



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

EVALUACIÓN FARMACOLÓGICA DEL EFECTO
ANTINOCICEPTIVO DE *Annona diversifolia* Saff.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

P R E S E N T A

AZUCENA IBETH CARBALLO VILLALOBOS



MÉXICO, D.F.

2009



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

Dedicatorias

A mis padres Alejandro y Maria, que con esfuerzo, perseverancia y amor me han acompañado en la culminación de esta etapa, gracias por ser mi apoyo incondicional, a ustedes les dedico todos mis logros.

Les prometo que éste será el inicio de una vida plena, espero seguir llenándolos de orgullo por el resto de mi vida. Los amo!!!

A mis hermanos Edgar y Yadi que con su compañía y aliento me motivaron a continuar y no detenerme jamás. Les agradezco su apoyo en los momentos difíciles. Yadi, eres mi mejor amiga y mi mejor apoyo.

A Yutzín, Fernanda, Uriel y Elena que brindan esa chispa de felicidad en mi vida y me dan momentos inolvidables.

A ti Alberto que ahora me acompañas en una nueva etapa, gracias por ser parte de mi vida y compartir estos momentos de felicidad a mi lado. Te amo.

A todos ustedes gracias por estar siempre presentes, por su apoyo incondicional y por empujarme a seguir adelante.

Una dedicatoria especial:

A Maury, gracias por ser mi amiga y un ejemplo de perseverancia y triunfo.

A mi tía Raquel y Yolanda, gracias por alentarme y hacer que me sienta orgullosa de mi misma, porque siempre estuvieron motivándome.

A mis tios Eloina y Moises por sus palabras de aliento y motivación.

A Marisol y Jose Luis, por acompañarme en los momentos difíciles y ser unos excelentes amigos. Gracias por soportarme.

¿ todos ustedes comparto parte de este logro.

Agradecimientos

A mi Asesora de Tesis: la Dra. Eva González Trujano, es una excelente Doctora y ser humano que me ha enseñado a ser una mejor persona, en el aspecto tanto intelectual como personal. GRACIAS por guiarme y apoyarme en este proyecto, siempre le agradeceré el apoyo, y la confianza que me brindó.

Un agradecimiento especial a la M en C. Laura Martínez, parte de este trabajo es gracias a tí. Gracias por tu apoyo y guía.

El futuro pertenece a quienes creen en la belleza de sus sueños.

Eleanor Roosevelt (1884-1962)
Diplomática. Defensora de los derechos sociales.

ÍNDICE

	Página
Abreviaturas.	i
Índice de tablas.	iv
Índice de figuras.	v
Resumen.	x
1. Antecedentes.	1
1.1 Dolor.	1
1.1.1 Epidemiología	1
1.1.2 Definición	2
1.1.3 Clasificación	2
1.1.3.1 Dolor rápido y lento.	2
1.1.3.2 Dolor profundo.	2
1.1.3.3 Dolor muscular.	3
1.1.3.4 Dolor visceral.	3
1.1.3.5 Dolor referido.	3
1.1.3.6 Dolor inflamatorio.	4
1.1.3.7 Dolor nociceptivo.	4
1.1.3.8 Dolor somático.	4
1.1.3.9 Dolor neuropático.	4
1.1.3.10 Hiperalgnesia.	5
1.2 Fisiología sensorial.	5
1.2.1 Sensibilidad.	7
1.3 Nocicepción.	8

	Página
1.3.1 Transmisión del estímulo nociceptivo.	8
1.3.2 Nociceptores.	9
1.3.2.1 Nociceptores cutáneos.	10
1.3.2.2 Nociceptores viscerales, musculares y articulares.	10
1.3.3 Activación de los nociceptores.	11
1.4 Modelos animales de dolor.	15
1.4.1 Prueba de estiramiento abdominal.	17
1.4.2 Modelo de disfunción inducida por dolor en rata.	17
1.4.2.1 La gota.	19
1.4.3 Consideraciones éticas en el estudio del dolor en animales.	20
1.4.4 Criterios para la validación de los modelos animales de dolor.	21
1.5 Tratamiento farmacológico del dolor.	23
1.5.1 Analgésicos opioides.	24
1.5.1.1 Potencia analgésica de algunos fármacos tipo opioide.	25
1.5.2 Analgésicos antiinflamatorios no esteroideos.	27
1.5.3 Fármacos adyuvantes.	29
1.6 Herbolaria.	31
1.6.1 La ilama " <i>Annona diversifolia</i> Saff".	33
1.6.1.1 Principales componentes bioactivos presentes en las annonaceas.	37
2. Planteamiento del problema.	42
3. Hipótesis.	43
4. Objetivos.	44
4.1 Objetivo general.	44

	Página
4.2 Objetivos particulares.	44
5. Metodología.	45
5.1 Material.	45
5.1.1 Equipo.	45
5.1.2 Reactivos.	45
5.1.3 Material biológico.	46
5.1.4 Material vegetal.	46
5.2 Metodología.	46
5.2.1 Obtención del extracto.	46
5.2.2 Fraccionamiento del extracto etanólico de <i>A. diversifolia</i> .	47
5.2.3 Cromatografía en columna para la separación de sub-fracciones activas obtenidas de la fracción acetona del extracto etanólico de <i>A. diversifolia</i> .	47
5.2.4 Preparación del extracto y los fármacos.	48
5.2.5 Evaluación de la actividad antinociceptiva.	48
5.2.5.1 Grupos experimentales.	49
5.2.5.2 Modelo de estiramiento abdominal inducido por ácido acético "Writhing".	49
5.2.5.3 Modelo PIFIR.	50
5.2.6 Evaluación de la toxicidad aguda.	52
5.2.7 Análisis estadístico.	52
6. Resultados.	56
6.1 Comparación de la actividad antinociceptiva de extractos crudos de <i>A. diversifolia</i> en el modelo de estiramiento abdominal.	56
6.1.1 Actividad antinociceptiva del extracto etanólico de <i>A. diversifolia</i> .	57

