capilar.

Está indicado en:

- **Insuficiencias circulatorias periféricas:** arteriopatías de las extremidades, cuadros varicosos, flebitis, edemas distales, fragilidad capilar, hemorroides.
- **Insuficiencias circulatorias cerebrales.**
- **Trastornos psico-comportamentales de la senescencia.**

En investigaciones recientes llevadas a cabo por Da Silva (1994) y Kubo (1992) se desprende que hesperidina podría tener uso terapéutico como suave agente antiinflamatorio, siendo también precursor de otros flavonoides dotados con tal actividad.

II.3. NEOHESPERIDINA DIHIDROCHALCONA.

II.3.1. SINTESIS.

Neohesperidina dihidrochalcona se obtiene a partir de flavanonas-7-neohesperidosil, tales como neohesperidina, isómero de hesperidina y componente amargo de la naranja agria (Nakabayashi, 1961); y naringina que lo es del pomelo y las toronjas, *Citrus grandis* y *C. paradisi* (Albach y cols., 1969).

El proceso de síntesis de neohesperidina dihidrochalcona a partir de la naringina es el siguiente:

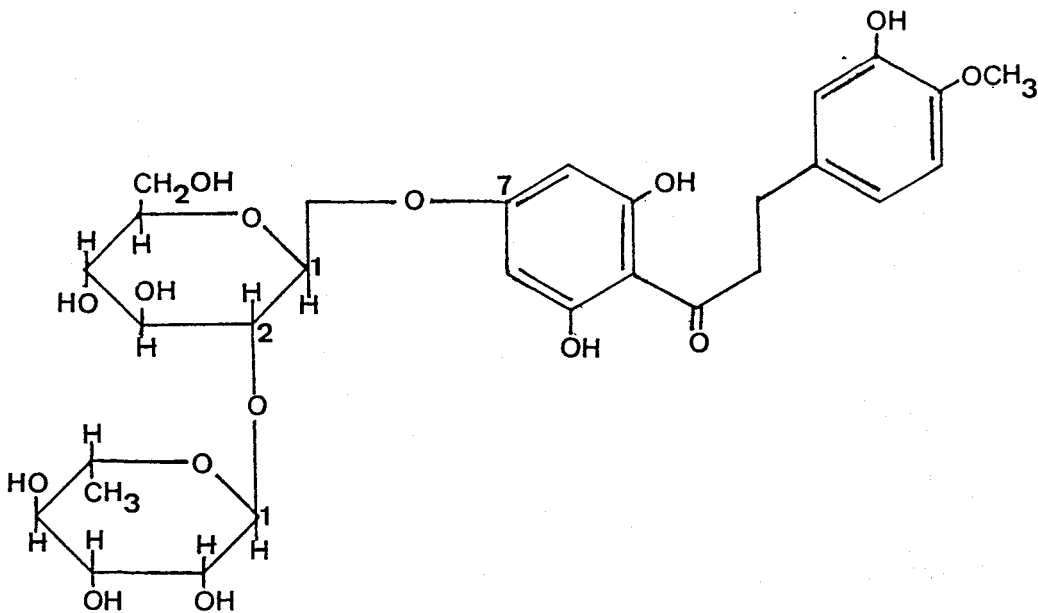
1. Fragmentación alcalina de la flavanona en solución KOH 20%, formándose la metilcetona correspondiente.
2. Condensación con isovainillina en exceso originándose la chalcona de neohesperidina, de sabor 1500 veces más dulce que la sacarosa.
3. Reducción por hidrogenación catalítica formándose neohesperidina dihidrochalcona (Belitz y Grosh, 1985b), de mayor poder edulcorante y estabilidad que la chalcona (Badui, 1981).

A partir de neohesperidina la síntesis se realiza por apertura del anillo C y posterior hidrogenación catalítica (Horowitz, 1964).

II.3.2. ESTRUCTURA QUIMICA.

Neohesperidina dihidrochalcona, es un O-heterósido de peso molecular 612.60 y fórmula $C_{28}H_{36}O_{15}$. El enlace O-glucosídico entre la genina y la parte osídica se realiza a través de los grupos -OH en C₇ y C₁ respectivos de cada parte. El grupo osídico es el disacárido neohesperidosa, α -L-ramnosil(1→2) β -D-glucosa.

La estructura química de neohesperidina dihidrochalcona se corresponde con la siguiente secuencia: 1-[4-[[2-O-(6-Deoxy- α -L-mannopyranosyl)- β -D-glucopyranosyl]oxy]-2,6-dihydroxyphenyl]-3-(3-hydroxy-4-methoxyphenyl)-1-propanone.



NEOHESPERIDINA DIHIDROCHALCONA

II.3.3. PROPIEDADES FISICO-QUIMICAS.

Ciertas dihidrochalconas tienen sabor dulce, cuya intensidad y calidad depende de los sustituyentes en el anillo B. Requisito previo para que posean este sabor es la presencia de al menos un grupo hidroxilo y que no existan tres grupos hidroxilo o alcoxilo adyacentes (Belitz y Grosh, 1985a). Tienen un poder edulcorante 1000 a 1500 veces más potente que la sacarosa.

Cristaliza en acetona.

Punto de fusión: 156-158 °C (Windholz, 1992b).

II.3.4. APLICACIONES.

Algunas dihidrochalconas, derivados de flavanonas poseen un sabor dulce relativamente puro que se percibe lentamente y persiste un cierto tiempo.

Neohesperidina dihidrochalcona tiene un gran poder edulcorante no calórico (Horowitz y Gentili, 1963b; Robertson y cols., 1974), 20 veces más potente que la sacarina. Es por tanto un edulcorante potencial de uso en gomas de mascar, colutorios, y diversos tipos de caramelos (Belitz y Grosh, 1985a).

MATERIAL Y METODOS

III.1. CONDICIONES EXPERIMENTALES.

III.1.1. ANIMALES DE EXPERIMENTACION.

Las distintas experiencias con animales de experimentación se llevaron a cabo sobre ratas de raza Wistar o ratones de raza Swiss, según el ensayo a realizar, agrupados en lotes de 6 animales de ambos sexos. Estos se mantienen en unas condiciones estandar de luz y temperatura (12 h de luz al día y 22-25°C). Asimismo el peso y alimentación de los animales estuvieron en función de la optimización de la técnica.

III.1.2. SUSTANCIAS ENSAYADAS.

Las sustancias utilizadas en las distintas experiencias son:

- Hesperidina (Extrasynthèse).
- Neohesperidina dihidrochalcona (Extrasynthèse).
- Etanol absoluto (Merck).
- Carbenoxolona (Leo S.A.).

- Indometacina (Sigma Chemical).
- Clorhidrato de ranitidina (Alter S.A.).
- Carragenina (Sigma Chemical).
- Albúmina (Merck).
- Hidroclorhidrato de D-glucosamina (Merck).
- Prostaglandina E₂ (PGE₂) standard (Sigma Chemical).
- PGE₂ tritiada (Amersham).
- Anticuerpos de PGE₂ (Sigma Immuno Chemicals).
- Clorhidrato de acetilcolina (Sigma).
- Valerato de estradiol, Progynon Depot^R, (Schering AG).
- Dihidroclorhidrato de histamina (Merck).
- 5-Hidroxitriptamina (Sigma Chemical).
- Bitartrato de (-)noradrenalina (Sigma Chemical).
- Tiopental sódico, Pentothal^R, (Abbott).
- Azul de Evans (Merck).
- Xantina Oxidasa (Merck).
- Superóxido dismutasa (Sigma Chemical).
- Alopurinol (Sigma Chemical).
- Manitol (Sigma Chemical).
- Butilhidroxitolueno (Sigma Chemical).

Los principios se vehiculizan en suero fisiológico, formando una suspensión de la que se administran dosis de 100 y 150 mg/Kg de peso animal.

En los ensayos *in vitro*, órgano aislado y acción antioxidante, se seleccionó como disolvente la mezcla dimetilsulfóxido/etanol en la relación 1/4.

III.1.3. ANALISIS ESTADISTICO DE RESULTADOS.

Los resultados se expresan como media \pm SEM y el análisis estadístico se realiza por el procedimiento de la "t" de Student y/o la "U" de Mann-Whitney.

La relación entre los valores experimentales y los controles fueron considerados significativos desde $p < 0.05$.

III.2. TECNICAS Y DESARROLLO DE LAS EXPERIENCIAS.

III.2.1. ULCERAS GASTRICAS AGUDAS EXPERIMENTALES.

En experimentación animal existe un gran número de técnicas para la génesis de úlcera gástrica o duodenal, lo que indica que no existe un método "ideal" para inducir la úlcera experimental.

Para valorar la acción antiulcerosa de distintos medicamentos o sustancias, se selecciona la técnica más adecuada atendiendo a ciertos criterios, tales como, la elevada influencia, fácil diagnóstico de las úlceras, simplicidad, costo, producción de úlceras modificadas por agentes terapéuticos conocidos o procedimientos quirúrgicos utilizados (García Simón y cols., 1982).

La patogénesis de la úlcera gástrica o duodenal ha sido generalmente investigada observando los factores que contribuyen al desarrollo de úlceras experimentales.

Con este propósito, se han desarrollado gran diversidad de técnicas para la producción de úlceras experimentales en diferentes especies de animales (Brodie, 1968), tratando de obtener un modelo ideal de preparación, que permita la mejor

evaluación de la efectividad de los diferentes recursos terapéuticos utilizados en esta afección.

Casi siempre se seleccionan aquellas que producen elevada incidencia de úlceras, fácilmente discernibles en el área de interés del tracto gastrointestinal, reproducidas en animales de bajo costo de mantenimiento, buena reproducibilidad y fácil manipulación, considerándose, además, la analogía de la secreción gastrointestinal del animal utilizado, con la del humano.

Las úlceras experimentales en ratas, se pueden clasificar de acuerdo con los métodos expuestos a continuación:

- Ligadura del píloro.
- Administración de fármacos.
- Inducida por stress múltiples.
- Mediante cirugía.

III.2.1.1. ULCERA AGUDA INDUCIDA POR INMOVILIZACIÓN Y FRÍO.

Cuando se somete al animal de experimentación a situaciones límite, como el estado de inmovilización y frío, se produce una serie de cambios bioquímicos, que en su conjunto, llegan a provocar lesiones en la mucosa gástrica.

Estos cambios son:

- **Estimulación del sistema nervioso autónomo** con el consiguiente aumento de la liberación de catecolaminas, lo que origina un aumento de la acidosis a nivel gástrico.

- **Variación de mecanismos endocrinos** que reajustan el riego sanguíneo.

- **Aumento de actividad de leucotrienos (LT)** con su potente acción proinflamatoria. Los LTB₄ producen quimiotaxis sobre neutrófilos y eosinófilos, liberación de enzimas lisosomales, producción y liberación de radicales superóxidos en las células inflamatorias, y aumento de la permeabilidad capilar (Higgs y cols., 1994). Los LTC₄ y LTD₄ producen cambios vasculares locales con vasoconstricción, disminuyendo el flujo sanguíneo mucosal (Whittle y cols., 1985).

- **Estimulación del PAF**, que disminuye el flujo sanguíneo favoreciendo la isquemia de la mucosa gastroduodenal.

Para desarrollar este modelo de úlcera experimental hemos utilizado ratas Wistar de ambos sexos y de un peso medio comprendido entre 250 y 300 g.

Treinta y seis horas antes de la experiencia, se mantienen en ayunas y con libre acceso al agua, introducidas en jaulas individuales con rejillas en su interior, para dificultarles la coprofagia. Así evitamos las interferencias sobre la mucosa gástrica de restos de comida o heces ingeridas.

Para provocar este tipo de úlcera, se inmovilizan los animales, introduciéndolos en rejillas cilíndricas individuales y se mantienen en cámara frigorífica a 3-5 °C durante 3 h (Senay y Levine, 1967).

Posteriormente, se administra por sonda intragástrica (p.o.) 1 h antes de la inmovilización, las sustancias correspondientes a cada lote, a razón de 1 mL/100g de peso:

- Grupo control: Solución salina fisiológica (S.S.F.).
- Grupo patrón: Ranitidina 100 mg/Kg de animal.
- Grupos problema: Hesperidina y neohesperidina dihidrochalcona a las dosis de 100 y 150 mg/kg.

Se sacrifican los animales por inhalación de eter etílico, se aísla el estómago, que se abre por su curvatura mayor y se lava su interior con 4 mL de solución salina. Se recoge el moco gástrico en 4 mL de agua destilada, se homogeneiza mediante potter y lo conservamos a -4 °C para su estudio bioquímico.

A continuación, se mide la superficie ulcerada, y se determina el índice de ulceración (I.U.) que presenta la mucosa gástrica, siguiendo el criterio de Cioli (1967):

- 0, en ausencia de lesión, vasodilatación o hasta 3 lesiones puntiformes.
- 1, más de 3 lesiones puntiformes.
- 2, de 1 a 5 úlceras pequeñas < 2 mm.
- 3, más de 5 úlceras pequeñas < 2 mm.
- 4, 1 ó más úlceras grandes.

Este modelo de ulceración presenta una serie de ventajas como son una alta incidencia de lesiones encontradas, simplicidad de la técnica, corta duración de la experiencia, y uniformidad de las lesiones, lo que facilita su evaluación y cuantificación.

III.2.1.2. ULCERA AGUDA INDUCIDA POR ETANOL ABSOLUTO.

Para estudiar la acción citoprotectora de determinadas sustancias sobre la mucosa gástrica, se ha de recurrir a un modelo de úlcera experimental, que no debe depender de la secreción de jugo gástrico sino de la potenciación de los mecanismos de defensa de la mucosa.

Para ello, se puede provocar lesiones necrosantes en la mucosa gástrica con la instilación de sustancias agresivas como ácidos fuertes en exceso (HCl 0.6 N), bases fuertes (NaOH 0.2 N), soluciones hipertónicas (NaCl 25%), líquidos a alta temperatura, o precipitantes de proteínas (ácido tricloroacético, alcoholes concentrados como el etanol absoluto).

Hemos seguido el modelo propuesto por Robert (1979): Las ratas en ayunas de 36 h, reciben p.o., a razón de 1 mL/100 g de animal, las distintas sustancias:

- Grupo control: S.S.F.
- Grupo patrón: suspensión de carbenoxolona 80 mg/Kg.
- Grupos problema: suspensión de hesperidina o neohesperidina dihidrochalcona a las dosis anteriormente expuestas.

Transcurridos 60 min, se administra por la misma vía 1 mL de etanol absoluto, y tras un periodo similar, se sacrifican los animales. Se extrae el estómago, que se abre por su curvatura mayor y, se manipula según el protocolo indicado con anterioridad.

El índice de ulceración (I.U.) que presenta la mucosa gástrica se determina siguiendo la escala recogida por Jiménez (1986):

- 0, sin lesión.
- 1, úlceras hemorrágicas, finas, dispersas y de longitud < 5 mm.
- 2, 1 úlcera hemorrágica de longitud < 5 mm y diámetro < 1 mm.
- 3, más de 1 úlcera de grado 2.
- 4, 1 úlcera de longitud > 5 mm y diámetro > 1 mm.
- 5, 2 o 3 úlceras de grado 4.
- 6, 4 o 5 úlceras de grado 4.
- 7, más de 6 úlceras de grado 4.
- 8, lesiones generalizadas.

El modelo de úlcera aguda inducida por etanol absoluto, es reproducible en el 100% de los casos, originando una serie de lesiones que ocupan un 30-40% de la superficie total de la mucosa, con bandas hemorrágicas necróticas, localizadas fundamentalmente en la zona del corpus del estómago.

III.2.1.2.a. Protección crónica sobre la úlcera gástrica aguda inducida por etanol absoluto.

Para ver la protección crónica que pueden originar hesperidina y neoheperidina dihidrochalcona, tratamos los animales durante 7 días consecutivos con 3 dosis de 100 mg/Kg de principio cada día (Konturek y cols., 1986a).

Se emplearon ratas Wistar de ambos sexos, de peso medio 250 a 300 g. Con libre acceso a la comida, hasta 36 h antes de la administración de la última dosis de principio.

El octavo día de ensayo, y transcurridos 90 min de la última toma, se les administra 1 mL de etanol absoluto p.o.. Tras otros 60 min se sacrifican los animales y se les extraen los estómagos, manipulándolos del mismo modo que en técnicas anteriores.

III.2.1.2.b. Modificaciones provocadas en la úlcera inducida por etanol:

Pretratamiento con indometacina.

A fin de ver la posible influencia de las prostaglandinas en el efecto antiulceroso (autacoide que entre otras acciones, actúa como potente citoprotector) (Wilson, 1986; Walt, 1990), estudiamos el efecto que ejerce la administración de un inhibidor de la enzima ciclooxigenasa (indometacina i.p., 10 mg/Kg) sobre la lesión de la mucosa gástrica provocada por la instilación de 1 mL de etanol absoluto (Alcaraz y Tordera, 1988).

Para ello, administramos la indometacina a animales mantenidos 36 h en ayunas. A los 30 min, se administra p.o. el principio flavónico, una hora más tarde, se instila el etanol absoluto a cada animal y se sigue el protocolo de ensayos anteriores.

III.2.1.3. ESTUDIO BIOQUIMICO DEL MOCO GASTRICO.

III.2.1.3.a. Determinación de proteínas totales.

El moco gástrico recogido sobre 4 mL de agua destilada es homogeneizado mediante potter, y conservado a -4°C hasta su estudio.

Para la determinación de proteínas totales seguimos el método de Lowry (1951), técnica colorimétrica que a una λ de 750 nm permite observar la presencia de unos compuestos de color azul, que se forman, tras reacción redox acoplada a la oxidación del complejo cobre-proteína, y cuya intensidad depende del contenido de la muestra en proteínas.

Se toma 1 mL del homogeneizado y se diluye en agua destilada hasta 25 o 2.5 mL de volumen final, según se trate de muestras obtenidas en úlcera de etanol o de stress respectivamente. A 1 mL de esta dilución se le añade 5 mL de reactivo D [Na_2CO_3 (2% p/v en NaOH 0.1 M) : $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (1% p/v) : tartrato Na-K (2.7% p/v); en la proporción 10:1:1], solución alcalina de Cu^{2+} que acompleja el metal con las proteínas. Se agita durante 20 min y a continuación, se añade 0.5 mL de reactivo E (Folin Ciocalteous : agua destilada en 1:1) que oxida el complejo Cu^{2+} -proteína formando los cromóforos azul de molibdeno y azul de

tungsteno que absorben a la citada λ . Se agita de nuevo, ahora durante 30 min y a continuación medimos en el fotocolorímetro (Spectronic 20, Bausch & Lomb) frente a un blanco de agua destilada.

La recta de calibración se realiza con las siguientes concentraciones standard de albúmina: $5 \cdot 10^{-5}$, 10^{-4} , $1.5 \cdot 10^{-4}$, y $2 \cdot 10^{-4}$ mg/mL.

Sobre esta recta se calcula las concentraciones de proteínas totales de cada muestra, según la absorbancia que presenten.

III.2.1.3.b. Determinación de hexosaminas.

El contenido en hexosaminas del moco gástrico, se determina según el método descrito por Boas (1953) y modificado por Bulbena (1986). Se trata de una técnica colorimétrica, que determina las absorbancias a una λ de 530 nm.

A 2 mL del homogeneizado se le añaden otros 2 mL de ácido clorhídrico 1 N y se mantiene durante 16 h en baño de aceite a 100°C. Tras enfriarse este hidrolizado, se le añade agua destilada hasta un volumen final de 5 mL, se filtra al vacío y, 3 mL se hacen pasar por una microcolumna cromatográfica de fase

reversa (cartucho Sep-Pak[®] C18) previamente activada con 3 mL de metanol y 3 mL de agua destilada. El primer mL se desprecia, y los 2 mL siguientes, que serán ya de muestra purificada, se someten a la reacción colorimétrica. A cada mL de muestra purificada, separados en tubos distintos, se le añade otro de solución de acetilacetona (2% en carbonato sódico 1 N). Se mantiene en baño maría a 89-90°C durante 45 min. Después de enfriarse a temperatura ambiente, se añade 2 mL de etanol absoluto y 1 mL de solución de p-dimetilaminobenzaldehído (2.69% en la mezcla a partes iguales de etanol absoluto y ácido clorhídrico concentrado). Se agita con cuidado y al cabo de 10 min, se mide la absorbancia de un compuesto formado de color rojizo a 530 nm de longitud de onda, frente a un blanco de agua destilada.

Las concentraciones de hexosaminas por muestra, se calculan sobre una recta de calibración, realizada a partir de las absorbancias obtenidas, con las concentraciones standard de glucosamina de 25, 50 y 100 $\mu\text{g/mL}$.

III.2.1.3.c. Determinación de prostaglandinas.

La determinación analítica del contenido en prostaglandinas del moco gástrico, se realiza siguiendo el método descrito por Navarro y cols. (1988) mediante técnica de radioinmunoanálisis (RIA).

En primer lugar, hay que provocar las úlceras según el modelo a estudiar. El moco se recoge por raspado de la mucosa sobre 6 mL de tampón teap pH 3.24 (ácido fórmico 0.04 M + trietilamina hasta pH 3.15 + 15% de etanol absoluto + Inyesprim^R en el momento de efectuar el ensayo), se homogeneiza y centrifuga a 3000 rpm, 4°C durante 10 min. El sobrenadante, se pasa por columna Sep-Pak^R activada previamente con 10 mL de metanol y 10 mL de agua acidulada (agua destilada + ácido clorhídrico hasta pH 3.15). A continuación, se pasan por la columna sucesivamente, 10 mL de agua acidulada, aire, 10 mL de eter de petroleo, aire, y finalmente 5 mL de metilformiato, cuyo eluyente es el que se recoge, pues contiene las prostaglandinas de la muestra. Esta solución se evapora con aire a presión, redisolviendo a continuación las prostaglandinas en 1200 μ L de acetonitrilo.

En una alícuota de 100 μ L que se vuelve a evaporar con aire, es donde se realiza la determinación del contenido en prostaglandinas del moco.

En cada ensayo se analizan 2 viales de radiactividad máxima (viales 1 y 2), 2 de radiactividad mínima o B_{NS} (viales 3 y 4), y 2 de ligando radiactivo máximo B_o (viales 5 y 6); así como una serie de alícuotas de concentraciones standard de prostaglandina, para crear la curva patrón (viales 7→24); y 2 alícuotas por cada muestra (viales 25 y 26→.....).

El protocolo a seguir, siempre en frío, es el siguiente:

- 100 μ L tris clorhídrico 100 mM (Trizma 1.21% p/v en agua bidestilada + HCl 35% hasta pH 7.4) en eppendorf 1→6 y 25→.....
- 100 μ L tris BSA 2% (albúmina 2% p/v en tris clorhídrico 100 mM) en eppendorf 1→4.
- 100 μ L de 9 concentraciones conocidas de prostaglandina E_2 (PGE_2), que van desde 1.9 pg/100 μ L hasta 500 pg/100 μ L, en eppendorf 7→24.
- 200 μ L de PGE_2 tritiada (PGE_2^*)(5000 DPM/100 μ L) en todos los eppendorf.
- 500 μ L de anticuerpos anti PGE_2 (Ac) en eppendorf 5→.....
- Agitar vigorosamente.
- Mantener en cámara frigorífica hasta día siguiente.
- 200 μ L solución de carbón activo (0.5 g carbón activo + 0.1 g dextrano T.70 + 25 mL tris clorhídrico) en eppendorf 3→....., y agitar
- A los 12 min centrifugar a 3000 rpm 4°C durante 15 min.

- Decantar sobrenadante en viales con 8 mL de líquido de centelleo.
- 3 h de reposo a temperatura ambiente.
- Determinación de las cuentas por millón en contador de centelleo (Beckman LS 1800).

En la curva patrón, obtenida al representar $1-\%B_{max}$ frente al \ln de las concentraciones standard de PGE_2 , se extrapolan los valores de $1-\%B_{max}$ de cada muestra, obteniéndose el $\ln [PGE_2]$ correspondiente; donde $\%B_{max} = B_o - B_x / B_o - B_{NS}$.

Las prostaglandinas de la muestra, compiten con la tritiada por el anticuerpo, para formar complejos que no son arrastrados por el carbón activo. Cuanto menor sea el contenido de prostaglandinas de la muestra, mayor será la radioactividad en los viales que se analizan en el contador, pues la cantidad de complejo $Ac-PGE_2^*$ formado será mayor.

III.2.2. ACCION SOBRE LA PERMEABILIDAD VASCULARL.

Hemos seguido el método espectrofotométrico descrito por Takeuchi (1991), que se fundamenta en el modelo experimental desarrollado por Ukada (1970) y modificado por Szabo (1985).

