



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

---

**Facultad de Química**

**Participación de la anhidrasa carbónica en el  
efecto antinociceptivo de Diosmina y  
Hesperidina en un modelo de edema plantar en  
ratas Wistar**

**TESIS**

Que para obtener el título de  
**Química Farmacéutica-Bióloga**

**P R E S E N T A**

Ady Xathziri Muñiz Alquicira

**DIRECTOR DE TESIS**

Dra. Azucena Ibeth Carballo Villalobos

Ciudad Universitaria, CDMX. 2022





Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:** Profesor: CASTRO TORRES NELLY NORMA

**VOCAL:** Profesor: GONZALEZ TRUJANO MARIA EVA

**SECRETARIO:** Profesor: CARBALLO VILLALOBOS AZUCENA IBETH

**1er. SUPLENTE:** Profesor: CERBON CERVANTES MARCO ANTONIO

**2° SUPLENTE:** Profesor: CARDOSO SALDAÑA GUILLERMO CELESTINO

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

BIOTERIORIO DE LA FACULTAD DE QUÍMICA 4TO PISO EDIFICIO "A"

**ASESOR DEL TEMA:**

---

DRA. AZUCENA IBETH CARBALLO VILLALOBOS

**ASESOR TÉCNICO:**

---

MVZ. ATONATIU EDMUNDO GÓMEZ MARTÍNEZ

**SUSTENTANTE:**

---

ADY XATHZIRI MUÑIZ ALQUICIRA

*Este proyecto fue realizado gracias al Programa UNAM-PAPIIT: IN21792*

## Índice

Acrónimos .....	I
Índice de Tablas .....	II
Índice de Figuras .....	II
Resumen .....	1
Marco teórico.....	2
Dolor .....	2
Inflamación .....	3
Clasificación de la inflamación .....	3
Modelos utilizados .....	5
Tratamientos antiinflamatorios actualmente utilizados.....	7
Uso de productos naturales en la inflamación y dolor .....	8
Flavonoides .....	8
Hesperidina.....	11
Diosmina.....	12
Mecanismos de Acción de hesperidina y diosmina .....	13
Justificación.....	16
Hipótesis .....	16
Objetivos .....	17
Objetivo General .....	17
Objetivos particulares.....	17
Metodología.....	17
Fármacos y reactivos .....	17
Preparación de los diferentes tratamientos .....	17
Animales de experimentación .....	18
Condiciones de alojamiento y alimentación.....	19
Evaluación por medio del la prueba de formalina al 1%.....	19
Evaluación por modelo de hilo .....	20
Administración de la dosis .....	20
Justificación de la vía de administración y niveles de dosis .....	17
Úlcera gástrica inducida por Etanol.....	20
Análisis estadístico .....	21

Resultados .....	23
Prueba de Formalina al 1%.....	23
Modelo de Hilo .....	28
Efecto gastroprotector de Diosmina y Hesperidina.....	29
Discusión.....	31
Conclusiones.....	38
Bibliografía .....	38

Acrónimos

RO	Especies Reactivas de Oxígeno
TLR	Receptores tipo Toll
TNF	Factor de Necrosis tumoral
IL	Interleucina
AINE <sub>s</sub>	Medicamentos antiinflamatorios no esteroideos
COX	Ciclooxigenasa
PN	Productos Naturales
SNC	Sistema Nervioso Central
TRPV <sub>1</sub>	Receptor de potencial Transitorio V <sub>1</sub>
AC	Anhidrasa Carbónica
AAZ	Acetazolamida
SFN	Sulfonamida
EEM	Error Estándar de la Media
IAC	Inhibidor de Anhidrasa Carbónica

Índice de Tablas

Tabla 1. Clasificación de los Flavonoides (Simone Badal et al., 2017). 9

Tabla 2. Esquema de administración de tratamientos para la evaluación del efecto antiinflamatorio 21

Índice de Figuras

Figura 1. Pasos implicados en los procesos inflamatorios crónicos y sus consecuencias. .... 5

Figura 2. Anillos en la estructura base de los flavonoides..... 10

Figura 3. Estructuras químicas de hesperidina, hesperetina y rutinosa. .... 12

Figura 4. Estructura química de diosmina..... 13

Figura 5. Efectos de diosmina ..... 15

Figura 6. Diagrama de Proceso de la prueba de formalina en dos fases (0-5 min y 20-25 min) y modelo de hilo.  
..... 22

Figura 7. Diagrama de proceso del Modelo de Úlcera Gástrica. .... 23

Figura 8. Evaluación del efecto antiinflamatorio de los flavonoides diosmina y hesperidina en la prueba de Formalina al 1%..... 25

Figura 9. Evaluación del efecto antiinflamatorio de los flavonoides diosmina y hesperidina en la prueba de Formalina al 1%..... 27

Figura 10. Evaluación del efecto antiinflamatorio de los flavonoides diosmina y hesperidina en Modelo de Hilo.  
..... 29

Figura 11. Efecto gastroprotector de diosmina, hesperidina y meloxicam sobre lesiones gástricas inducidas por etanol. .... 30

Figura 12. Fotografías representativas de las lesiones gástricas..... 31



## Resumen

Las enfermedades asociadas con inflamación son un problema de salud pública grave, debido a que los tratamientos actuales, como los fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) y antiinflamatorios esteroideos, presentan limitaciones en su eficacia y severos efectos adversos. Los flavonoides como diosmina y hesperidina destacan por ser una alternativa viable contra este tipo de afecciones, ya que en diversos estudios se ha demostrado su efecto antiinflamatorio, debido a su capacidad para reducir mediadores químicos como: TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , ICAM-1, COX-2; además de su capacidad de inhibir a los neutrófilos que generan radicales superóxidos (ONOO<sup>-</sup>) y productos finales de la glicosilación. Si bien los mecanismos de acción por los cuales estos flavonoides median su efecto antiinflamatorio ya se han estudiado, aún existen varias interrogantes como la participación de la anhidrasa carbónica (AC) en el efecto antinociceptivo de diosmina y hesperidina, los cuales pueden ser explorados en diferentes modelos de dolor e inflamación.

Se cree que la inhibición de la AC ayuda a reducir la inflamación mejorando los síntomas que esto implica como: dolor, enrojecimiento, hinchazón, calor y pérdida de movilidad del área afectada. Esta es la razón por la que en este trabajo se planteó la hipótesis de que los flavonoides diosmina y hesperidina producen un efecto antiinflamatorio en la prueba de formalina al 1%, el cual es mediado por la inhibición de la AC. Para ello el estudio se realizó con ratas Wistar macho (180 a 250g), a las cuales se les cuantificó el tiempo de lamida y el número de sacudidas en dos intervalos de tiempo (de 0 a 5 min y de 20 a 25 min) después de la administración de formalina al 1% en la zona plantar de la extremidad posterior derecha. Los tratamientos consistieron en vehículo c.b.p, diosmina (316.2 y 100 mg/Kg), hesperidina (316.2 y 100 mg/Kg), meloxicam (10 mg/Kg), acetazolamida (100 mg/Kg), sulfonamida (100 mg/Kg) y las combinaciones de acetazolamida/diosmina, sulfonamida/diosmina, acetazolamida/hesperidina y sulfonamida/hesperidina (ambas en 100 mg/Kg). Posteriormente, se procedió a la eutanasia y se llevó a cabo la medición de ambas extremidades posteriores para medir el grado de inflamación. Los resultados indican que los flavonoides producen un efecto antiinflamatorio, donde la actividad de la AC juega un papel importante, siendo de mayor importancia para esta afección algunas de sus isoenzimas.

## Marco teórico

### Dolor

El dolor es individual y subjetivo. La Asociación Internacional para el Estudio del Dolor lo define como “una sensación desagradable y una experiencia emocional asociadas con un daño tisular real o potencial, o descrita en términos de tal daño” (Raja et al., 2021). Aunado a esto, es importante diferenciar este concepto de la nocicepción, la cual se refiere a los fenómenos biológicos desencadenados por la acción de los estímulos nocivos sobre el organismo antes de que esa información sea consciente. Aquí se incluyen aspectos como la actividad de los nociceptores, la transmisión de potenciales de acción, el funcionamiento de las diferentes sinapsis a lo largo de las vías ascendentes. Debe tenerse presente que no siempre la nocicepción da lugar a la percepción de dolor. Dolor, como ya se mencionó, es la percepción que el sujeto experimenta con todos sus componentes sensoriales, emocionales y discriminativos. El dolor habitualmente es el resultado de una actividad nociceptiva, pero puede haber casos de dolor sin nocicepción, es decir, sin la presencia de una lesión o de un estímulo nocivo (Moreno et al., 2004). Existen diferentes clasificaciones del dolor; según su origen son los siguientes:

- Dolor nociceptivo: Causado por la activación de las fibras aferentes nociceptivas, normalmente a través de la estimulación térmica, mecánica o química.
- Dolor neuropático: Causado por daños o enfermedades que afectan a cualquier parte del sistema somatosensorial. Suele describirse como "ardor", "hormigueo", "eléctrico" o "punzante".
- Dolor psicógeno: Dolor causado, aumentado o prolongado por factores mentales, emocionales o conductuales. Este tipo de dolor también se denomina psicalgia o dolor somatomorfo (Cheng, 2018).

Generalmente, el dolor es asociado con otro proceso llamado inflamación donde el organismo lucha contra un agente extraño que puede generar algún daño y el paciente lo evidencia sintiendo dolor, calor, rubor o impotencia funcional.

## Inflamación

La palabra inflamación proviene del latín *inflammare* o *inflammatio*, que significa encender fuego. Clásicamente, la inflamación se define como una respuesta adaptada de los tejidos vivos vascularizados que se activa ante la presencia de un agente patógeno o una lesión. Además de ser una de las reacciones protectoras más fundamentales y pronunciadas del organismo como componente central de la inmunidad innata (Schmid-Schönbein, 2006). Macroscópicamente la inflamación se caracteriza por la aparición de 5 signos:

- El primer signo es el rubor, el cual se produce por una mayor irrigación sanguínea (incremento en la concentración de eritrocitos) de la zona donde se está dando el estímulo inflamatorio
- El segundo signo es dolor producto de la acción de diferentes mediadores como prostaglandinas, bradiquininas y sustancia P, las cuales actúan sobre los nociceptores.
- El tercer signo corresponde al calor que se genera por el aumento de la actividad metabólica de la zona y un incremento de especies reactivas de oxígeno (RO) y a la llegada de sangre caliente.
- El cuarto signo es la tumefacción que se produce por la extravasación de líquido del torrente sanguíneo hacia la zona afectada, debido un incremento de la permeabilidad vascular de los vasos sanguíneos que rodean el tejido.
- Finalmente, el quinto signo, o signo de Virchow, corresponde a la disminución de la función del órgano o tejido afectado (Alessandri et al., 2013).

## Clasificación de la inflamación

Las etapas de la inflamación dependen de la duración del proceso, así como de varios factores inmunológicos. Estas etapas se han clasificado en procesos agudos y crónicos.

La inflamación aguda es un proceso corto que dura de minutos a unos pocos días y sus principales características son la fuga de proteínas o líquido plasmático y el movimiento de leucocitos hacia un área extravascular (Markiewski et al., 2007). Estas reacciones celulares y vasculares están intermediadas por factores químicos producidos a partir de células o plasma y son responsables de los síntomas clínicos clásicos de inflamación como hinchazón, enrojecimiento, dolor, calor y pérdida de función.

Hay tres pasos principales en las respuestas inflamatorias agudas que incluyen un aumento del flujo sanguíneo al área inflamada, seguido de vasodilatación y aumento de la permeabilidad vascular con fuga de plasma de la microcirculación y migración de leucocitos fagocíticos al tejido circundante (Kobayashi et al., 2014; Markiewski et al., 2007). Según el tipo de infección (bacteria, virus, parásito, etc.), los sensores, mediadores y tejidos diana difieren durante la respuesta inflamatoria (Medzhitov, 2010).

Los patógenos bacterianos se reconocen a través de los receptores del sistema inmunitario innato como los receptores tipo Toll (TLR), que se expresan en los macrófagos residentes en los tejidos y estimulan la generación de citocinas inflamatorias (Por ejemplo: Factor de necrosis tumoral (TNF-  $\alpha$ ), Interleucinas (IL-1 $\beta$  y IL-6)), quimiocinas y PGE2. Posteriormente, estas sustancias reaccionan en los tejidos objetivo que incluyen vasos sanguíneos locales para estimular la vasodilatación, la extravasación de neutrófilos y la fuga de plasma en el sitio infectado (inflamación aguda). Entonces, los macrófagos y mastocitos residentes en los tejidos de los neutrófilos encuentran los patógenos para eliminarlos (Pecchi et al., 2009).

Por otra parte, la inflamación crónica generalmente ocurre tras la persistencia de cuerpos extraños, exposiciones químicas continuas, inflamación aguda recurrente o patógenos específicos. El proceso molecular y celular de esta inflamación es variado y depende del tipo de células y órganos inflamados (Figura 1) (Ferguson, 2010).

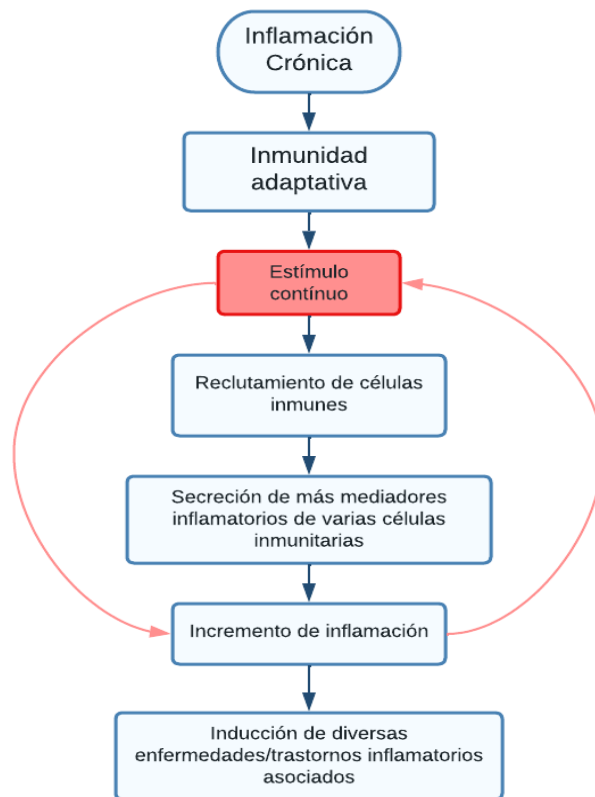


Figura 1. Pasos implicados en los procesos inflamatorios crónicos y sus consecuencias. (Ferguson, 2010)

### Modelos experimentales

En la última década se han realizado numerosos estudios *in vivo* e *in vitro* para evaluar los efectos de fármacos y nuevas moléculas con respecto al dolor y la inflamación. Sin embargo, debido a que la evaluación en seres humanos es compleja y produce en ocasiones daños irreversibles al organismo, el generar y validar modelos animales fácilmente reproducibles para ampliar el conocimiento de los mecanismos involucrados y evaluar el potencial analgésico y antiinflamatorio de éstos es necesario (Boyce-Rustay et al., 2009).