	Página
6.1.2 Actividad antinociceptiva de las fracciones obtenidas del extracto etanólico de <i>A diversifolia</i> .	60
6.1.3 Actividad antinociceptiva de las sub-fracciones obtenidas de la fracción de acetona del extracto etanólico de <i>A diversifolia</i> .	62
6.2 Comparación de la actividad antinociceptiva del extracto crudo de <i>A. diversifolia</i> en el modelo PIFIR.	64
6.2.1 Actividad antinociceptiva del extracto etanólico de <i>A diversifolia</i> .	66
6.2.2 Actividad antinociceptiva de las fracciones obtenidas del extracto etanólico de <i>A diversifolia</i> .	69
6.3 Evaluación de la dosis efectiva 50 del extracto etanólico de <i>A. diversifolia</i> .	71
6.4 Evaluación de la toxicidad aguda: dosis letal 50 del extracto etanólico de <i>A. diversifolia</i> .	73
7. Discusión.	75
8. Conclusión.	82
9. Perspectivas.	83
10. Bibliografía.	84
11. Cibergrafía	100
Apéndice A	102
Apéndice B	109

ABREVIATURAS

δ	Delta
κ	Kappa
μ	mu
μL	Microlitro
5-HT	Serotonina
AA	Ácido Acético
AAP	Analgésicos Antipiréticos
ABC	Área bajo la curva
ACh	Acetilcolina
AINEs	Analgésicos Antiinflamatorios no Esteroideos
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
ANADEVA	Análisis de Varianza
ASA	Ácido acetilsalicílico
ATP	Adenosin trifosfato
BK	Bradicinina
Ca^{++}	Ión calcio
c.a.	Contracciones abdominales
CGRP	Gen relacionado con el péptido de la calcitonina
CMPC	Guanidín-monofosfato cíclico
COX-1	Ciclooxigenasa 1
COX-2	Ciclooxigenasa 2
DA	Dopamina

mL	Mililitro
NA	Noradrenalina
Na ⁺	Ión sodio
NGF	Factor de crecimiento nervioso (por sus siglas en ingles)
NK-A	Neurocinina A
OMS	Organización Mundial de la Salud (<i>WHO por sus siglas en ingles</i>)
p.o.	Vía de administración oral (<i>intraperitoneal</i>)
PAG	Diacilglicerol
Pgs	Prostaglandinas
PIFIR	"Pain induced-functional impairment in rats" (modelo para medir analgesia: disfunción inducida por dolor en ratas)
PO	Dióxido de potasio
ROS	Especies de Oxígeno reactivas
rpm	Revoluciones por minuto
s.s	Solución salina
SN	Sistema Nervioso
SNA	Sistema Nervioso Autónomo
SNC	Sistema Nervioso Central
SNP	Sistema Nervioso Periférico
SNPm	Sistema Nervioso Parasimpático
SNS	Sistema Nervioso Somático
SNSm	Sistema Nervioso Simpático
SP	Sustancia P

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Clasificación de la sensibilidad general.	7
Tabla 2. Clasificación de los Receptores Sensoriales.	11
Tabla 3. Modelos experimentales de dolor.	15
Tabla 4. Principales AINEs	28
Tabla 5. Rendimiento obtenido de las sub-fracciones de la fracción de hexano.	47
Tabla 6. Rendimiento obtenido de las sub-fracciones de la fracción de acetona.	48
Tabla 7. Determinación de la dosis letal 50 (DL ₅₀)	52
Tabla 8. Efecto antinociceptivo de las subfracciones obtenidas de la fracción de Acetona de <i>A. diversifolia</i> en el modelo Writhing. (n=6)	64
Tabla 9. Evaluación de la Dosis Letal Cincuenta (DL ₅₀), vía intraperitoneal.	74
Tabla 10. Apéndice A	102
Tabla 11. Apéndice B	109

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Fig. 1 Vías de transmisión del dolor.	6
Fig. 2 Activación de nociceptores.	12
Fig. 3 Amplificación del dolor mediante la acción de la sustancia P.	13
Fig. 4 Patogenia de la artritis gotosa aguda.	19
Fig. 5 Tratamiento farmacológico del dolor.	23
Fig. 6 Estructura química del tramadol.	26
Fig. 7 Estructura química de la codeína.	26
Fig. 8 Estructura química de la morfina.	27
Fig. 9 Estructura química de la pentazocina, butorfanol y nalbufina.	27
Fig. 10 Árbol y fruto de la <i>A. diversifolia</i> .	34
Fig. 11 Proporción de reportes científicos de las Annonas publicados de 1960 a 1996.	36
Fig. 12 Estructuras químicas de principales metabolitos secundarios presentes en las annonas.	41
Fig. 13 Sitio de la administración intra-articular (i.art.) de la suspensión de ácido úrico en la extremidad posterior derecha de la rata para producir nocicepción en el modelo PIFIR.	50
Fig. 14. Esquema del sistema de registro del tiempo de contacto de las extremidades traseras de la rata: A dispositivo contador de tiempo, B caja con switch de dos posiciones, C electrodos, D motor que mueve a los tambores y E tambores o cilindros de acero inoxidable.	51