Según este modelo, colorantes, como el sintético azul de Evans, administrado por vía intravenosa, se unen a las proteínas plasmáticas, en particular a la albúmina, y colorea aquella zona donde tiene lugar su extravasación, como es el caso de la mucosa gástrica dañada por las úlceras.

Los animales utilizados, ratas Wistar de ambos sexos, se encuentran en ayunas desde 36 h antes de la experiencia. Se les administra con sonda intragástrica el tratamiento correspondiente a cada lote y, se les provoca extravasación de proteínas mediante lesión de la mucosa gástrica, inducida por etanol absoluto, salvo el lote control, que no sufre ningún tipo de ulceración.

Los animales son anestesiados con tiopental sódico (60 mg/Kg i.p.), y a los 30 min de haberles provocado la úlcera se les inyecta a través de la vena femoral 1 mL de solución al 1% de azul de Evans. Transcurridos 30 min, los animales se sacrifican y se les extrae el estómago, que una vez abierto por su curvatura mayor, se mantiene en 9 mL de formamida. Se introduce en estufa a 65°C

durante 12 h, para que extraiga la totalidad del colorante extravasado, formándose un solución de color azul, a la que se determina su absorbancia mediante colorimetría a una λ de 620 nm, frente a un blanco de formamida.

Para el cálculo de las concentraciones de azul de Evans, en las soluciones de formamida o, la cantidad existente por unidad de peso de tejido, se crea una recta patrón mediante soluciones de concentraciones conocidas del colorante en formamida, que también permanecerán en estufa a 65 °C durante 12 h.

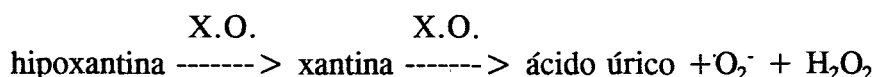
Los resultados se expresaron como mg de azul de Evans/mg de tejido.

III.2.3. ACCION ANTIOXIDANTE *IN VITRO*.

Los radicales libres derivados del oxígeno (RLO), forman parte del proceso degenerativo de la mucosa gástrica en los casos de ulceración (Salim, 1990). Se forman, tras degranulación mastocítica, así como por activación del sistema enzimático NADPH-oxidasa de la membrana leucocitaria de leucocitos, que emigran a la zona agredida por agentes ulcógenos. También en casos de hipoxia-reperusión, como congestión de la microcirculación por acúmulos endoteliales, por acción de la enzima xantina oxidasa, se inicia y potencia el sistema generador de RLO (Alarcón de la Lastra y cols., 1995).

III.2.3.1. ACCION ANTIRRADICALARIA SUPEROXIDO.

La xantina oxidasa (X.O.) es una enzima capaz de generar radicales superóxido (O_2^-) *in vivo*, por la oxidación de productos reducidos provenientes del catabolismo anaerobio del ATP intracelular. Esta enzima cataliza la siguiente reacción:



Para determinar la capacidad captadora de radical superóxido, se incuba *in vitro* un medio de reacción que imita al medio *in vivo*, generándose radical superóxido (McCord y Fridouich, 1968; Robak y cols., 1988) que tiene la capacidad de reducir compuestos como el ferrocitocromo C, que una vez reducido absorbe a una λ de 550 nm.

El medio de reacción contiene:

- Tampón fosfato 50mM, pH 7.4.
- Xantina 100 μ M.
- EDTA 1mM (actúa como quelante de cualquier metal catalítico que pudiera interferir al formar otros radicales).
- Citocromo C tipo III 100 μ M.
- Sustancia problema, sustancia de referencia o vehículo.
- Enzima X.O. 0.066U/mL.

La cantidad de citocromo C reducido que se forma, dependerá de las propiedades captadoras de radical superóxido de la sustancia en estudio. Su absorbancia, se mide a 550 nm durante 2 min con un retraso inicial de 30 s desde que comienza la reacción, es decir, desde que se adiciona la enzima al medio de reacción.

III.2.3.2. ACCION ANTIRRADICALARIA HIDROXILO.

El dimetilsulfóxido (DMSO) es un potente captador del radical hidroxilo (OH), que origina formaldehído en el proceso de la oxidación (Klein y cols., 1981).

Para determinar si las sustancias en estudio tienen capacidad captadora de OH, se incuban en un medio de reacción con un generador de este tipo de radicales (ácido ascórbico- Fe^{3+} -EDTA), junto con DMSO. Así, si existe competencia por el radical, la formación de formaldehído será menor.

El medio de reacción contiene:

- Tampón fosfato 50mM, Ph 7.4.
- DMSO 33mM.
- EDTA 0.1mM.
- Complejo Fe^{3+} -EDTA (1:2) 167 μ M.
- Sustancia problema, sustancia de referencia o vehículo.

La reacción esquematizada es la siguiente:

medio de reacción

↓ ácido ascórbico 2mM, 37° C, 30 min

↓ tricloroacético 17.5% p/v

formaldehido

↓ revelador: acetato amónico 1M + acetil acetona 0.01M,

58° C, 5 min

↓ 0-4° C

3,5-diacetil-1,4-dihidrolutidina

Se inicia con la adición de ácido ascórbico 2mM al medio de reacción, se incuba a 37° C durante 30 min, y se detiene adicionando tricloroacético 17.5% p/v en agua destilada. Para detectar el formaldehido producido, hay que generar mediante un revelador (acetato amónico 1M + acetil acetona 0.01M) un producto de color amarillo, 3,5-diacetil-1,4-dihidrolutidina, que absorbe a 412 nm. Una vez adicionado el revelador, se calienta durante 5 min a 58° C, interrumpiéndose la reacción con frío.

La lectura del cromóforo se realiza en espectrofotómetro a una λ de 412 nm.

Como sustancia de referencia se utiliza el manitol 25 ó 50 mM, pues es captador de OH.

III.2.3.3. ACCION ANTILIPOPEROXIDANTE.

Mediante este ensayo, determinamos la capacidad de los principios para modificar la peroxidación lipídica no enzimática de membranas microsomales (Afanas'ev y cols., 1989; Miles y cols., 1980).

Los microsomas se extraen de hígados perfundidos de ratas Wistar mediante homogeneización y una serie de centrifugaciones sucesivas, que generan un residuo de microsomas que resuspendemos en tampón fosfato. A esta suspensión, se le calcula por el método de Biuret, el contenido en proteínas microsomales, para poder hacer un uso controlado de las membranas.

El medio de reacción está formado por:

- Tampón fosfato 50mM, pH 7.4.
- Sustancia problema, sustancia de referencia o vehículo.
- Microsomas hepáticos (1.5 mg proteínas/mL).
- Fe²⁺ 0.05mM.

Este último componente, junto con el ácido ascórbico a baja concentración, generan radicales libres que oxidan a los lípidos de las membranas microsomales (Slater, 1972).

La reacción tiene lugar de acuerdo con el siguiente esquema:

medio de reacción

- ↓ ácido ascórbico 0.4mM, 37° C, 30 min
- ↓ ácido fosfórico 1% (1mL)
- ↓ butilhidroxitolueno 0.01% en etanol (33 μ L)
- ↓ revelador: ácido tiobarbitúrico 6% (0.3mL)
- 100° C, 45 min
- ↓ 0-4° C
- ↓ n-butanol (1.4mL), agitación + centrifugación 4500 rpm,
4° C, 15 min

malondialdehído

Se inicia con la adición al medio de reacción de ácido ascórbico 0.4mM, se incuba 30 min a 37° C con agitación constante. Transcurrido este tiempo, una alícuota de 0.14 mL del medio se vierte sobre 1 mL de ácido fosfórico 1% para detener la reacción. Además, se añade 33 μ L de butilhidroxitolueno (BHT) 0.01% en etanol, para asegurar que la peroxidación lipídica se detenga, ya que se trata de un potente inhibidor de la peroxidación. De ahí, que se utilice como sustancia de referencia en esta misma técnica a la concentración de 10^{-4} M.

Para determinar el grado de peroxidación lipídica existente en el medio de reacción, se utiliza el test del ácido tiobarbitúrico (TBA)(Bernheim y cols., 1948), que revela al malondialdehído formado tras una serie de reacciones. Así, añadimos 0.3 mL de TBA 6% en agua destilada a la alícuota con la reacción detenida. Se incuba 45 min en baño maría a 100° C y se interrumpe la reacción con frío. Se añade 1.4 mL de n-butanol, disolvente orgánico que extrae el cromóforo mediante agitación y centrifugación a 4500 rpm, 4° C durante 15 min. La absorbancia se determina a una λ de 535 nm. Cuanto menor sea ésta es porque la capacidad inhibidora de la peroxidación de las sustancias ensayadas es mayor.

III.2.4. ACCION ANTIINFLAMATORIA.

Para determinar la actividad antiinflamatoria de hesperidina y neohesperidina dihidrochalcona seguimos el método de Winter (1962). Según esta técnica, provocamos una reacción de inflamación en la pata trasera derecha de ratas hembras (peso medio 180-200 g) mantenidas en ayunas 18 h antes del ensayo. La inflamación se induce mediante inyección s.c., de 0.1 mL de suspensión de carragenina al 1% en S.S.F., bajo la aponeuresis plantar.

Previo a la inyección de carragenina, se determina el volumen de la pata hasta su articulación tibio-tarsiana (V_0), mediante pletismómetro de Lence (Lence 1962). Se administra entonces por sonda intragástrica a razón de 1mL/100g:

- Grupo control: S.S.F.
- Grupo patrón: indometacina 25 mg/Kg.
- Grupos problema: Hesperidina y neohesperidina dihidrochalcona 100 y 150 mg/kg.

Pasada 1 h es cuando se inyecta vía s.c. la suspensión de carragenina. Transcurrida 3 y 5 h se mide el volumen de la pata hasta la misma articulación (V_t), pudiendose determinar el índice de inflamación (I) y el porcentaje de reducción del edema respecto al lote control (%AAI) (Piña y Armijo, 1978):

Indice de inflamación:

$$I = V_t 100 / V_0$$

Porcentaje de actividad antiinflamatoria (%AAI):

$$\%AAI = (I_c - I_x) 100 / (I_c - 100)$$

I_c = Indice de inflamación del lote control en su valor medio.

I_x = Indice de inflamación individual de cada rata.

III.2.5. ACCION SOBRE EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL.

III.2.5.1. PRUEBAS NEUROFARMACOLOGICAS.

El esquema de Irwin (Irwin, 1964; Turner, 1965) comporta una serie de pruebas simples, que nos proporcionan una idea general sobre la actividad neurofarmacológica del principio activo. Comprenden un estudio sobre el comportamiento, estado neurológico y actividad sobre el sistema nervioso autónomo.

El grado de afectación de los parámetros considerados, se comprueba por simple observación a los 30, 60, 120 y 240 min desde la administración.

Para la realización de las experiencias, hemos utilizado ratas Wistar, administrando todas las dosis en un volumen constante de 0.5 mL i.p..

Los efectos del fármaco, se han evaluado de acuerdo con una escala arbitraria de intensidad creciente de 0 a 8, confeccionada a partir de la observación de los animales sin tratamiento. La puntuación básica para los signos que aparecen normalmente, es de 0 ó 4 según el tipo de parámetro; una actividad hiponormal se puntuará con un valor inferior, correspondiéndose con una puntuación mayor de 4 las actividades hipernormales.

Los parámetros valorados se pueden encuadrar en tres apartados:

A. Estudio del comportamiento.

A.1. Estado de vigilancia.

- Grado de alerta.
- Estereotípia. Consiste en una serie de movimientos repetitivos realizados por el animal.
- Pasividad. Mide la respuesta del animal al ser colocado en una posición desacostumbrada.

A.2. Estado de ánimo.

- Aseo.
- Intranquilidad.
- Irritabilidad.

A.3. Actividad motora.

- Actividad espontánea. Mediante este parámetro se determina la actividad exploradora del animal tras colocarlo bajo un embudo grande de cristal.
- Reactividad. Se observa el comportamiento del animal al quitarle el embudo.
- Respuesta al tacto.

B. Estudio neurológico.

B.1. Excitación del S.N.C.

- Sobresalto al ruido.
- Fenómeno de Straub. Curvatura de la cola en forma de "S" sobre el dorso.
- Temblor.
- Convulsiones.

B.2. Incoordinación motora.

- Anormalidad al andar.
- Test de la voltereta. Cómo cae el animal tras hacerle girar en el aire dos o tres vueltas, cogiéndole de la cola.

B.3. Tono muscular.

- Fuerza presora. Se observa la facilidad con que el animal deja caer una varilla en posición horizontal.

B.4. Reflejos.

- Reflejo pinneal. Se valora tocando el interior de la oreja con un instrumento fino.
- Reflejo corneal. Se aprecia al contacto de la cornea con un instrumento.

C. Estudio del Sistema Nervioso Autónomo.

C.1. Signos oculares.

- Apertura palpebral.
- Exoftalmos.

C.2. Signos secretorios.

- Micción.
- Sialorrea.

C.3. Signos generales.

- Piloerección.
- Signo de retroceso.

III.2.5.2. ACTIVIDAD MOTORA: ACTIVIDAD MOTORA ESPONTANEA.

Hemos utilizado ratones Swiss machos con un peso medio de 25 a 30 g, mantenidos en ayunas 18 h antes de iniciar la experiencia. La administración de las diferentes dosis, se efectúa por vía intraperitoneal en un volumen constante de 0.3 mL para cada ratón, condiciones experimentales seguidas, en todas las pruebas relacionadas con el S.N.C..

El número de movimientos totales para cada lote, constituido por seis animales, se registra en un actímetro Panlab 0603, durante 15 min, a los 30 y 60 min de la administración (Sánchez y cols., 1988).

III.2.5.3. CONDUCTA EXPLORATORIA: TEST DE LA CURIOSIDAD.

Hemos seguido la técnica descrita por Boissier y Simow (Boissier y Simow, 1967).

Los ratones, se disponen en el centro de la plancha, y se registra el número de veces que cada ratón durante 5 min introduce la cabeza en los orificios, a los 30 y 60 de la administración.

III.2.5.4. CURIOSIDAD RESIDUAL: TEST DE LA EVASION.

Hemos utilizado una modificación del "Kletter-test" propuesto por Kneip (Kneip, 1960), por la cual, se contabiliza el número de evasiones efectuadas por el animal durante 5 min, a los 30 y 60 de la administración del fármaco.

III.2.5.5. COORDINACION MOTORA: TEST DEL ROTA-ROD.

Este ensayo, se usa para determinar la actividad miorrelajante de un fármaco (Dunham y Miya, 1957). En él se determina a los 30 y 60 min de su administración el tiempo que los ratones son capaces de estar sobre un rota-rod con una velocidad inicial de 5 rpm y una aceleración de 8 rpm.

III.2.5.6. RELAJACION MUSCULAR: TEST DE LA TRACCION.

Para la realización de este test utilizamos el dispositivo de Joulon-Courvoissier (Courvoissier, 1956), que nos permite comprobar, si los animales suspendidos de un alambre por sus extremidades anteriores, tardan más de 5 s en colocar las posteriores en dicho alambre. Previamente, se seleccionan los animales, desechando aquellos que tardan más de 5 s en realizar el movimiento.

III.2.6. ENSAYOS SOBRE ORGANO AISLADO.

III.2.6.1. EFECTO SOBRE DUODENO DE RATA.

Se emplearon ratas machos de raza Wistar de un peso aproximado de 250-300 g. Para la extracción del duodeno, seguimos el método descrito por Magnus (1948). El animal se sacrifica mediante un golpe en la nuca y posterior exanguinación. Tras la apertura de la cavidad abdominal se extraen unos 2 cm de duodeno, desde el píloro, y se coloca para su manipulación en una placa Petri que contiene solución nutritiva Tyrode a 37°C y con oxigenación constante de carbógeno (95% de oxígeno y 5% de dióxido de carbono). A continuación, se limpia el interior del intestino aislado, haciendo pasar por su luz solución nutritiva, con la ayuda de una jeringa. Se limpia de restos de mesenterio y se ata por sus extremos, de un lado, a una varilla que lo mantiene en el fondo de la copa del baño de órgano, y del otro, a un transductor isotónico (Harvard) conectado a un equipo registrador Omniscrite. El órgano se somete a una tensión inicial de 1 g, manteniendo el baño termostataado a 37° C y con burbujeo continuo de carbógeno.

La solución nutritiva que baña al duodeno, se renueva periódicamente, mientras se deja al órgano un periodo de equilibración de 1 h. La composición (mM) de la solución nutritiva Tyrode empleada es la siguiente: NaCl 136.90; KCl 2.68; CaCl₂ 0.90; NaHCO₃ 11.90; MgCl₂ 1.10; NaH₂PO₄ 0.42; Glucosa 5.50 (Espluges y Morcillo, 1982).

Transcurrido el periodo de estabilización (60 min), se adicionan concentraciones acumulativas de acetilcolina (Ach) desde 10^{-8} a 10^{-5} M.

Entre una y otra dosis se deja un periodo de tiempo breve y suficiente para que el duodeno responda.

Después de obtener 2 curvas control similares, se ensayaron HESP y NHDC incubándolas en baño durante 30 min a una concentración final de 10^{-4} M. A continuación, se adicionan las distintas dosis de Ach, comparándose las contracciones del músculo con la respuesta emitida en ausencia de los principios flavónicos.

III.2.6.2. EFECTO SOBRE UTERO DE RATA.

Se emplearon ratas hembras de raza Wistar de 150 g de peso a las cuales, 24 h antes del ensayo, se les administra vía intraperitoneal 5 mg de valerato de estradiol (Progynon Depot[®])/Kg de peso.

Se sacrifican y exanguinan, y tras la apertura de la cavidad abdominal, se aislan unos 2 cm de cada uno de los cuernos uterinos. Se sitúan en una placa Petri que contiene solución nutritiva de Jalon-Ringer a 31 °C con oxigenación constante. Se limpian de cualquier resto de tejido que tenga adherido y se ata un extremo al soporte, que lo fijará en el fondo de la copa del baño. El otro extremo, se ligará mediante hilo a un transductor isométrico (Harvard), que estará conectado al registrador para recoger las variaciones del útero. Se ajusta a una tensión de 1 g y se mantiene en reposo durante 60 min en la solución nutritiva, termostatizada a 31°C y gaseada con carbógeno, que se renueva cada 10 min.

Pasado el citado periodo de reposo, se cambia la solución del baño a una despolarizante, que contiene 10 veces la concentración de K⁺ de la anterior (Edwards y cols., 1986). Esto, provoca una contracción sostenida del útero, al que una vez estabilizado, se le adicionan dosis acumulativas al doble de histamina (1.610⁻⁶M - 2·10⁻⁴M) dejando un periodo de 5 min entre ellas.

Tras la despolarización y estabilización del útero, se adiciona al baño una dosis de hesperidina o neohesperidina dihidrochalcona (10^{-4}M), o bien de ranitidina ($3 \cdot 10^{-5}\text{M}$), incubándose durante 30 min. Pasado este tiempo, se inicia la adición de las distintas dosis de histamina.

La composición (mM) de las soluciones nutricias utilizadas son (Kitchen, 1884):

- Solución **Jalon-Ringer**: NaCl 154.00; KCl 5.63; CaCl_2 0.65; NaHCO_3 5.95; Glucosa 2.77.

- Solución **Jalon-Ringer despolarizante**: NaCl 103.30; KCl 56.30; CaCl_2 0.65; NaHCO_3 5.95; Glucosa 2.77.

III.2.6.3. EFECTO SOBRE CONDUCTO DEFERENTE DE RATA.

Las experiencias sobre conducto deferente se llevaron a cabo según la técnica descrita por Leach (1956). El órgano obtenido de ratas macho de raza Wistar, debe comprender la porción que va desde el epidídimo, hasta su desembocadura en la vesícula seminal y próstata. Se limpia de grasa envolvente y adherencias mesentéricas, se liga por sus extremos y se coloca en baño de órganos de modo, que la porción prostática (la más gruesa) esté más próxima a la entrada de oxígeno al baño, y el extremo opuesto, la porción epididimal, se une a un transductor isométrico (Harvard), acoplado a un equipo de registro Omniscribe.

El órgano sometido a una tensión inicial de 1 g, se equilibra en la siguiente solución nutritiva (mM) preparada en agua destilada (Picarelli y cols., 1962), siempre a 31 °C: NaCl 138.00; KCl 5.70; CaCl₂ 1.80; NaHCO₃ 15.00; NaH₂PO₄H₂O 0.36; Dextrosa 5.50.

Tras un periodo de equilibración de 60 min, se realizan curvas dosis-efecto con noradrenalina (NA) (10^{-7} - 10^{-4} M) hasta obtener 2 curvas control similares. Posteriormente, se administra al baño hesperidina y neohesperidina dihidrochalcona (10^{-4} M), dejando actuar durante 30 min y se vuelve a repetir la curva con el agonista, para estudiar el efecto el mismo.

III.2.6.4. EFECTO SOBRE FUNDUS DE RATA.

Las tiras de fundus gástrico se obtienen de acuerdo con la técnica de Vane (1957). Tras el sacrificio del animal, se le extrae el estómago, que se secciona por la línea de separación corpus-fundus. Nos quedamos con la zona fúndica, que se abre por su curvatura menor y se disecciona perpendicularmente a ésta, en forma de zig-zag, para preservar las fibras longitudinales de la capa muscular. La tira de fundus gástrico obtenida, se incuba en solución de **Krebs-bicarbonato** con atropina 10^{-7} M a 37° C, y con una tensión inicial de 1 g.

La composición (mM) de la solución nutritiva es (Espluges y Morcillo, 1982): NaCl 118.00; KCl 4.70; CaCl_2 2.50; NaHCO_3 25.00; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.10; KH_2PO_4 1.00; Glucosa 11.00.

El tiempo preciso para que se estabilice el órgano, es de 30 min, registrándose las contracciones con un transductor isotónico (Harvard) conectado a un equipo (Omniscribe). Se toman como patrón las contracciones de fundus inducidas por serotonina (5-HT) 10^{-7} M (dosis submaximal), observando su modificación en presencia de hesperidina o neohesperidina dihidrochalcona (10^{-4} M).

RESULTADOS

IV.1. ULCERAS GASTRICAS AGUDAS EXPERIMENTALES.

IV.1.1. ULCERA INDUCIDA POR INMOVILIZACION Y FRIO.

En la tabla I se observa como hesperidina y neohesperidina dihidrochalcona presentan una marcada capacidad para inhibir el índice de ulceración, que en ambos casos sigue una clara relación dosis-efecto (Fig. 1).

Hesperidina (100 y 150 mg/Kg) origina disminución significativa del índice de ulceración y superficie ulcerada respecto al grupo control, aunque es neohesperidina dihidrochalcona la que muestra mayor eficacia, ya que la dosis de 150 mg/Kg supera el efecto de ranitidina (100 mg/Kg).

La cantidad de moco gástrico (Tabla II) no experimenta variaciones significativas, así como su contenido proteico. Sin embargo, la concentración de hexosaminas, aumenta (Fig. 2, 3, 4) significativamente para ambos principios. En la determinación del contenido en prostaglandinas endógenas de la mucosa gástrica (Tabla III, Fig. 5) se aprecia, un aumento de éstas respecto al grupo sin ulcerar (control 1). En relación al grupo control 2, lote ulcerado sin tratamiento, hesperidina y neohesperidina dihidrochalcona originan una disminución de la concentración de prostaglandinas, que en ningún caso es significativa.

TABLA I**ULCERA GASTRICA INDUCIDA POR INMOVILIZACION Y FRIO**

LOTE	Indice de ulceración (I.U.)	Incidencia de úlceras (%)	Superficie ulcerada (mm ²)
Control	2.50 ± 0.50	83.33	4.87 ± 1.06
Ranitidina 100 mg/kg	0.33 ± 0.21 **	33.33	1.46 ± 0.52 *
HESP 100 mg/kg	0.83 ± 0.40 *	50.00	1.37 ± 0.55 *
HESP 150 mg/kg	0.50 ± 0.34 **	33.33	1.42 ± 0.21 **
NHDC 100 mg/kg	0.67 ± 0.42 *	33.33	1.63 ± 0.60 *
NHDC 150 mg/kg	0.17 ± 0.10 **	16.67	0.87 ± 0.15 **

Significancia determinada por el test t-Student:

* p<0.050, ** p<0.010.