Un modelo ampliamente utilizado para evaluar el efecto antiinflamatorio de determinados compuestos sobre la respuesta inflamatoria aguda es la nocicepción inducida por inyección de formalina. Esta prueba aplica para el modelo de dolor nociceptivo agudo y tónico y se basa en la administración de una disolución de formaldehído diluido (formalina) en un intervalo de

concentraciones que van del 1 al 5%, administrando un pequeño volumen en la extremidad trasera del animal (Doak et al., 1997). La prueba se lleva a cabo, principalmente, en roedores, aunque se han hecho experimentos en gatos, conejos, cobayos y aves domésticas. Esta prueba describe diferentes comportamientos, entre los que se encuentran el morder (biting), lamer (licking) y sacudir (flinching/shakes) la pata inyectada (Wu et al., 2004).

La prueba de formalina presenta dos fases: la primera ocurre del minuto 0 al 5 y se caracteriza por conductas nociceptivas de lamida y sacudida de la pata administrada, siendo este último el parámetro más utilizado para cuantificar el grado de dolor. La segunda fase tiene su máximo a los 20 a 25 minutos (la prueba tiene una duración de 60 minutos aproximadamente) después de la inyección del irritante químico. Durante esta fase se observa la fase inflamatoria por la liberación de mediadores químicos (Veiga et al., 2004) .

Se ha reportado que la nocicepción observada durante la primera fase se debe a la estimulación directa de nociceptores, principalmente fibras C. La segunda fase (tónica o inflamatoria) se atribuye al proceso desencadenado por mediadores de inflamación aguda como son la presencia de histamina, serotonina, prostaglandinas y bradicinina. Es por esta segunda fase que la temperatura se considera un factor importante de controlar, pues a menor temperatura el proceso de inflamación se desarrolla más lento, por ello se sugiere una temperatura controlada de 22-23°C para ratones y 25-27°C para ratas (Tjølsen et al., 1992).

Esta prueba también se ve afectada por factores de estrés del animal como: sonidos, olores, luz intensa, elevada presión atmosférica o intensa actividad humana en el cuarto durante el periodo en que se está llevando a cabo la prueba, por ello se recomienda tener un cuarto exclusivo para la realización de esta prueba o establecer restricciones en cuanto al sonido y nivel de actividad durante la realización de la prueba (Rosland, 1991).

Por otra parte, para la cuantificación de la inflamación o edema plantar existen diversas técnicas, directas e indirectas, como son:

- Volumétrica: Basada en el volumen de líquido desplazado por la extremidad hinchada del roedor.
- Gravimétrica: Pesando la pata cortada en estado húmedo y seco.
- Mediciones lineales de la circunferencia de la pata mediante un lazo de cinta,

manualmente o mediante un lazo mecánicamente, las cuales se realizan al milímetro más cercano y a nivel del metatarsiano.

- Medición del diámetro de la pata mediante calibradores micrométricos.

El método gravimétrico puede adaptarse para proporcionar una cifra fácil de comparar, a saber, el índice de inflamación. Este índice es paralelo a la medición del diámetro de la pata. Todos los métodos anteriores son fiables para el estudio de la inflamación, debido a que son precisos, exactos y reproducibles (Petricevic et al., 1978). Los modelos anteriormente mencionados, como muchos otros, nos ayudan a poder introducir nuevos medicamentos en la industria farmacéutica evaluando la seguridad y eficacia de un fármaco experimental.

#### Tratamiento antiinflamatorio.

Los medicamentos antiinflamatorios esteroideos y los medicamentos antiinflamatorios no esteroideos (AINE) se usan actualmente contra la inflamación. (Mehrzadi et al., 2021). Los AINEs, incluida la indometacina, inhiben las actividades de las enzimas ciclooxigenasa-1 (COX-1) y ciclooxigenasa-2 (COX-2), impidiendo la síntesis de tromboxanos y prostaglandinas y, por ende, muestran actividad antipirética, analgésica y antiinflamatoria. Los antiinflamatorios esteroideos, por su parte, son glucocorticoides con propiedades antiinflamatorias, debido a que inhiben la transcripción de genes proinflamatorios al unirse a los receptores de glucocorticoides y activar los genes antiinflamatorios (Ou et al., 2019).

Tanto los antiinflamatorios esteroideos como los AINEs producen efectos adversos que causan problemas de salud graves limitando su poder terapéutico; por ejemplo, los primeros causan obesidad y osteoporosis cuando se administran por un tiempo prolongado, mientras que los AINEs pueden ser la causa de enfermedades cardiovasculares, úlceras gastrointestinales, trastornos de la función renal y hepatotoxicidad (Cordaro et al., 2020). Por lo tanto, existe una necesidad urgente de descubrir nuevos fármacos que puedan ser más efectivos y seguros contra el dolor y la inflamación. Los productos naturales (PN) siempre han sido usados como interesantes recursos terapéuticos para esta afección y son fuente para el desarrollo de nuevos fármacos (Butler, 2008).

### Uso de productos naturales en la inflamación y dolor

Históricamente, los PN han demostrado su valor como fuente de moléculas con potencial terapéutico y en la actualidad siguen representando un grupo importante para la identificación de nuevos fármacos. Debido a que los PN se producen en los organismos vivos, éstos poseen propiedades que están optimizadas evolutivamente para cumplir diferentes funciones biológicas (Unirse a proteínas diana específicas u otras biomoléculas, entre otras funciones) (Atanasov et al., 2015). Por lo tanto, la extensión en la exploración de los PN busca encontrar compuestos innovadores para tener alternativas terapéuticas en diversos padecimientos especialmente para el cáncer, enfermedades infecciosas, diabetes mellitus, enfermedades inflamatorias y combatir la resistencia a los antimicrobianos (Thomford et al., 2018).

Los compuestos aislados de los PN más estudiados hasta el momento contra el dolor y la inflamación son: terpenoides, alcaloides, flavonoides y fenoles por sus propiedades biológicas. Los terpenoides, específicamente los terpenos, pueden actuar en el Sistema Nervioso Central (SNC) modulando importantes sistemas neurotransmisores, tales como glutamatérgicos, serotoninérgicos, opioidérgicos y cannabinoides con un papel importante en la modulación del dolor crónico (Batista et al., 2008).

Por otra parte, los alcaloides producen propiedades en el SNC, especialmente los derivados de los alcaloides indol. Investigaciones recientes encontraron que el alcaloide lapaconitina (Obtenido de especies de plantas *Aconitum*) tiene un perfil analgésico (Xu et al., 2006).

Los flavonoides son uno de los metabolitos secundarios más importantes para la industria farmacéutica y cosmética por su utilidad como componente preventivo del cáncer, antienvjecimiento, antioxidante, antiinflamatorio y analgésico (le Marchand, 2002; Shahidi et al., 1992).

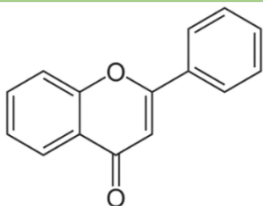
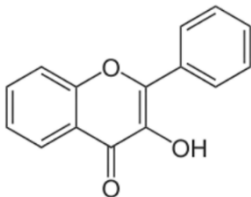
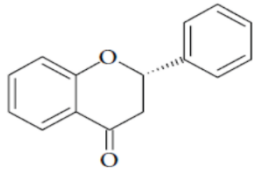
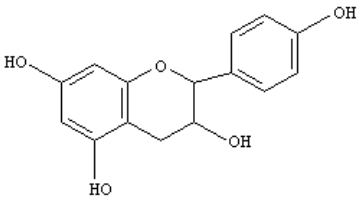
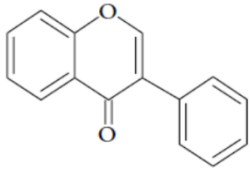
### Flavonoides

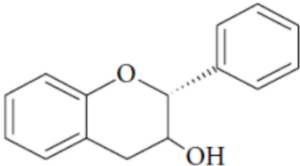
Los flavonoides son metabolitos secundarios de biogénesis mixta ampliamente distribuidos en las plantas donde se les encuentra en forma libre como glicósidos (O-glicósidos; o C-glicósidos), sulfatos y algunas veces como dímeros o polímeros (Mata, 2019). Se sabe que son responsables de una gran variedad de efectos farmacológicos de especies de plantas medicinales como antiinflamatorios, antioxidantes, antibacterianos, anticancerígenos y como



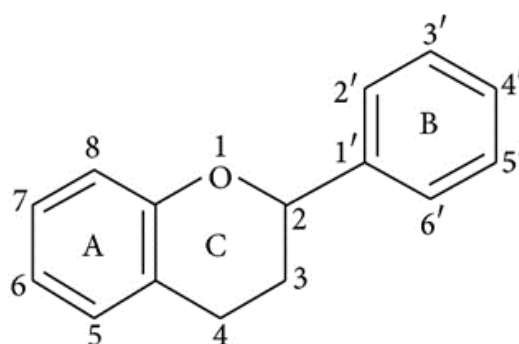
analgésicos (Kumar & Pandey, 2013). Éstos compuestos se encuentran en frutas, verduras, semillas y flores, así como en cerveza, vino, té verde, té negro y soja, los cuales son consumidos en la dieta humana de forma habitual (Martínez Flórez et al., n.d.). Los flavonoides se pueden clasificar en subfamilias con base en su estructura molecular (Tabla 1) (Simone Badal et al., 2017).

Tabla 1. Clasificación de los Flavonoides (Simone Badal et al., 2017).

Grupo	Estructura Base	Ejemplo
Flavonas		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Luteolina</li> <li>• Apigenina</li> <li>• Crisina</li> </ul>
Flavonoles		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Quercetina</li> <li>• Rutina o quercetin-3-rutinósido</li> <li>• Astragalina</li> </ul>
Flavanonas		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Naringina</li> <li>• Hesperidina</li> </ul>
Antocianinas		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Peralgonidina</li> <li>• Cianidina</li> <li>• Peonidina</li> </ul>
Isoflavonas		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Genisteina</li> <li>• Daidzeina</li> </ul>

<p><b>Flavan 3-oles</b></p>		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Catequina</li> <li>• Epicatequina</li> </ul>
-----------------------------	---	---

Se han identificado más de 8000 compuestos, los cuales tienen la estructura base de un esqueleto de 15 carbonos (Figura 2), C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>, que consiste en dos anillos bencénicos (A y B) unidos mediante un anillo heterocíclico (C) (Kumar & Pandey, 2013). Biogénicamente, la unidad C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> proviene de fenilalanina o tirosina por la ruta del ácido siquímico. La otra porción de la molécula proviene de ácidos carboxílicos pequeños por la ruta de los policétidos.



*Figura 2. Anillos en la estructura base de los flavonoides (Kumar & Pandey, 2013).*

Respecto a sus propiedades físicas y químicas podemos decir que, tanto las flavonas como los flavonoles, son sólidos coloridos (amarillo muy tenue hasta intenso), mientras que las antocianinas son de colores rojo intenso, morado, violeta y azul. Las pruebas que comúnmente se usan para su identificación son la prueba con reactivo de Neu (sol. al 1% de difenilborato de 2 amino-etilo) también llamado reactivo general de productos naturales, forma complejos de borato altamente fluorescentes visibles con luz UV y la prueba de Shinoda produce coloraciones rojizas cuando se les adiciona magnesio seguido de HCl concentrado a las disoluciones acuosas o alcohólicas de flavonoides como flavonas y flavonoles (Mata, 2019).

Los flavonoides cuentan con diferentes acciones biológicas que son resultado de la modulación de algunos procesos de transducción de señales de los organismos vivos y no por su habilidad

de capturar radicales libres como algunos piensan. Algunas de estas propiedades terapéuticas son que a nivel vascular disminuyen la fragilidad y permeabilidad de los capilares aumentando así su resistencia.

Otros estudios han demostrado que los flavonoides tienen propiedades bactericidas contra agentes patógenos causantes de enfermedades periodontales como *Porphyromonas gingivalis*. También han demostrado tener efecto antifúngico contra *Candida albicans*, que es el principal patógeno en la candidiasis oral (Guasgua, 2017).

Tienen propiedades anticancerígenas dado que han demostrado tener un efecto potencial terapéutico en la prevención contra diferentes tipos de cáncer, así como el desarrollo de estos durante la carcinogénesis. Se han sugerido muchas vías de acción de los flavonoides contra el cáncer, las más reconocidas son: Inhibición de p53 mutada, inhibición de proteínas de choque térmico, capacidad de unión a receptores de estrógeno e inhibición de la expresión de proteínas (Kumar & Pandey, 2013).

Por último, su propiedad antiinflamatoria y analgésica se ha descrito ampliamente. Estudios han sugerido que los flavonoides inhiben cinasas debido a la competencia de unión con ATP de los flavonoides a los sitios catalizadores de las enzimas. También se ha reportado que los flavonoides pueden inhibir la expresión de óxido nítrico, ciclooxigenasa y lipooxigenasa que son esenciales para la producción de prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos (Kumar & Pandey, 2013).

### Hesperidina

La hesperidina (hesperidina- $\beta$ -7-rutinósido) es una flavanona glicosilada, compuesta por una aglicona llamada hesperetina o metil eriodictiol y un disacárido llamado rutinosa (Figura 3). La unidad de disacárido (C<sub>12</sub>H<sub>22</sub>O<sub>10</sub>) se compone de una molécula de ramnosa y una de glucosa (Garg et al., 2001).

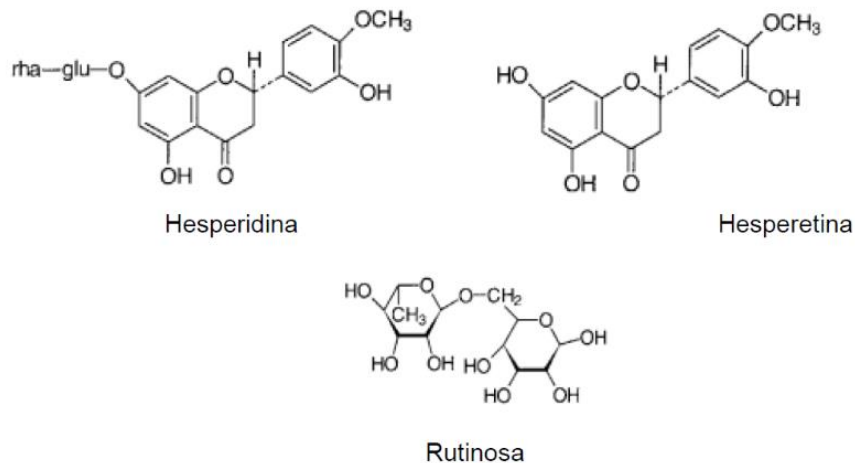


Figura 3. Estructuras químicas de hesperidina, hesperetina y rutinosa (Garg et al., 2001).

Su nombre sistemático es (3,5,7-trihidroxi-4-metoxiflavona 7-ramnoglucósido) y fue aislado por primera vez en 1828 por el químico francés Lebreton del albedo (parte interior esponjosa de la cáscara) de las naranjas, y desde entonces se ha encontrado en limones y otras frutas cítricas (Manthey et al, 2001). Según los estudios realizados hasta el momento, la concentración de hesperidina es mayor en las plantas *Citrus sinensis* ( $15,25 \pm 8,21$  mg / 100 g de peso de fruta fresca) y *Citrus reticulado* ( $19,26 \pm 11,56$  mg / 100 g de peso de fruta fresca) (Peterson et al., 2006).