Fig. 15 Preparación y fraccionamiento biodirigido de las hojas de <i>A. diversifolia</i> .	54
Fig. 16 Diseño experimental en el modelo "writhing".	55
Fig. 17 Diseño experimental en el modelo PIFIR.	55
Fig. 18 Curso temporal del efecto antinociceptivo de los extractos etanólico y hexánico de <i>A. diversifolia</i> i.p. en comparación con el grupo control en la nocicepción inducida con ácido acético al 1% i.p.	56
Fig. 19 Efecto antinociceptivo de los extractos etanólico y hexánico de <i>A. diversifolia</i> i.p. en comparación con el grupo control en la nocicepción inducida con ácido acético al 1% i.p.	57
Fig. 20 Curso temporal del efecto antinociceptivo del extracto etanólico de <i>A. diversifolia</i> i.p. en comparación con el grupo control en la nocicepción inducida con ácido acético al 1% i.p.	58
Fig. 21 Curva dosis-respuesta del efecto antinociceptivo del extracto etanólico de <i>A. diversifolia</i> i.p. en comparación con el grupo control en la nocicepción inducida con ácido acético al 1% i.p.	58
Fig. 22 Curso temporal del efecto antinociceptivo producido por el fármaco de referencia tramadol i.p. en comparación con el grupo control en la nocicepción inducida con ácido acético al 1% i.p.	59
Fig. 23 Curva dosis-respuesta del efecto antinociceptivo del fármaco de referencia tramadol i.p. en comparación con el grupo control en la nocicepción inducida con ácido acético al 1% i.p.	60
Fig. 24 Curso temporal del efecto antinociceptivo producido por las fracciones obtenidas del extracto etanólico de <i>A. diversifolia</i> i.p.	61

- Fig. 25 Curva dosis-respuesta del efecto antinociceptivo de las fracciones obtenidas del extracto etanólico de *A. diversifolia* i.p. en comparación con el grupo control en la nocicepción inducida con ácido acético al 1% i.p. 61
- Fig. 26 Curso temporal del efecto antinociceptivo de las sub-fracciones obtenidas de la fracción de acetona del extracto etanólico de *A. diversifolia* i.p. en comparación con el grupo control en la nocicepción inducida con ácido acético al 1% i.p. 62
- Fig 27 Curva dosis-respuesta del efecto antinociceptivo de las sub-fracciones obtenidas de la fracción de acetona del extracto etanólico de *A. diversifolia* i.p. en comparación con el grupo control en la nocicepción inducida con ácido acético al 1% i.p. 63
- Fig. 28 Curso temporal del efecto antinociceptivo del extracto etanólico vs. El extracto hexánico de *A. diversifolia* p.o. en comparación con el vehículo, en la disfunción inducida por el ácido úrico al 20%. 65
- Fig. 29 Curva Dosis-Respuesta del efecto antinociceptivo del extracto etanólico vs. El extracto hexánico de *A. diversifolia* p.o. en comparación con el vehículo en la disfunción inducida por el ácido úrico al 20%. 66
- Fig. 30 Curso temporal del efecto antinociceptivo del extracto etanólico de *A. diversifolia* p.o. en comparación con el vehículo en la disfunción inducida por el ácido úrico al 20% en ratas. 67
- Fig. 31 Curva Dosis-Respuesta del efecto antinociceptivo del extracto etanólico de *A. diversifolia* p.o. en comparación con el vehículo en la disfunción inducida por el ácido úrico al 20%. 67

- Fig. 32 Curso temporal del efecto antinociceptivo del fármaco de referencia tramadol i.p. en comparación con el vehículo en la disfunción inducida por el ácido úrico al 20% en ratas. 68
- Fig. 33 Curva dosis-respuesta del efecto antinociceptivo del fármaco de referencia tramadol i.p. en comparación con el vehículo en la disfunción inducida por el ácido úrico al 20%. 69
- Fig. 34 Curso temporal del efecto antinociceptivo de las fracciones obtenidas del extracto etanólico de *A. diversifolia* p.o. en comparación con el vehículo en la disfunción inducida por el ácido úrico al 20%. 70
- Fig. 35 Curva dosis-respuesta del efecto antinociceptivo de las fracciones obtenidas del extracto etanólico de *A. diversifolia* p.o. en comparación con el vehículo en la disfunción inducida por el ácido úrico al 20%. 71
- Fig. 36 Curva dosis-respuesta y DE_{50} i.p. del efecto antinociceptivo del extracto etanólico de *A. diversifolia* en comparación con tramadol en el modelo "writhing". 72
- Fig. 37 Curva dosis-respuesta y DE_{25} del efecto antinociceptivo del extracto etanólico de *A. diversifolia* p.o. y AAS p.o. en comparación con el tramadol i.p. en el modelo PIFIR. 73

“EVALUACIÓN FARMACOLÓGICA DEL EFECTO ANTINOCICEPTIVO DE *A. diversifolia* Saff. EN ROEDORES”

RESUMEN

Del conjunto de plantas que están siendo más utilizadas a nivel mundial, sobresalen aquellas cuyas propiedades curativas se aplican a enfermedades neurológicas. De las enfermedades del sistema nervioso central que más se tratan con plantas medicinales son: la ansiedad, la depresión, los trastornos del sueño, la epilepsia y el dolor. En lo que se refiere al dolor, de acuerdo con la “Internacional Association for the Study of Pain” (IASP) éste se define como una experiencia sensorial y emocional desagradable asociada con daño tisular real o potencial. El control del dolor en el ser humano tiene varios aspectos. El alivio del dolor se puede lograr mediante diferentes estrategias. La más común y efectiva es la administración de analgésicos (fármacos para aliviar el dolor). Un analgésico es un compuesto que alivia el dolor sin causar pérdida de conocimiento. Aparte del aspecto humanitario y ético, el alivio del dolor permite disminuir la incidencia de complicaciones asociadas a él. De ahí la búsqueda exhaustiva de fármacos que puedan aliviar el dolor.