ULCERA INDUCIDA POR INMOVILIZACION-FRIO

INDICE DE ULCERACION

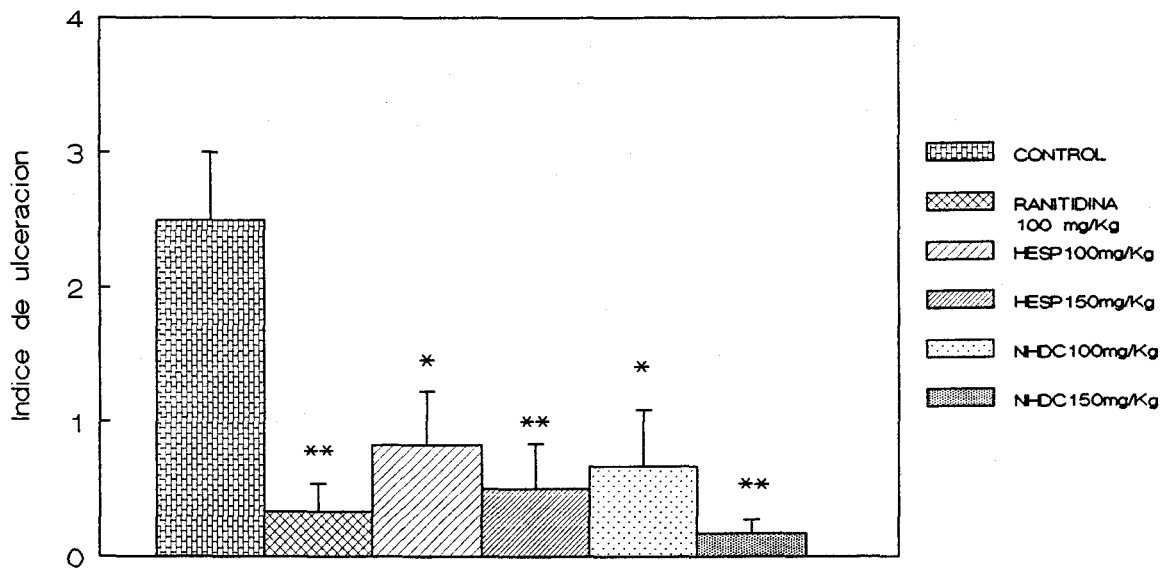


Fig. 1

TABLA II**CONTENIDO GLICOPROTEICO DEL MOCO GASTRICO**
Ulcera inducida por inmovilizacion y frio

LOTE	Peso moco (g)	Concentración proteínas totales (mg/mL)	Concentración hexosaminas (μ g/mL)
Control	0.113 \pm 0.021	0.93 \pm 0.08	77.52 \pm 4.83
Ranitidina 100 mg/kg	0.038 \pm 0.011 *	0.55 \pm 0.03 **	70.56 \pm 2.68 n.s.
HESP 100 mg/kg	0.088 \pm 0.026 n.s.	0.85 \pm 0.14 n.s.	70.53 \pm 3.92 n.s.
HESP 150 mg/kg	0.102 \pm 0.030 n.s.	1.01 \pm 0.17 n.s.	123.17 \pm 4.11 ***
NHDC 100 mg/kg	0.040 \pm 0.010 *	0.54 \pm 0.08 **	111.17 \pm 2.87 ***
NHDC 150 mg/kg	0.073 \pm 0.010 n.s.	0.91 \pm 0.11 n.s.	117.37 \pm 2.98 ***

Significancia determinada por el test t-Student:

n.s. no significativo, * $p < 0.050$, ** $p < 0.010$, *** $p < 0.001$.

ULCERA INDUCIDA POR INMOVILIZACION-FRIO MOCO GASTRICO

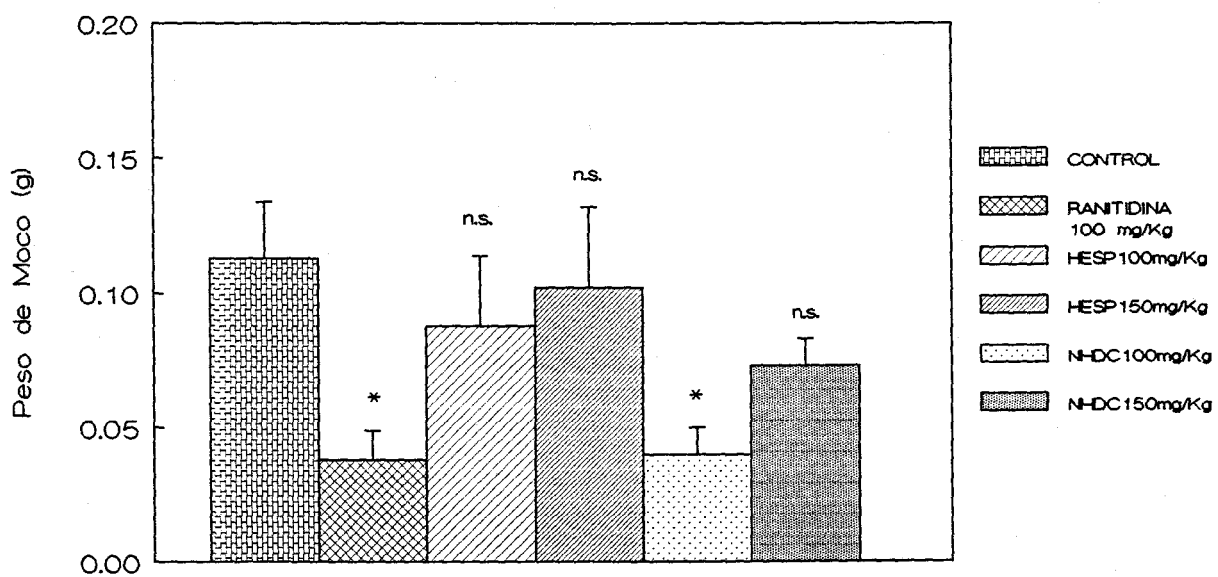


Fig. 2

ULCERA INDUCIDA POR INMOVILIZACION-FRIO

PROTEINAS TOTALES DEL MOCO GASTRICO

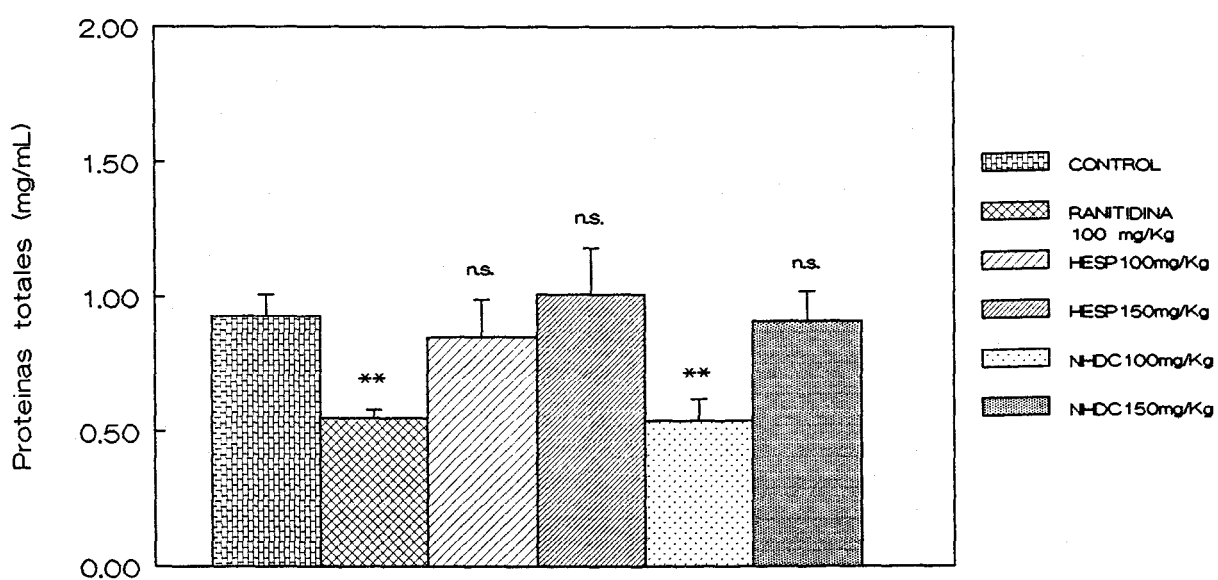


Fig. 3

ULCERA INDUCIDA POR INMOVILIZACION-FRIO HEXOSAMINAS DEL MOCO GASTRICO

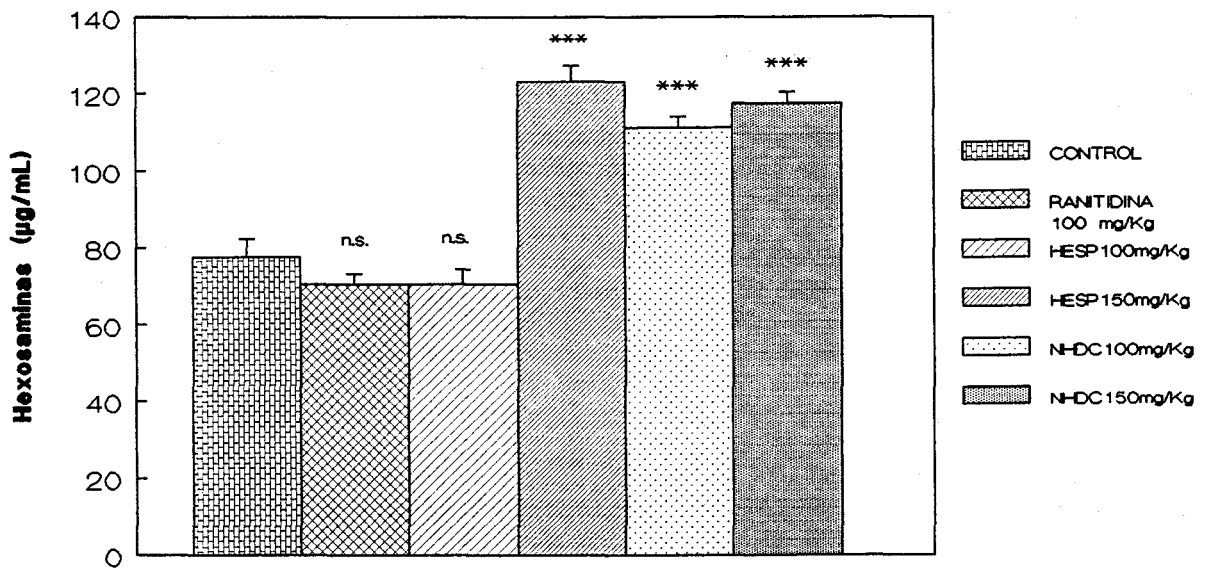


Fig. 4

TABLA III

PROSTAGLANDINAS DEL MOCO GASTRICO
Úlcera inducida por inmovilización y frío

LOTE	Peso moco (g)	Conc. prostaglandinas (pg/mg)
Control 1 (Sin úlcera)	0.080 ± 0.001	16.44 ± 0.45
Control 2 (Stress)	0.113 ± 0.021	80.42 ± 30.37
HESP 100 mg/kg	0.088 ± 0.026 n.s.	43.55 ± 15.85 n.s.
HESP 150 mg/kg	0.102 ± 0.030 n.s.	42.33 ± 8.17 n.s.
NHDC 100 mg/kg	0.040 ± 0.010 *	64.92 ± 25.42 n.s.
NHDC 150 mg/kg	0.073 ± 0.010 n.s.	33.42 ± 9.60 n.s.

Significancia determinada por el test t-Student:
n.s. no significativo, * $p < 0.050$.

ULCERA INDUCIDA POR INMOVILIZACION-FRIO PROSTAGLANDINAS DEL MOCO GASTRICO

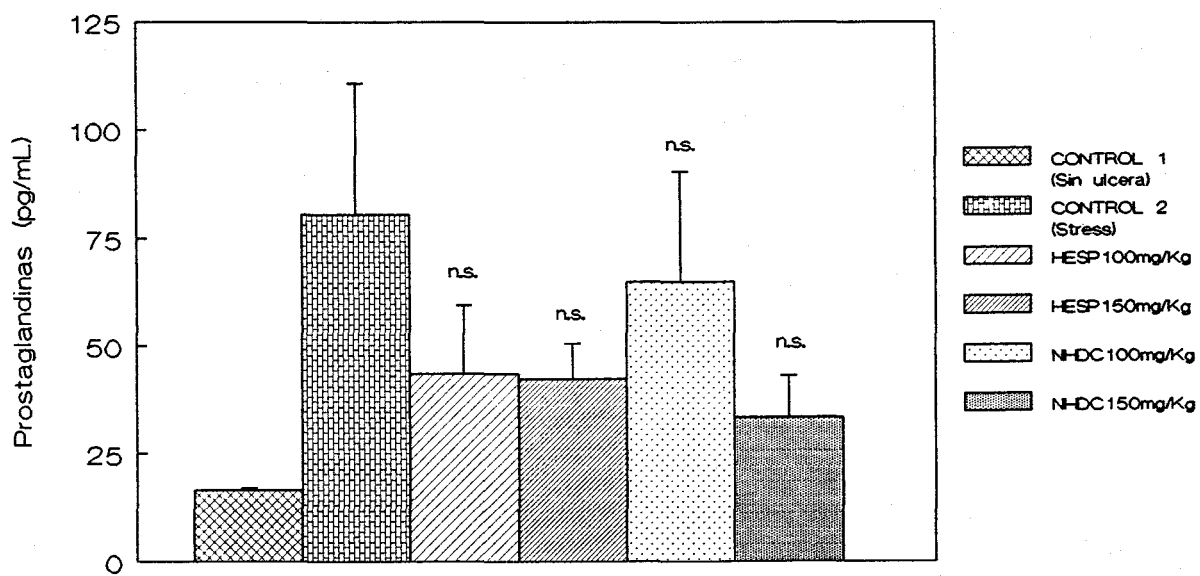


Fig. 5

IV.1.2. ULCERA INDUCIDA POR ETANOL ABSOLUTO.

La tabla IV nos muestra los datos obtenidos en este modelo de úlcera experimental. Se observa una acción citoprotectora del principio neohesperidina dihidrochalcona tanto a la dosis de 100 mg/Kg como a la 150 mg/Kg. Ambas dosis de hesperidina también dan lugar a un menor índice de ulceración y superficie ulcerada respecto al grupo control, pero sin llegar a ser significativo (Fig.6).

La tabla V y las figuras 7, 8 y 9 desvelan el estudio bioquímico realizado al moco gástrico de los animales sometidos a ulceración por instilación de 1 mL de etanol absoluto. La cantidad de moco secretado por los animales tratados no se modifica de forma significativa respecto al lote control (lote ulcerado y sin tratamiento). Al analizar su composición vemos que si bien no se modifica de forma general el contenido proteico (solo se ve aumentado con la dosis de 100 mg/Kg de neohesperidina dihidrochalcona), los resultados son distintos al determinar el contenido glucídico, ya que con ambos principios se experimenta una disminución destacada de la concentración de hexosaminas.

La determinación de prostaglandinas (Tabla VI, Fig. 10) para los grupos que consiguen un resultado positivo en este tipo de ulceración, no revela ninguna variación significativa respecto al grupo control 2. Si bien respecto al grupo control 1 (lote sin ulcerar) se encuentra disminuida.

TABLA IV

ULCERA GASTRICA INDUCIDA POR ETANOL ABSOLUTO

LOTE	Indice de ulceración (I.U.)	Superficie ulcerada (mm ²)
Control	6.56 ± 0.41	241.11 ± 38.68
Carbenoxolona 80 mg/kg	3.20 ± 0.49 ***	52.77 ± 13.93 *
HESP 100 mg/kg	4.33 ± 0.80 *	145.25 ± 43.29 n.s.
HESP 150 mg/kg	5.50 ± 0.43 n.s.	161.54 ± 17.66 n.s.
NHDC 100 mg/kg	4.00 ± 0.45 **	112.42 ± 10.84 *
NHDC 150 mg/kg	4.62 ± 0.37 **	124.00 ± 18.21 *

Significancia determinada por el test t-Student:

n.s. no significativo, * p<0.050, ** p<0.010, *** p<0.001.

ULCERA INDUCIDA POR ETANOL ABSOLUTO

INDICE DE ULCERACION

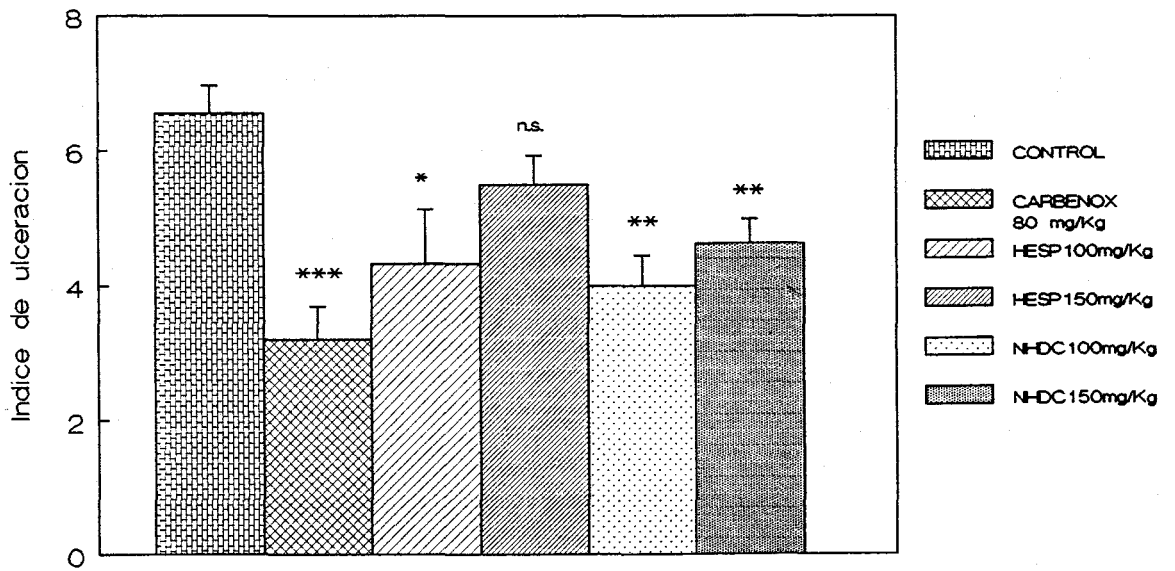


Fig. 6

TABLA V

CONTENIDO GLICOPROTEICO DEL MOCO GASTRICO
Úlcera inducida por etanol absoluto

LOTE	Peso moco (g)	Concentración proteínas totales (mg/mL)	Concentración hexosaminas (μ g/mL)
Control	0.553 \pm 0.102	4.56 \pm 0.47	55.66 \pm 3.15
Carbenoxolona 80 mg/Kg	0.785 \pm 0.070 n.s.	9.54 \pm 1.78 **	78.76 \pm 2.70 **
HESP 100 mg/kg	0.475 \pm 0.123 n.s.	4.78 \pm 0.80 n.s.	32.47 \pm 3.42 ***
HESP 150 mg/kg	0.683 \pm 0.093 n.s.	5.10 \pm 0.41 n.s.	34.10 \pm 3.11 ***
NHDC 100 mg/kg	0.807 \pm 0.222 n.s.	7.06 \pm 0.71 **	31.48 \pm 2.87 ***
NHDC 150 mg/kg	0.743 \pm 0.076 n.s.	4.33 \pm 0.46 n.s.	41.15 \pm 0.93 ***

Significancia determinada por el test t-Student:

n.s. no significativo, * $p < 0.050$, ** $p < 0.010$, *** $p < 0.001$.

ULCERA INDUCIDA POR ETANOL ABSOLUTO

MOCO GASTRICO

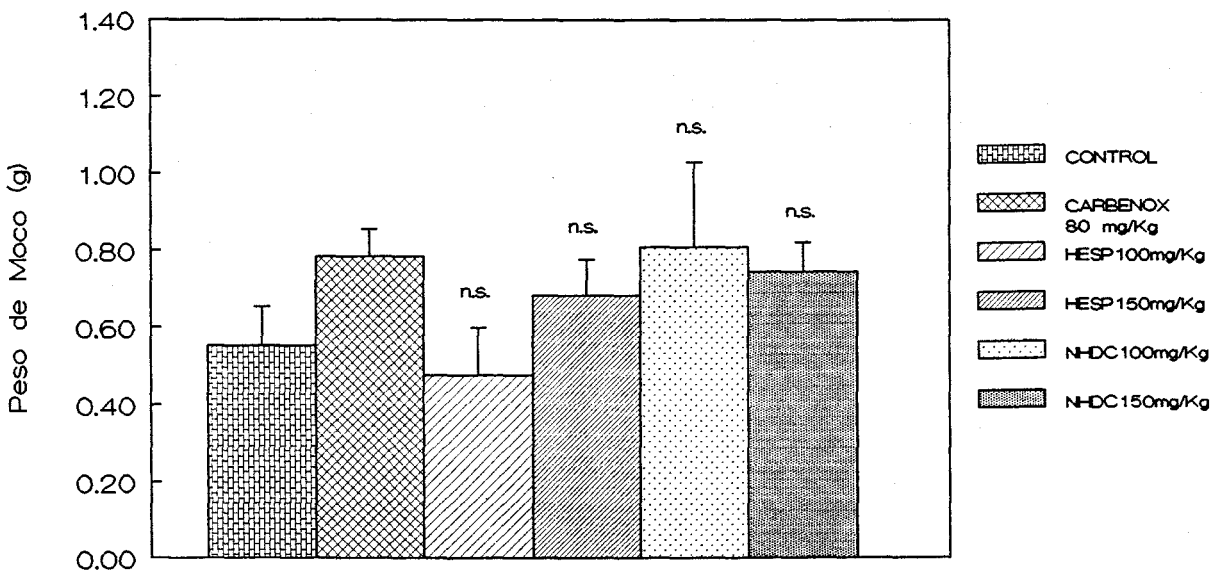


Fig. 7

ULCERA INDUCIDA POR ETANOL ABSOLUTO

PROTEINAS TOTALES DEL MOCO GASTRICO

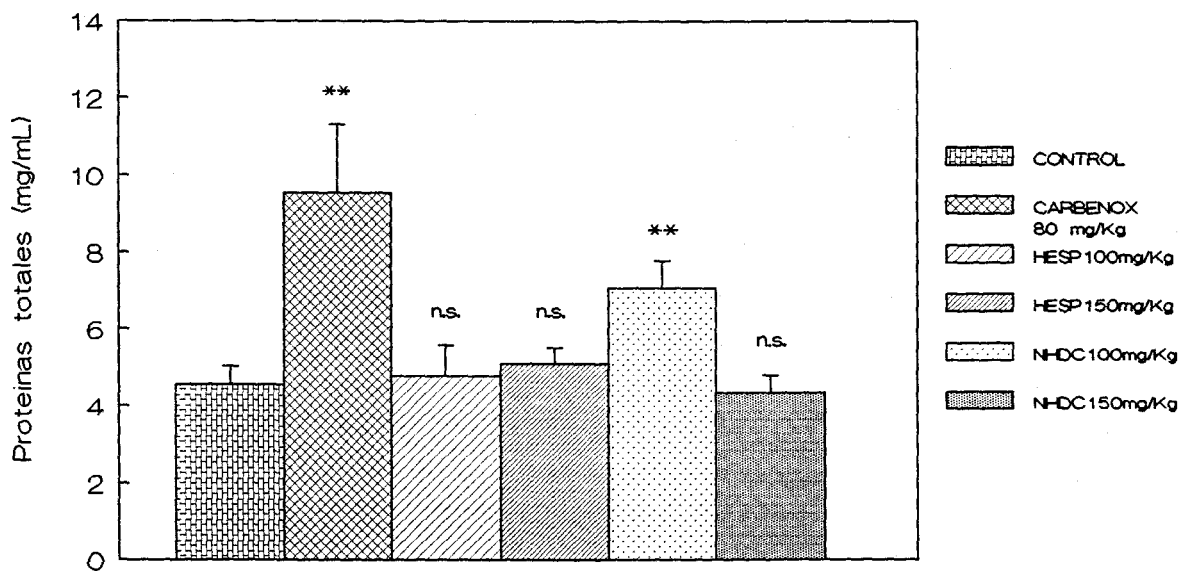


Fig. 8

ULCERA INDUCIDA POR ETANOL ABSOLUTO HEXOSAMINAS DEL MOCO GASTRICO

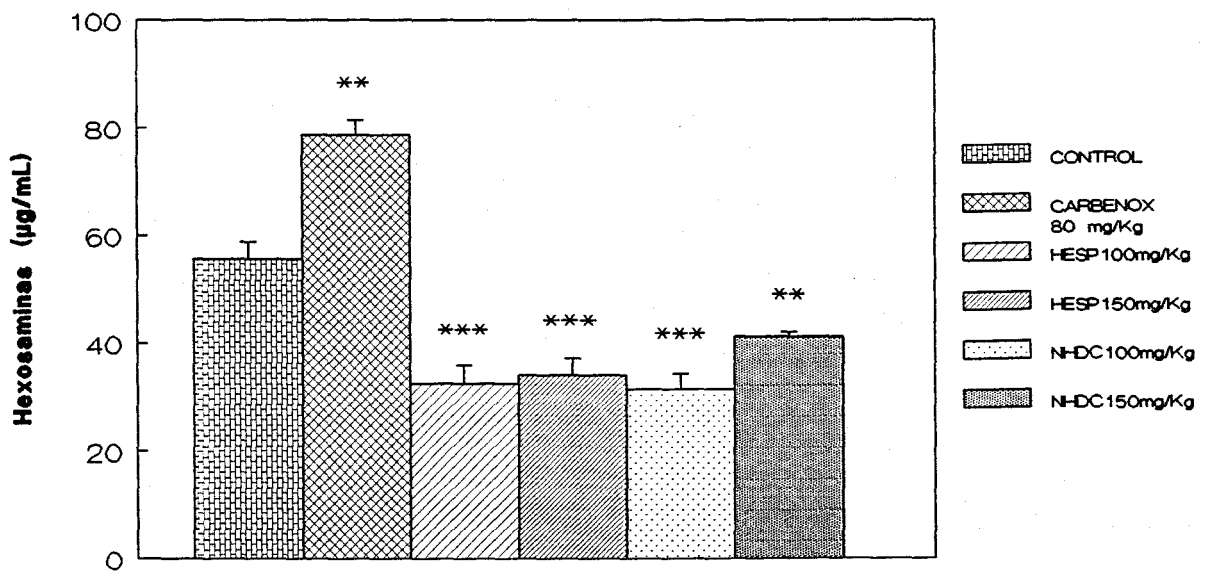


Fig. 9

TABLA VI

PROSTAGLANDINAS DEL MOCO GASTRICO
Úlcera inducida por etanol absoluto

LOTE	Peso moco (g)	Conc. prostaglandinas (pg/mg)
Control 1 (Sin úlcera)	0.080 ± 0.001	16.44 ± 0.45
Control 2 (etanol abs.)	0.553 ± 0.102	4.51 ± 0.40
NHDC 100 mg/kg	0.807 ± 0.222 n.s.	5.04 ± 0.53 n.s.
NHDC 150 mg/kg	0.743 ± 0.076 n.s.	4.43 ± 1.39 n.s.