### Diosmina

La diosmina (3, 5,7-trihidroxi-4-metoxiflavona 7-ramnoglucósido) es un glucósido flavonoide natural que puede aislarse de varias fuentes vegetales o derivarse del flavonoide hesperidina. la característica estructural de la diosmina ( $C_{28}H_{32}O_{15}$ ) es un doble enlace entre dos átomos de carbono en el anillo C (Figura 4). Se presenta de forma natural como un glucósido, lo que significa que tiene una molécula de azúcar unida a su estructura flavonoide de tres anillos. Se aisló por primera vez en 1925 y se introdujo como agente terapéutico en 1969 (Zheng et al., 2020).

La diosmina se utiliza desde hace más de 30 años como agente flebotónico y protector vascular y recientemente se ha empezado a investigar para otros fines terapéuticos como tratamiento de cáncer y dolor (“Monograph. Diosmin.,” 2004). Sin embargo, el uso clínico de la diosmina ha sido muy limitado, debido a su baja solubilidad en agua y biodisponibilidad.

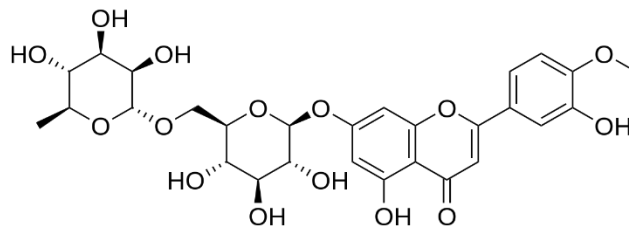


Figura 4. Estructura química de diosmina.

Al ser ingerida, la diosmina se convierte rápidamente en diosmetina en forma de aglicona en la flora intestinal. Tiene una vida media plasmática de 26 a 43 h, después la diosmetina se reduce a ácidos fenólicos o sus derivados conjugados con glicina y se elimina por la orina (Kern Pharma, 2012).

#### Mecanismos de acción de hesperidina y diosmina

A pesar de las diversas investigaciones realizadas sobre los diferentes usos de los flavonoides, hasta el momento no se conoce de forma precisa la actividad de éstos en el SNC. Existen propuestas que ayudan a comprender mejor y establecer posibles mecanismos de acción implicados en el dolor y la inflamación, particularmente nos centraremos en la hesperidina y diosmina.

La hesperidina inhibe de manera significativa la síntesis de PGs *in vivo* (Damon et al., 1987) y también reduce de manera dosis dependiente la producción de óxido nítrico, TNF- $\alpha$ , IL-12 inducidas por lipopolisacáridos e INF- $\alpha$ , efectos que podrían asociarse al mecanismo de acción a través del cual hesperidina reduce la inflamación y la nocicepción en varios modelos experimentales (Rao et al., 2008).

El mecanismo implicado en el efecto antinociceptivo de la hesperidina también se le atribuye a su actividad antioxidante, por la inhibición de la producción de ROS (especies reactivas de oxígeno). Se sabe que la producción de las ROS es uno de los pasos desencadenantes de los procesos de inflamación y dolor, éstas son producidas por células relacionadas con mecanismos de defensa del organismo, como los neutrófilos polimorfonucleares (Mittal et al., 2014).

Las ROS que se liberan durante el proceso inflamatorio incluyen al anión superóxido ( $O_2^-$ ), el radical hidróxido ( $OH^\cdot$ ), el peróxido de hidrogeno ( $H_2O_2$ ) y el ácido hipocloroso ( $HOCl$ ); los cuales son capaces de desencadenar una cascada de señales que terminan con la producción de mediadores del dolor como las prostaglandinas, a través de la producción de COX-2, TNF- $\alpha$  y IL-1. Además, diversos estudios relacionan la producción de ROS con el dolor. En estos estudios se evalúa la presencia o disminución de estas en comparación con la intensidad de dolor, encontrando que, al disminuir la cantidad de ellas, el dolor disminuye. Por otro lado, la cantidad de estas sustancias aumenta en el proceso doloroso (Ji et al., 2015; Wang et al., 2008).

Los mecanismos responsables de otros efectos farmacológicos reportados de la hesperidina, como el antiinflamatorio, tampoco están descritos con claridad, pero se sabe que es capaz de reducir a las TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , ICAM-1; además de su capacidad de inhibir a los neutrófilos que generan radicales superóxidos ( $ONOO^-$ ) y productos finales de la glicosilación (Ferraz et al., 2020). Lo anterior sugiere que este flavonoide puede inducir su efecto antinociceptivo a través de varios mecanismos, ya que algunos de estos productos también están relacionados con la nocicepción.

Por otra parte, la diosmina se ha explorado como el componente principal del medicamento Daflon (contiene un 90% de diosmina y un 10% de otros flavonoides expresados en forma de hesperidina), el cuál es utilizado en la clínica para mejorar la microcirculación. Sin embargo, también se reporta que la diosmina posee diversas actividades farmacológicas, incluyendo la antiinflamación, la antioxidación, protección contra el cáncer, protección del hígado, neuroprotección, protección cardiovascular, protección renal y protección de la retina (Figura 5) (Zheng et al., 2020). A pesar de esto, aún no se han identificado dianas farmacológicas específicas.

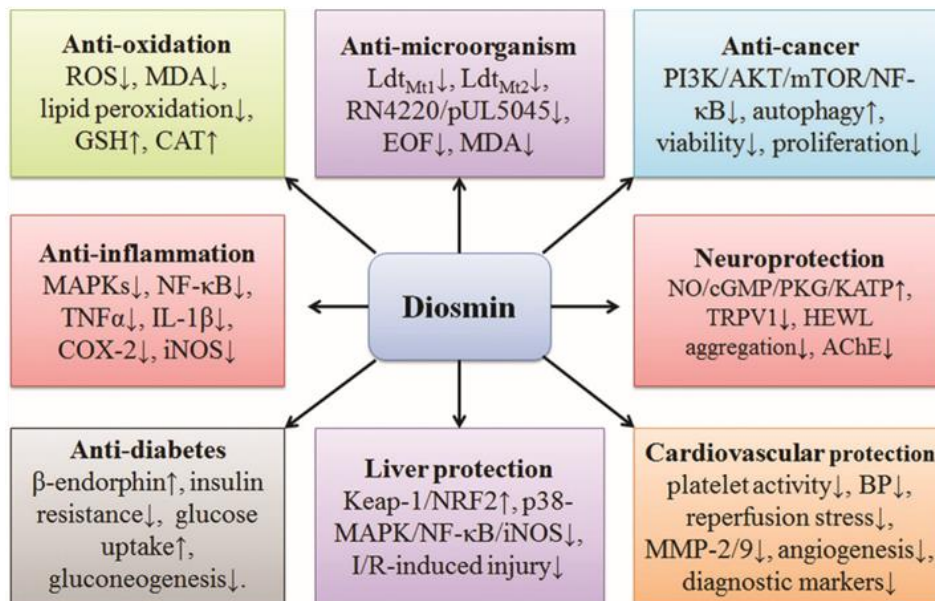


Figura 5. Efectos de diosmina (Zheng et al., 2020)

Con respecto a su efecto neuroprotector se informa que, en el modelo de rata con CCI, la diosmina combinada con hesperidina mejoran significativamente la hiperalgesia mecánica y térmica. Estos efectos pueden ser bloqueados por los antagonistas de los receptores D<sub>2</sub>, GABA<sub>A</sub> y opioides, pero no por el inhibidor del receptor 5-HT<sub>1A</sub>. En consecuencia, la diosmina por sí sola puede exhibir efectos antihiperálgicos no por los receptores GABA<sub>A5</sub>-HT<sub>1A</sub> sino por los receptores D<sub>2</sub> y opioides, acompañados por la reducción de la expresión de citocinas proinflamatorias (IL-1β, TNFα e IL-6) (Carballo-Villalobos et al., 2018). En otro estudio se demostró que la diosmina atenúa el dolor e inflamación inducidos mediante la inhibición de las citocinas de la médula espinal (IL-1β, TNFα e IL-33/St2) y la activación de las células gliales. También se demostró que tiene efectos antinociceptivos en diferentes modelos de inflamación en ratas y ratones al antagonizar el receptor del potencial transitorio vanilloide1 (TRPV1) sin producir efectos secundarios evidentes (Zheng et al., 2020).

Recientes investigaciones han validado a las ACs (metaloenzimas que catalizan la conversión rápida de dióxido de carbono y agua a bicarbonato y protones) como nuevas dianas terapéuticas para el diseño de nuevos fármacos antiglaucoma, anticonvulsivos, medicamentos contra el cáncer, entre otros (Supuran et al., 2007). Entre sus diferentes isoformas presentes en el cuerpo humano, las hCA II y VII están presentes en el sistema nervioso y se expresan en gran medida tanto a nivel central como periférico y pueden modularse para aliviar el dolor y disminuir la

inflamación. La isoforma fisiológicamente dominante es hCA II y se expresa en diferentes células del SNC como los oligodendrocitos y los astrocitos, Por otra parte, se observan altos niveles de hCA VII en la corteza, el hipocampo y el tálamo, lo que los convierte en objetivos prometedores para aliviar esta afección (Akgül et al., 2022).

Aunado a esto, diferentes pruebas de inhibición *in vitro* de las isoformas de la AC han demostrado que los compuestos fenólicos naturales, como hesperidina y otros flavonoides, producen su inhibición, lo cual conlleva a su papel importante en el descubrimiento y diseño de nuevos fármacos, además proporciona un posible mecanismo molecular para lograr atenuar el dolor y la inflamación (Taslimi et al., 2017).

### Justificación

Actualmente, el dolor y las enfermedades asociadas con inflamación representan un grave problema sanitario de incidencia creciente, tanto por el número de pacientes afectados como por la gran repercusión sobre la calidad de vida de aquellos que lo experimentan. Por ello existe la necesidad de buscar alternativas terapéuticas para esta afección, ya que los medicamentos actualmente utilizados como AINE's y antiinflamatorios esteroideos presentan limitaciones en su eficacia y están asociados a efectos adversos severos. Los flavonoides son compuestos aislados como productos naturales con más estudios al respecto del dolor y la inflamación, por lo cual se han presentado como un buen recurso para nuevos tratamientos.

Por lo anterior, en este estudio se evaluaron los flavonoides diosmina y hesperidina, de origen natural, como potencial terapéutico del dolor y la inflamación. Además, se buscó coadyuvar dilucidar el posible mecanismo de acción involucrado de estos flavonoides a través de la inhibición de la AC.

### Hipótesis

Los flavonoides diosmina y hesperidina producirán efecto analgésico y antiinflamatorio en la prueba de formalina al 1% mediados por la participación de la anhidrasa carbónica.



## Objetivos

### Objetivo General

Evaluar la participación de la anhidrasa carbónica en el efecto antinociceptivo y antiinflamatorio de diosmina y hesperidina en ratas Wistar.

### Objetivos particulares

1. Evaluar el efecto antinociceptivo de diosmina y hesperidina, así como de los inhibidores de la AC acetazolamida (AAZ) y sulfonamida (SFN), en la prueba de formalina en rata.
2. Evaluar el efecto de la AAZ y sulfonamida SFN en combinación con los flavonoides diosmina y hesperidina para explorar la posible participación de la AC en el mecanismo de acción antinociceptivo.
3. Valorar la capacidad de protección gástrica de los flavonoides diosmina y hesperidina.

## Metodología

### Fármacos y reactivos

Los productos utilizados en este proyecto fueron los siguientes: diosmina de Fluka® analytical con lote: SLBC3987V, hesperidina de Sigma- Aldrich® con lote: SLBT3541, AAZ de Sigma- Aldrich® con lote: BCCC4390, SFN de Sigma-Aldrich® con lote:0000120872, como vehículo Tween 80 de Sigma- Aldrich® lote: 9005656 preparado al 1 %, como principio activo meloxicam en su presentación comercial Flaxol<sub>MX</sub> solución inyectable de uso veterinario de Biochem® con lote: ASD4887 y caducidad de abril 2022. Para la preparación de la formalina al 1% se tomó 1.25 mL del concentrado al 40% y se aforó a 50 mL en un matraz.

### Justificación de la vía de administración y niveles de dosis

La vía de administración p.o. fue seleccionada como la vía sugerida para el uso clínico de los flavonoides y las dosis se basan en la literatura reportada de estudios con diosmina y hesperidina (Carballo-Villalobos et al., 2016; Carballo-Villalobos et al., 2018). Así como para AAZ y SFN (Asiedu et al., 2010; Carta et al., 2015). Una vez evaluados los efectos antinociceptivos y antiinflamatorios de ambos flavonoides a las dosis de 100 y 316.2 mg/kg, se eligió la dosis (100 mg/kg), presentando una respuesta significativa respecto al vehículo y al

fármaco de referencia y sin diferencia significativa con respecto a la dosis de 316.2mg/kg. Esta dosis fue probada con los inhibidores AAZ y SFN (grupos 9, 10, 11 y 12, Tabla 2) y fue usada para evaluar el modelo de úlcera gástrica.

### Tratamientos

El volumen para la administración de los tratamientos a cada rata fue 0.1 mL/100 g de peso corporal. A partir de las dosis y el volumen de administración se realizó el cálculo de las concentraciones que se prepararon y administraron a los sujetos experimentales. El vehículo consistió en Tween 80 al 1%. Para la preparación de las dosis de flavonoides, AAZ y SFN se pesó la cantidad de sustancia necesaria y se realizó una suspensión usando Tween 80 al 1%.

Para administrar los flavonoides se usaron las dosis de 100 y 316.2 mg/kg vía esofágica (p.o). Meloxicam como fármaco de referencia antinociceptivo se utilizó en dosis de 10 mg/kg vía esofágica (p.o.). La AAZ y SFN se prepararon a una dosis de 100 mg/kg y fueron administrados por vía intraperitoneal (i.p.). Para la vía i.p se empleó una aguja de 27Gx13mm; para la vía p.o se usó una cánula de acero inoxidable (16G por 30 mm).

### Animales de experimentación

Ratas macho de la cepa Wistar se usaron con un peso entre los 180 y 250 g. Cada grupo experimental contó con una  $n \geq 6$  animales, los cuales se identificaron por medio de marcaje sobre la cola de las ratas con plumones indelebles no tóxicos. En cada jaula se colocó una tarjeta de identificación, todos los procedimientos y acciones realizadas se registraron en la bitácora del proyecto. El registro del peso se realizó el día de la evaluación de cada animal.

Las ratas se evaluaron en cilindros de metacrilato con una altura de 25 cm y área de 706.86 cm<sup>2</sup>, durante las dos fases que se presentan en el tiempo y posteriormente se sacrificaron en una cámara de CO<sub>2</sub>. Inmediatamente las medidas correspondientes del diámetro plantar se realizaron a las dos extremidades traseras para poder cuantificar el grado de inflamación.

### Condiciones de alojamiento y alimentación

Los animales se alojaron en el bioterio de Facultad de Química de la UNAM bajo condiciones ambientales controladas OFICIO/FQ/CICUAL/482/22. Para la realización de los experimentos, se usó la sala de procedimientos. Todas las salas se mantienen bajo control del ciclo de luz oscuridad de 12/12 horas e incluyen extracción e inyección de aire con al menos 16 recambios por hora, la temperatura y humedad relativa del medio ambiente en el cuarto experimental se mantuvo en  $22\pm 2$  °C y entre 40-70%, respectivamente.