En nuestro país existen varias especies utilizadas en medicina popular para el tratamiento del dolor, entre ellas se puede citar a la llama (*Annona diversifolia* Saff.), cuya infusión de hojas se utiliza como analgésico y anti-inflamatorio. Sin embargo, hasta el momento no se han realizado estudios científicos enfocados a demostrar los efectos analgésicos de esta especie. Por lo anterior, en este proyecto se propone comprobar los efectos antinociceptivos de extractos y fracciones activas de *A. diversifolia* Saff. utilizando modelos experimentales de dolor en roedores para acreditar mediante investigación básica que las propiedades terapéuticas atribuidas a esta especie son adecuadas.

En el presente estudio se describen los efectos de un extracto activo de *A. diversifolia* Saff. sobre la nocicepción inducida en dos modelos experimentales de dolor; tales como: estiramiento abdominal en ratones (“writhing”) y el modelo de disfunción inducida por dolor en ratas (PIFIR por sus siglas en inglés). Lo anterior, con la finalidad

de acreditar mediante investigación básica que las propiedades terapéuticas atribuidas a esta especie son adecuadas. Para el estudio se utilizaron ratones hembras Taconic (SW) (25-35g) y ratas macho Wistar (200-250 g). En el modelo de estiramiento abdominal, la nocicepción se indujo con la inyección de ácido acético al 1% vía i.p., realizada 30 minutos después de la administración del extracto etanólico (3, 30, 100 y 300 mg/kg i.p., n=6), fracciones (100 y 300 mg/kg) o el fármaco de referencia tramadol (3, 10, 17.8 y 30 mg/kg i.p., n=6). La actividad antinociceptiva se demostró por un incremento en la latencia al primer estiramiento abdominal y por una disminución en la frecuencia de los estiramientos abdominales. En el modelo PIFIR la nocicepción se indujo por la inyección de 50 µl de ácido úrico al 20% (suspendidos en aceite mineral) en la articulación fémur tibio-rotular de la extremidad posterior derecha de la rata. Cuando el índice de funcionalidad (I.F) de dicha extremidad fue 0, el extracto etanólico (30, 100, 300 y 600 mg/kg p.o.) o los fármacos de referencia ácido acetilsalicílico (ASA) (31.62, 56.23, 100, 177.82, 316.23, 562.32 mg/kg p.o.) o tramadol (3, 5.62, 10, 17.78 y 31.62 mg/kg i.p.) se administraron y se continuó con el registro para observar si había recuperación del I.F. La actividad antinociceptiva del extracto etanólico fue significativa y dosis-dependiente a partir de la dosis de 30 mg/kg en el modelo "writhing" o de 100 mg/kg en el modelo PIFIR, en comparación con una dosis de 10 mg/kg y 31.6 mg/kg para el tramadol, respectivamente. Posteriormente, una percolación del extracto etanólico se realizó con hexano, acetona o metanol. Estas fracciones se evaluaron a una dosis de 100 mg/kg para el modelo de "writhing" y de 300 mg/kg para el modelo PIFIR. De la fracción obtenida con acetona, que fue la que mostró mayor actividad antinociceptiva, se realizó una columna cromatográfica, De las sub-fracciones obtenidas con similar perfil cromatográfico se evaluaron en dosis correspondientes al contenido o rendimiento de cada sub-fracción. Las sub-fracciones 26-31, 118-120, 121-122, 123-136, 142-161 278-304 presentaron actividad antinociceptiva, sugiriendo que éstas contribuyen en parte a la respuesta antinociceptiva de la fracción de acetona. En el modelo de estiramiento abdominal, las dosis efectivas cincuenta (DE₅₀) calculadas fueron para el extracto etanólico 15.35 mg/kg i.p. en comparación con tramadol 12.42 mg/kg i.p. Mientras que en el modelo PIFIR, las DE₂₅ fueron calculadas en la consideración de que para el extracto etanólico este fue el máximo de eficacia

alcanzada con su administración p.o., evitando con esto la presencia de efectos adversos. Los valores calculados fueron de 684.71 mg/kg p.o, 230.81 mg/kg p.o. y 4.65 mg/kg, i.p. para el extracto etanólico, el ASA y el tramadol, respectivamente. La toxicidad aguda para el extracto hexánico y etanólico, así como del tramadol se determinó mediante el método de Lorke obteniendo valores de $DL_{50} = 141.4$ mg/kg para el extracto hexánico (menos activo), 928.3 mg/kg para el extracto etanólico (más activo) y 118.3 mg/kg para el tramadol administrados vía i.p. en ratones.

Los resultados obtenidos en los modelos de estiramiento abdominal y PIFIR demuestran que el extracto etanólico de *A. diversifolia* Saff. posee actividad antinociceptiva por lo que refuerza su uso en la medicina tradicional para el tratamiento del dolor, específicamente de tipo visceral y para la artritis gotosa con menos eficacia.