Significancia determinada por el test t-Student:
n.s. no significativo.

ULCERA INDUCIDA POR ETANOL ABSOLUTO PROSTAGLANDINAS DEL MOCO GASTRICO

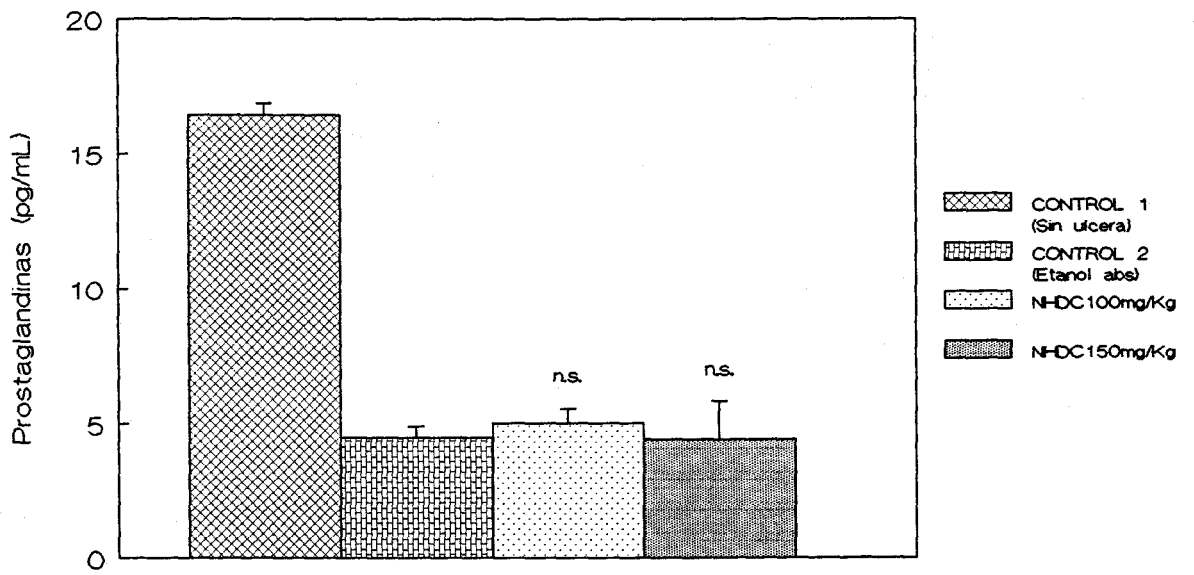


Fig. 10

IV.1.3. PROTECCION CRONICA SOBRE LA ULCERA INDUCIDA POR ETANOL ABSOLUTO.

Cuando el tratamiento con los principios se realiza de forma crónica a la dosis seleccionada de 100 mg/Kg (Tabla VII, Fig. 11), no se observan mayores variaciones respecto al tratamiento agudo con hesperidina. Sin embargo, neohesperidina dihidrochalcona tiene mayor capacidad para proteger la mucosa gástrica, ya que los valores de índice de ulceración y superficie ulcerada presentan una mayor significancia que en la administración de una dosis única (Tabla IV).

En el estudio del contenido glicoproteico del moco (Tabla VIII, Fig. 12, 13, 14) se observa que si bien las proteínas totales no experimentan ningún tipo de cambio, las hexosaminas sí se ven aumentadas significativamente para ambos principios.

TABLA VII

**PROTECCION CRONICA SOBRE LA ULCERA GASTRICA
INDUCIDA POR ETANOL ABSOLUTO**

LOTE	Indice de ulceración (I.U.)	Superficie ulcerada (mm ²)
Control	6.56 ± 0.41	241.11 ± 38.68
HESP 100 mg/kg	5.50 ± 0.57 n.s.	191.19 ± 35.02 n.s.
NHDC 100 mg/kg	3.78 ± 0.32 ***	117.31 ± 9.26 **

Significancia determinada por el test t-Student:
n.s. no significativo, ** p<0.010, *** p<0.001.

ULCERA INDUCIDA POR ETANOL ABSOLUTO
PROTECCION CRONICA. INDICE DE ULCERACION

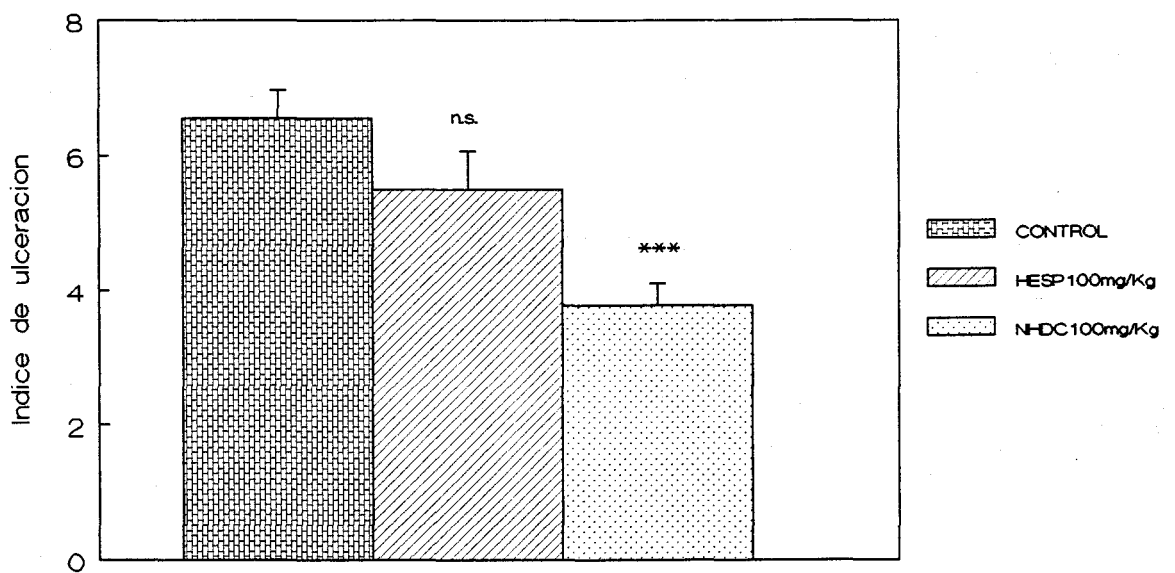


Fig. 11

TABLA VIII

CONTENIDO GLICOPROTEICO DEL MOCO GASTRICO Protección crónica sobre la úlcera inducida por etanol absoluto

LOTE	Peso moco (g)	Concentración proteínas totales (mg/mL)	Concentración hexosaminas (μ g/mL)
Control	0.553 \pm 0.102	4.56 \pm 0.47	55.66 \pm 3.15
HESP 100 mg/kg	0.880 \pm 0.079 n.s.	4.26 \pm 0.33 n.s.	120.17 \pm 1.86 ***
NHDC 100 mg/kg	0.834 \pm 0.089 n.s.	4.89 \pm 0.21 n.s.	140.96 \pm 5.92 ***

Significancia determinada por el test t-Student:
n.s. no significativo, *** $p < 0.001$.

ULCERA INDUCIDA POR ETANOL ABSOLUTO
PROTECCION CRONICA. MOCO GASTRICO

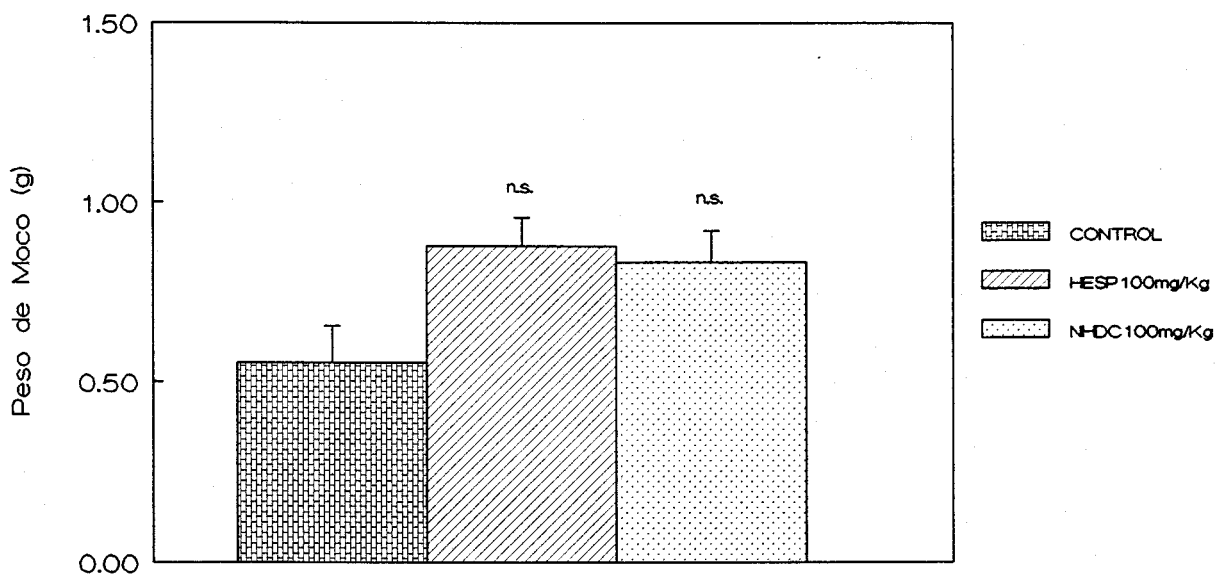


Fig. 12

ULCERA INDUCIDA POR ETANOL ABSOLUTO PROTECCION CRONICA. PROTEINAS TOTALES

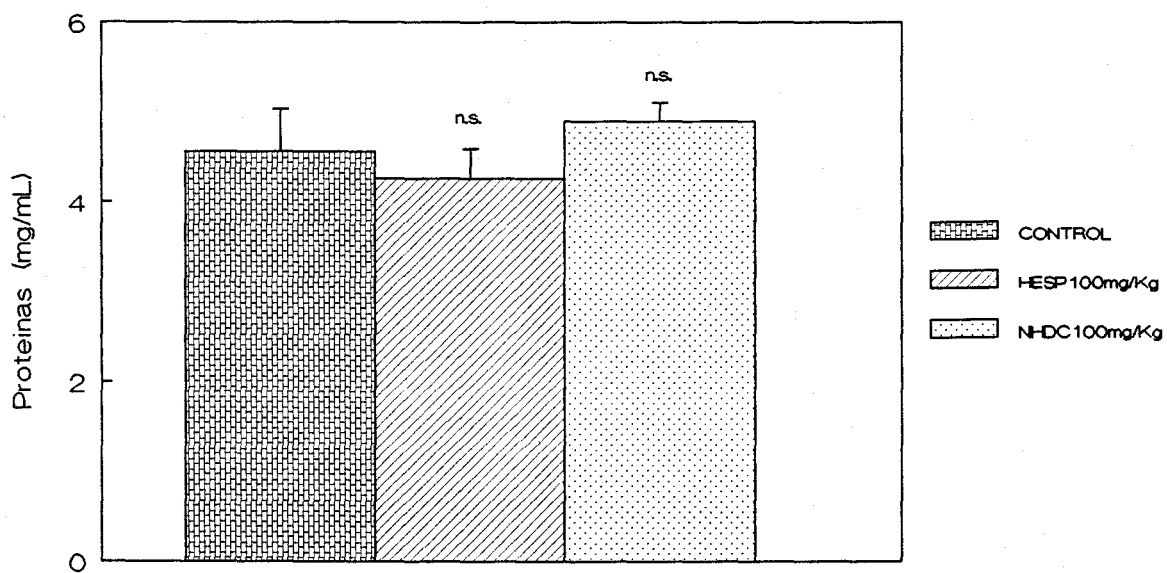


Fig. 13

ULCERA INDUCIDA POR ETANOL ABSOLUTO
PROTECCION CRONICA. HEXOSAMINAS

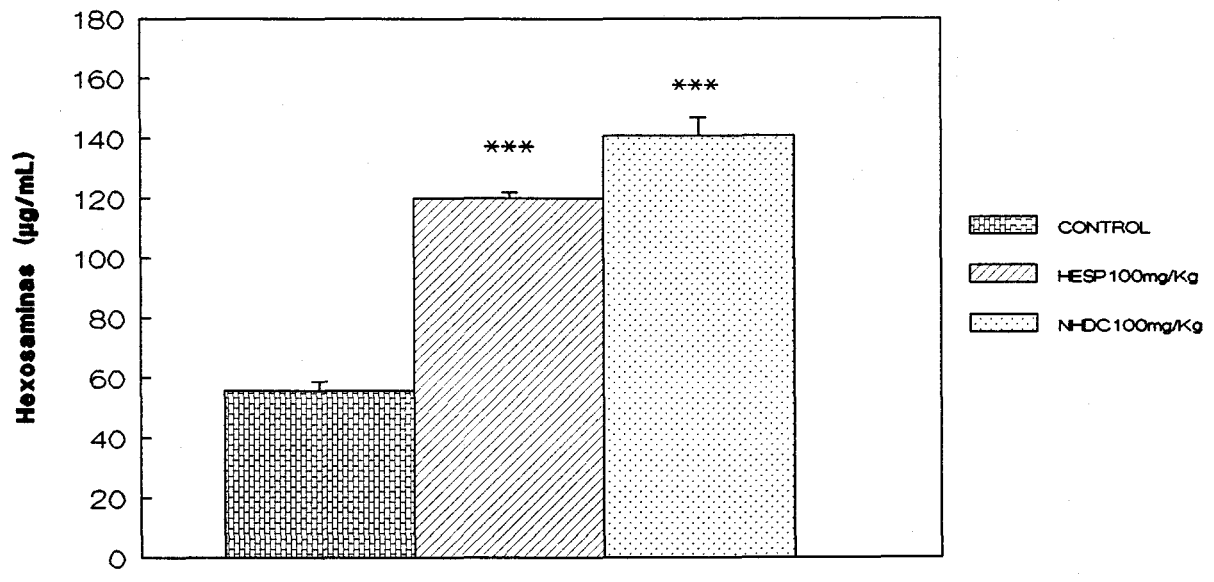


Fig. 14

IV.1.4. MODIFICACIONES PROVOCADAS EN LA ULCERA INDUCIDA POR ETANOL: PRETRATAMIENTO CON INDOMETACINA.

En la tabla IX observamos cómo neohesperidina dihidrochalcona 100 mg/Kg (dosis que se mostró más activa en ensayos anteriores), presenta un efecto citoprotector que continua siendo significativo respecto al grupo control en la úlcera gástrica inducida por etanol absoluto y pretratamiento con indometacina.

El estudio bioquímico del moco gástrico nos indica, que si bien su contenido proteico está disminuido respecto a su grupo control, las hexosaminas se encuentran aumentadas significativamente (Tabla X).

TABLA IX

**PRETRATAMIENTO CON INDOMETACINA EN LA ULCERA
INDUCIDA POR ETANOL ABSOLUTO**

LOTE	Indice de ulceración (I.U.)	Superficie ulcerada (mm ²)
Control	5.66 ± 0.53	277.58 ± 71.41
NHDC 100 mg/kg	4.29 ± 0.28 *	127.75 ± 11.25 *

Significancia determinada por el test t-Student:

* p<0.050.

TABLA X

CONTENIDO GLICOPROTEICO DEL MOCO GASTRICO
Pretratamiento con indometacina en la úlcera inducida por etanol absoluto

LOTE	Peso moco (g)	Concentración proteínas totales (mg/mL)	Concentración hexosaminas (μ g/mL)
Control	0.445 \pm 0.079	5.82 \pm 0.12	74.43 \pm 2.19
NHDC 100 mg/kg	0.393 \pm 0.034 n.s.	2.58 \pm 0.07 ***	119.38 \pm 2.91 ***

Significancia determinada por el test t-Student:
n.s. no significativo, *** $p < 0.001$.

IV.1.5. DISCUSION DE RESULTADOS.

Hesperidina y neohesperidina dihidrochalcona, presentan una marcada capacidad para inhibir el índice de ulceración, al utilizar la técnica de Senay y Levine (1967). En ambos casos, se observa una marcada relación dosis-efecto, con unos valores próximos a la ranitidina, sustancia ésta que, al inhibir la actividad histaminérgica, reduce considerablemente la secreción de ácido y pepsina independientemente del estímulo secretor (Daly y cols., 1981; Humphray y cols., 1986; Ruves y Stables, 1987; Sewing y cols., 1988).

No modifican el contenido en moco gástrico, al que ciertos autores (Clamp, 1989) le atribuyen un importante papel citoprotector, junto con el bicarbonato, mientras otros (Robert y Kauffman, 1984) consideran que su función citoprotectora es muy limitada.

Nuestros datos coinciden con los obtenidos por otros autores (Tsukada y cols., 1989) que demuestran que el stress produce en el animal de experimentación un descenso en la secreción de moco, afirmando que no solo existe una menor síntesis de sus componentes, sino que además varía su calidad.

Con nuestras muestras en general, no se modifica el contenido proteico, aunque sí se incrementa de forma significativa el de hexosaminas con la dosis de 150 mg/Kg de hesperidina, y con ambas dosis de neohesperidina dihidrochalcona.

Cuando la úlcera aguda la provocamos por administración de 1 mL de etanol absoluto, se observa una actividad antiulcerosa con neohesperidina dihidrochalcona tanto a dosis de 100 como de 150 mg/Kg. Sin embargo, a estas mismas dosis, hesperidina se muestra inactiva. Asimismo, en el ensayo de protección crónica neohesperidina dihidrochalcona (100 mg/Kg) se muestra más efectiva que en el tratamiento unidosis, mientras que hesperidina (100 mg/Kg) sigue sin mostrar acción citoprotectora.

En este modelo experimental, se producen graves alteraciones de la mucosa gástrica, que conllevan un aumento de la permeabilidad iónica de ésta (Szabo y Goldberg, 1990), así como acumulación de radicales libres tóxicos (De la Cruz y Sanchez de la Cuesta, 1990), y liberación de enzimas lisosomales (Salim, 1990).

No hay cambios significativos en la cantidad de moco secretado. Al analizar su composición, vemos que si bien no se modifica de forma general el contenido proteico (sólo con la dosis de 100 mg/Kg de neohesperidina dihidrochalcona) los resultados son distintos al determinar su contenido glucídico, ya que con ambos principios se origina una disminución destacada de la concentración de hexosaminas. En cambio, en el tratamiento crónico neohesperidina dihidrochalcona genera un moco de mayor calidad en cuanto a su contenido glucídico, así como hesperidina, que además aumenta la cantidad de moco secretado respecto al tratamiento en una sola dosis.

Estos resultados, nos permiten comprobar, que el moco no es responsable de la actividad antiulcerosa. Existen razones de peso, que hacen pensar que el moco por sí solo es incapaz de proteger la mucosa gástrica (Brooks, 1985).

Numerosas experiencias han demostrado un papel citoprotector de las prostaglandinas a nivel de la mucosa gástrica, especialmente rica en PGE₂ (Robert, 1979; Szabo y cols., 1981; Wilson, 1986; Walt, 1990). Estos mediadores, además de mantener la integridad de las células parietales, protegen la mucosa gástrica frente a lesiones provocadas por distintos agentes necrosantes (Robert y cols., 1983; Schmidt y cols., 1985).

La determinación analítica de las prostaglandinas del moco gástrico, a las dosis en que han manifestado actividad antiulcerosa en cada modelo experimental, no muestra variación significativa respecto al grupo control, en ninguno de ellos.

Estos resultados, nos sugieren que están implicados otros mecanismos distintos a los mediados por prostaglandinas. Cabe pensar, que en el efecto antiulceroso de hesperidina y neohesperidina dihidrochalcona influyan otros factores relacionados con un efecto vasoprotector, muy alterado en estos modelos experimentales, así como sus propiedades antioxidantes u otros mecanismos.

IV.2. ACCION SOBRE LA PERMEABILIDAD VASCULAR.

En la determinación del grado de modificación de la permeabilidad vascular a nivel de la mucosa gástrica, tras la lesión provocada por instilación de etanol absoluto, no encontramos variación significativa de la permeabilidad de los lotes pretratados con hesperidina y neohesperidina dihidrochalcona, respecto al lote control, como se puede observar en la tabla XI y figura 15.

TABLA XI**PERMEABILIDAD VASCULAR MUCOSAL**

LOTE	Azul de Evans por unidad de peso de tejido (mg/mg)	% disminución de la permeabilidad vascular
Control 1 (sin úlcera)	$1.8599 \pm 0.4659 \cdot 10^{-5}$	-----
Control 2 (etanol abs.)	$9.1421 \pm 1.7075 \cdot 10^{-5}$	-----
HESP 100 mg/kg	$8.0299 \pm 1.0999 \cdot 10^{-5}$ n.s.	12.17
HESP 150 mg/kg	$9.2499 \pm 1.7044 \cdot 10^{-5}$ n.s.	- 1.18
NHDC 100 mg/kg	$8.9788 \pm 1.1051 \cdot 10^{-5}$ n.s.	1.79
NHDC 150 mg/kg	$8.9550 \pm 0.6556 \cdot 10^{-5}$ n.s.	2.05

Significancia determinada por el test t-Student:

n.s. no significativo, *** $p < 0.001$.