A todos los animales se les proporcionó alimento específico para ratón/rata durante el periodo de aclimatación y hasta el término el estudio se les proporcionó agua *ad libitum* filtrada. Las jaulas para su alojamiento fueron de polisulfonato con las siguientes dimensiones: 32 cm x 47 cm x 20 cm (3 a 5 animales/caja), en conformidad a la NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones Técnicas para La Producción, Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio (NOM-062-ZOO-1999, 1999). La cama que se utilizó fue viruta derivada de pino.

### Evaluación de la respuesta bifásica inducida por formalina al 1%

Las ratas se evaluaron al colocarlas en cilindros de metacrilato con una altura de 25 cm y área de 706.86 cm<sup>2</sup> durante las dos fases que se presentan en el tiempo y posteriormente se sacrificaron en una cámara de CO<sub>2</sub>. Inmediatamente las medidas correspondientes del diámetro plantar se realizaron a las dos extremidades traseras para poder cuantificar el grado de inflamación. Para la adecuación a la prueba los animales permanecieron por 15 min en el cilindro de metacrilato con dos espejos encontrados con un ángulo de 90° para permitir la correcta observación de las extremidades. Posteriormente, las ratas se inyectaron en la planta de la pata posterior derecha 20 µL de formalina diluida al 1% con una aguja calibre 30. Los animales fueron devueltos a las cámaras y el comportamiento nociceptivo se observó inmediatamente después y durante los primeros 5 min (0 – 5 min) y posteriormente a los 20 min de la administración durante otros 5 min (20 - 25 min). El comportamiento nociceptivo de la pata se cuantificó como el número de sacudidas y el tiempo que el animal invierte en lamer la pata durante los dos periodos. Al terminar esta evaluación se procedió a la eutanasia con cámara de CO<sub>2</sub>, (Figura 6).

### Evaluación por modelo de hilo

Para la medición de la inflamación se utilizó el método de medición de circunferencia de la extremidad conocido, en inglés, como "paw circumference measurement method". En este método se mide el ancho de la extremidad sana y de la extremidad inducida con edema para determinar el grado de inflamación de la pata lesionada, a través de la diferencia del diámetro medido de ambas extremidades (Figura 6).

### Administración de la dosis

Los tratamientos de prueba se administraron de manera aguda por vía p.o. en dosis eficaces probadas en estudios previos (Carballo-Villalobos et al., 2016, 2018). diosmina y hesperidina (100 mg/kg), fármaco de referencia meloxicam (10 mg/kg), y vehículo (Tween 80 al 1%). Adicionalmente, fármacos inhibidores de la AC se administraron vía i.p., AAZ (100 mg/kg) y SFN (100 mg/kg). Los flavonoides se administraron 30 min antes de la inducción de la nocicepción, mientras que AAZ y SFN se administraron 10 min antes. Para la administración por vía esofágica se utilizaron sondas esofágicas de acero inoxidable 16G x 30 mm, previamente sanitizadas. Para la administración intraperitoneal se usaron jeringas estériles de 1 mL con aguja 27G x 13 mm.

### Úlcera gástrica inducida por Etanol

Esta prueba se realizó con la finalidad de evaluar la capacidad de protección gástrica de los flavonoides diosmina y hesperidina, por la vía de administración empleada, y compararlos con el meloxicam, el cual produce efectos adversos gastrointestinales (Shavlovskaya et al., 2022).

Se evaluó el grado de daño gástrico (grupos 13, 14 y 15, Tabla 2). La úlcera gástrica se indujo utilizando el modelo de inducción de daño gástrico por la administración de etanol absoluto en ratas (Robert et al., 1979). Treinta minutos después del tratamiento con el vehículo, los flavonoides (100 mg/kg) y meloxicam (10 mg/kg, p.o.), las ratas se administraron con 1 mL de etanol absoluto vía p.o. Una hora más tarde, las ratas se sacrificaron en una cámara de CO<sub>2</sub> para diseccionar sus estómagos. Los estómagos se llenaron con 10 mL de formaldehído al 10% para ser fijados. Después de 10 min, se cortó la curvatura mayor del estómago para exponer las paredes internas (Figura 7). El daño gástrico se identificó a través de una lesión mucosa con

bandas alargadas de lesiones hemorrágicas que fueron capturadas y medidas en milímetros con el programa de procesamiento de imagen ImageJ.

Se utilizaron las siguientes fórmulas para obtener los resultados:

$$\text{Índice de Ulceración (IU)} = \frac{\text{área de ulceración}}{\text{área estomacal total}}$$

$$\% \text{ de Gastroprotección} = \frac{(\text{IU promedio del grupo control} - \text{IU del tratamiento})}{(\text{IU promedio del grupo control})}$$

Tabla 2. Esquema de administración de tratamientos para la evaluación del efecto antiinflamatorio

Grupos	Número de animales	Sexo	Producto	Dosis	Vía de administración
1	6	♂	Vehículo	cbp	P.O.
2	6		Diosmina	100 mg/kg	
3	6		Diosmina	316.2 mg/kg	
4	6		Hesperidina	100 mg/kg	
5	6		Hesperidina	316.2 mg/kg	
6	6		Meloxicam	10 mg/kg	
7	6		Acetazolamida	100 mg/kg	I.P.
8	6		Sulfonamida	100 mg/kg	
9	6		Diosmina + AAZ	100 o 316.2 mg/kg + 100 mg/kg	P.O. e I.P.
10	6		Hesperidina + AAZ	100 o 316.2 mg/kg + 100 mg/kg	P.O. e I.P.
11	6		Diosmina + SFN	100 o 316.2 mg/kg + 100 mg/kg	P.O. e I.P.
12	6		Diosmina + AAZ	100 o 316.2 mg/kg + 100 mg/kg	P.O. e I.P.
13	6		Diosmina	100 o 316.2 mg/kg	P.O.
14	6		Hesperidina	100 o 316.2 mg/kg	P.O.
15	6		Meloxicam	10 mg/kg	P.O.

♂: macho; P.O: vía esofágica; I.P: vía intraperitoneal; cbp: cuanto baste para la cantidad final del producto que se va a preparar.

### Análisis estadístico

Para la prueba de formalina al 1%, los datos se presentan como el promedio más/menos el error estándar de medida (EEM) en los cursos temporales de tiempo de lamida y número de sacudidas. Un análisis de varianza (ANADEVA) de 2 vías, seguido de la prueba de comparación

múltiple de Tukey, se utilizó para comparar los parámetros estudiados entre los grupos. Las diferencias se consideraron significativas cuando la  $p \leq 0.05$ .

Para los datos de medición del diámetro de las extremidades inflamadas y daño gástrico se utilizó una ANADEVIA de una vía seguida de la *post-hoc* Tukey, las diferencias se consideraron significativas cuando la  $p \leq 0.05$ . El análisis de datos se realizó con el programa Prism GraphPad® versión 5.01.

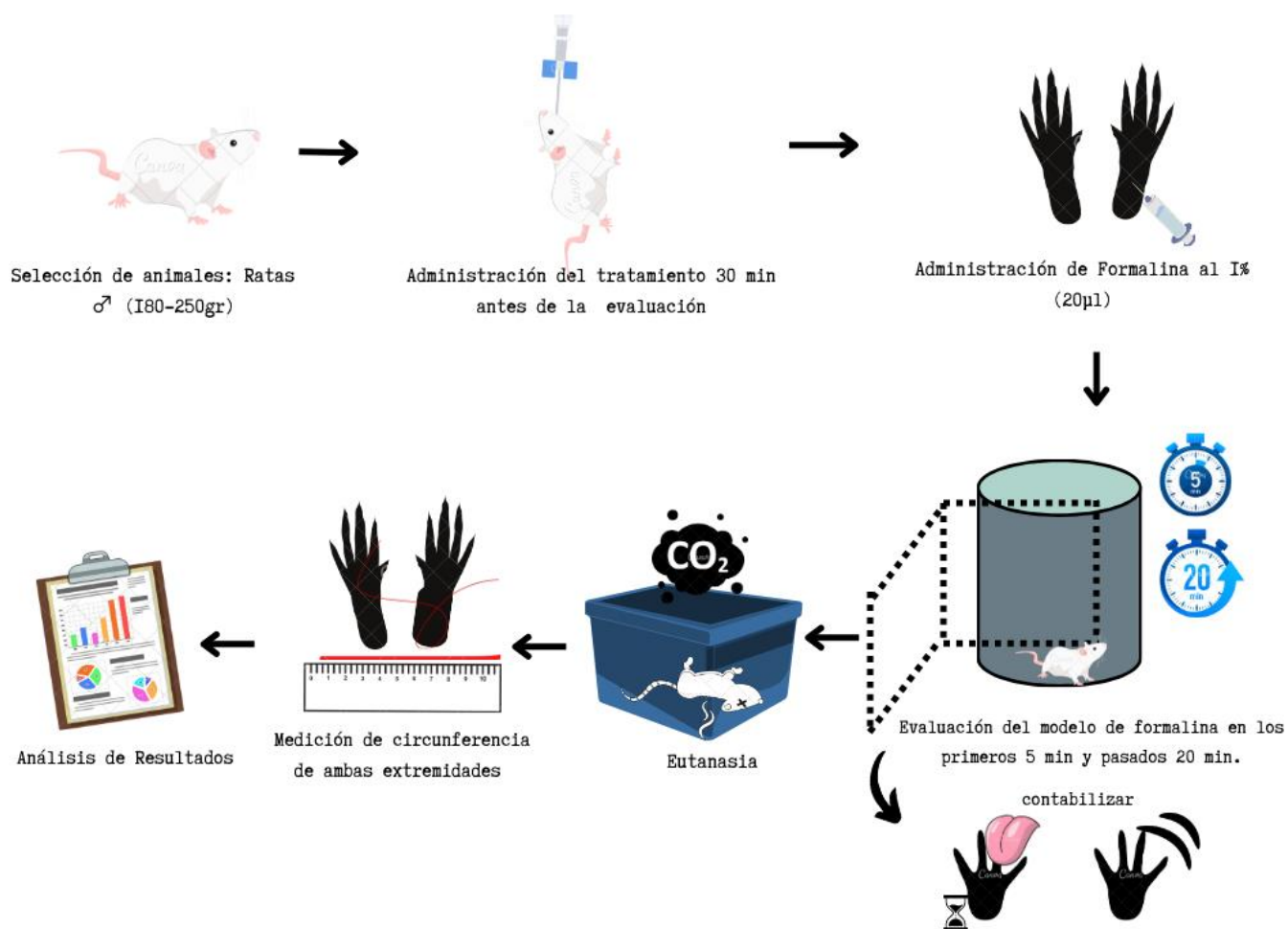


Figura 6. Diagrama de Proceso de la prueba de formalina en dos fases (0-5 min y 20-25 min) y modelo de hilo.

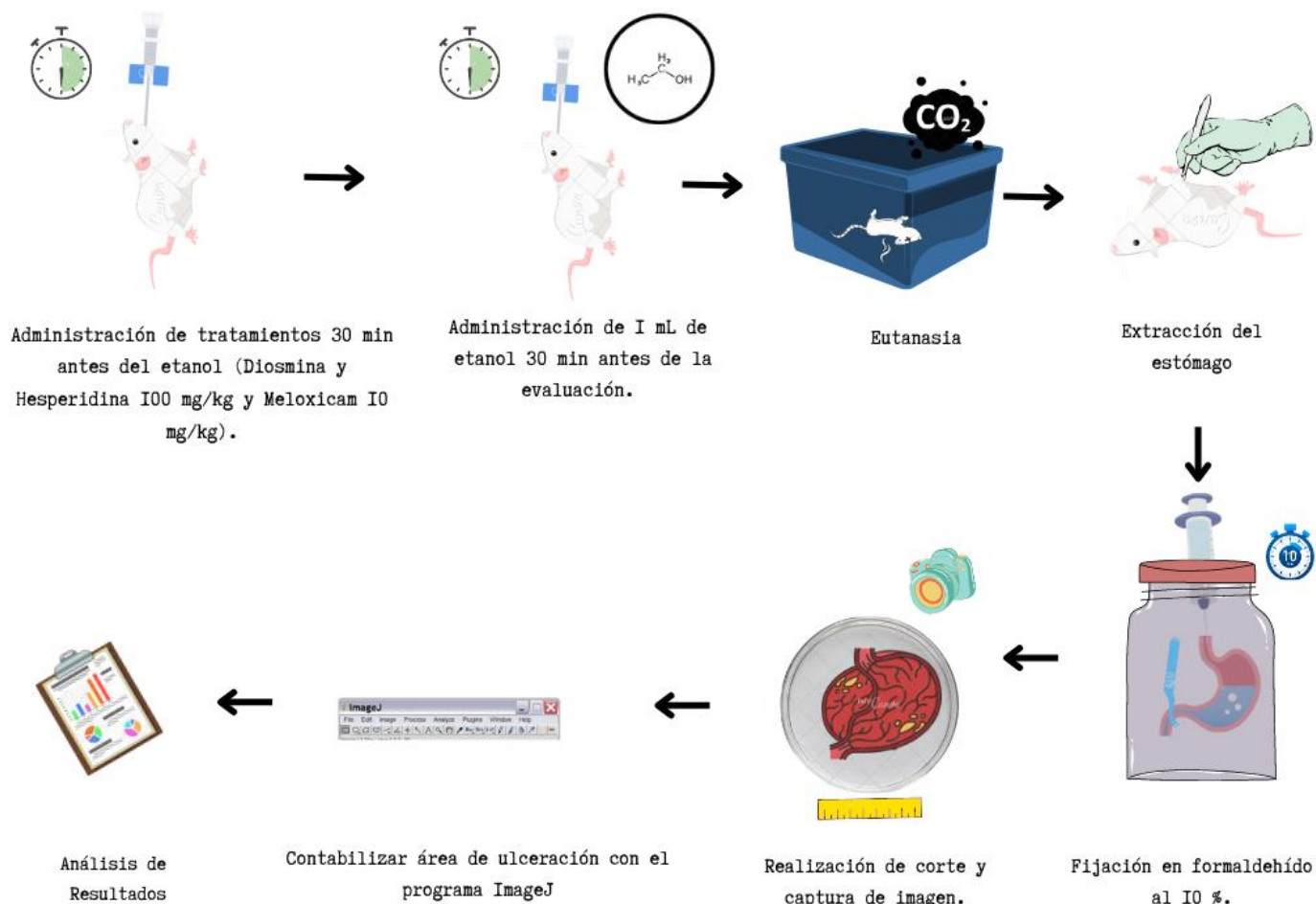


Figura 7. Diagrama de proceso del Modelo de Úlcera Gástrica.

## Resultados

### Prueba de formalina al 1%

La nocicepción inducida con formalina produjo la conducta típica de sacudidas y lamidas caracterizada por el retiro breve y rápido o la flexión de la pata inyectada (Lázaro-Ibáñez et al., 2001). Al graficar el tiempo de lamida y el número de sacudidas en función de las fases distintivas de este modelo de dolor (fase neurogénica evaluada de los 0-5 min y fase inflamatoria evaluada de los 20-25 min)(Tjølsen et al., 1992) se realizó una evaluación de la conducta nociceptiva, tanto del grupo control como de los tratamientos. Tradicionalmente, se considera que la fase neurogénica es el resultado de la sensibilización central de las neuronas del asta

dorsal y actividad de fibras C y A6, mientras que la fase inflamatoria se debe a la liberación de moléculas inflamatorias y la sensibilización de la médula espinal, al igual que una menor actividad de las fibras C (McCall et al., 1996).