1. ANTECEDENTES.

1.1 DOLOR

1.1.1 EPIDEMIOLOGÍA

En nuestro país, las principales causas de morbimortalidad se encuentran asociadas a la presencia del dolor [1]. Las personas con dolor crónico no maligno tienen una afectación multidimensional de la calidad de vida, que supera a otras enfermedades médicas crónicas [2]. El dolor crónico afecta a la salud física y psicológica del que lo padece, con repercusiones sobre las actividades diarias, autonomía, el empleo y el bienestar económico [3, 4]. Un estudio Mexicano señala que el 26% de la población sufre de alguna forma de dolor crónico [5]. La prevalencia del dolor crónico en Estados Unidos es del 35% (105 millones de habitantes), siendo principalmente problemas de origen osteoarticular, lumbalgias, migrañas y cáncer. Una encuesta europea reciente señala que el dolor crónico de intensidad moderada-severa afecta al 19% de la población adulta en Europa y que deteriora seriamente la calidad de vida, desempeño social y laboral de los afectados [6]. Un 29.6% de la población española no hospitalizada padece algún tipo de dolor, siendo el 17.6% dolor crónico [7]. La prevalencia del dolor crónico de causa no oncológica esta entre el 2 y el 40% de la población adulta [8]. Diferentes estudios reportan cifras de prevalencia que van desde 25 hasta 88% en sujetos mayores de 65 años, lo cual es aproximadamente el doble que en pacientes mas jóvenes [7, 9, 10].

El dolor es una sensación de gran importancia para la supervivencia, provocada por estímulos potencialmente dañinos para el organismo, que despierta reacciones reflejas que tienen por finalidad protegerlo [11]. Ya que previenen las lesiones, posibles o reales de los tejidos [12]. Aparece siempre que ha sido lesionado cualquier tejido y hace que el individuo reaccione eliminando o alejándose del estímulo doloroso [13]. Esta sensación se origina cuando son estimuladas las terminaciones nerviosas que se encuentran en las distintas partes del cuerpo [12].

1.1.2 DEFINICIÓN

El *dolor* se define como la percepción de una sensación aversiva, displacentera, originada por estímulos intensos potencialmente capaces de lesionar el organismo y que actúan sobre receptores específicos [11].

Los impulsos dolorosos se transmiten al sistema nervioso central (SNC) mediante dos sistemas diferentes. Un sistema nociceptor está formado por pequeñas fibras mielinizadas A δ . El otro consiste en fibras C no mielinizadas. Estas últimas se encuentran en la división lateral de las raíces dorsales y se les suele denominar como fibras C de las raíces dorsales [14].

1.1.3 CLASIFICACIÓN

1.1.3.1 DOLOR RÁPIDO Y LENTO.

Un estímulo doloroso causa una sensación precisa, aguda y localizada seguida de una sensación sorda, intensa, difusa y desagradable. Estas dos sensaciones se conocen como dolor rápido y lento. El dolor rápido se debe a la actividad de las fibras A δ [14], esta clase de dolor es la que se percibe al clavar una aguja en la piel, o al producirse bruscamente una quemadura y no es percibido por la mayoría de los tejidos profundos del organismo [13]. Mientras que el dolor lento suele acompañarse de destrucción de los tejidos, se debe a la actividad en las fibras C para el dolor [14] y puede observarse en la piel y en casi cualquier órgano o tejido profundo [13].

El transmisor sináptico secretado por las fibras aferentes primarias que conducen el dolor ligero y rápido es el glutamato (GLU), y el que transmite el dolor intenso y lento es la sustancia P (SP) [13,14].

1.1.3.2 DOLOR PROFUNDO.

El dolor profundo es poco localizado, ocasiona náuseas y suele acompañarse de transpiración y cambios en la presión arterial [14].

1.1.3.3 DOLOR MUSCULAR.

Si un músculo se contrae en forma rítmica en presencia de un aporte sanguíneo adecuado, casi nunca se produce dolor. Empero, si se ocluye el aporte sanguíneo al músculo, la contracción pronto produce dolor. El dolor persiste después de la contracción hasta que se reestablece el flujo sanguíneo [14].

1.1.3.4 DOLOR VISCERAL.

El dolor visceral se irradia o se refiere a otras áreas. Es difícil su localización, se acompaña de náuseas y síntomas autónomos [14]. El dolor procedente de las distintas vísceras abdominales o torácicas es uno de los pocos criterios que se pueden utilizar para diagnosticar la inflamación, enfermedades u otras dolencias viscerales.

La víscera no posee receptores sensoriales para ninguna otra clase de sensaciones más que para el dolor [13]. Cualquier estímulo que excite las terminaciones nerviosas del dolor en áreas difusas de la víscera produce dolor visceral. Estos estímulos son la isquemia del tejido visceral, las lesiones de naturaleza química de la superficie de la víscera, el espasmo de la musculatura lisa de una víscera hueca y la distensión de los ligamentos [13].

Todos los dolores viscerales verdaderos que se originan en la cavidad torácica y abdominal se transmiten fundamentalmente a través de las fibras nerviosas que conducen el dolor y que discurren con los nervios del sistema nervioso autónomo (SNA), sobre todo con los nervios simpáticos. Estas fibras nerviosas son fibras pequeñas de tipo C y, por tanto, pueden transmitir solamente el dolor de tipo crónico-sordo (lento) de sufrimiento [13].

1.1.3.5 DOLOR REFERIDO.

El dolor referido puede definirse como el que se percibe en una zona del cuerpo diferente del lugar de origen. Tanto el dolor visceral como el dolor profundo dan lugar al llamado dolor referido ya que se caracterizan por ser difusos (mal localizados) [13].