PERMEABILIDAD VASCULAR MUCOSAL AZUL DE EVANS EXTRAVASADO

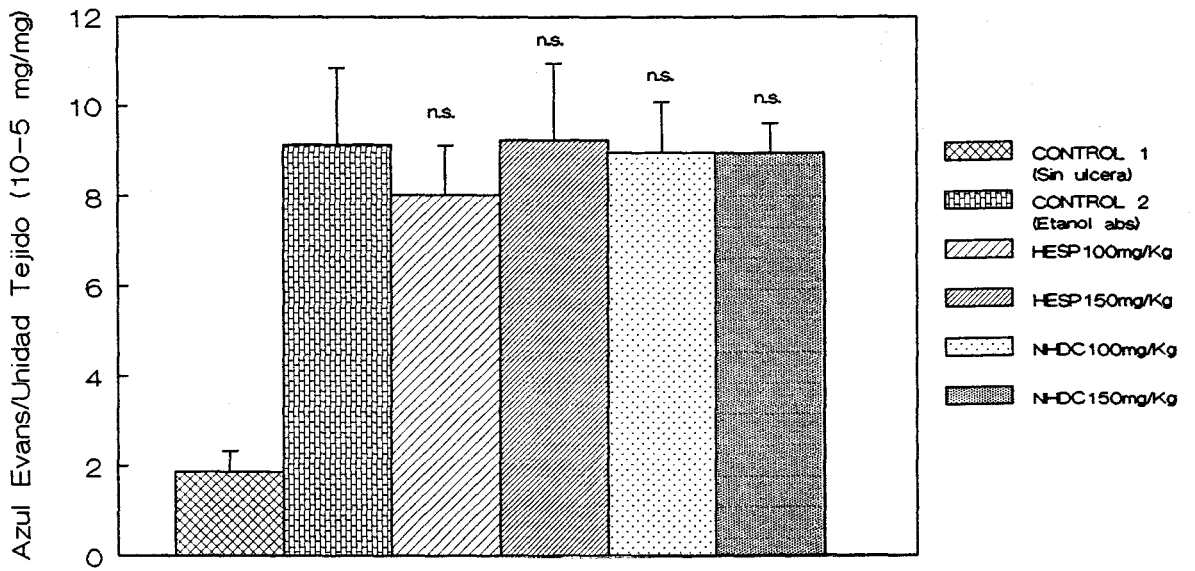


Fig. 15

IV.2.1. DISCUSION DE RESULTADOS

La valoración de la permeabilidad vascular, nos permite observar la influencia que puede ejercer hesperidina y neohesperidina dihidrochalcona sobre el flujo sanguíneo, ya que es uno de los factores que colabora en la integridad de la mucosa gástrica (Whittle, 1989,1993)

Tanto las lesiones inducidas por etanol (Sarfeh y cols., 1983) como las provocadas por situaciones de stress (Kitajima y cols., 1988) y otros agentes ulcógenos, están íntimamente relacionadas con las alteraciones a nivel vascular.

La vasoconstricción previa, seguida de una vasodilatación de arterias y arteriolas originada por los agentes ulcógenos, provocan un engrosamiento de los capilares de la mucosa y un incremento de la presión intracapilar, que unido al aumento de la permeabilidad y a la presencia de mediadores inflamatorios en los tejidos, originan un edema intenso de la mucosa gástrica que lleva a la formación del blister hiperémico (Hollander y cols., 1989).

Los resultados obtenidos al estudiar la exteravasación inducida, en las zonas lesionadas de la mucosa gástrica, nos ponen de manifiesto, la ineficacia de hesperidina y neohesperidina dihidrochalcona para ejercer un mecanismo protector a nivel de los vasos. A la vista de estos resultados, el efecto antiulceroso habrá que relacionarlo con otro u otros de los procesos implicados en la protección de la mucosa gástrica

IV.3. ACCION ANTIOXIDANTE *IN VITRO*.

Los valores obtenidos al determinar la actividad antioxidante *in vitro* de hesperidina y neohesperidina dihidrochalcona se refleja en la tabla XII.

En los tres ensayos realizados: actividad captadora de radicales superóxido, actividad captadora de radicales hidroxilo, y peroxidación lipídica no enzimática, neohesperidina dihidrochalcona (10^{-4} - $5 \cdot 10^{-3}$ M) muestra propiedades antioxidante significativas, que en los tres ensayos realizados, supera a las propias sustancias de referencia.

Con hesperidina, no se consigue la homogeneidad de resultados logrados con neohesperidina dihidrochalcona. Con respecto a la actividad captadora de radicales superóxido, hesperidina se muestra activa a las dos dosis ensayadas (10^{-4} M y $5 \cdot 10^{-4}$ M), no presentando actividad significativa alguna en cuanto a la capacidad captadora de radicales hidroxilo. Solo la dosis de 10^{-3} M de hesperidina, es capaz de inhibir de forma significativa la peroxidación lipídica no enzimática.

En la figura 16, hemos representado la actividad antioxidante de hesperidina y neohesperidina dihidrochalcona a la dosis de $5 \cdot 10^{-4}$ M, junto con las respectivas sustancias de referencia para cada ensayo.

TABLA XII

ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE IN VITRO

RLO→ Sustancia ensayada ↓	Radical superóxido % Inhibición	Radical hidroxilo % Inhibición	Peroxidación lipídica no enzimática % Inhibición
HESP 10 ⁻⁴ M	8.66 ± 1.40 *	2.20 ± 1.03 n.s.	-1.23 ± 0.79 n.s.
HESP 5·10 ⁻⁴ M	11.69 ± 2.36 *	-0.56 ± 1.25 n.s.	4.86 ± 2.33 n.s.
HESP 10 ⁻³ M	—	0.35 ± 1.42 n.s.	9.78 ± 0.35 *
HESP 5·10 ⁻³ M	—	0.65 ± 1.09 n.s.	—
NHDC 10 ⁻⁴ M	31.53 ± 0.82 ***	6.00 ± 0.80 ***	15.43 ± 2.20 **
NHDC 5·10 ⁻⁴ M	84.62 ± 2.23 ***	6.92 ± 1.00 ***	77.87 ± 3.22 ***
NHDC 10 ⁻³ M	—	7.99 ± 1.33 **	95.33 ± 1.35 ***
NHDC 5·10 ⁻³ M	—	23.49 ± 0.66 ***	—
Sustancia de referencia	SOD 25 U/mL: 77.52 ± 0.45 ***	Manitol 5·10 ⁻² M 14.01 ± 1.39 ***	BHT 10 ⁻⁴ M: 94.37 ± 1.21 ***

Significancia determinada por el test t-Student:

n.s. no significativo, * p<0.050, ** p<0.010, *** p<0.001.

ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

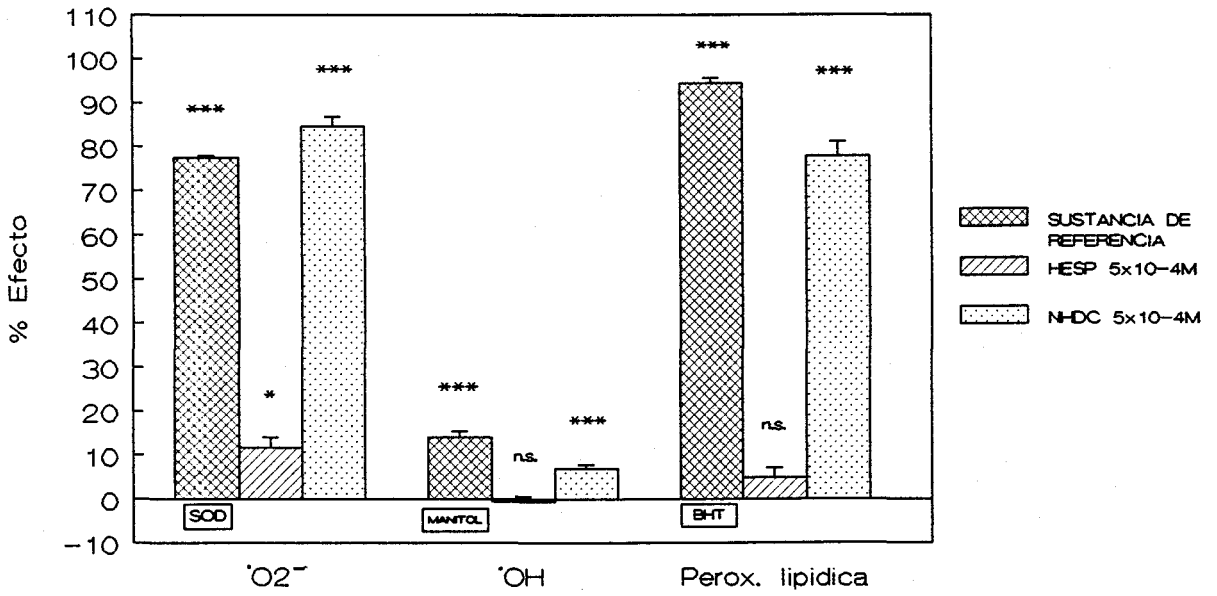


Fig. 16

IV.3.1. DISCUSION DE RESULTADOS.

Desde hace mucho tiempo, se conoce la acción inhibitoria de diferentes flavonoides sobre los sistemas enzimáticos (Steinlid, 1970; Varma y cols., 1975). Pincemail y cols. (1987) describieron la capacidad de un extracto flavónico para inhibir la formación de radicales O_2^- , H_2O_2 , generados durante la estimulación por neutrófilos.

Existe una relación entre estructura de flavonoides y su actividad antioxidante (Ratty y Das, 1988), siendo más activos los flavonoles. Su actividad, se incrementa con el número de -OH sustituidos en el anillo B (Husain y cols., 1987; Torel y cols., 1986), aunque estas condiciones no siempre son aceptadas por otros autores (Affany y cols., 1987; Fraga y cols., 1987; Afanas'ev y cols., 1989).

En un estudio llevado a cabo por Mora y cols. (1990), en el que se valora la actividad de una serie de principios flavónicos, hesperidina se muestra incapaz de inhibir de forma significativa los radicales peróxidos generados por adición de $FeSO_4$ y cisteína.

Estos datos, coinciden con los obtenidos por nosotros, en los cuales hesperidina sólo a las dosis de 10^{-4} y $5 \cdot 10^{-4}M$ es capaz de mostrar una ligera actividad inhibitoria de la génesis de radical O_2^- , así como de la peroxidación lipídica no enzimática a la dosis de $10^{-3}M$, sin afectar de forma significativa la

formación de radicales OH, generados mediante el sistema ácido ascórbico-Fe³⁺-EDTA.

Neohesperidina dihidrochalcona, por el contrario, se puede definir como un auténtico principio antioxidante con gran potencia captadora de radicales tanto, O₂⁻ como OH e inhibidora de la peroxidación lipídica no enzimática.

Estos resultados, coinciden plenamente con los obtenidos al hacer la valoración de la actividad antiulcerosa de ambos principios. Hesperidina se muestra menos eficaz que neohesperidina dihidrochalcona al proteger la mucosa gástrica frente a la agresión. Teniendo en cuenta el papel importante que juegan los RLO en las lesiones tisulares asociadas a la administración de etanol absoluto (Salim, 1990), es posible relacionar la actividad antiulcerosa con la antioxidante.

IV.4. ACCION ANTIINFLAMATORIA.

El estudio de la actividad antiinflamatoria revela que mientras hesperidina 100 y 150 mg/Kg origina un efecto antiinflamatorio significativo sobre el edema plantar inducido por carragenina, presentando su máxima actividad a las 3 h de producir la lesión inflamatoria, neohesperidina dihidrochalcona no presenta actividad significativa aunque los índices de inflamación obtenidos estén por debajo del lote control (Tabla XIII, Fig. 17).

TABLA XIII

ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA

LOTE	Indice inflamación a las 3 h I_{3h}	% Actividad antiinflamatoria a las 3 h $\%AAI_{3h}$	Indice inflamación a las 5 h I_{5h}	% Actividad antiinflamatoria a las 5 h $\%AAI_{5h}$
Control	142.99 ± 4.33		140.04 ± 4.50	
Indometacina 25 mg/kg	104.17 ± 2.85 ***	90.31 ± 6.62	109.67 ± 2.49 ***	75.84 ± 6.21
HESP 100 mg/kg	126.13 ± 2.50 **	39.22 ± 5.83	124.40 ± 3.18 *	39.07 ± 7.93
HESP 150 mg/kg	125.23 ± 2.12 **	41.43 ± 4.93	123.91 ± 2.47 *	40.29 ± 6.16
NHDC 100 mg/kg	135.30 ± 2.93 n.s.	17.50 ± 6.97	136.08 ± 2.49 n.s.	9.90 ± 6.22
NHDC 150 mg/kg	136.94 ± 2.72 n.s.	14.07 ± 6.33	132.49 ± 2.72 n.s.	18.85 ± 6.79

Significancia determinada por el test t-Student:

n.s. no significativo, * $p < 0.050$, ** $p < 0.010$, *** $p < 0.001$.

ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA

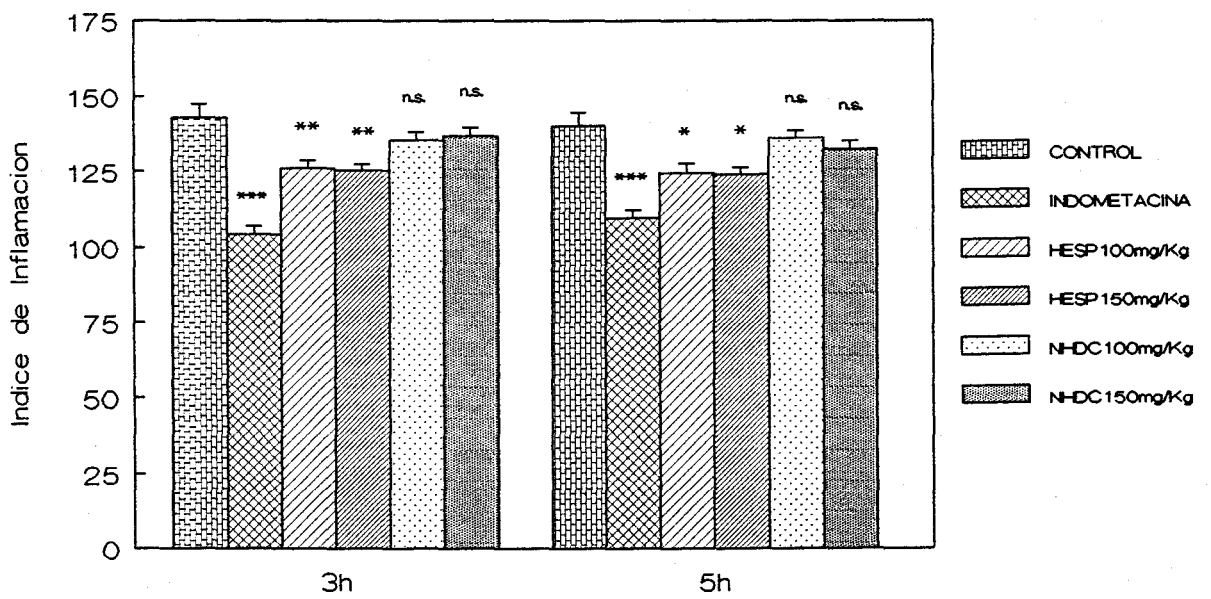


Fig. 17

IV.4.1. DISCUSION DE RESULTADOS.

Al evaluar la actividad antiinflamatoria de hesperidina y neohesperidina dihidrochalcona frente a la inflamación provocada por carragenina, agente flogógeno que produce un efecto poco influido por factores ajenos a los propios de la inflamación, con resultados fácilmente reproducibles y que además, permite establecer una buena relación con la acción antiinflamatoria humana (Otternessi y Gangs, 1988).

Se observa, que sólo hesperidina a las dos dosis ensayadas, es capaz de disminuir el índice de inflamación, tanto a las 3 como a la 5 h de la administración.

Existen gran número de estudios sobre flavonoides relacionados con su actividad antiinflamatoria y antiedematosa (Casley-Smith, 1985a, 1985b; Corvazier y Maclouf, 1985; Alcaraz y Hoult, 1985). Estudios más recientes, sugieren que esta actividad, es debida en gran parte, a la inhibición de la enzima fosfolipasa A₂, de manera semejante a como actúan los corticoides (Gabor, 1985a). Se ha visto que los distintos sustituyentes de la molécula, juegan un importante papel en esta actividad (Ferrandiz, 1990).

Cabe pensar, que la ausencia de efecto de neohesperidina dihidrochalcona pueda ser debido a las diferencias con la molécula de hesperidina que se ajusta más a los requerimientos estructurales desde el punto de vista químico.

IV.5. ACCION SOBRE EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL.

El comportamiento de los animales de experimentación al someterlos a las pruebas que constituyen el esquema de Irwin (Tablas XIV y XV), nos orienta hacia una actividad depresora del S.N.C., que se manifiesta por una disminución de los movimientos espontáneos, así como del estado de vigilia. Estas observaciones son más notables cuando administramos hesperidina.

El resto de las pruebas realizadas confirman estos primeros datos (Tablas XVI-XX, Fig. 18-21). En los tiempos en que se han realizado los controles (30 y 60 min), la dosis de 150 mg/Kg de hesperidina es capaz de deprimir la actividad motora espontánea. Sin embargo, no se ven modificados los parámetros que determinan el estado de relajación muscular.

Los datos obtenidos tras la administración de neohesperidina dihidrochalcona, son significativos al determinar la actividad motora espontánea y la curiosidad residual, a la dosis de 150 mg/Kg.

TABLA XIV

ESQUEMA DE IRWIN PARA ANIMALES TRATADOS CON HESPERIDINA

LOTE→	CONTROL				HESP 100 mg/kg				HESP 150 mg/kg			
	30	60	120	240	30	60	120	240	30	60	120	240
Tiempo(min)→ Parámetro (valor normal)↓												
Alerta 4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
Estereotipia 0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Pasividad 0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Aseo 4	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
Intranquilidad 0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Irritabilidad 0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Activ. espontánea 4	4	4	4	4	3	3	3	3	3	3	2	3
Reactividad 4	4	4	4	4	3	3	3	3	3	3	2	3
Respuesta al tacto 4	4	4	4	4	4	4	4	4	3	4	3	4
Sobresalto ruido 4	4	4	4	4	4	4	3	4	4	4	3	4
Cola de Straub 0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Temblor 0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Convulsiones 0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Anormalidad andar 0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Test de voltereta 0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Fuerza presora 4	4	4	4	4	4	4	3	3	3	4	3	3
Reflejo pineal 4	4	4	4	4	3	3	4	4	3	3	3	4
Reflejo corneal 4	4	4	4	4	4	3	3	3	4	3	3	3
Apertura palpebral 4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
Exoftalmos 0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Micción 4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
Sialorrea 0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Piloerección 0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Signo de retroceso 0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Valor ponderal de los distintos parámetros para cada grupo.

TABLA XV

**ESQUEMA DE IRWIN PARA ANIMALES TRATADOS CON
NEOHESPERIDINA DIHIDROCHALCONA**

LOTE→	CONTROL				NHDC 100 mg/kg				NHDC 150 mg/kg			
Tiempo(min)→ Parámetro (valor normal)↓	30	60	120	240	30	60	120	240	30	60	120	240
Alerta 4	4	4	4	4	4	4	4	4	3	4	4	5
Estereotipia 0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Pasividad 0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Aseo 4	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Intranquilidad 0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Irritabilidad 0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Activ. espontánea 4	4	4	4	4	3	4	3	3	4	4	3	3
Reactividad 4	4	4	4	4	3	4	3	3	4	4	4	3
Respuesta al tacto 4	4	4	4	4	4	4	4	4	3	4	4	4
Sobresalto ruido 4	4	4	4	4	4	4	3	4	5	4	4	4
Cola de Straub 0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Temblor 0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Convulsiones 0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Anormalidad andar 0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Test de voltereta 0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Fuerza presora 4	4	4	4	4	3	4	3	3	4	4	4	5
Reflejo pineal 4	4	4	4	4	4	4	4	4	3	4	4	4
Reflejo corneal 4	4	4	4	4	4	4	4	3	4	4	4	4
Apertura palpebral 4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
Exoftalmos 0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Micción 4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
Sialorrea 0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Piloerección 0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Signo de retroceso 0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Valor ponderal de los distintos parámetros para cada grupo.

TABLA XVI

ACTIVIDAD MOTORA ESPONTANEA

LOTE↓	Tiempo→	30 min	60 min
	Control	100.00	100.00
HESP	100 mg/kg	93.82	71.21
HESP	150 mg/kg	88.85	39.89
NHDC	100 mg/kg	142.65	143.96
NHDC	150 mg/kg	49.34	89.56

Porcentaje de actividad de cada grupo respecto del grupo control.

ACTIVIDAD MOTORA ESPONTANEA MOVIMIENTOS TOTALES

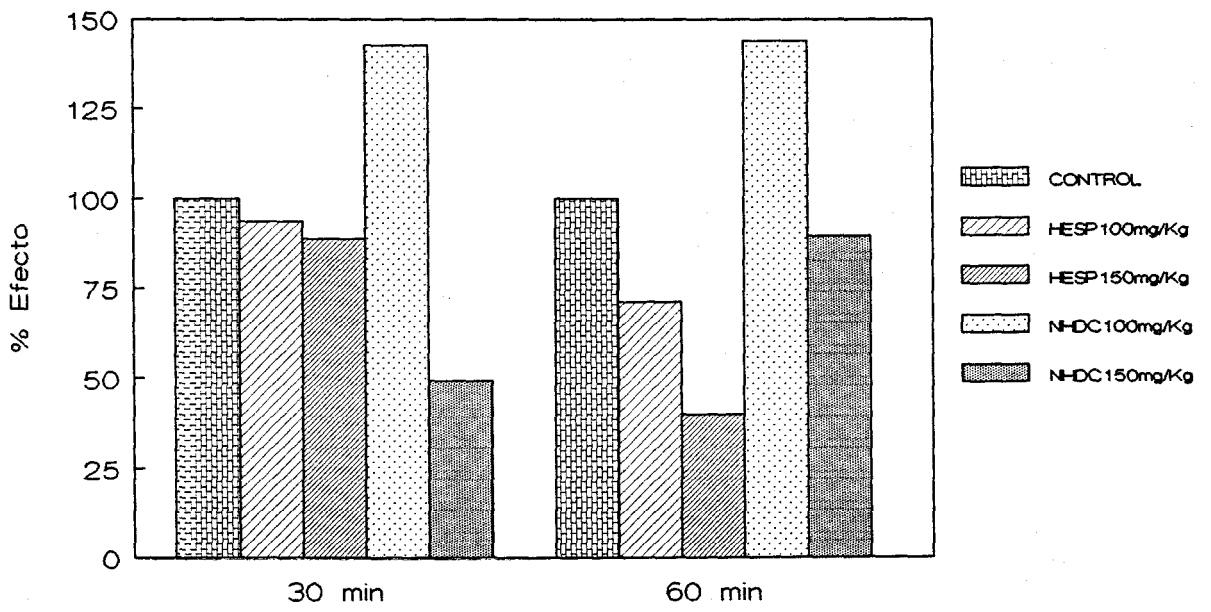


Fig. 18

TABLA XVII

CONDUCTA EXPLORATORIA
Test de la curiosidad

LOTE↓	Tiempo→	30 min	60 min
	Control	16.50 ± 0.99	10.50 ± 1.18
HESP	100 mg/kg	5.83 ± 0.48 **	3.00 ± 0.36 **
HESP	150 mg/kg	5.33 ± 0.49 **	2.50 ± 0.72 **
NHDC	100 mg/kg	17.00 ± 1.84 n.s.	10.67 ± 1.17 n.s.
NHDC	150 mg/kg	8.67 ± 2.97 n.s.	7.33 ± 2.11 n.s.

Movimientos realizados por cada grupo ($\bar{X} \pm \epsilon$).

Significancia determinada por el test U Mann-Whitney:

n.s. no significativo, ** $p < 0.010$.

ACTIVIDAD EXPLORATORIA TEST DE LA CURIOSIDAD

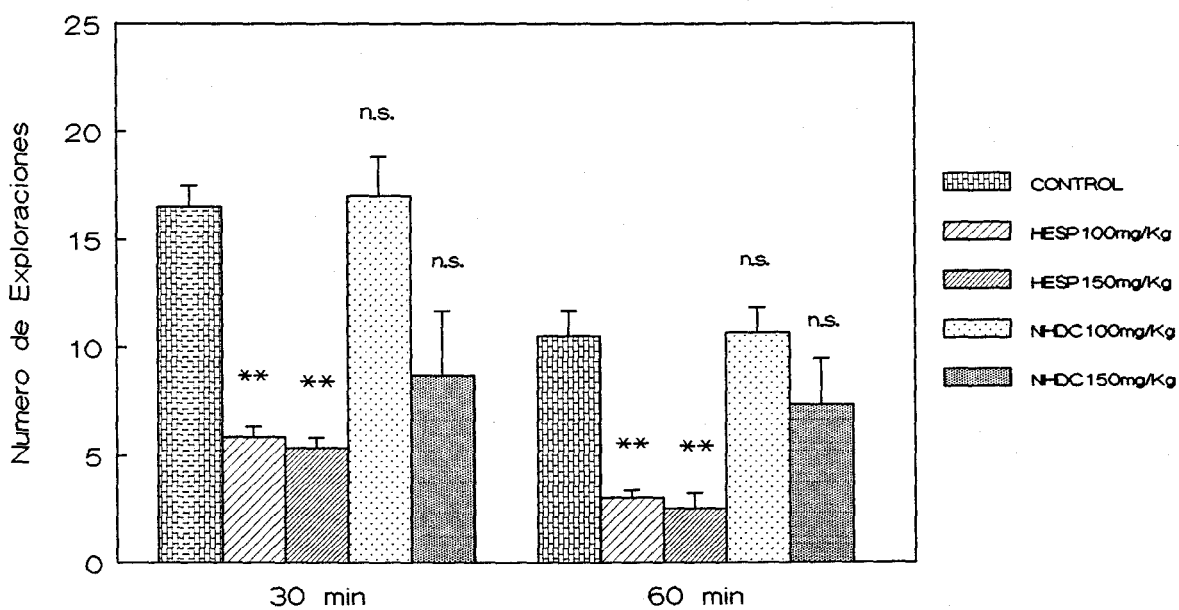


Fig. 19

TABLA XVIII

CURIOSIDAD RESIDUAL
Test de la evasión

LOTE↓	Tiempo→	30 min	60 min
	Control	3.50 ± 0.56	2.17 ± 0.31
HESP	100 mg/kg	1.50 ± 0.76 n.s.	0.83 ± 0.54 n.s.
HESP	150 mg/kg	0.83 ± 0.54 *	0.50 ± 0.34 *
NHDC	100 mg/kg	3.33 ± 0.61 n.s.	1.67 ± 0.33 n.s.
NHDC	150 mg/kg	2.17 ± 0.60 n.s.	0.67 ± 0.33 *

Número de evasiones de cada grupo ($\bar{x} \pm \epsilon$).