Analizando el gráfico de la Figura 8 panel (A) encontramos que en ambas fases los flavonoides presentaron disminución tanto en el tiempo de lamida como en el número de sacudidas en comparación al vehículo (control), demostrando su efecto analgésico-antinflamatorio. Un efecto mayor se obtuvo en la Fase 1 en el tiempo de lamida para la diosmina con ambas dosis con respecto a meloxicam con una diferencia significativa de  $P < 0.01$ . Por otro lado, la hesperidina no presentó diferencia significativa contra meloxicam a ninguna dosis. Con respecto a la fase 1, en el número de sacudidas, se obtuvo una respuesta mayor de antinocicepción de ambos flavonoides en sus dos dosis con respecto a meloxicam con una diferencia de  $P < 0.05$ . El meloxicam no presenta un efecto atenuante en el número de sacudidas en este punto, lo cual se puede atribuir a que este medicamento es un inhibidor selectivo de la ciclooxigenasa-2 (COX-2) (Khalil et al., 2020) y dado que en el estado crónico de dolor inflamatorio, la COX-2 es la isoenzima predominante en el sitio de la inflamación y en la médula espinal lo cual se da en la Fase 2 de este modelo (Euchenhofer et al., 1998). Aunado a esto, podemos observar que en la Fase inflamatoria ya se puede ver el efecto en la disminución del número de sacudidas, teniendo el mismo efecto que los flavonoides (Figura 8B).

En la Fase 2 de ambos comportamientos se obtuvo un efecto antinociceptivo similar de los flavonoides en ambas dosis y meloxicam con respecto al vehículo con una diferencia significativa de  $P < 0.001$ . Cabe mencionar que, dados los resultados, no se encontró ninguna diferencia significativa entre las dosis de 100 mg/kg y 316.2 mg/kg en diosmina y hesperidina.



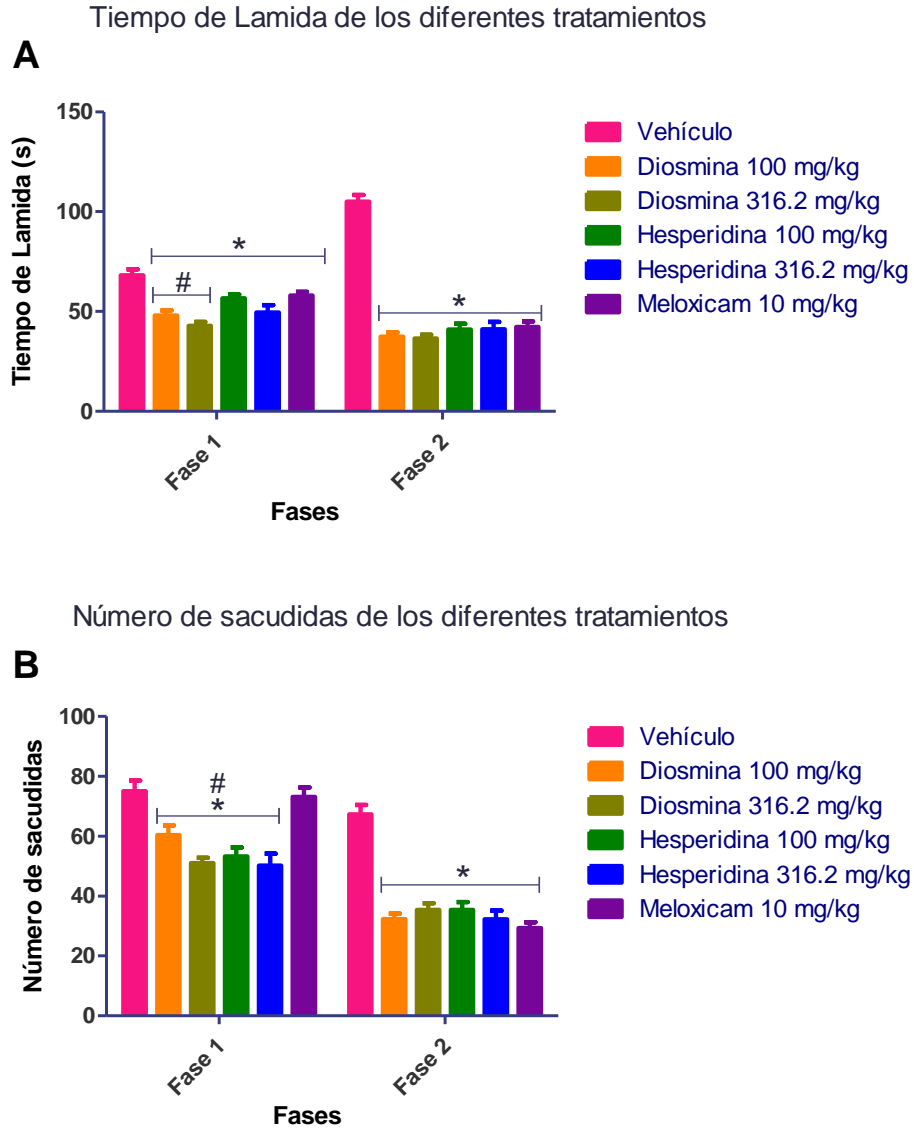


Figura 8. Evaluación del efecto antiinflamatorio de los flavonoides diosmina y hesperidina en la prueba de Formalina al 1%. Panel (A): Cada barra representa la media  $\pm$  EEM del tiempo de lamida (seg.) en dos intervalos de tiempo, Fase 1 (neurogénica) y Fase 2 (inflamatoria); se muestran los grupos administrados con: diosmina y hesperidina a 100mg/kg y 316.2 mg/kg cada uno, meloxicam a 10 mg/kg y vehículo cbp. Panel (B): Cada barra representa la media  $\pm$  EEM del número de sacudidas en Fase 1 y Fase 2 para los mismos tratamientos. En ambos paneles se realizó un análisis de varianza de dos vías donde: \* ( $p \leq 0.05$ ) Vs. Vehículo, # ( $p \leq 0.05$ ) Vs. meloxicam. Todos los grupos tienen una  $n \geq 6$  los cuales fueron tomados aleatoriamente.

En la Figura 9 se hizo la comparación de ambos flavonoides a una dosis de 100 mg/kg con respecto a los inhibidores SFN y AAZ a una dosis de 100 mg/kg. Asimismo, se compararon las distintas combinaciones entre estos grupos para poder evidenciar la participación de la CA en el efecto antinociceptivo de diosmina y hesperidina.

Al analizar el gráfico se observa que en ambas fases al administrar los inhibidores SFN y AAZ de manera individual no se obtiene un efecto terapéutico, ya que no hay diferencia significativa con respecto al vehículo. Al ser administrados en combinación con los flavonoides se observa una diferencia significativa de  $P < 0.001$  con respecto al vehículo en la Fase 2 del tiempo de lamida. No obstante, en comparación con los flavonoides administrados individualmente existe una diferencia de  $P < 0.001$  lo que indica que no se alcanzó el efecto antiinflamatorio deseado, lo cual sugiere que tanto la SFN y AAZ inhiben de alguna manera el efecto terapéutico de la diosmina y hesperidina.

En la Fase 1 se puede observar que los únicos tratamientos con diferencia contra el control en ambos comportamientos (lamidas y sacudidas) (Figura 9A y 9B) son diosmina y hesperidina, teniendo una diferencia significativa de  $P < 0.01$  para el número de sacudidas y de  $P < 0.05$  para el tiempo de lamida; lo que nos indica que el efecto provocado por estos flavonoides se ve afectado al ser combinados con SFN y AAZ. De igual manera podemos observar que en esta etapa no hay ninguna disminución de las conductas con la administración individual de SFN y AAZ.

En la Fase 2 nos encontramos con una mayor diferencia entre el flavonoide administrado de manera individual y de manera conjunta con los inhibidores SFN y AAZ, siendo para diosmina una diferencia de  $P < 0.001$  contra las combinaciones D-S y D-A en ambas conductas, del mismo modo para hesperidina con una diferencia de  $P < 0.001$  contra las combinaciones H-S y H-A en ambas conductas. En el número de sacudidas (Figura 9B) en esta fase las combinaciones (D-S, D-A, H-S, H-A) y los inhibidores SFN y AAZ no tuvieron ninguna diferencia significativa con respecto al vehículo. Mientras tanto, en tiempo de lamida se observó una diferencia de  $P < 0.001$  contra el vehículo para D-S, D-A, H-S y H-A por lo que podemos deducir que el efecto antinociceptivo de los flavonoides no se ve completamente bloqueado.

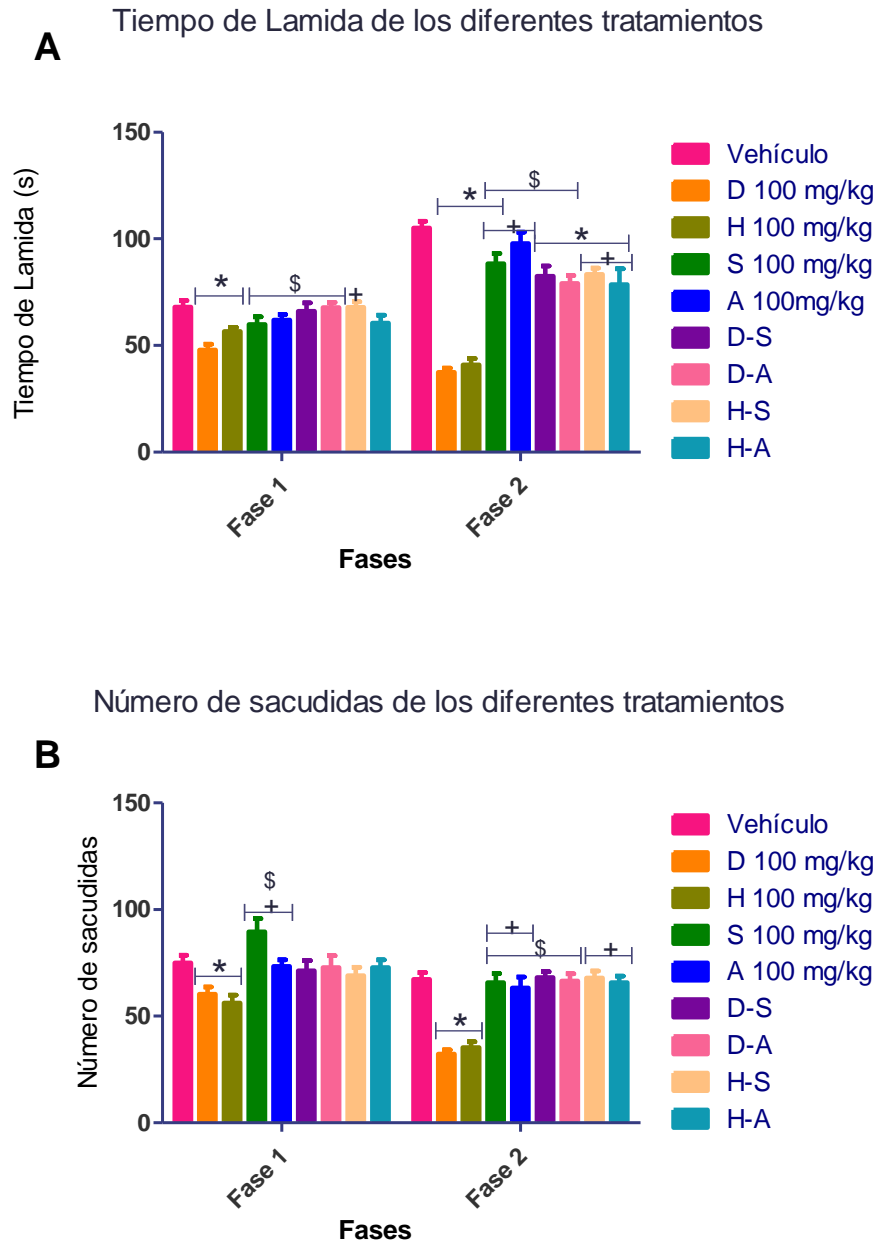


Figura 9. Evaluación del efecto antiinflamatorio de los flavonoides diosmina y hesperidina en la prueba de Formalina al 1%. Panel (A): Cada barra representa la media  $\pm$  EEM del Tiempo de lamida (seg.) en dos intervalos de tiempo, Fase 1 (neurogénica) y Fase 2 (inflamatoria); se muestran los grupos administrados con: (D) diosmina y (H) hesperidina a 100mg/kg, vehículo cbp., (S) SFN y (A) AAZ a 100mg/kg y las diferentes combinaciones entre flavonoides y SFN y AAZ (D-S, D-A, H-S, H-A). Panel (B): Cada barra representa la media  $\pm$  EEM del número de sacudidas tanto para Fase 1 como para Fase 2 para los mismos tratamientos. Para ambos

paneles se realizó un análisis de varianza de dos vías donde: \* diferencia estadísticamente significativa ( $p \leq 0.05$ ) Vs. vehículo, + diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ ) Vs. hesperidina y \$ diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ ) Vs. diosmina. Todos los grupos tienen una  $n \geq 6$  los cuales fueron tomados aleatoriamente.

### Modelo de Hilo

Los resultados de este modelo evaluaron los efectos de los diferentes tratamientos sobre edema plantar durante la fase aguda de la inflamación, esto es 30 min posteriores a la administración de la formalina al 1 %. En la Figura 10 panel (A) se muestran los datos obtenidos por los flavonoides en dosis de 100 mg/kg y 316.2 mg/kg, Meloxicam a 10 mg/kg y Vehículo donde podemos observar que todos los tratamientos obtuvieron un efecto antiinflamatorio con respecto al vehículo, con una diferencia significativa de  $P < 0.0001$ . De igual manera que en la prueba de formalina no se obtuvieron diferencias entre las dosis probadas con los flavonoides por lo cual se trabajó con la dosis de 100 mg/kg para las combinaciones con SFN y AAZ.

En la Figura 10 panel (B) se puede observar que tanto diosmina como hesperidina al ser administrados de manera individual provocan un efecto antiinflamatorio alto. Sin embargo, al ser administrados en conjunto con los inhibidores SFN y AAZ su efecto se ve disminuido. Los grupos S, A, D-S y D-A obtuvieron una diferencia de  $P < 0.0001$  contra diosmina y los grupos S, A, H-S, H-A obtuvieron una diferencia de  $P < 0.0001$  contra hesperidina. Los inhibidores AAZ y SFN administrados de manera individual y en conjunto obtuvieron un efecto antiinflamatorio, no obstante, no fue suficiente para marcar una diferencia con respecto al vehículo, ya que no se observó ninguna diferencia significativa con respecto a éste.