1.1.3.6 DOLOR INFLAMATORIO.

Después de cualquier lesión mayor que un daño menor, se produce dolor inflamatorio, el cual persiste hasta que la lesión sana. La aplicación de un estímulo que solo debiera ocasionar un dolor menor en el área lesionada produce una respuesta exagerada (hiperalgesia) y los estímulos que serían inocuos en condiciones normales, como el tacto, producen dolor (alodinia). La inflamación de cualquier tipo induce la liberación de muchas citocinas y de distintos factores de crecimiento en el área inflamada. Muchas de estas sustancias facilitan la percepción y transmisión en las áreas cutáneas y en el asta dorsal. Esto es lo que causa hiperalgesia y alodinia [14].

1.1.3.7 DOLOR NOCICEPTIVO.

El Dolor Nociceptivo, también llamado dolor normal, aparece en todos los individuos y se produce por un daño somático o visceral [15].

1.1.3.8 DOLOR SOMÁTICO.

El Dolor Somático afecta a piel, músculo, ligamentos, articulaciones o huesos. Se caracteriza por ser un dolor bien localizado y circunscrito a la zona dañada. No suele ir acompañado de reacciones vegetativas [15].

1.1.3.9 DOLOR NEUROPÁTICO.

El Dolor Neuropático, llamado anormal o patológico, aparece en una minoría de individuos y es el resultado de una lesión o enfermedad del sistema nervioso periférico (SNP) o SNC. El sistema nociceptivo se comporta de forma anormal, existiendo una falta total de relación causal entre lesión tisular y dolor. Una de sus características más típicas, patognomónica, es la aparición de alodinia: aparición de dolor frente a estímulos que habitualmente no son dolorosos [15].

1.1.3.10 HIPERALGESIA.

El aumento en la sensibilización de los receptores es responsable de la hiperalgesia [13]. Esta hiperalgesia se caracteriza por un aumento de la percepción y de la sensibilidad al dolor.

La causa de la *hiperalgesia primaria* es la sensibilización de los receptores nociceptivos en el sitio de la lesión a consecuencia de las sustancias químicas liberadas por el tejido dañado.

La hiperalgesia secundaria se observa en la zona que rodea a la lesión, donde los estímulos inocuos mecánicos, pero no térmicos, producen dolor (alodinia). La causa de este dolor puede ser local o central.

A nivel local, se debería a la activación en el sitio de la lesión de terminaciones nociceptivas que producen descargas antidrómicas que viajan por las ramificaciones del aferente primario a las zonas no lesionadas, donde liberan sustancia P, que sensibiliza a mecanonociceptores de la región y produce hiperalgesia.

A nivel central se sensibilizan neuronas del asta posterior de la médula espinal. En esta sensibilización están involucrados los mecanorreceptores y no los nociceptores [11].

1.2 FISIOLÓGÍA SENSORIAL

La fisiología sensorial estudia los mecanismos que nos permiten detectar los estímulos físicos, modo de operación de las vías sensoriales que transmiten la información a la corteza cerebral y su procesamiento [16].

La capacidad para sentir estímulos es vital para la supervivencia. Si no se percibe el dolor, se hacen frecuentes los accidentes. En general, si no podemos sentir el ambiente y hacer los ajustes homeostáticos necesarios, no sobreviviríamos en ese medio [17]. El ser humano conecta con el medio externo a través de los sentidos. Las sensaciones que podemos percibir las denominamos sensaciones sensoriales: vista, olfato, gusto, tacto y oído; hay otras sensaciones a

las que denominamos sensaciones sensibles que constituyen la sensibilidad somatoestática [18].

La recepción sensorial se inicia en las células receptoras. Son células muy especializadas en la percepción de estímulos. Las sensaciones son fenómenos subjetivos, generados por el Sistema Nervioso (SN) mediante mecanismos físicos o químicos que no son inherentes a la fuerza del estímulo en sí mismo [19].

Los receptores sensoriales son estructuras en las cuales existen células capaces de responder con una gran sensibilidad a señales específicas del entorno, y de transferir la información recibida a terminales nerviosas aferentes al SNC que corresponden a axones de neuronas sensitivas. El proceso que hace que el receptor sensorial responda de un modo útil al estímulo se denomina transducción sensorial (Fig. 1) [19].