Significancia determinada por el test U Mann-Whitney:

n.s. no significativo, * $p < 0.050$, ** $p < 0.010$.

CURIOSIDAD RESIDUAL TEST DE LA EVASION

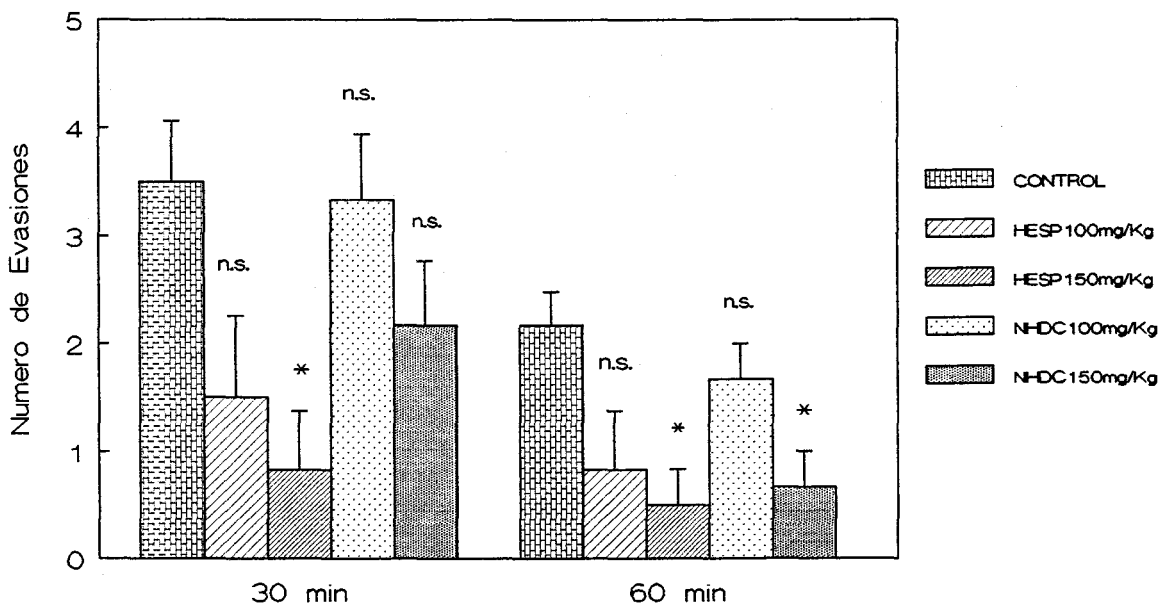


Fig. 20

TABLA XIX

COORDINACION MOTORA
Test del rota-rod

LOTE↓	Tiempo→	30 min	60 min
	CONTROL	100.00 ± 13.86	100.00 ± 13.57
HESP	100 mg/kg	97.38 ± 12.28 n.s.	96.64 ± 18.68 n.s.
HESP	150 mg/kg	85.33 ± 9.13 n.s.	72.35 ± 9.69 n.s.
NHDC	100 mg/kg	143.32 ± 18.66 n.s.	179.07 ± 9.48 **
NHDC	150 mg/kg	144.94 ± 21.12 n.s.	144.24 ± 24.54 n.s.

Porcentaje de actividad de cada grupo respecto del grupo control.
 Significancia determinada por el test U Mann-Whitney:
 n.s. no significativo, * $p < 0.050$, ** $p < 0.010$.

COORDINACION MOTORA TEST DEL ROTA-ROD

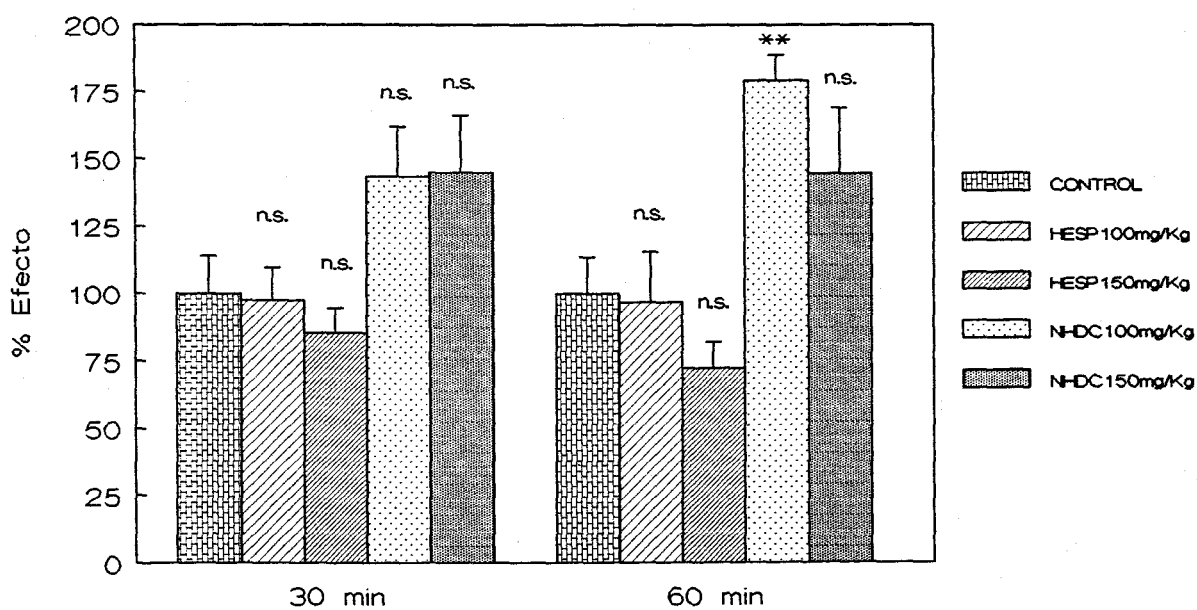


Fig. 21

TABLA XX

RELAJACION MUSCULAR Test de la tracción

LOTE↓	Tiempo→	30 min	60 min
	Control	0.00	0.00
HESP	100 mg/kg	16.67	33.33
HESP	150 mg/kg	33.33	66.67
NHDC	100 mg/kg	0.00	0.00
NHDC	150 mg/kg	0.00	0.00

Porcentaje de fracasos de cada lote.

IV.5.1. DISCUSION DE RESULTADOS.

El conjunto de ensayos que nos permiten observar la acción de hesperidina y neohesperidina dihidrochalcona sobre el S.N.C. nos indica cierta acción depresora de hesperidina, reflejada en la disminución de los movimientos espontáneos así como el estado de vigilia, en las pruebas que constituyen el esquema de Irwin.

Estos datos, se ratifican al realizar el resto de las pruebas, presentando hesperidina a la dosis de 150 mg/Kg capacidad de deprimir la actividad motora espontánea y el grado de alerta. El tono muscular no se modifica de forma significativa al realizar los ensayos específicos que nos permiten valorar este parámetro.

Estos resultados, que nos permiten deducir "a priori" cierta acción depresora de hesperidina, no coinciden con los obtenidos tras la administración de neohesperidina dihidrochalcona a ninguna de las dosis ensayadas. Cabe pensar que esta molécula al tener un mayor grado de oxidación se transforme más rápidamente en el organismo, con lo cual su paso al S.N.C. se vea comprometido.

IV.6. ENSAYOS SOBRE ORGANO AISLADO.

IV.6.1. EFECTO SOBRE DUODENO DE RATA.

Hesperidina y neohesperidina dihidrochalcona (10^{-4} M) ejercen un débil efecto potenciador sobre las contracciones inducidas por Ach en duodeno aislado de rata, siendo este efecto algo mayor en presencia de hesperidina, aunque en ningún caso de forma significativa (Fig. 22).

ACCION SOBRE RECEPTOR COLINERGICO
Duodeno de rata

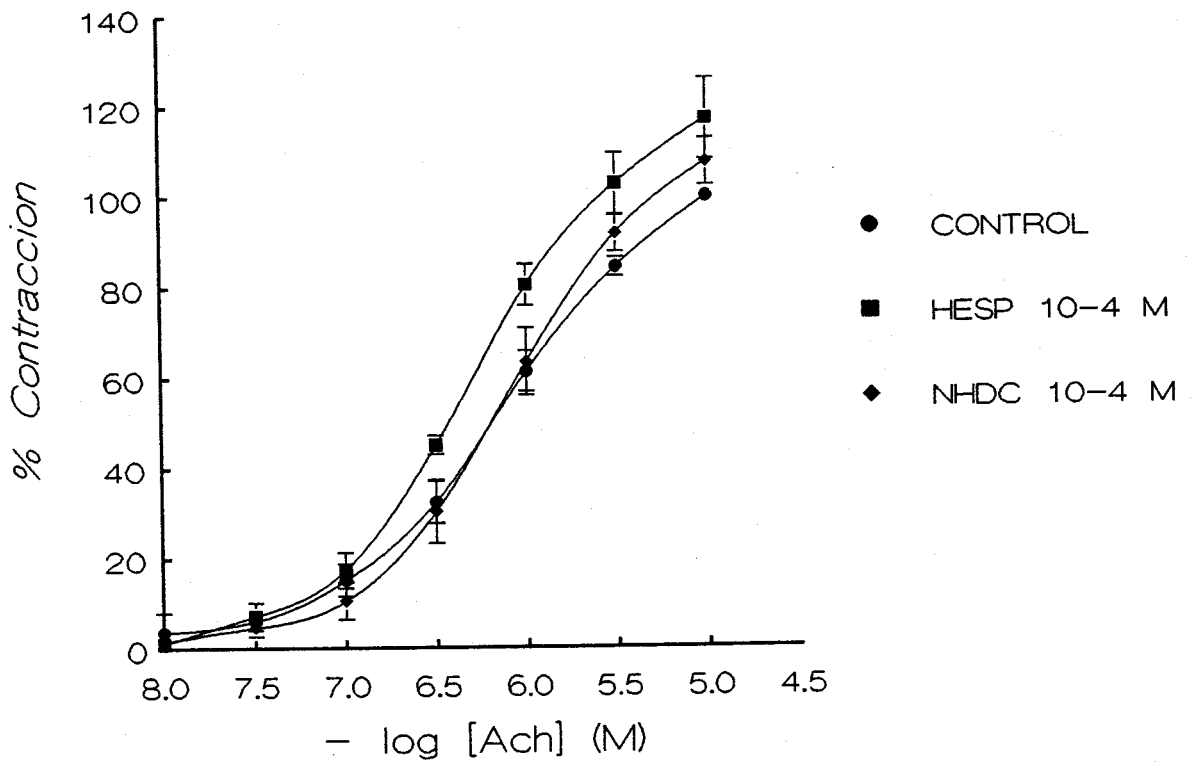


Fig. 22

IV.6.2. EFECTO SOBRE UTERO DE RATA.

El efecto relajante de la histamina ($1.6 \cdot 10^{-6}$ - $2 \cdot 10^{-4}$ M) en útero despolarizado por KCl (56.3 mM) no se ve afectado por hesperidina y neohesperidina dihidrochalcona (10^{-4} M) a diferencia del efecto antihistamínico producido por ranitidina ($3 \cdot 10^{-5}$ M), antagonista de receptores H_2 , que se traduce en una disminución de la relajación provocada por dosis acumulativas de histamina (Fig. 23).

ACCION SOBRE RECEPTOR HISTAMINERGICO
Utero de rata despolarizado

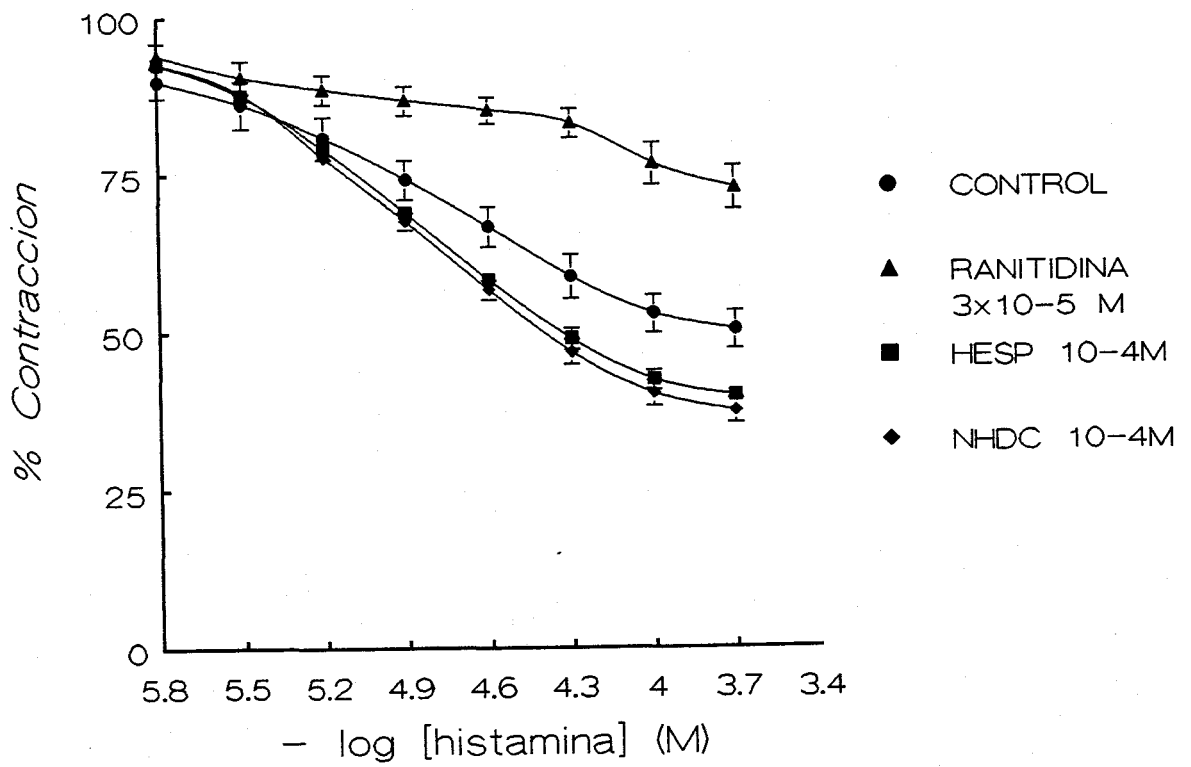


Fig. 23

IV.6.3. EFECTO SOBRE CONDUCTO DEFERENTE DE RATA.

Los resultados alcanzados sobre contracciones inducidas por NA (10^{-7} - 10^{-4} M) en presencia de hesperidina y neohesperidina dihidrochalcona (10^{-4} M) no difieren de los obtenidos cuando las curvas dosis-respuesta realizadas con el agonista se efectúan en ausencia de éstos (Fig. 24).

ACCION SOBRE RECEPTOR ADRENERGICO
Conducto deferente de rata

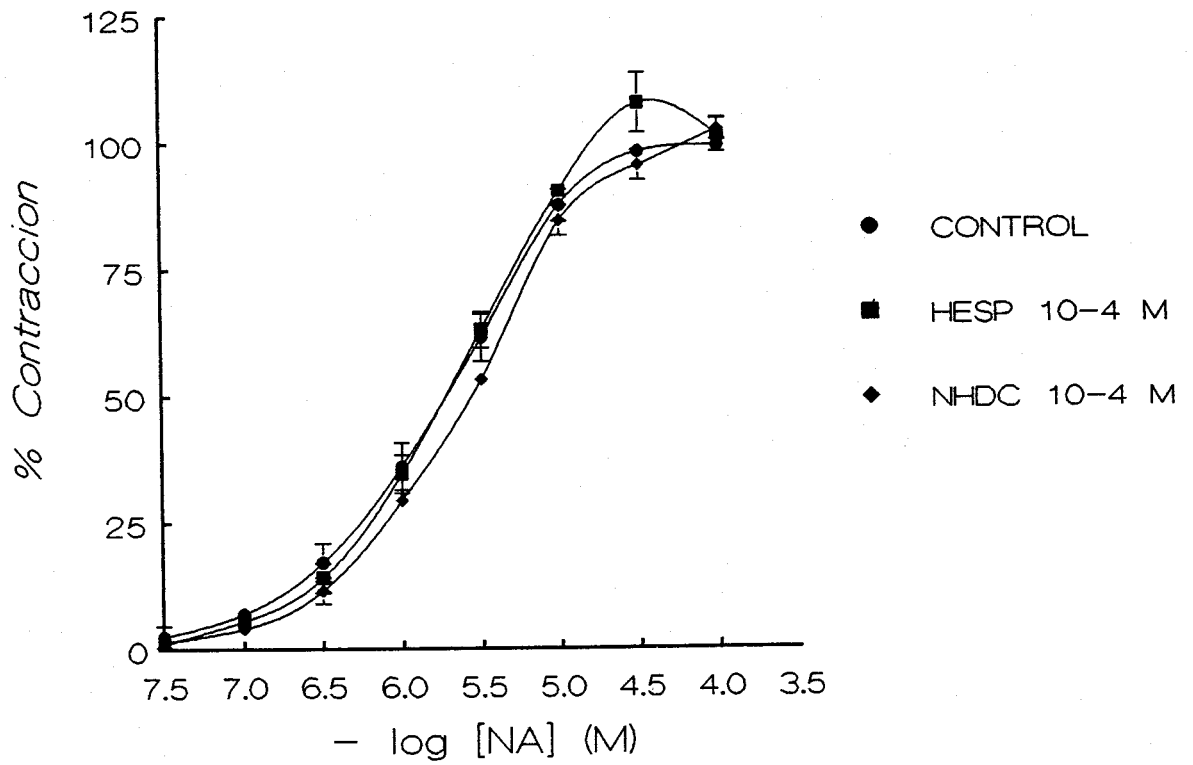


Fig. 24

IV.6.4. EFECTO SOBRE FUNDUS DE RATA.

La contracción inducida por 5-HT (10^{-7} M), en tiras de fundus gástrico de rata, no se ve afectada significativamente cuando se realiza en presencia de hesperidina o neohesperidina dihidrochalcona (10^{-4} M), como se observa en la figura 25.

ACCION SOBRE RECEPTOR SEROTONERGICO

Fundus gastrico de rata

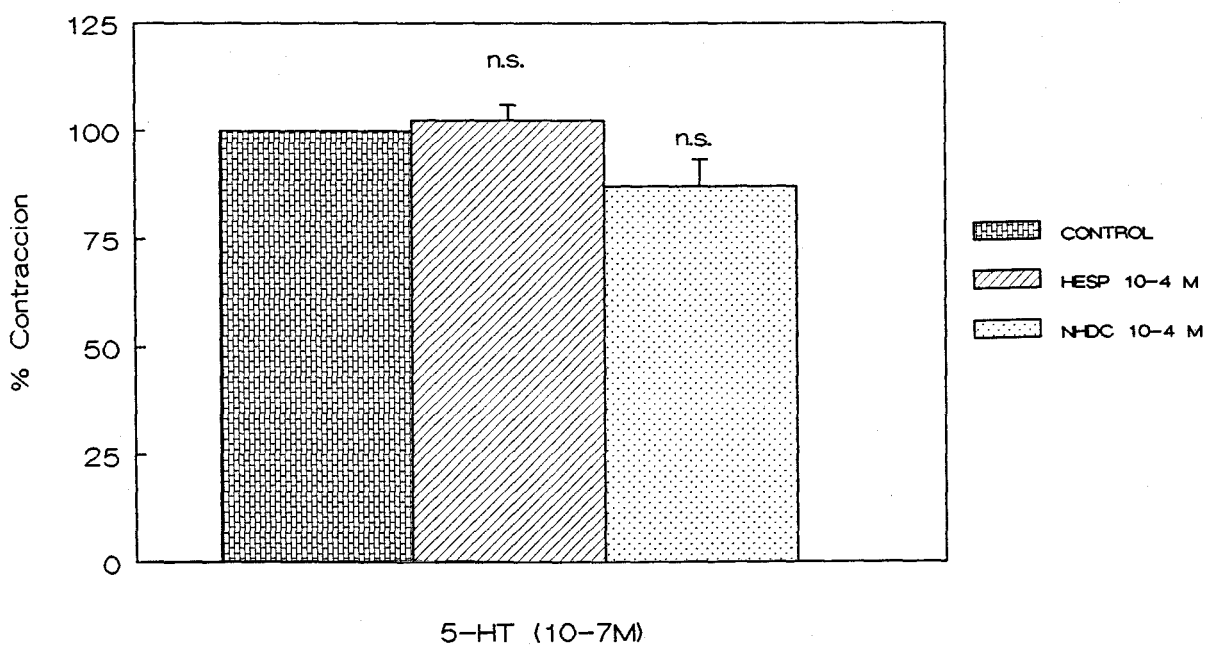


Fig. 25

IV.6.5. DISCUSION DE RESULTADOS.

La úlcera gástrica es un proceso patológico en el que puede ser útil disminuir la secreción gástrica ácida por tratarse de un agente irritativo local (Wolfe y Soll, 1988; Atkinson y Graig, 1990).

La histamina y la Ach actúan de forma sinérgica y potenciadora sobre la secreción ácida, estimulando cada una de ellas sus respectivos receptores situados en la propia célula parietal (Obrink, 1991). El bloqueo específico de uno de ellos, reduce las posibilidades de interacción sinérgica y, por tanto, reduce la respuesta a los estímulos específicos de los demás receptores. La histamina, ejerce su acción sobre receptores H_2 (Ganellin y Parsons, 1982), y está mediada por la activación de la adenilciclase de la célula parietal. La Ach, estimula los receptores muscarínicos específicos de la superficie de las células parietales y de las células que contienen histamina.

Los fármacos antihistamínicos H_2 bloquean los receptores H_2 de manera específica y competitiva (Burland y cols., 1975; Dowschke y cols., 1979; Chremus, 1986; Lin y cols, 1986; Huttemann, 1988; Deakin y Williams, 1992; Black, 1993) y en consecuencia, reducen el volumen total de secreción gástrica de ácido.

El bloqueo de receptores muscarínicos en las células de la mucosa gástrica por agentes anticolinérgicos (Stockbrugger y cols., 1979; Jaup, 1981; Londong y cols., 1987), consigue inhibir la influencia neurogénica sobre las células parietales, reduciendo así la secreción basal de ácido.

Hemos elegido dos preparaciones *in vitro*: duodeno y útero de rata, para el estudio de la posible acción de hesperidina y neohesperidina dihidrochalcona sobre la secreción gástrica.

El preparado de duodeno de rata, nos permite caracterizar la acción de los dos principios en estudio sobre el receptor muscarínico, pudiendo observar cómo a la dosis ensayada (10^{-4}M) no existe un desplazamiento significativo de las curvas dosis-efecto realizadas con Ach (10^{-8} - 10^{-5}M). El mismo comportamiento se puede observar en el preparado de útero, donde la relajación producida por histamina ($1.6 \cdot 10^{-6}$ - $2 \cdot 10^{-4}\text{M}$) en el órgano despolarizado por KCl (65.3 mM), no se ve afectada en presencia de hesperidina y neohesperidina dihidrochalcona (10^{-4}M), a diferencia de ranitidina (antagonista H_2) que produce un desplazamiento significativo de la curva de histamina.