% de Antiinflamación de los Diferentes Tratamientos

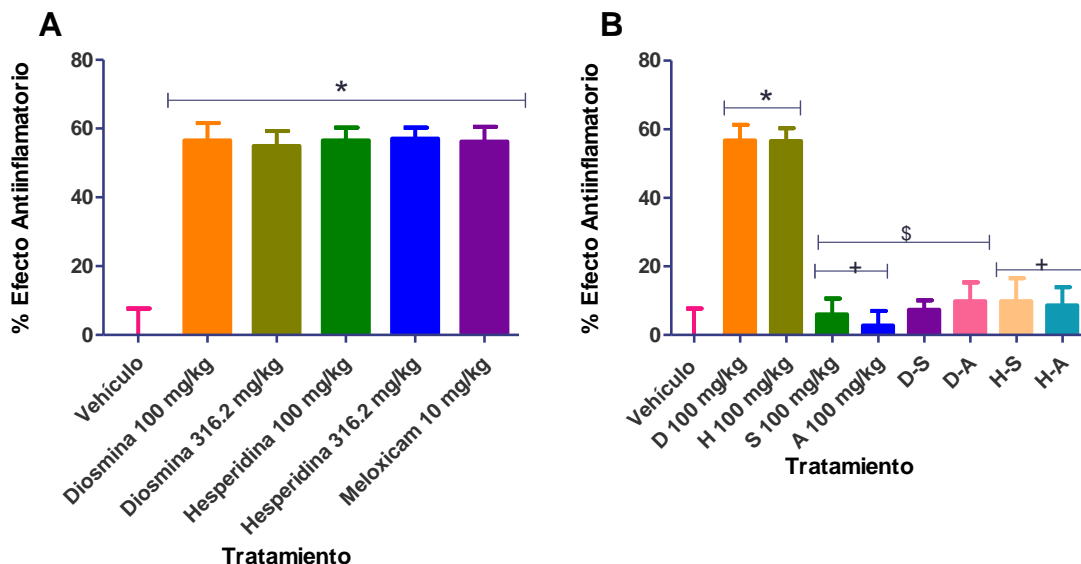


Figura 10. Evaluación del efecto antiinflamatorio de los flavonoides diosmina y hesperidina en Modelo de Hilo. Panel (A): Cada barra representa la media  $\pm$  EEM del % de antiinflamación obtenido en dos intervalos de tiempo; Fase 1 (neurogénica) y Fase 2 (inflamatoria), se muestran los grupos administrados con: diosmina y hesperidina a 100 y 316.2 mg/kg cada uno y meloxicam a 10 mg/kg. Panel (B): Cada barra representa la media  $\pm$  EEM del % de antiinflamación obtenido en ambas fases para los grupos administrados con: (D) Diosmina y (H) hesperidina a 100 mg/kg, vehículo cbp., (A) AAZ y (S) SFN a 100 mg/kg y las diferentes combinaciones entre flavonoides y SFN y AAZ (D-A, D-S, H-A, H-S). Para ambos paneles se realizó un análisis de varianza de una vía seguida de una prueba Tukey donde: \* diferencia estadísticamente significativa ( $p \leq 0.05$ ) Vs. vehículo, + diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ ) Vs. hesperidina y \$ diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ ) Vs. diosmina. Todos los grupos tienen una  $n \geq 6$  los cuales fueron tomados aleatoriamente.

Efecto gastroprotector de diosmina y hesperidina

Debido a la vía de administración que utilizamos y dado que el fármaco de referencia puede causar graves efectos adversos gastrointestinales, evaluamos un posible efecto adverso utilizando el modelo de úlcera gástrica inducida por etanol. Se administraron dosis de 100 mg/kg para ambos flavonoides, ya que no se observaron diferencias significativas en los ensayos anteriores. Para este modelo de úlcera gástrica, los tratamientos fueron vehículo, flavonoides y meloxicam a 10 mg/kg, administrados 30 min antes de que las ratas recibieran 1 mL de etanol absoluto por vía oral.

En la Figura 11 panel (A) se observa el % de gastroprotección de los diferentes tratamientos, teniendo una diferencia de  $P < 0.0001$  los grupos diosmina y hesperidina con respecto a

meloxicam. Por otra parte, se obtuvo una diferencia contra vehículo de  $P < 0.0001$ , tanto de los flavonoides como de meloxicam. En la Figura 11 panel (B) se presenta el IU o porcentaje de daño existente, en el cual el grupo vehículo obtuvo un IU= 0.9537. Los grupos diosmina, hesperidina y meloxicam presentaron una diferencia de  $P < 0.0001$  con respecto al vehículo. Aunado a esto, los Flavonoides tuvieron una diferencia significativa de  $P < 0.0001$  contra Meloxicam lo cual nos indica que ambos flavonoides nos proporcionan una protección significativa de la mucosa gástrica en comparación tanto del vehículo como del fármaco meloxicam.

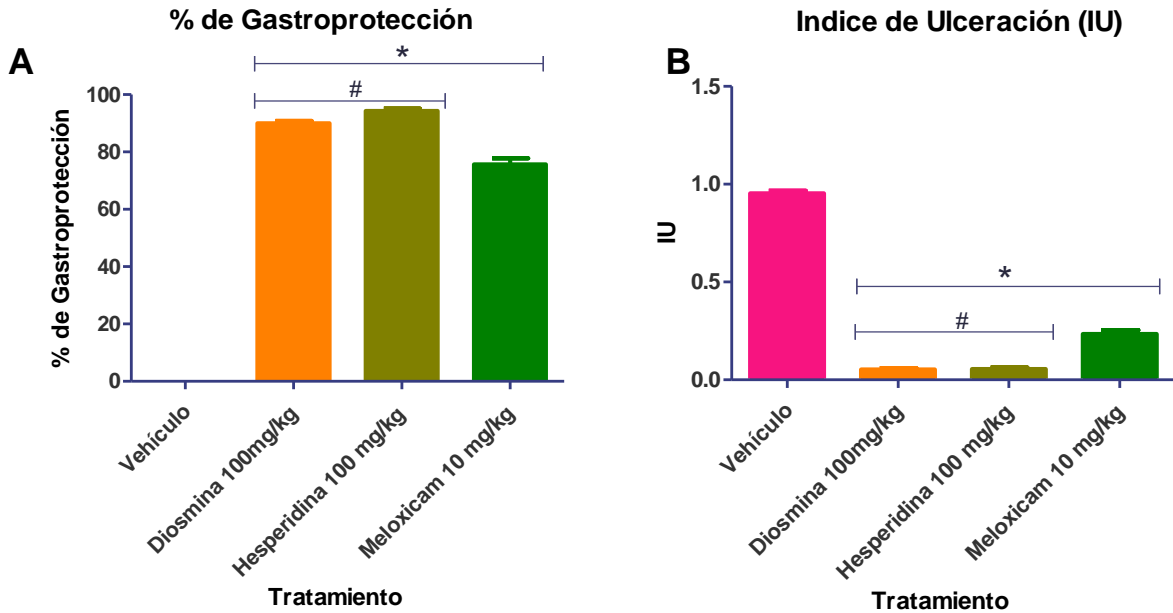


Figura 11. Efecto gastroprotector de diosmina, hesperidina y meloxicam sobre lesiones gástricas inducidas por etanol absoluto en ratas wistar. Panel (A): Cada barra representa la media  $\pm$  EEM del % de gastroprotección para los grupos administrados con: vehículo cbp., diosmina y hesperidina a 100 mg/kg y meloxicam a 10 mg/kg. Panel (B): Cada barra representa el IU para los grupos vehículo, diosmina y hesperidina a 100 mg/kg y meloxicam a 10 mg/kg. Para ambos paneles se realizó un análisis de varianza de una vía seguida de una prueba Tukey donde: \* diferencia estadísticamente significativa ( $p \leq 0.05$ ) Vs. vehículo y # diferencia estadísticamente significativa ( $p \leq 0.05$ ) Vs. meloxicam. Todos los grupos tienen una  $n \geq 6$  los cuales fueron tomados aleatoriamente.

En la Figura 12 se muestran fotografías representativas de de cada grupo de tratamiento administrado, mostrando el estómago con un corte por la curvatura menor exponiendo de esta forma el área de ulceración. El área afectada puede visualizarse con tonos oscuros de rosa, rojo, café y negro; de esta manera podemos observar que tanto diosmina como hesperidina proporcionan una protección a la mucosa gástrica al administrar un agente irritante como el etanol, al contrario de esto meloxicam y el grupo vehículo muestran bandas hemorrágicas gracias a la coloración antes mencionada.

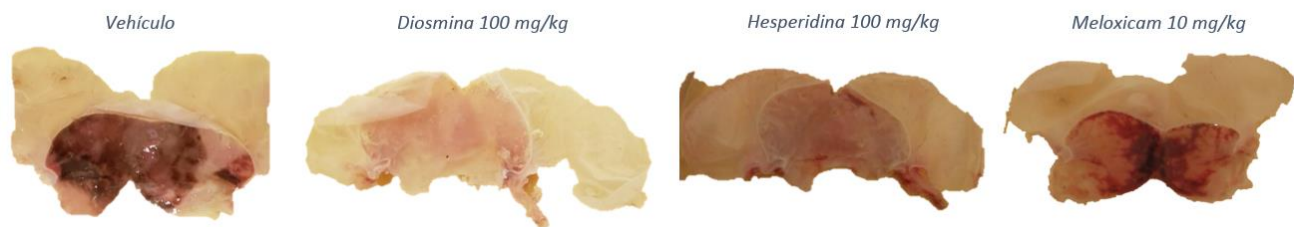


Figura 12. Fotografías representativas de las lesiones gástricas en ratas administradas con los siguientes tratamientos: Vehículo, Diosmina 100 mg/kg, Hesperidina a 100 mg/kg y meloxicam a 10 mg/kg.

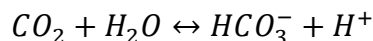
### Discusión

En el presente estudio se evaluó la participación de la AC en el efecto antinociceptivo de los flavonoides diosmina y hesperidina en un modelo de dolor agudo y tónico inducido con la prueba de formalina al 1% en ratas Wistar. En la literatura se reporta que diferentes flavonoides incluidos diosmina y hesperidina causan un efecto terapéutico desde los 5 mg/kg hasta 400 mg/kg sin producir efectos tóxicos en modelos experimentales con ratones y ratas (Bouskela et al., 1997; Vabeiryureilai et al., 2019). Para las personas se estima que la ingesta dietética de estos flavonoides en países occidentales es de 193 a 562 mg, lo que corresponde de 2.8 a 8 mg/kg de peso corporal para una persona de 70 kg (Boonpawa et al., 2017). En este estudio se trabajaron con dosis de 100 y 316.2 mg/kg para observar si existía alguna diferencia en la respuesta terapéutica entre estas dosis y trabajar con la que causará mayor efecto. Sin embargo, no hubo diferencia significativa entre estos dos grupos por lo que se decidió usar la dosis más baja de 100 mg/kg para la continuación de este proyecto.

Los flavonoides han sido estudiados como agentes antiinflamatorios en varios modelos *in vivo* e *in vitro*. No obstante, no se ha dilucidado por completo su mecanismo de acción y la participación de la AC, ya que los mecanismos reportados hasta el momento se enfocan en la inhibición de factores de transcripción como NF- $\kappa$ B y la activación de la proteína 1 (AP-1), así como la activación del factor 2 relacionado con el factor nuclear eritroide 2 (Nrf2) (Serafini et al., 2010).

Por su parte, las AC son metaloenzimas que contienen zinc y catalizan reacciones de hidratación y deshidratación de  $\text{CO}_2$  y  $\text{H}_2\text{CO}_3$ , respectivamente. La reacción de hidratación

genera iones de bicarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ) e hidrógeno ( $\text{H}^+$ ) a partir de  $\text{CO}_2$  mientras que la reacción de deshidratación genera  $\text{CO}_2$  a partir de ácido carbónico ( $\text{H}_2\text{CO}_3$ ) como se muestra en la siguiente reacción (Supuran, 2008):



La reacción de AC está involucrada en muchos procesos fisiológicos y patológicos, incluida la respiración, transporte de  $\text{CO}_2$  y bicarbonato entre los tejidos metabólicos y los pulmones, homeostasis del pH y del  $\text{CO}_2$ , secreción de electrolitos en varios tejidos y órganos, resorción ósea, calcificación y tumorigenicidad (Supuran, 2008).

Margheri et al. (2016) encontró que algunas isoformas de la AC (ACIV, ACIX y ACXII) se encuentran sobreexpresadas en presencia de inflamación, siendo así consideradas dianas terapéuticas para esta afección. De igual manera se identificaron a las isoformas ACII y ACVII como dianas terapéuticas para dolor de tipo neuropático, ya que se encuentran en niveles relativamente altos en la corteza, el hipocampo y el tálamo (Supuran, 2016).

En nuestro estudio la administración de los flavonoides diosmina y hesperidina dio como resultado la disminución de los comportamientos de lamida y sacudida, así como la disminución de la inflamación de la extremidad comparados con los grupos vehículo, AAZ, SFN y sus respectivas combinaciones con los flavonoides. (Supuran, 2011) reporta que los flavonoides al igual que varios compuestos fenólicos actúan uniéndose a la enzima mediante el anclaje al ion hidroxilo, el cual está unido a la molécula de disolvente unida al Zn (II). Si bien estos resultados no pueden demostrar el efecto por parte de los flavonoides sobre la AC, se espera que pueda estar mediado por la inhibición de la actividad esta enzima sobre la hidratación del  $\text{CO}_2$  y la deshidratación de  $\text{H}_2\text{CO}_3$ , reacciones llevadas a cabo por esta enzima, ayudando a que el pH del medio se estabilice.

Al analizar los resultados de la prueba de formalina se observó un aumento en los comportamientos de lamida y sacudida en la Fase 2 en comparación con la Fase 1 en el grupo vehículo, AAZ, SFN y las combinaciones de estos con los flavonoides, lo cual se debe a que en este modelo se ven representadas dos fases; recordando que, en la Fase 1 o neurogénica, puede observarse durante los primeros minutos de la evaluación la activación de las fibras A $\delta$  y fibras C, dando lugar a la generación de potenciales de acción que inducen, a su vez, la



liberación de neurotransmisores en la asta dorsal de la médula espinal provocando la transmisión y la percepción del dolor. En este punto el pH del medio se mantiene equilibrado, sin embargo, al pasar los minutos el daño avanza, situándonos en la fase 2 o inflamatoria. En esta fase se desencadena una cascada de liberación de sustancias inflamatorias sensibilizantes o excitadoras de los nociceptores. Entre ellas se mencionan iones  $K^+$  y  $H^+$ , serotonina, bradiquinina, histamina, prostaglandinas, leucotrienos y Sustancia P. El conjunto de estas sustancias se denomina sopa inflamatoria (Moreno et al., 2004).

En diversos artículos ha sido reportado que en los tejidos inflamados existe una alta concentración de iones de hidrógeno, lo que indica que el pH se vuelve más ácido a medida que aumenta la intensidad de la reacción inflamatoria; también se ha sugerido que la acidosis local proporciona un vínculo causal entre las enfermedades inflamatorias y el dolor relacionado (Steen et al., 1995). Aunado a lo anterior y ya que las AC se muestran sobre expresadas en cuadros inflamatorios, podemos decir que son estas enzimas las que ayudan a acidificar el medio aumentando la  $pCO_2$  y disminuyendo el pH en la zona afectada tomando en cuenta que estos valores son inversamente proporcionales (Lucía Pasten, 2021).

La respuesta de los flavonoides fue comparada con el fármaco de referencia meloxicam el cual tuvo una disminución en los comportamientos de lamida, sacudidas e inflamación. Sin embargo, al analizar los resultados podemos notar que en la Fase 1 tanto en el número de sacudidas como en el tiempo de lamida su efecto no es tan notorio en comparación con los flavonoides diosmina y hesperidina ya que presentan una diferencia significativa en comparación con el fármaco meloxicam. Al llegar a la Fase 2 el efecto del meloxicam iguala al de los flavonoides, ya que no se presentaron diferencias significativas en esta fase entre dichos grupos.