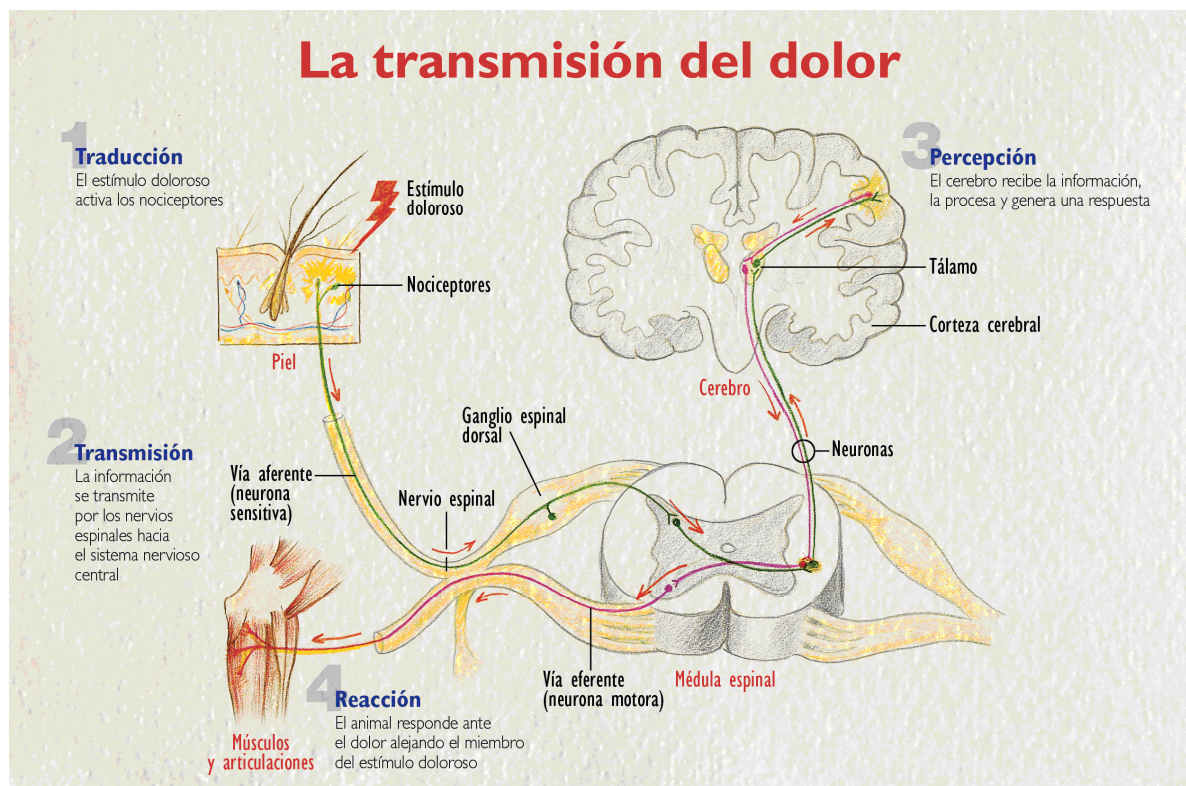


Fig. 1 Vías de transmisión del dolor. [174].

1.2.1 SENSIBILIDAD.

La sensibilidad general puede clasificarse de diversas formas, esta se divide en:

Sensibilidad superficial (*o esteroceptiva*) hace referencia a estímulos aplicados a la superficie del cuerpo (piel y mucosas) [18].

La sensibilidad profunda (*o propioceptiva*) esta relacionada con la recepción de señales procedentes de receptores situados en estructuras mas profundas (músculos, ligamentos y articulaciones) [18]

La sensibilidad visceral (*o enteroceptiva*) comprende la identificación de información procedente de los órganos internos [18]. Tabla 1

Tabla 1. Clasificación de la sensibilidad general.

SENSIBILIDAD SUPERFICIAL O ESTEROCEPTIVA (PIEL Y MUCOSAS)
Táctil
Térmica (frío, calor)
Dolorosa
LA SENSIBILIDAD PROFUNDA O PROPIOCEPTIVA CONSCIENTE E INCONSCIENTE (MUSCULOS, ARTICULACIONES, TENDONES, LIGAMENTOS)
Batistesia (posición)
Cinestesia (movimiento)
Barestesia (presión)
Palestesia (vibración)
LA SENSIBILIDAD VISCERAL O ENTEROCEPTIVA
Por vasos, cerosas, vísceras...

Generalmente, la sensibilidad superficial y la profunda son tratadas juntas bajo el nombre de sensibilidad somática [20].

En lo que se refiere a sensibilidad dolorosa, los receptores para el dolor se denominan **nociceptores** ya que el término fisiológico para decir dolor, es

nocicepción. La nocicepción es el concepto fisiológico referido a la transducción (conversión de una energía determinada en un receptor específico convirtiéndola en un potencial generador) y conducción de la sensación dolorosa [20].

1.3 NOCICEPCIÓN.

Al fenómeno de detección, transducción y transmisión de un estímulo nocivo se denomina nocicepción. Los estímulos térmicos, mecánicos o químicos capaces de producir daño tisular, son captados por receptores específicos llamados nociceptores, que los transmiten en forma de impulsos nerviosos a la médula por medio de fibras nerviosas aferentes. Desde la médula ascienden vías que conducen la información a centros supraespinales y desde éstos hasta la corteza cerebral, donde la sensación dolorosa se hace consciente [21,22].

1.3.1 TRANSMISIÓN DEL ESTÍMULO NOCICEPTIVO.

El estímulo originado en los nociceptores es transmitido a la médula por medio de nervios periféricos. Estos nervios están formados por fibras nerviosas, que a su vez están compuestas por los axones de diferentes tipos de neuronas: aferentes sensitivas primarias, motoneuronas y neuronas simpáticas postganglionares. Las aferentes sensitivas son neuronas bipolares, que tienen su cuerpo celular en los ganglios raquídeos, desde donde parte la prolongación central, que alcanza las astas posteriores de la médula a través de las raíces dorsales.

En las diferentes fibras nerviosas que componen los nervios periféricos se pueden distinguir tres grupos: A, B y C en función de su diámetro, grado de mielinización y velocidad de conducción. Las de tipo A son fibras gruesas, mielínicas, de conducción rápida, que transportan sensaciones somáticas. Dentro de éstas, las del tipo A δ , son fibras mielínicas de pequeño diámetro que conducen a una velocidad de 12-30 m/s, y transportan las sensaciones de temperatura y

dolor recogidas por los mecanorreceptores de alto umbral y los receptores térmicos. La estimulación de las fibras A δ , produce el dolor inicial, de carácter agudo, punzante, localizado y de inicio rápido. Las fibras de tipo C son amielínicas, de conducción lenta (0.2-2 m/s) y llevan sensibilidad al dolor y temperatura procedente de los nociceptores polimodales. Las fibras C median el denominado dolor lento, de carácter insidioso, difuso, mal localizado y que se prolonga más allá de la duración del estímulo. Las fibras A δ y C están presentes en la piel y en estructuras viscerales y somáticas profundas [23].