Los resultados obtenidos muestran, que hesperidina y neohesperidina dihidrochalcona (10^{-4}M) carecen de efectos a nivel del receptor muscarínico e histaminérgico H_2 , no pudiéndose atribuir su acción antiulcerosa a un efecto inhibidor de la secreción ácida mediado por estos tipos de receptores.

Además de la transmisión colinérgica (Konturek, 1982; Wood, 1984), existen otros compuestos con probable función neurotransmisora o neuromoduladora. Las neuronas del interior de los plexos no solo secretan Ach, sino también NA, 5-HT, purinas y diversos peptidos con actividad farmacológica (Walsh, 1988).

Entre los factores implicados en la secreción gástrica, se encuentran los mecanismos serotoninérgicos y adrenérgicos. Es por ello, por lo que hemos estudiado hesperidina y neohesperidina dihidrochalcona (10^{-4} M) sobre el preparado de fundus gástrico de rata (Vane, 1957, 1959) y conducto deferente de rata (Swedin, 1971; Ambache y Zar, 1971) para ver su posible actuación sobre estos mecanismos.

Los resultados obtenidos sobre contracciones inducidas por NA (10^{-7} - 10^{-4} M) en conducto deferente de rata, así como los alcanzados sobre contracciones inducidas por 5-HT (10^{-7} M) en tiras de fundus gástrico de rata, nos ponen de manifiesto la ineficacia de los dos flavonoides en estudio sobre ambos mecanismos.

CONCLUSION

En la úlcera provocada por inmovilización y frío, tanto hesperidina como neohesperidina dihidrochalcona se muestran efectivos, pudiéndose además establecer una clara relación dosis-efecto. Disminuyen la superficie ulcerada y aunque no llegan a incrementar el contenido de moco, son capaces de modificar de forma significativa la concentración de hexosaminas.

Los resultados obtenidos al provocar las lesiones gástricas por etanol absoluto no coinciden con los expuestos anteriormente, sólo neohesperidina dihidrochalcona se muestra capaz de proteger la mucosa, y ninguno de los dos principios en estudio tienen la propiedad de modificar la calidad del moco.

La actividad antiulcerosa de hesperidina y neohesperidina dihidrochalcona no puede explicarse por un mecanismo dependiente de prostaglandinas, tampoco por un efecto vasoprotector, ni se puede asociar a una acción antsecretora directa, ya que el estudio sobre órgano aislado nos indica que no son capaces de antagonizar el receptor H_2 ni otros implicados en este proceso.

Hesperidina se manifiesta como un agente antiinflamatorio con actividad depresora a nivel central, sin afectar al tono muscular. Aunque sea discutida la influencia del S.N.C. sobre la úlcera provocada por situaciones estresantes, la realidad es que no podemos dejar de establecer una cierta relación, ya que hesperidina solo se muestra eficaz frente a este modelo experimental.

Neohesperidina dihidrochalcona, que se muestra eficaz en los distintos modelos de úlceras ensayados, presenta tal capacidad captadora de radicales hidroxilo y superóxido, así como inhibidora de la peroxidación lipídica no enzimática, que nos permite proponer que su mecanismo de acción, si no totalmente, depende en gran parte de su propia actividad antioxidante.

BIBLIOGRAFIA

AFANES'EV I.B., DOROZHKO A.I., BRODSKII A.V., KOSTYUK V.A., POTAPAVICH A.J. (1989) Chelatin and free radical scavenging mechanisms of inhibitory action of rutin and quercetin in lipid peroxidation. *Biochem. Pharmacol.* 38, 1763-1769.

AFFANY A., SALVAYRE R., DOUSTE-BLAZY L. (1987) Comparison of the protective effect of various flavonoids against lipid peroxidation of erythrocyte membranes (induced by cumene hydroperoxide). *Fundam. Clin. Pharmacol.* 1, 451-457.

ALARCON DE LA LASTRA C., MARTIN M.J., 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 M.J., MOTILVA V. (1991) Effects of naringenin and silymarin on urinary excretion of water and electrolytes in rats. *Phytother. Res.* 5, 191-193.

ALARCON DE LA LASTRA C., MARTIN M.J., MOTILVA V., JIMENEZ M., LA CASA C., LOPEZ A. (1995) Gastroprotection induced by silymarin, the hepatoprotective principle of *Silybum marianum* in ischemia-reperfusion mucosal injury: Role of neutrophils. *Planta Medica* 61, 116-119.

ALBACH R.F., AMELIA T., LIME B.J. (1969) Time of naringin production in grapefruit. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 94, 605-609.

ALCARAZ M.J., HOULT J.R.S. (1985) Actions of flavonoids and the novel antiinflammatory flavone, hypolaetin-8-glucoside, on prostaglandin biosynthesis and inactivation. *Biochem. Pharmacol.* 34, 2477-2482.

ALCARAZ M.J., TORDERA M. (1988) Studies on the gastric anti-ulcer activity of hypoleatin-8-glucoside. *Phytother. Res.* 2, 85-88.

AMBACHE N., ZAR M. (1971) Evidence against adrenergic transmission in the guinea-pig vas deferens. *J. Physiol.* 216, 359-389.

ARENS H., ULBRICH B., FISCHER H., PARNHAM H.J., ROMER A. (1986) Novel antinflammatory flavonoids from Podophyllum versipelle cell culture. *Planta Medica* 6, 468-473.

ARRIAGA, F.J., RUMBERO A. (1990) Naringin, hesperidin and neohesperidin content in juices from thirteen *Citrus* sp. *Fitoterapia* 61, 31-36.

ASAO SASAHARA, KUNIAKI HIRAI, YUKO TOMINAGA, YOSHIKAZU TAHARA (1957) Permeability-inhibiting action of methylhesperidin. *Taishitsu Igaku Kenkyusho Hokoku* 8, 213-217.

ATKINSON A.J.Jr., CRAIG R.M. (1990) Therapy of peptic ulcer disease. En: Peptic ulcer disease. Mechanisms and management. Ed. Molinoff P.B.. Healthpress Publishing Group, Inc., Rutherford, N.J., 83-112.

AUMENTE M.D., AYUSO M.J. GARCIA GIMENEZ M.D., TORO M.V. (1988) Les flavonols isolés d'Erica andevalensis Cabezudo-Ribera: Contribution à l'étude de l'activité antimicrobienne de l'espèce. *Plantes Médicinales et Phytothér.* 22, 113-118.

BADUI DERGAL S. (1981) Química de los alimentos., 1ª ed., Ed. Alhambra Mexicana S.A., 282-283.

BALERIOLA LUCAS C. (1979) Tesis Doctoral, Dpto. de Farmacognosia y Farmacodinamia, Facultad de Farmacia, UCM, Madrid.

BARABOI U.A. (1967) Effect of sodium gallate and some other polyphenols on adrenaline toxicity. *Fiziol. Zh.* 13, 809-812.

BARBERAN F.A.T., MANEZ S., VILLAR A. (1987) Identification of antiinflammatory agents from *Sideritis* species growing in Spain. *J. Nat. Prod.* 50, 313-314.

BAUMANN J., WURM G., BRUCHHAUSEN F. (1980) Hemmung der prostaglandinsynthetase durch flavonoide und phenolderivate im vergleich mit deren O₂-radicalföngereigenschaften. *Arch. Pharm.* 313, 330-337.

BELITZ H.D., GROSH W. (1985a) Química de los alimentos. Ed. Springer-Verlag GmbH & Co., Berlín, 357-358.

BELITZ H.D., GROSH W. (1985b) Química de los alimentos. Ed. Springer-Verlag GmbH & Co., Berlín, 652-655.

BERETZ A., CAZENAVE J.P., ANTON R. (1980) Flavonoids inhibition of agregation and secretion of washed human platelets: Structure-activity relationships. *Planta Medica* 99, 240.

BEREZOUSKAGA N.N. (1967) Inhibitory effect of bioflavones and ascorbic acid on hyaluronidase. *Vop. Med. Khim.* 13, 145-149.

BERNHEIM F., BERNHEIM M.L.C., WILBUR K.M. (1948) The reaction between thiobarbituric acid and oxidation products of certain lipids. *J. Biol. Chem.* 174, 257-265.

BHARGAVA S.K. (1984) Estrogenic and pregnancy interceptory effects of the flavonoids (VI-VII) of *Vitex negundo* L. seeds in mice. *Plant. Med. et Phytother.* 18, 74-79.

BINDOLI A., CAVALLINI S., SILIPRANDI N. (1977) Acción inhibidora de la silimarina sobre la peroxidación lipídica en los microsomas y mitocondrias hepáticos de la rata. *Biochem. Pharmacol.* 26, 2405-2409.

BLACK J. (1993) Reflections on the analytical pharmacology of histamine H₂ receptor antagonists. *Gastroenterology* 105, 963-968.

BOAS N.F. (1953) Method for the determination of hexosamines in tissues. *J. Biol. Chem.* 204, 553-563.

BOISSIER J.R., SIMON P. (1967) Le test de la curiosité pour l'étude du psicoleptiques. *Thérapie* 22, 467.

BONILLA RIVERA P.E., LOCK DE UGAZ O., JURUPE CHICO H. (1991) Chemical-biological study of *Werneria dactilophylla*. *Bol. Soc. Quim. Perú* 57, 182-188.

BRODIE D.A. (1968) Experimental peptic ulcer. *Gastroenterology* 55, 125-134.

BROOKS F.P. (1985) Fisiopatología de la úlcera péptica. En: *Úlcera péptica*. Ed. Brooks, F.P., Cohen, S., Soloway, L.D.. Churchill-Livingtone, NY, 45-153.

BRUNETON J. (1991) Elementos de fitoquímica y de farmacognosia. Ed. Acribia S.A., Zaragoza, 157-172.

BULBENA O., ESCOLAR G., ESPLUGUES J.V., MARTI-CABRERA M., ESPLUGUES J. (1986) Efectos del acexamato de zinc sobre la síntesis de moco gástrico en la úlcera de stress. Estudio comparativo con otros fármacos. *Rev. Farmacol. Clin. Exp.* 3, 105-109.

BURLAND W.L., DUCAN W., HESSELBO T. (1975) Pharmacological evaluation of cimetidine, a new histamine-H₂ receptor antagonist, in healthy man. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 2, 481-486.

CASLEY-SMITH J. (1985a) The effects of diosmin (a benzopyrone) upon some high protein edemas: lung contusion, and burn and lymphedema of rat legs. *Agents Actions* 17, 14-20.

CASLEY-SMITH J. (1985b) Treatment of high protein edemas by direct application of benzopyrones. En C.A. 1986, 104, 174646w.

CHREMUS A.N. (1986) Pharmacodinamics of famotidine in humans. *Am. J. Med.* 81, 3-7.

CIOLI V., SILVESTRINI B., DORDONI F. (1967) Evaluation of potential of gastric ulceration after administration of certain drugs. *Experim. Molec. Pathology* 6, 68-75.

CLAMP J.R., ERC D. (1989) The gastric mucosal barrier. *Meth. Find. exp Clin. Pharmac.* 11, 19-25.

CLARK W.G., GEISSMAN T.A. (1949) Potentiation of epinephrine effects by flavonoid compounds. *Nature* 163, 36-37.

COCHRAN K.W., STAHMANN M.A. (1961) Chemoprophylaxis of poliomyelitis using polylysine and other polymers. Polyamino acids, polypeptides, proteins. *Proc. Intern. Symp. Madison, Wis.* 341-345.

CORVAZIER E., MACLOUF J. (1985) Interference of some flavonoids and nonsteroidal antiinflammatory drug with oxidative metabolism of araquidonic acid by human platelets and neutrophils. *Biochem. Biophys. Acta* 835, 315-321.

COURVOISSIER S. (1956) The traction test. *J. Clin. Exp. Psychopath.* 17, 25.

DA SILVA EMIM J.A., OLIVEIRA A.B., LAPA A.J. (1994) Pharmacological evaluation of the anti-inflammatory activity of a citrus bioflavonoid, hesperidin, and the isoflavonoids, duartin and claussequinone, in rats and mice. *J. Pharm. Pharmacol.* 46, 118-122.

DALY M.J., HUMPHRAY J.M., STABLES R. (1981) Some in vitro and in vivo actions of the new histamine H₂ receptor antagonist ranitidine. *Brit. J. Pharmacol.* 72, 49-54.

DE LA CRUZ J.P., SANCHEZ DE LA CUESTA F. (1990) Radicales libres derivados del oxígeno. Implicaciones tisulares y posible prevención farmacológica. En: Avances en cardiopatía isquémica. Ed. Marin Jastrapie L.E., Barcelona, Salvat, 124-146.

DEAKIN M., WILLIAMS J.G. (1992) Histamine H₂-receptor antagonists in peptic ulcer disease. *Drug* 44, 709-719.

DEBY C. (1982) Dissociabilité des activités anti-lipoperoxydante et antiradicalaire: conséquences sur la biosynthèse des prostanoides. *Bull. Cl. Sci. Acad. Roy. Belg.* 68, 358-368.

DELLA LOGGIA R., TUBARO A., DRI P., ZILLI C., DEL NEGRO P. (1986) The role of the flavonoids in the anti-inflammatory activity of the *Chamomilla recutita*. *Prog. Clin. Biol. Res. (Plant Flavonoids Biol. Med.)* 213, 481-484.

DI CARLO G., VIOLA P., AUTORE G., IZZO A.A., CAPASSO F. (1994) Effects of quercetin on gastrointestinal tract in rats and mice. *Phytother. Res.* 8, 42-45.

DOWSCHKE W., LUX G., DOMSCHKE S. (1979) Gastric inhibitory action of H₂-antagonist ranitidine and cimetidine. *Lancet* 1, 320-324.

DUNHAM M.W., MIYA T.S. (1957) A note on a simple apparatus for detecting neurological deficit in rats and mice. *J. Am. Pharm. Sci. Ed.* 46, 208-209.

EDENHARDER R., VON PETERSDORFF I., RAUSCHER R. (1993) Antimutagenic effects of flavonoids, chalcones and structurally related compounds on the activity of 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline and other heterocyclic amine mutagens from cooked food. *Mutat. Res.* 287, 261-274.

EDWARDS D., GOOD D., GRAGER S., HOLLINGSWORTH M., SMALL R.C., WESTON A.H. (1986) The spasmogenic action of oxytocin in rat uterus, comparison with other agonist. *Br. J. Pharmacol.* 88, 899-908.

ESPLUGUES J., MORCILLO E. (1982) Desarrollo de nuevos fármacos II. Evaluación en el laboratorio. En: Farmacología general. Ed. Esplugues J. Fundación García Muñoz, Sección Saber, Valencia, 332.

EVANS W.C. (1991a) Farmacognosia., 13^a ed., Ed. McGraw-Hill, 448-450.

EVANS W.C. (1991b) Farmacognosia., 13^a ed., Ed. McGraw-Hill, 478-480.

FERRANDIZ, M.L. RAMACHANDRAN NAIR A.G., ALCARAZ M.J. (1990) Inhibition of sheep platelet araquidonate metabolism by flavonoids from spanish and indian medicinal herbs. *Pharmatic* 45, 206-208.

FRAGA C.G., MARTINO V.S., FERRARO G.E., COUSSIO J.D., BOVERIS A. (1987) Flavonoids as antioxidants evaluated by in vitro and in situ liver chemiluminescence. *Biochem. Pharmacol.* 36, 717-720.

FRANK N.A., POUNDEN W.D., KESTERSON J.W. (1963) Hesperidin complex lacking estrogenic activity. *Citrus Ind.* 44, 9.

FRIZ M. (1959) Animals experiments on the problem of fertility inhibition with hyaluronidase inhibitors. *Zentr. Gynäköl.* 81, 1635-1642.

FUJIKI H., HORIUCHI T., YAMASHITA K., HAKII H., SUGANUMA M., NISHINO H., IWASHITA A., HIRATA Y., SUGIMURA T. (1986) Plant flavonoids in biology and medicine. Ed. V. Cody, E. Middleton Jr., J.B. Harborne, Alan R. Liss, New York, 429-440.

GABOR M. (1974) Farmacological research on flavonoids. *Bull. Liaison, Groupe polyphénols*, 5. En C.A. 1975, 83, 71223z.

GABOR M. (1981) Advances in the pharmacology of benzopyrone derivatives and related compounds. *Proceedings International Bioflavonoids Symposium, Munich*, 363-401.

GABOR M. (1985a) Flavonoids and Bioflavonoids. Ed. L. Farkas, M. Gabor, F. Kallay, Szeged, 304-305.

GABOR M. (1985b) Flavonoids and Bioflavonoids. Ed. L. Farkas, M. Gabor, F. Kallay, Szeged, 315.

GANELLIN C.R., PARSONS M.E. (1982) Pharmacology of histamine receptors. Ed. John Wright & Sons, Ltd., Bristol, England.

GARCIA SIMON G., BALLEENILLA T., MIYARES C.M. (1982) Estudio de la efectividad de diversas técnicas para la inducción experimental de úlceras. *Rev. Cub. Farm.* 16, 117-123.

GAZAVE J.M. (1967) Isoflavone compounds. En C.A. 1968, 68, 104985v.

GIL MUÑOZ M.I. (1983) Elucidación de estructuras de flavonoides potencialmente activos. Tesina de Licenciatura, Facultad de Farmacia, Universidad de Valencia.

GOERTZ L. (1990) Osmic acid and hesperidin for the treatment of cardiovascular inflammations. En C.A. 1991, 114, 136078m.

HARBONE J.B., MABRY T.J., MABRY H. (1975) The Flavonoids. Ed. Chapman and Hall, London, 1033.

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

HAYES N.A., FOREMAN J.C. (1987) The activity of compounds extracted from feverfew on histamine release from rat mast cells. *J. Pharm. Pharmacol.* 39, 466-470.

HEDIN P.A., WAAGE S.K. (1986) Role of flavonoids in plant resistance to insects. *Prog. Clin. Biol. Res. (Plant Flavonoids Biol. Med.)* 213, 87-100.

HERRERA M.D., MARHUENDA E. (1991) Activité spasmodolytique de Genista tridentata L. *Plantes Médicinales et Phytothér.* 25, 147-156.

HIGGS G.A., MONCADA S., VANE J.R. (1984) Eicosanoids in inflammation. *Ann. Clin. Res.* 16, 287-299.

HILLER K. (1965) Flavonoide als pflanzenfarbstoffe und therapeutica. *Deutch. Apoth. Ztg.* 102, 1088.

HOLLANDER D., TARNAWSKI M.D., ANDRZEJ S. (1989) Gastric cytoprotection. Ed. Plenum, New York.

HOPE W.C., WELTON A.F., FIEDLER-NAGY C., BATULA-BERNARDO C., COFFEY J.W. (1983) In vitro inhibition of the biosynthesis of slow reacting substance of anaphylaxis (SRS-A) and lipoxygenase activity by quercetin. *Biochem. Pharmacol.* 32, 367-371.

HOROWITZ R.M., GENTILI B. (1963a) Flavonoids of Citrus. VI. Structure of neohesperidose. *Tetrahedron* 19, 773-82.

HOROWITZ R.M., GENTILI B. (1963b) Dihydrochalcone derivatives and their use as sweetening agents. *En C.A.* 1963, 59, 11650c.

HOROWITZ R.M. (1964) Biochemistry of phenolic compounds. Ed. J.R. Harborne, Academic Press, Londres.

HU C.Q., CHEN K., SHI Q., KILKUSKIE R.E., CHENG Y.C., LEE K.H. (1994) Anti-aids agents 10. Acacetin-7-O- β -D-galactopyranoside, an anti-HIV principle from Chrysanthemum morifolium and a structure-activity correlation with some related flavonoids. *J. Nat. Prod.* 57, 42-51.

HUMPHRAY J.M., REEVES J.J., STABLES R. (1986) A comparison of the H₂ receptors antagonist and antisecretory effects of famotidine and ranitidine. *Brit. J. Pharmacol.* 88, 390.

HUSAIN S.R., CILLARD J., CILLARD P. (1987) Hydroxy radical scavenging activity of flavonoids. *Phytochemistry* 26, 2489-2491.

HUTTEMANN W. (1988) A comparison of roxatidine acetate and ranitidine in duodenal ulcer healing. *Drug* 35, 90-95.

HIO M., USHIJIMA K., FUJITA M., MATSUMOTO M., MIYATAKE S. (1980) Effect of flavonoids on alkaline phosphatase. *Nippon Nôgei Kagaku Kaishi (J. Agric. Chem. Soc. Jpn.)* 54, 171-175.

HIO M., HIMENO S., MIYAUCHI K., MIKUMO K., OHTA N. (1983) Effect of flavonoids on glyoxalase I activity. *Nippon Nôgei Kagaku Kaishi (J. Agric. Chem. Soc. Jpn.)* 57, 765-769.

IIO M., UYEDA M., IWANAMI T., NAKAGAWA Y. (1984a) Flavonoids as a possible preventive of dental caries. *Agric. Biol. Chem.* 48, 2143-2145.

IIO M., YOSHIOKA A., IMAYOSHI Y., KORIYAMA C., MORIYAMA A. (1984b) Effect of flavonoids on O-glucosidase and β -fructosidase from yeast. *Agric. Biol. Chem.* 48, 1559-1563.

IIO M., MORIYAMA A., MATSUMOTO Y., TAKAKI N., FUKUMOTO M. (1985) Inhibition of xantine oxidase by flavonoids. *Agric. Biol. Chem.* 49, 2173-2176

IIO M., ONO Y., KAI S., FUKUMOTO M. (1986) Effects of flavonoids on xantine oxidation as well as on cytochrome c reduction by milk xantine oxidase. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 32, 635-642.

IRWIN S. (1964) Drug screening and evaluation of nens compounds in animals. En: *Animals and clinical pharmacologie techniques in drug evaluation*. Ed. Nodine J., Siegler P.E., Year Book Medical Publisher, Chicago, 26.

ITO S., LACY E.R., RUTTEN M.J., CRITCHLOW J., SILEN W. (1984) Rapid repair and injured gastric gastric mucosa. *Scand. J. Gastroenterol.* 19 (supl. 101), 87-91.

IZZO A.A., DI CARLO G., MASCOLO N., CAPASSO F. (1994) Antiulcer effect of flavonoids. Role of endogenous PAF. *Phytotherapy Research* 8, 179-181.

JAUP B.H. (1981) Studies on the mode of action of pirenzepine in man with special reference to its anticholinergic muscarinic properties. *Scan. J. Gastroenterol.* 16, 1-26.

JIMENEZ B. (1986) *Dittrichia viscosa* (L) W. Greuter. Estudio farmacoquímico y farmacodinámico. Tesina de Licenciatura, Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla.

JOLY M., HAAG-BERRURIER J.P., ANTON R. (1980) Cytotoxicite de flavonoides sur cellules d'hepatome en culture. *Planta Medica* 39, 230.

KITAJIMA M., OTSUKA S., SHIMIZN A., NAKAJIMA M., KIUCHI T., IKEDA Y., OSHIMA A. (1988) Impairment of gastric microcirculation in stress. *J. Clin. Gastroenterol.* 10 (suppl. 1), 120-128.

KITCHEN I. (1984) Textbook of in vitro practical pharmacology. Ed. Blackwell Scientific Publications, Oxford, 5.

KLEIN S.M., COHEN G., CEDERBAUM A.I. (1981) Production of formaldehyde during metabolism of dimethyl sulfoxide by hydroxyl radical generating systems. *Biochemistry* 20, 6006-6012.

KNEIP P. (1960) Kletter-Trieb und Letter-test. *Arch. Int. Pharmacodyn* 126, 238-246.

KONOSHIMA T., TAKASAKI M., KOZUZA M., INADA A., NAKANISHI T., TOKUDA H., MATSUMOTO T. (1989) Studies on inhibitors of skin tumor promotion (V). Inhibitory effects of flavonoids on Epstein-Barr virus activation. II. *Shoyakugaku Zasshi* 43, 135-141.

KONTUREK S.J. (1982) Cholinergic control of gastric acid secretion in man. *Scand. J. Gastroenterol.* 17, 1-4.

KONTUREK S.J., KITLER M.E., BRZOWSKI T., RADECKI T. (1986a) Gastric protection by meciadanol, a new synthetic flavonoid-inhibiting histidine decarboxylase. *Digestive Diseases and Sciences* 31, 847-852.

KONTUREK S.J., RADECKI T., BRZOWSKI T., KITLAR M.E. (1986b) Antiulcer and gastroprotective effects of solon, a synthetic flavonoid derivative of sophoradin. Role of endogenous prostaglandins. *Eur. J. Pharmacol.* 125, 185-192.

KUBO MASAYOSHI, MORITA OSUMA, SASAKI HIROSHI, SATO SHUNJI (1992a) Calcium antagonists containing phenols. Jpn Kokai Tokkyo Koho. En C.A. 1993, 118, 240923b.