El fármaco meloxicam es un AINE considerado inhibidor de la COX-1 y COX-2 con mayor selectividad por COX-2, esta enzima no se encuentra presente normalmente en la célula, pero aparece rápidamente tras la exposición de la célula a agentes, como lipopolisacáridos o citocinas proinflamatorias, y regula la producción de los prostanoideos que participan en la inflamación y en otros procesos no inflamatorios, tanto fisiológicos como patológicos (Juan A et al., 2000).

Por otra parte, Damas & Liégeois (1999) estudian la reacción inflamatoria inducida por la formalina en la pata de rata, donde reportan que mientras que ambas fases son inhibidas por la morfina u otros fármacos de acción central, sólo la segunda fase es inhibida por fármacos antiinflamatorios como la indometacina y el naproxeno. Este último teniendo un mecanismo de acción similar al meloxicam ya que inhiben la acción de la ciclooxigenasa, lo cual puede explicar el motivo de que no haya una disminución de los comportamientos de lamida y sacudida en los primeros minutos de la evaluación.

Posteriormente, en la prueba de nocicepción se realizó la evaluación de los inhibidores SFN y AAZ, al igual que sus respectivas combinaciones con los flavonoides (diosmina/SFN, diosmina/AAZ, hesperidina/SFN y hesperidina/AAZ), en la cual se observó que al ser administrados de manera individual no hay respuesta antiinflamatoria ya que los niveles de número de sacudidas, tiempo de lamida y % de inflamación se mantienen elevados sin diferencia significativa con el grupo vehículo.

Al igual que los flavonoides, SFN y AAZ son inhibidores de la AC que se unen de manera diferente a la enzima. SFN y AAZ carecen de especificidad de isoforma lo que puede llevar a efectos secundarios como aumento de micción, sequedad en la boca, náuseas y vomito en el caso de la AAZ y diarrea, dolor abdominal y dolor de cabeza en el caso de SFNzz (Aggul et al., 2022). Supuran, (2011) evalúa la inhibición de la AC con diferentes productos naturales reportando que los inhibidores como la AAZ y SFN actúan mediante la coordinación del inhibidor con el ion  $Zn(II)$  al reemplazar el ion agua/hidróxido unido al zinc dando lugar a una geometría tetraédrica de  $Zn(II)$  interrumpiendo así el ciclo de hidratación del dióxido de carbono, lo cual nos indica que se tratan de inhibidores no competitivos ya que la enzima no puede catalizar su reacción para producir un producto además de que se reducen el número de moléculas funcionales de enzima que pueden realizar la reacción.

Aunado a lo anterior, se sabe que los inhibidores SFN y AAZ tienen una mayor afinidad y actividad inhibitoria en las isoformas ACII y ACVII, las cuales son consideradas dianas terapéuticas para el dolor (Kılıcaslan et al., 2016), lo cual puede ayudarnos a explicar por qué la falta de actividad antiinflamatoria, ya que, las ACII y ACVII tienen su ubicación mayoritariamente en el tálamo y corteza, dejándolas muy lejos del lugar de la lesión. Por el contrario, en este lugar se encuentran sobreexpresadas ACIV, ACIX y ACXII, ya que están

presentes en la membrana de las células basales, es decir, en células ubicadas en la parte más baja (o base) de la epidermis, que es la capa más externa de la piel (Espinosa Monrroy et al., 2010) y con las cuales la afinidad es menor.

Se ha demostrado en diversos reportes que tanto la AAZ como la SFN muestran eficacia contra diferentes tipos de dolor desde dosis de 100 hasta 200 mg/kg en modelos de dolor neuropático y visceral (M. Asiedu et al., 2010; M. N. Asiedu et al., 2014). Sin embargo, con respecto a su efecto antiinflamatorio hay pocos estudios, siendo algunos de estos su eficacia contra la enfermedad pulmonar obstructiva crónica, inflamación pulmonar y enfermedades inflamatorias intestinales como enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa (Eide et al., 2012; Puscas et al., 1989). Lo anterior puede ser debido a que la ACII tiene también su ubicación en esófago, colon y estómago y al ser más afín la AAZ y SFN a esta isoenzima contribuyen a la mejora de enfermedades relacionadas con estos órganos (Espinosa Monrroy et al., 2010).

Aunque hay evidencia que indica que estos medicamentos podrían tener efectos antiinflamatorios, se necesitan más estudios para determinar su eficacia en diferentes tipos de inflamación, ya que en este modelo en particular se sugiere que la dosis no fue suficiente para inhibir todas las AC presentes en el cuerpo incluyendo las AC mayormente relacionadas con la inflamación, generando una respuesta elevada en cuanto al número de lamidas y sacudidas.

Existen diversos estudios *in vitro* e *in vivo* que destacan la acción de los inhibidores AAZ y SFN en su disminución a síntomas relacionados con el dolor neuropático, presentándolos como fármacos favorables para este tipo de condiciones (M. Asiedu et al., 2010). Lo cual, en primer lugar, nos deja en claro que tanto AAZ como SFN son inhibidores capaces de atravesar la barrera hematoencefálica y por lo que tienen mayor afinidad con isoformas como la ACII y ACVII presentes en mayor cantidad en el tálamo, hipocampo y corteza como se mencionó con anterioridad. Conforme a esto podemos decir que no se tienen reportes sobre sus efectos en mecanismos inflamatorios. En nuestro caso, la lesión es causada por un estímulo químico (formalina al 1%) para causar la inflamación de un miembro, al contrario del dolor neuropático en el que se causa un daño parcial en los nervios periféricos o espinales como la ligadura del nervio espinal (PNI) y la ligadura parcial del nervio ciático (LPN).

Con respecto a las combinaciones de SFN y AAZ con los flavonoides se observó que, hay una diferencia significativa en el tiempo de lamida en comparación con el grupo vehículo. Sin embargo, este efecto no fue el suficiente para igualar la respuesta de los flavonoides administrados individualmente, ya que hay una diferencia significativa entre los grupos diosmina y hesperidina con las combinaciones. Con respecto al número de sacudidas las combinaciones entre SFN y AAZ no presentaron disminución de esta conducta careciendo de una diferencia significativa con el grupo vehículo. Lo anterior puede mostrarnos la importancia del mecanismo que tienen los flavonoides diosmina y hesperidina sobre la AC para poder causar un efecto antiinflamatorio, ya que como se mencionó con anterioridad no es el único mecanismo que estas sustancias ocupan para causar una respuesta; por lo tanto, dado que obtuvimos una respuesta similar al vehículo en estas combinaciones podemos decir que el mecanismo de la AC es uno de los principales por el cual los flavonoides llevan a cabo esta acción.

Por otra parte, estos resultados sugieren que tanto AAZ como SFN pudieron inhibir a las isoformas de la AC cambiando la estructura de la enzima impidiendo que los flavonoides llevaran a cabo su efecto antiinflamatorio. Cuando los flavonoides fueron evaluados de manera individual se administraron 30 min antes de la aplicación de formalina. Por otra parte, cuando fueron administrados de manera conjunta con AAZ y SFN, los flavonoides se administraron de igual manera 30 min antes de la formalina, pero con la diferencia de que SFN y AAZ se administraron 10 min antes de la formalina, dejando 20 min de acción para los flavonoides antes de que el otro fármaco entrara en acción. En este punto podemos recordar que tanto la SFN y AAZ tienen una unión con el ion Zn (II) cambiando la conformación de la molécula ya que reemplazan a ion hidróxido por lo cual podemos deducir que, al momento de administrar los flavonoides, estos se unen al ion hidroxilo, el cual es desplazado al momento de administrar los inhibidores AAZ y SFN, motivo por el cual no se observó un efecto. No obstante, es necesario realizar más estudios para evaluar los factores que intervienen en el efecto de SFN y AAZ en modelos de inflamación.

Para el modelo de úlcera gástrica los flavonoides diosmina y hesperidina produjeron un marcado efecto protector contra la ulceración gástrica inducida por etanol, obteniendo un alto % de gastroprotección en comparación con el grupo meloxicam y vehículo. El fármaco meloxicam

presentó un área de ulceración notablemente mayor a los flavonoides, esto pudo visualizarse gracias a las bandas hemorrágicas mostradas en la Figura 12.

Se ha demostrado que varios flavonoides producen una fuerte actividad antiulcerogénica que es comparable a la de los medicamentos antiulcerosos utilizados clínicamente (Mehreen et al., 2022) Suárez et al., (1996) analiza a la hesperidina en diferentes modelos experimentales de úlcera gástrica, encontrando que este flavonoide muestra una marcada capacidad para reducir el índice de ulceración. De igual manera Elshazly et al., (2018) propuso que los efectos gastro protectores de los flavonoides se asocian a una disminución de la acidez gástrica libre y total y a un aumento del pH gástrico; lo cual podría estar relacionado con la inhibición de AC sin embargo se necesitan más evidencias que respalden esta información por lo que habría que realizar más estudios entorno a este problema.

Por su parte los fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE) ejercen su acción inhibiendo la ciclooxigenasa (COX). Recientemente, se ha postulado que la eficacia antiinflamatoria de estos medicamentos surge de la inhibición de la isoforma COX-2 de la ciclooxigenasa, mientras que la inhibición de la isoforma COX-1 produce los molestos y a veces graves efectos secundarios gástricos como hemorragias digestivas y úlcera (Furst, 1997).

El meloxicam es un AINE derivado del oxicam, (Khalil & Aldosari, 2020) y es considerado un inhibidor predominantemente selectivo de la COX-2, sin embargo, su selectividad no es completa (Shavlovskaya et al., 2022). Lo cual evidencia el daño gástrico en el grupo administrado con este medicamento sin llegar a presentar el grado de lesión producido por el grupo vehículo. Kendall et al. (2022) estudia los efectos tóxicos de dosis altas de meloxicam donde encontró que los ratones desarrollan ulceración gastrointestinal cuando se les administra meloxicam en dosis de 17,5 a 35 mg/kg por vía oral una vez al día durante 3 meses; además de identificar sangre oculta en heces en 9 de 18 ratones tratados con este medicamento.

En nuestro modelo experimental se midió el % de gastroprotección donde los flavonoides mostraron ser los mejores candidatos para proteger la mucosa gástrica y ejercer su efecto antiinflamatorio. Si bien el meloxicam puede ser una buena alternativa para tratar la inflamación y el dolor, en el modelo de úlcera gástrica podemos observar que los flavonoides no solo tienen

un efecto antiinflamatorio satisfactorio y mayor que este tratamiento, sino que también confieren una protección a la mucosa gástrica teniendo un índice de ulceración mucho menor que este fármaco.

### Conclusiones

La prueba con formalina al 1% ha demostrado ser sensible a la acción de los flavonoides. Por lo que se sugiere que el tratamiento con estas sustancias es eficaz y tiene un componente de tipo antiinflamatorio.

La AC participa en el efecto analgésico y antiinflamatorio de los flavonoides diosmina y hesperidina. La AAZ y SFN al ser combinados con los flavonoides revierten estos efectos, mientras que por sí solos no producen respuesta.

Los flavonoides son compuestos naturales que son bien tolerados por el cuerpo, disminuyendo los efectos adversos provocados por algunos AINEs como lo es el Meloxicam, lo que los convierte en buenos candidatos para el desarrollo de nuevos medicamentos para la posible inhibición de esta enzima y el tratamiento de enfermedades inflamatorias.

### Bibliografía

Aggul, A. G., Uzun, N., Kuzu, M., Taslimi, P., & Gulcin, I. (2022). Some phenolic natural compounds as carbonic anhydrase inhibitors: An in vitro and in silico study. *Archiv Der Pharmazie*, 355(6), 2100476.

<https://doi.org/10.1002/ardp.202100476>

Akgül, Ö., Lucarini, E., Mannelli, L. D. C., Ghelardini, C., D'Ambrosio, K., Buonanno, M., Monti, S. M., de Simone, G., Angeli, A., Supuran, C. T., & Carta, F. (2022). Sultam based Carbonic Anhydrase VII inhibitors for the management of neuropathic pain. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 227, 113956.

<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2021.113956>

- Alessandri, A. L., Sousa, L. P., Lucas, C. D., Rossi, A. G., Pinho, V., & Teixeira, M. M. (2013). Resolution of inflammation: Mechanisms and opportunity for drug development. *Pharmacology & Therapeutics*, *139*(2), 189–212. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2013.04.006>
- Asiedu, M. N., Mejia, G. L., Hübner, C. A., Kaila, K., & Price, T. J. (2014). Inhibition of Carbonic Anhydrase Augments GABAA Receptor-Mediated Analgesia via a Spinal Mechanism of Action. *The Journal of Pain*, *15*(4), 395–406. <https://doi.org/10.1016/j.jpain.2014.01.001>
- Asiedu, M., Ossipov, M. H., Kaila, K., & Price, T. J. (2010a). Acetazolamide and midazolam act synergistically to inhibit neuropathic pain. *Pain*, *148*(2), 302–308. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2009.11.015>
- Asiedu, M., Ossipov, M. H., Kaila, K., & Price, T. J. (2010b). Acetazolamide and midazolam act synergistically to inhibit neuropathic pain. *Pain*, *148*(2), 302–308. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2009.11.015>
- Atanasov, A. G., Waltenberger, B., Pferschy-Wenzig, E.-M., Linder, T., Wawrosch, C., Uhrin, P., Temml, V., Wang, L., Schwaiger, S., Heiss, E. H., Rollinger, J. M., Schuster, D., Breuss, J. M., Bochkov, V., Mihovilovic, M. D., Kopp, B., Bauer, R., Dirsch, V. M., & Stuppner, H. (2015). Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. *Biotechnology Advances*, *33*(8), 1582–1614. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.08.001>
- Batista, P. A., Werner, M. F. de P., Oliveira, E. C., Burgos, L., Pereira, P., Brum, L. F. da S., & Santos, A. R. S. dos. (2008). Evidence for the involvement of ionotropic glutamatergic receptors on the antinociceptive effect of (-)-linalool in mice. *Neuroscience Letters*, *440*(3), 299–303. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2008.05.092>
- Boonpawa, R., Spenkelink, A., Punt, A., & Rietjens, I. M. C. M. (2017). Physiologically based kinetic modeling of hesperidin metabolism and its use to predict in vivo effective doses in humans. *Molecular Nutrition & Food Research*, *61*(8), 1600894. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201600894>

- Bouskela, E., Cyrino, F. Z. G. A., & Lerond, L. (1997). Effects of oral administration of different doses of purified micronized flavonoid fraction on microvascular reactivity after ischaemia/reperfusion in the hamster cheek pouch. *British Journal of Pharmacology*, 122(8), 1611–1616.  
<https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0701554>
- Boyce-Rustay, J., & Jarvis, M. (2009). Neuropathic Pain: Models and Mechanisms. *Current Pharmaceutical Design*, 15(15), 1711–1716. <https://doi.org/10.2174/138161209788186272>
- Bupivacaine and Meloxicam. (2021). *American Journal of Health-System Pharmacy*, 78(21), 1922–1929.  
<https://doi.org/10.1093/ajhp/zxab304>
- Butler, M. S. (2008). Natural products to drugs: natural product-derived compounds in clinical trials. *Natural Product Reports*, 25(3), 475. <https://doi.org/10.1039/b514294f>
- Carballo-Villalobos, A. I., González-Trujano, M. E., Pellicer, F., Alvarado-Vásquez, N., & López-Muñoz, F. J. (2018). Central and peripheral anti-hyperalgesic effects of diosmin in a neuropathic pain model in rats. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 97(July 2017), 310–320.  
<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.10.077>
- Cheng, J. (2018). Overview of pain states. *Fundamentals of Pain Medicine*, 3–6. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-64922-1\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-319-64922-1_1)
- Cordaro, M., Fusco, R., D’Amico, R., Siracusa, R., Peritore, A. F., Gugliandolo, E., Genovese, T., Crupi, R., Mandalari, G., Cuzzocrea, S., di Paola, R., & Impellizzeri, D. (2020). Cashew (*Anacardium occidentale* L.) Nuts Modulate the Nrf2 and NLRP3 Pathways in Pancreas and Lung after Induction of Acute Pancreatitis by Cerulein. *Antioxidants*, 9(10), 992. <https://doi.org/10.3390/antiox9100992>
- Damon, M., Flandre, O., Michel, F., Perdrix, L., Labrid, C., & Crastes de Paulet, A. (1987). Effect of chronic treatment with a purified flavonoid fraction on inflammatory granuloma in the rat. Study of prostaglandin