KUBO MASAYOSHI, YANAGISAWA TOSHIHIKO, SASAKI HIROSHI, SATO SHUNJI (1992b) Phenol compounds as lipid peroxide formation inhibitors for therapeutic use. Jpn Kokai Tokkyo Koho. En C.A. 1992, 117, P245625v.

KUBO MICHITOKU, MATSUDA HIDEAKI (1992) Antiallergy agents containing hesperidin. Jpn Kokai Tokkyo Koho. En C.A. 1993, 118, 94322m.

KUPPUSAMY U.R., DAS N.P. (1992) Effects of flavonoids on cyclic AMP phosphodiesterase and lipid mobilization in rat adipocytes. *Biochem. Pharmacol.* 44, 1307-1315.

LABRID C.L., PERDRIX L. (1992) Mechanisms of oedema: activity of Daflon 500 mg.. *Phlebology.* 2 (suppl. 7), 30-36.

LACY E.R. (1985) Prostaglandins and histological changes in the gastric mucosa. *Dig. Dis. Sci.* 30, 835-839.

LAEKEMAN G.M., CLAEYS M., RWANGABO P.C., HERMAN A.C., VLIETINCK A.J. (1986) Cardiovascular effects of 3-methylquercetin. *Planta Medica* 6, 433-437.

LALIBERTE R., CAMPBELL D., BRUDERLEIN F. (1967) Antihelminthic activities of chalcones and related compounds. *Can. J. Pharm. Sci.* 2, 37-43.

LANDOFFI R., MOWER R., STEINER M. (1984) Modification of platelet function and arachidonic acid metabolism by bioflavonoids: Structure-activity relations. *Biochem. Pharmacol.* 33, 1525-1530.

LAROCCA L.M., PIANTELLI M., LEONE G. (1990) Type II oestrogen binding sites in acute lymphoid and non-lymphoid leukemias. Growth inhibitory effect of oestrogens and flavonoids. *Brit. J. Haematol.* 75, 489-495.

LEACH G.D.H. (1956) Estimation of drug antagonism on the isolated guinea-pig deferents. *J. Pharm. Pharmacol.* 8, 501-503.

LENCE P. (1962) A new device for pletysmoscopic measuring of small object. *Arch. Int. Pharmacodyn.* 136, 237-241.

LETAN A. (1966) The relation of structure to antioxidant activity of quercetin and its derivatives I. Primary activity. *J. Food Sci.* 31, 518-523.

LIN T.M., EVANS D.C. WARNICK M.W. (1986) Actions of nizatidine, a selected H₂-receptor antagonist, on gastric acid secretion in dogs, rats and frogs. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 239, 406-410.

LINA B.A.R., DREEF-VAN-DER-MEULEN H.C., LEEGWATER D.C. (1990) Subchronic (13 week) oral toxicity of neohesperidin dihydrochalcone in rats. *Food Chem. Toxicol.* 28, 507-513.

LONDONG W., LONDONG V., MIEIERL A., VODER HOLZER V. (1987) Telenzepine is a least 25 times more potent than pirenzepine a dose response and comparative secretory study. *Gut* 28, 888-895.

LORENZ W., KUSCHE J., BERTH H., NATHIAS C.H. (1983) Action of several flavonoids on enzymes of histamine metabolism in vitro. En: Histamine. Ed. C. Maslinski, Stroudsburg, 265-269.

LOWRY D.H., ROSEBROUNG N.J., FAAR A.L., RANDALL R.J. (1951) Protein measurement with the phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.

MacGREGOR J.T. (1986) Plant flavonoids in biology and medicine. Ed. V. Cody, E. Middleton Jr., J.B. Harborne, A. R. Liss, New York, 411-424.

MAGNUS R. (1948) Farmacología Experimental. Ed. F. Guerra, Utecha, México, 114.

MAKAROV V.A., LITITVINENKO V.I. (1968) Prunus spinosa flavonoids. *Aktual. Vol. Farm.* (publ. 1970), 200-201. En C.A. 1972, 76, 108082m

MARHUENDA E., GARCIA GIMENEZ, M.D. (1986) Etude de l'activite antibacterienne de la fraction flavonique des sommites fleuris d'Ononis natrix L. subsp. natrix. *Al Biruniya, Rev. mar. Pharm.* 2, 117-120.

MARHUENDA E. ALARCON DE LA LASTRA C., MARTIN M.J. (1988) Actividad espasmolítica de la fracción flavónica de Thymus carnosus Boiss. *Real Acad. Farm.* 54, 644-654.

MARTIN M.J., ALARCON DE LA LASTRA C., MARHUENDA E., DELGADO F. (1988) Anti-ulcerogenicity of the flavonoid fraction from Dittrichia viscosa L. W. Greuter in rats. *Phytother. Res.* 2, 183-186.

MARTIN M.J., MOTILVA V., ALARCON DE LA LASTRA C. (1993) Quercetin and naringenin; effects on ulcer formation and gastric secretion in rats. *Phytother. Res.* 7, 150-155.

McCORD J.M., FRIDOUICH I. (1968) The reduction of cytochrome C by milk xantine oxidase. *J. Biol. Chem.* 243, 5753-5760.

MIDDLETON E. Jr., DRZEWIECKI G., TATUM J. (1987) The effects of citrus flavonoids on human basophil and neutrophil function. *Planta Medica* 53, 311-314.

MILES P.R., WRIGHT J.R., BOWMAN L., COLBY H.D. (1980) Inhibition of hepatic microsomal lipid peroxidation by drug substrates without drug metabolism. *Biochem. Pharmacol.* 29, 565-570.

MITSHER L.A., DRAKE S., GOLLAPUDI S.R., HARRIS J.A., SHANKEL D.M. (1985) Isolation and identification of higher plant agents active in antimutagenic assay systems, *Glycyrrhiza glabra*. En: Antimutagenesis and Anticarcinogen mechanisms. Ed. D.M. Shankel, P.E. Hartman, T. Kada, A. Hollaender. Pleum Press, 153-165.

MONBOISSE J., BRAQUET P., RANDOUX A., BOREL J.P. (1983) Non-enzymic degradation of acid-soluble calf skin collagen by superoxide ion: protective effect of flavonoids. *Biochem. Pharmacol.* 32, 53-58.

MORA A., PAYA M., RIOS J.L., ALCARAZ M.J. (1990) Structure-activity relationships of polymethoxyflavones and other flavonoids as inhibitors of non-enzymic lipid peroxidation. *Biochem. Pharmacol.* 40, 793-797.

MORONEY M.A., ALCARAZ M.J. FORDER R.A., CAREY F., HOULT J.R.S. (1988) Selectivity of neutrophil 5-lipoxygenase and cyclooxygenase inhibition by antiinflammatory flavonoid glycoside and related aglycone flavonoids. *J. Pharm. Pharmacol.* 40, 787-792.

MOTILVA V., ALARCON DE LA LASTRA C., MARTIN M.J., 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 M.J. (1994) Ulcer-protectin effects of naringenin on gastric lesions induced by ethanol in rat: Role of endogenous prostaglandins. *J. Pharm. Pharmacol.* 46, 91-94.

NAGARATNAM P.D., RATTY A.K. (1986) Effects of flavonoids on induced non-enzymic lipid peroxidation. *Prog. Clin. Biol. Res.* 213, 243-247.

NAKABAYASHI T. (1961) Citrus flavonoids. VI. Chemical structure of the disaccharide of neohesperidin, naringin and poncirin. *Nippon Nogei Kagaku Zasshi* 35, 942-945. En C.A. 1964, 60, 11043h.

NAVARRO C., ESCOLAR G., BAÑOS J.E., CASANOVAS C.I., BULBENA O. (1988) Effect of zinc acexamate on gastric mucosal production of prostaglandin E₂ in normal and stress rats. *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 33, 75-80.

NORTHOVER B.J., SUBRAMANIAN (1962) Possible mediators of inflammatory reactions in the mouse foot. *Brit. J. Pharmacol.* 18, 346-355.

OBRĪNK K.J. (1991) Histamine and gastric acid secretion. *Scand. J. Gastroenterol.* 26, 4-8.

OCCHIUTO F., CIRCOSTA C., COSTA R., BRIGUGLIO F., TONMASINI A. (1986). Etude comparée de l'activité cardiovasculaire des pousses feuilles et des fleurs de *Crataegus oxycanta*. *Planta med. et Phytoter.* 20, 52-63.

OKUDA J., MIWA I., INAGAKI K., HORIE T., NAKAYAMA M. (1982) Inhibition of aldose reductases from rat and bovine lenses by flavonoids. *Biochem. Pharmacol.* 31, 3807-3822.

OTTERNESSI I.G., GANGS D.J. (1988) Nonsteroidal antiinflammatory drugs: an analysis of the relation-ship between laboratory animal and clinical doses, including species scaling. *J. Pharm. Sci.* 77, 790-795.

PALOMINO O.M. (1995) Flavonoides del género Sideritis (Lamiaceae) por HPLC. Tesis Doctoral, Dpto. de Farmacología, Facultad de Farmacia, UCM, Madrid.

PANASIAK W., WLEKLIK M., ORACZEWSKA A., LUCZAK M. (1989) Influence of flavonoids on combined experimental infections with EMC virus and Staphylococcus aureus in mice. *Acta Microbiol. Pol.* 38, 185-188.

PAPPANO N.B., BLANCO S.E., DEBBATTISTA N.B., SEGOVIA R.F., FERRETTI F.H. (1985) Mechanisms of bacteriostatic action of flavonoids on a Staphylococcus aureus strain. *Comun Biol.* 4, 23-37.

PARIS R.R., MOYSE H. (1976) Matière Médicale. Ed. Masson, Paris, 108.

PAYA M., HALLWELL B., HOULT R.S. (1992) Interactions of a series of coumarins with reactive oxygen species. *Biochem. Pharmacol.* 44, 205-214.

PEREZ GUERRERO C., MARTIN M.J., MARHUENDA E. (1994) Prevention by rutin of gastric lesions induced by ethanol in rats: Role of endogenous Prostaglandins. *Gen. Pharmac.* 25, 575-580.

PICARELLI Z.P., HYPPOLITO N., VALLE J.R. (1962) Sinergistic effect of 5-hidroxytryptamine on the response of rat seminal vesicles to adrenaline and noradrenaline. *Arch. Int. Pharmacodyn.* 138, 345.

PINCEMAIL J., DEBY C., LION Y., BRAQUET P., HANS F., DRIEU K., GOUTIER R. (1985) Role of flavonoids in lipoperoxidation and radicalar reactions. En: Flavonoids and bioflavonoids. Ed. L. Farkas, M. Gabor, F. Kallay, Szeged, 423-436

PINCEMAIL J., THIRION A., DUPHIS M., BRAQUET P., DRIEU K., DEBY C. (1987) Ginkgo biloba extract inhibits oxigen species production generated by phorbol myristate acetate stimulated stimulated human leukocytes. *Experientia* 43, 181-184.

PIÑA M., ARMIJO M. (1978) Estudio de los efectos antiinflamatorios y analgésicos del eterilato, benorilato y ácido acetilsalicílico. *Arch. de Farmacol. y Toxicol.* 4, 183-186.

RATTY A.K., DAS N.P. (1988) Effects of flavonoids on non-enzymatic lipid peroxidation: structure-activity relationship. *Bioche. Med. Metab. Biol.* 39, 69-79.

ROBAK J., DUNIEC Z., RZADKOWSKA-BODALSKA H., OLECHNOWIAZ W., CISOWSKI W. (1986) The effect of some flavonoids on non-enzymic lipid oxidation and enzymic oxidation of arachidonic acid. *Pol. J. Pharmacol. Pharm.* 38, 483-491.

ROBAK J., RYSZARD J., GRYGLEWSKI R.J. (1988) Flavonoids are scavengers of superoxide anions. *Biochem. Pharmacol.* 37, 837-841.

ROBBINS R.C. (1966) Effect of vitamin C and flavonoids on blood cell aggregation and capillary resistance. *Intern. Z. Vitaminforsch.* 36, 10-15.

ROBBINS R.C. (1967) Effect of flavonoids on survival time of rats fed thrombogenic or atherogenic regimens. *J. Atheroscler. Res.* 7, 3-10.

ROBERT A. (1979) Cytoprotection by prostaglandins. *Gastroenterology* 71, 761-767.

ROBERT A., NEZAMIS J.E., LANCASTER C. (1983) Mild irritants prevent gastric necrosis through adaptative cytoprotection mediated by prostaglandins. *Am. J. Physiol (Gastroenterol. Liver Physiol.* 8) 245, 113-121.

ROBERT A., KAUFFMAN G.L. (1984) Stress ulcer. En: *Gastrointestinal disease*. Ed. Sleinger M.J., Fordtran J.S., 3^a ed., W.B. Saunders, Philadelphia, 612-625.

ROBERT S.H., SALIL K.D., ABRAHAN E.N. (1965) Certain organic substances and their effects on the incidenc of dental caries in the cotton rat. *J. Dental Res.* 44, 549-553.

ROBERTSON G.H., CLARK J.P. LUNDIN R. (1974) Dihydrochalcone sweeteners. Preparation of neohesperidin dihydrochalcone. *Ind. Eng. Chem. Prod. Res. Develop.* 13, 125-129. En C.A. 1974, 81, 37745v.

ROSAM A.C., WALLACE J.L., WHITTLE B.R.J. (1986) Potent ulcerogenic actions of platelet activating factor on the stomach. *Nature* 319, 54-56.

RUVES J.J., STABLES R. (1987) The antisecretory profile of action of the H₂ receptor antagonists famotidine, loxidine, ranitidine and L-643441 on the rat isolated gastric mucosa. *Agents Actions* 20, 22-28.

SALIM A.S. (1990) Removing oxygen-derived free radicals stimulates healing of ethanol-induced erosive gastritis in the rat. *Digestion* 47, 24-28.

SANCHEZ MATEO C.C., DARIAS DEL CASTILLO V., BRAVO DIAZ L. (1988) Estudio farmacológico de una nueva serie de análogos tiofenólicos de dibenzoacepinas. Tesis Doctoral. Universidad de La Laguna, 108-109.

SANTUS R., PERDRIX L., HAIGLE J., MORLIER P., MAZIERE C., LABRID C. (1991) Daflon as a cellular antioxidant and a membrane-stabilizing agent in human fibroblasts irradiated by ultraviolet A radiation. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* 8, 200-205.

SARFEN I.J., TARNAWSKI A., MALKI A., MASON G.R., MARCH T., IVERY K.J. (1983) Portal hypertension and gastric mucosal injury in rats. Effects of alcohol. *Gastroenterology* 84, 987-993.

SCAMBIA G., RANELLETTI F.O. BENEDETTI P.P., BONANNO G., DE VICENZO R., FERRANDINA G., RUMI C., LAROCCA L.M., MANCUSO S. (1990) Inhibitory effect of quercetin on OVCA 433 cells and presence of type II oestrogen binding sites in primary ovarian tumours and cultured cells. *Br. J. Cancer* 62, 942-946.

SCHMIDT K.L., HENAGAN J.M., HILBURN P.J. (1985) Prostaglandin cytoprotection against ethanol-induced gastric injury in rat: A histologic and citologic study of the surface epithelium. *Gastroenterology* 88, 649.

SENAY E.C., LEVINE R.J. (1967) Synergism between cold and restraint for rapid production of stress ulcer in rats. *Proc. Soc. Exp. Biol.* 124, 1221-1223.

SEWING K.F., BEIL W., HANNEMANN H. (1988) Comparative pharmacology of histamine H₂ receptor antagonist. *Drugs* 33 (suppl. 3), 25-29.

SLATER T.F. (1972) Free radical mechanisms in tissue injury. Ed. Pion, London, 118.

SOMASUNDARAN S., SADIQUE J. (1986) Anti-hemolytic effects of flavonoidal glycosides of Clerodendrom inerme: an in vitro study. *Fitoterapia* 57, 103-110.

SON HEUNG S., KIM HYUN S., KWON TAE B., JU JIN S. (1992) Isolation, purification and hypotensive effect of bioflavonoids in Citrus sinensis. *Han 'guk Yougyang Siklyong Hakkoechi* 21, 136-142.

STEINLID G. (1970) Flavonoids as inhibitors of the formation of adenosine triphosphate in plant mitochondria. *Phytochem.* 9, 2251-2256.

STOCKBRUGGER R., JAUP B., HAMMER R., DOTERALL G. (1979) Inhibition of gastric acid secretion by pirenzepine(L-S-519) in man. *Scand. J. Gastroenterol.* 14, 615-620.

SWEDIN G. (1971) Studies on neurotransmission mechanisms in the rat and guinea-pig vas deferens. *Acta Physiol. Scand.* suppl. 369.

SWIES J., ROBAK J., DABROWSKI L., DUNIEC Z., MICHALSKA Z., GRYGLEWSKI R.J. (1984) Antiaggregatory effect of flavonoids in vivo and their influence on lipoxygenase and cyclooxygenase in vitro. *Pol. J. Pharmacol. Pharm.* 36, 455-465.

SZABO S., TRIER J.S., FRANKEL P.W. (1981) Sulphydryl compounds may mediate gastric citoprotection. *Science* 214, 200-202.

SZABO S., TRIER J.S., BROWN A., SCHOOR J. (1985) Early vascular injury and increased vascular permeability in gastric mucosal injury caused by ethanol in the rat. *Gastroenterology* 88, 228-236.

SZABO S., GOLDBERG I. (1990) Experimental pathogenesis. Drugs and chemical lesions in the gastric mucosa. *Scand. J. Gastroenterol.* 25 (suppl. 174), 1-8.

SZERT-GYORGYI A. (1936) Über den einfluss von substanzen der flavongrupe auf die permeabilität der kapillaren. Vitamin P. *Dtsch. Med. Wschr.* 62, 1325.

TAKEUCHI K., OKABE S. (1983) Role of luminal alkalization in repair process of ethanol induced mucosal damage in rat stomach. *Dig. Dis. Sci.* 28, 993-997.

TAKEUCHI K., VESHIMA K., HIRONAKA Y., FUJIOKA Y., MATSUMOTO J., OKAVE S. (1991) Oxygen free radicals and lipid peroxidation in the pathogenesis of gastric mucosal lesions induced by indometacin in rats. *Digestion* 49, 175-184.

TANAKA T., MAKITA H., OHNISHI M., HIROSE Y., WANG A., MORI H., SATOH K., HARA A., OGAWA H. (1994) Chemoprevention of 4-nitroquinoline 1-oxide- induced oral carcinogenesis by dietary curcumin and hesperidin; comparison with the protective effect of β -carotene. *Cancer Res.* 54, 4653-4659.

TEIJI IWAMI (1960) The effects of various flavone glycosides on the excretion of uric acid and the capillary stabilizing action. *Hirosaki Igaku* 12, 83-88.

TOREL J., CILLARD J., CILLARD P. (1986) Antioxidant activity of flavonoids and reactivity with peroxyradical. *Phytochemistry* 25, 383-385.

TSUCHIYA Y., SHIMIZU M., HIYAMA Y., ITOH K., HASHIMOTO Y., NAKAYAMA M., HORIE T., MORITA N. (1985) Antiviral activity of natural occurring flavonoids in vitro. *Chem. Pharm. Bull.* 33, 3881-3886.

TSUKADA M., SEIND Y., VEDA S., UCHINO H., SAKAI M. (1989) Influence of water-immersion stress on synthesis of mucus glycoprotein in the rat gastric mucosa. *Scand. J. Gastroenterol.* 24 (suppl. 162) 127-130.

TURNER R.A. (1965) Screening methods in Pharmacologie (Vol I). Academic Press, New York, 22-41.

UKADA K., TAKEUCHI Y., MUVAT H.C. (1970) Simple method for quantification of enhanced vascular permeability. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 33, 1384-1387.

VAN DER BROUCKE C.O., LEMLY J.A. (1983) Spasmolytic activity of the flavonoids from Thymus vulgaris. *Pharm. Week. Sci. Ed.* 5, 9-14.

VANE J.R. (1957) A sensitive method for the assay of 5-hydroxytryptamine. *Brit. J. Pharmacol.* 12, 344-346.

VANE J.R. (1959) The relative activities of some tryptamine analogues on the isolated rat stomach strip preparation. *Br. J. Pharmacol.* 14, 87-98

VARMA S.D., MIKUNI J., KINOSHITA J.M. (1975) Flavonoids as inhibitors of lens aldose-reductase. *Science* 188, 1215-1216.

VILLAR A., ESPLUGUES J., ALCARAZ M.J. (1982) Acute anti-inflammatory activity of the Sideritis mugronensis flavonoids. *Arch. de Farmacol. y Toxicol.* 8, 99-106.

VILLAR A., GASCO M.A., ALCARAZ M.J. (1985a) Effect of hipolaetin-8-glucoside on human platelet aggregation induced by ADP. *Planta Medica* 5, 455-456.

VILLAR A., GASCO M.A., ALCARAZ M.J. MANEZ S., CORTES D. (1985b) Hypolaetin-8-O-glucoside, an antiinflammatory flavonoid from Sideritis mugronensis. *Planta Medica* 1, 70.

WAAGE S., HEDIN P. (1984) Biologically active flavonoids from Gossypium arborecim. *Phytochemistry* 23, 2509-2511.

WALL M.E., WANI M.C., MANIKUMAR G., ABRAHAN Ph., TAYLOR H., HUGHES Th.J., WARNER J., McGIVNEY R. (1988) Plant antimutagenic agents 3: Flavonoids. *J. Nat. Prod.* 51, 1084-1091.

WALLACE J.L., WHITTLE B.R.J. (1986) Profile of gastrointestinal damage induced by platelet activating factor. *Prostaglandins* 32, 137-142.

WALSH J.H. (1988) Peptides as regulators of gastric acid secretion. *Ann. Rev. Physiol.* 50, 41-63.

WALT R.P. (1990) Prostaglandins and peptic ulcer therapy. *Scand. J. Gastroenterol.* 25 (suppl. 174), 29-36.

WHITTLE B.J.R., OREN-WOLMAN N., GUTH P.H. (1985) Gastric vasoconstrictor actions of LTC₄, PGE_{2α} and TX mimetic u-46619 on rat submucosal microcirculation in vivo. *Am. J. Physiol.* 248, 6580-6586.

WHITTLE B.J.R. (1989) Role of eicosanoids and related mediators in gastric mucosal ulcerations. *Scand. J. Gastroenterol.* 24 (suppl. 162), 222-224.

WHITTLE B.J.R. (1993) Modulation by prostanoids in the release of inflammatory mediators from mast cells: Involvement in mucosal protection. *Gastroenterology* 104, 314-315.

WILKINSON A.H.B. (1991) Treatment of herpes infections with lysine and vitamin C and hesperidin. *En C.A.* 1992, 117, P205186w.

WILSON D.E. (1986) Therapeutic aspects of prostaglandins in the treatment of peptic ulcer disease. *Dig. Dis. Sci.* 31, 425.

WINDHOLZ M. (1992a) The Merck index, an encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals. 16^a ed. Ed. Merck & Co., Inc., Rahway, New Jersey, U.S.A., 675.

WINDHOLZ M. (1992b) The Merck index, an encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals. 16^a ed. Ed. Merck & Co., Inc., Rahway, New Jersey, U.S.A., 925.

WINTER C.A., RISLEY E.A., NUSS G.W. (1962) Carragenan-induced oedema in hind paw of the rat as an assay for anti-inflammatory drugs. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 111, 544-547.

WOLFE M.H., SOLL A.H. (1988) The physiology of gastric acid secretion. *N. Engl. J. Med.*, 319, 1707-1715.

WOOD J.D. (1984) Enteric neurophysiology. *Am. J. Physiol.* 247, 6585-6598

YUTING C., RONGLIANG Z., ZHONGJIAN J., YONG J. (1990) Flavonoids as superoxide scavengers and antioxidants. *Free Radic. Biol. Med.* 9, 19-21.

ZARAGOZA F., IGLESIAS I., BENEDI J., FDEZ-CORBEIRA P. (1985) Efecto sobre la agregación plaquetaria de los citroflavonoides. *Fitoterapia* 56, 343-347.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Resolución de la Junta de Gobierno de la Facultad de Filosofía y Letras, en sesión ordinaria celebrada el día 15 de mayo de 1968, en el salón de sesiones de la Facultad de Filosofía y Letras, con el objeto de aprobar el programa de estudios de la licenciatura en Filosofía y Letras, en el área de Filosofía, para el ciclo de 1968-1969.

[Handwritten signature]

[Handwritten signature]

[Handwritten signature]

El Vocal
[Handwritten signature]
El Doctorado

[Handwritten signature]