- E2 and F2 alpha and thromboxane B2 release and histological changes. *Arzneimittel-Forschung*, 37(10), 1149–1153. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3481266>
- Eide, C. R. P., & Asplund, C. A. (2012). Altitude Illness. *Current Sports Medicine Reports*, 11(3), 124–130. <https://doi.org/10.1249/JSR.0b013e3182563e7a>
- Elshazly, S. M., Abd El Motteleb, D. M., & Ibrahim, I. A. A. E.-H. (2018). Hesperidin protects against stress induced gastric ulcer through regulation of peroxisome proliferator activator receptor gamma in diabetic rats. *Chemico-Biological Interactions*, 291, 153–161. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2018.06.027>
- Espinosa Monrroy, Lorena- Sierra Vargas, M. (2010). *Anhidrasa carbonica, nuevas perspectivas*. 200–209.
- Euchenhofer, C., Maihöfner, C., Brune, K., Tegeder, I., & Geisslinger, G. (1998). Differential effect of selective cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitor NS 398 and diclofenac on formalin-induced nociception in the rat. *Neuroscience Letters*, 248(1), 25–28. [https://doi.org/10.1016/S0304-3940\(98\)00325-5](https://doi.org/10.1016/S0304-3940(98)00325-5)
- Ferguson, L. R. (2010). Chronic inflammation and mutagenesis. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 690(1–2), 3–11. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2010.03.007>
- Ferraz, C. R., Carvalho, T. T., Manchope, M. F., Artero, N. A., Rasquel-Oliveira, F. S., Fattori, V., Casagrande, R., & Verri, W. A. (2020). Therapeutic Potential of Flavonoids in Pain and Inflammation: Mechanisms of Action, Pre-Clinical and Clinical Data, and Pharmaceutical Development. *Molecules*, 25(3), 762. <https://doi.org/10.3390/molecules25030762>
- Furst, D. E. (1997). Meloxicam: Selective COX-2 inhibition in clinical practice. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*, 26, 21–27. [https://doi.org/10.1016/S0049-0172\(97\)80049-2](https://doi.org/10.1016/S0049-0172(97)80049-2)
- Garg, A., Garg, S., Zaneveld, L. J. D., & Singla, A. K. (2001). Chemistry and pharmacology of the Citrus bioflavonoid hesperidin. *Phytotherapy Research*, 15(8), 655–669. <https://doi.org/10.1002/ptr.1074>

- Ji, G., Li, Z., & Neugebauer, V. (2015). Reactive oxygen species mediate visceral pain-related amygdala plasticity and behaviors. *Pain*, *156*(5), 825–836. <https://doi.org/10.1097/j.pain.000000000000120>
- Juan A, G. M., & Juan J, G.-R. C. (2000). Fisiopatología de la ciclooxigenasa-1 y ciclooxigenasa-2 \_ Revista Española de Reumatología. *ELSEVIER*, *27*(1), 33–35.
- Kendall, L. v, Bailey, A. L., Singh, B., & McGee, W. (2022). Toxic Effects of High-dose Meloxicam and Carprofen on Female CD1 Mice. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, *61*(1), 75–80. <https://doi.org/10.30802/AALAS-JAALAS-21-000071>
- Khalil, N. Y., & Aldosari, K. F. (2020a). *Meloxicam* (pp. 159–197). <https://doi.org/10.1016/bs.podrm.2019.10.006>
- Khalil, N. Y., & Aldosari, K. F. (2020b). *Meloxicam* (pp. 159–197). <https://doi.org/10.1016/bs.podrm.2019.10.006>
- Kilicaslan, S., Arslan, M., Ruya, Z., Bilen, Ç., Ergün, A., Gençer, N., & Arslan, O. (2016). Synthesis and evaluation of sulfonamide-bearing thiazole as carbonic anhydrase isoforms hCA I and hCA II. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, *31*(6), 1300–1305. <https://doi.org/10.3109/14756366.2015.1128426>
- Kobayashi, H., Higashiura, Y., Shigetomi, H., & Kajihara, H. (2014). Pathogenesis of endometriosis: The role of initial infection and subsequent sterile inflammation (Review). *Molecular Medicine Reports*, *9*(1), 9–15. <https://doi.org/10.3892/mmr.2013.1755>
- Kumar, S., & Pandey, A. K. (2013). Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. *The Scientific World Journal*, *2013*, 1–16. <https://doi.org/10.1155/2013/162750>
- le Marchand, L. (2002). Cancer preventive effects of flavonoids—a review. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, *56*(6), 296–301. [https://doi.org/10.1016/S0753-3322\(02\)00186-5](https://doi.org/10.1016/S0753-3322(02)00186-5)
- Lucía Pasten. (2021). *REGULACION DEL PH FISIOLÓGICO*. <https://filadd.com>

- Manthey, J. A., & Grohmann, K. (2001). Phenols in Citrus Peel Byproducts. Concentrations of Hydroxycinnamates and Polymethoxylated Flavones in Citrus Peel Molasses. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(7), 3268–3273. <https://doi.org/10.1021/jf010011r>
- Margheri, F., Ceruso, M., Carta, F., Laurenzana, A., Maggi, L., Lazzeri, S., Simonini, G., Annunziato, F., del Rosso, M., Supuran, C. T., & Cimaz, R. (2016). Overexpression of the transmembrane carbonic anhydrase isoforms IX and XII in the inflamed synovium. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 31(sup4), 60–63. <https://doi.org/10.1080/14756366.2016.1217857>
- Markiewski, M. M., & Lambris, J. D. (2007). The Role of Complement in Inflammatory Diseases From Behind the Scenes into the Spotlight. *The American Journal of Pathology*, 171(3), 715–727. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2007.070166>
- Martínez-Flórez, S., González-Gallego, J., Culebras, J. M., & Tuñón, M. J. (n.d.). [Flavonoids: properties and anti-oxidizing action]. *Nutricion Hospitalaria*, 17(6), 271–278. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12514919>
- Mata, R. (2019). *Compuestos aromáticos de origen siquímico*.
- McCall, W. D., Tanner, K. D., & Levine, J. D. (1996). Formalin induces biphasic activity in C-fibers in the rat. *Neuroscience Letters*, 208(1), 45–48. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(96\)12552-0](https://doi.org/10.1016/0304-3940(96)12552-0)
- Medzhitov, R. (2010). Inflammation 2010: New Adventures of an Old Flame. *Cell*, 140(6), 771–776. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.03.006>
- Mehreen, T., Aamir, S., Shah, N. A., Shahid, M., Javaid, I., Roghani, M., Roghani, A., & Roghani, F. (2022). EFFECT OF THE FLAVONOID 6-AMINOFLAVONE IN ASPIRIN-INDUCED GASTRIC ULCER IN SPRAGUE-DAWELY RATS: A HISTOMORPHOLOGICAL STUDY. *Journal of Ayub Medical College Abbottabad*, 34(4(SUPPL 1)), 940–943. <https://doi.org/10.55519/JAMC-04-S4-10369>

- Mehrzadi, S., Khalili, H., Fatemi, I., Malayeri, A., Siahpoosh, A., & Goudarzi, M. (2021). Zingerone Mitigates Carrageenan-Induced Inflammation Through Antioxidant and Anti-inflammatory Activities. *Inflammation*, 44(1), 186–193. <https://doi.org/10.1007/s10753-020-01320-y>
- Monograph. Diosmin. (2004). *Alternative Medicine Review : A Journal of Clinical Therapeutic*, 9(3), 308–311. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15387721>
- Moreno, C., & Prada, D. M. (2004). *Fisiopatología del dolor clínico 2*.
- Ou, Z., Zhao, J., Zhu, L., Huang, L., Ma, Y., Ma, C., Luo, C., Zhu, Z., Yuan, Z., Wu, J., Li, R., & Yi, J. (2019). Anti-inflammatory effect and potential mechanism of betulinic acid on  $\lambda$ -carrageenan-induced paw edema in mice. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 118, 109347. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.109347>
- Pecchi, E., Dallaporta, M., Jean, A., Thirion, S., & Troadec, J.-D. (2009). Prostaglandins and sickness behavior: Old story, new insights. *Physiology & Behavior*, 97(3–4), 279–292. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2009.02.040>
- Peterson, J. J., Dwyer, J. T., Beecher, G. R., Bhagwat, S. A., Gebhardt, S. E., Haytowitz, D. B., & Holden, J. M. (2006). Flavanones in oranges, tangerines (mandarins), tangors, and tangelos: a compilation and review of the data from the analytical literature. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19, S66–S73. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2005.12.006>
- Petricovic, M., Wanek, K., & Denko, C. W. (1978). A New Mechanical Method for Measuring Rat Paw Edema. *Pharmacology*, 16(3), 153–158. <https://doi.org/10.1159/000136761>
- Puscas, I., Hajdu, A., Buzás, G., & Bernáth, Z. (1989). Prevention of non-steroidal anti-inflammatory agents induced acute gastric mucosal lesions by carbonic anhydrase inhibitors. An endoscopic study. *Acta Physiologica Hungarica*, 73(2–3), 279–283.

- Raja, S. N., Carr, D. B., Cohen, M., Finnerup, N. B., Flor, H., Gibson, S., Keefe, F., Mogil, J. S., Ringkamp, M., & Kathleen, A. (2021). *compromises*. 161(9), 1976–1982.  
<https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000001939>.The
- Rao, Y. K., Fang, S.-H., & Tzeng, Y.-M. (2008). Antiinflammatory activities of flavonoids and a triterpene caffeate isolated from *Bauhinia variegata*. *Phytotherapy Research*, 22(7), 957–962.  
<https://doi.org/10.1002/ptr.2448>
- Schmid-Schönbein, G. W. (2006). ANALYSIS OF INFLAMMATION. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 8(1), 93–151. <https://doi.org/10.1146/annurev.bioeng.8.061505.095708>
- Serafini, M., Peluso, I., & Raguzzini, A. (2010). Flavonoids as anti-inflammatory agents. *Proceedings of the Nutrition Society*, 69(3), 273–278. <https://doi.org/10.1017/S002966511000162X>
- Shahidi, F., Janitha, P. K., & Wanasundara, P. D. (1992). Phenolic antioxidants. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 32(1), 67–103. <https://doi.org/10.1080/10408399209527581>
- Shavlovskaya, O. A., Bokova, I. A., & Shavlovskiy, N. I. (2022). Meloxicam clinical effects. *Zhurnal Nevrologii i Psikiatrii Im. S.S. Korsakova*, 122(1), 36. <https://doi.org/10.17116/jnevro202212201136>
- Simone Badal; Rupika Delgoda. (2017). *Pharmacognosy. Fundamentals, Applications and Strategies*. Elsevier.  
<https://doi.org/10.1016/C2014-0-01794-7>
- Steen, K., Steen, A., & Reeh, P. (1995). A dominant role of acid pH in inflammatory excitation and sensitization of nociceptors in rat skin, in vitro. *The Journal of Neuroscience*, 15(5), 3982–3989.  
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.15-05-03982.1995>
- Suárez, J., Herrera, M. D., & Marhuenda, E. (1996). Hesperidin and Neohesperidin Dihydrochalcone on Different Experimental Models of Induced Gastric Ulcer. *Phytotherapy Research*, 10(7), 616–618.  
[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-1573\(199611\)10:7<616:AID-PTR897>3.0.CO;2-N](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-1573(199611)10:7<616:AID-PTR897>3.0.CO;2-N)

- Supuran, C. T. (2008). Carbonic anhydrases: novel therapeutic applications for inhibitors and activators. *Nature Reviews Drug Discovery*, 7(2), 168–181. <https://doi.org/10.1038/nrd2467>
- Supuran, C. T. (2011). Carbonic anhydrase inhibition with natural products: Novel chemotypes and inhibition mechanisms. *Molecular Diversity*, 15(2), 305–316. <https://doi.org/10.1007/s11030-010-9271-4>
- Supuran, C. T. (2016). Carbonic anhydrase inhibition and the management of neuropathic pain. *Expert Review of Neurotherapeutics*, 16(8), 961–968. <https://doi.org/10.1080/14737175.2016.1193009>
- Tanaka, A., Matsumoto, M., Nakagiri, A., Kato, S., & Takeuchi, K. (2002). NSAID-induced small intestinal damage: role of COX inhibition. *InflammoPharmacology*, 10(4–6), 313–325. <https://doi.org/10.1163/156856002321544783>
- Taslimi, P., Caglayan, C., & Gulcin, İ. (2017). The impact of some natural phenolic compounds on carbonic anhydrase, acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase, and  $\alpha$ -glycosidase enzymes: An antidiabetic, anticholinergic, and antiepileptic study. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 31(12), e21995. <https://doi.org/10.1002/jbt.21995>
- Thomford, N., Senthebane, D., Rowe, A., Munro, D., Seele, P., Maroyi, A., & Dzobo, K. (2018). Natural Products for Drug Discovery in the 21st Century: Innovations for Novel Drug Discovery. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(6), 1578. <https://doi.org/10.3390/ijms19061578>
- Vabeiryureilai, M., Lalrinzuali, K., & Jagetia, G. C. (2019). Chemopreventive effect of hesperidin, a citrus bioflavonoid in two stage skin carcinogenesis in Swiss albino mice. *Heliyon*, 5(10), e02521. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e02521>
- Wang, J., Cochran, V., Abdi, S., Chung, J. M., Chung, K., & Kim, H. K. (2008). Phenyl N-t-butyl nitron, a reactive oxygen species scavenger, reduces zymosan-induced visceral pain in rats. *Neuroscience Letters*, 439(2), 216–219. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2008.05.018>

Xu, H., Arita, H., Hayashida, M., Zhang, L., Sekiyama, H., & Hanaoka, K. (2006). Pain-relieving effects of processed Aconiti tuber in CCI-neuropathic rats. *Journal of Ethnopharmacology*, *103*(3), 392–397.

<https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.08.050>

Zheng, Y., Zhang, R., Shi, W., Li, L., Liu, H., Chen, Z., & Wu, L. (2020a). Metabolism and pharmacological activities of the natural health-benefiting compound diosmin. *Food & Function*, *11*(10), 8472–8492.

<https://doi.org/10.1039/D0FO01598A>

Zheng, Y., Zhang, R., Shi, W., Li, L., Liu, H., Chen, Z., & Wu, L. (2020b). Metabolism and pharmacological activities of the natural health-benefiting compound diosmin. *Food & Function*, *11*(10), 8472–8492.

<https://doi.org/10.1039/D0FO01598A>