1.3.2 NOCICEPTORES

Todos los receptores del dolor son terminaciones nerviosas libres (nociceptores), su característica fundamental es que responden a estímulos que por su intensidad son capaces de lesionar los tejidos, pero no responden a estímulos de mediana o baja intensidad [11].

Se han encontrado nociceptores en las capas superficiales de la piel, en estructuras profundas como el periostio y superficies articulares, y en vísceras como el corazón o la vesícula biliar.

Existen tres tipos de nociceptores: mecanorreceptores de alto umbral, nociceptores térmicos y nociceptores polimodales. Los dos primeros, localizados en piel y mucosas, responden a un solo tipo de estímulo: mecánico intenso o térmico, respectivamente. Ambos transmiten la información a la médula por axones finamente mielinizados, que forman las fibras A δ . Los nociceptores polimodales responden a la presión, temperatura, estímulos químicos, etc; se encuentran en piel, tegumentos y paredes viscerales y transmiten los impulsos a través de fibras C amielínicas [22].

Cuando el dolor se prolonga y se daña el tejido, se facilitan y reorganizan las vías centrales nociceptivas [14]. Los receptores del dolor (nociceptores) pueden ser excitados por medios mecánicos o químicos [13]. Las sustancias que producen la sensación dolorosa, como la histamina o las cininas, estimulan directamente las

terminaciones nerviosas, mientras que las prostaglandinas (Pgs) reducen el umbral del dolor al aumentar la sensibilidad de los receptores al estímulo [12].

1.3.2.1 NOCICEPTORES CUTÁNEOS.

Se les divide en dos tipos:

Mecanonociceptores. Son terminaciones libres de fibras mielínicas finas tipo A δ . Responden a estímulos mecánicos muy intensos. No responden a estímulos térmicos o químicos salvo que hayan sido sensibilizados previamente.

Nociceptores polimodales. Son activados por varias clases de estímulos dolorosos: mecánicos, térmicos y químicos. Son terminaciones libres de fibras amielínicas finas tipo C [11].

1.3.2.2 NOCICEPTORES VISCERALES, MUSCULARES Y ARTICULARES.

Los receptores viscerales son también terminaciones libres (fibras A δ) que se ubican en las paredes de las vísceras huecas, en las fascias, alrededor de los vasos sanguíneos y en la duramadre. También hay receptores polimodales (fibras C) en algunas vísceras como el corazón [11]. Tabla 2

En las articulaciones hay mecanonociceptores que se distribuyen en el periostio de los huesos, en la cápsula articular y de los tendones, ligamentos y fascias. En los músculos se encuentran terminaciones libres de fibras tipo III (equivalentes a las A δ) y IV (equivalentes a fibras C) [11]. Tabla 2

Tabla 2. Clasificación de los Receptores Sensoriales.

ENERGÍA	TIPO	LOCALIZACIÓN	SENSACIÓN
FUERZA MECÁNICA	MECANORECEPTOR	-PIEL, TEJIDOS SUBCUTÁNEOS - ARTICULACIONES, MÚSCULOS, - VESTIBULARES, CÓCLEA - VÍSCERAS - VASOS	- TACTO, PRESIÓN, COSQUILLO - SENTIDO, POSICIÓN Y MOVIMIENTO-ELONGACIÓN - AUDICIÓN - DISTENSIÓN PRESIÓN SANGUÍNEA
LUZ	FOTORECEPTOR	RETINA	VISIÓN
CALOR	TERMORECEPTOR	PIEL	CALOR Y FRÍO
SUSTANCIAS EN SOLUCIÓN	QUIMIORECEPTOR	MUCOSA OLFATORIA, PAPILAS GUSTATIVAS, ARTERIAS	OLFATO, GUSTO, PO ₂ , PCO ₂ , PH
FUERZAS EXTREMAS	NOCICEPTOR	PIEL, VÍSCERAS, MÚSCULOS, ARTIC.	DOLOR

Los mecanismos de transducción de los mecanonociceptores no se conocen, pero se considera que pueden ser similares a los de los mecanoreceptores. También se supone que la activación de los nociceptores polimodales se realizaría, en algunos casos, a través de segundos mensajeros [11]. Tabla 2

1.3.3 ACTIVACION DE LOS NOCICEPTORES.

La sensibilización de un nociceptor es el proceso por el cual la fibra aferente aumenta la intensidad de la respuesta y disminuye el umbral de activación. Esta sensibilización ocurre cuando sustancias químicas tales como iones K⁺, bradisinina (BK), histamina, serotonina (5-HT), los ácidos, la acetilcolina (ACh), la PgE, leucotrienos u otras son liberadas y formadas cerca de un nociceptor por

lesión o inflamación del tejido [13]. Las sustancias liberadas en el sitio de lesión, como 5-HT por las plaquetas, histamina por los mastocitos y leucotrienos, o formadas localmente como PgE, contribuyen a la sensibilización de la terminal, ya sea por activación de segundos mensajeros o abriendo canales iónicos como la 5-HT (Fig. 2) [11].

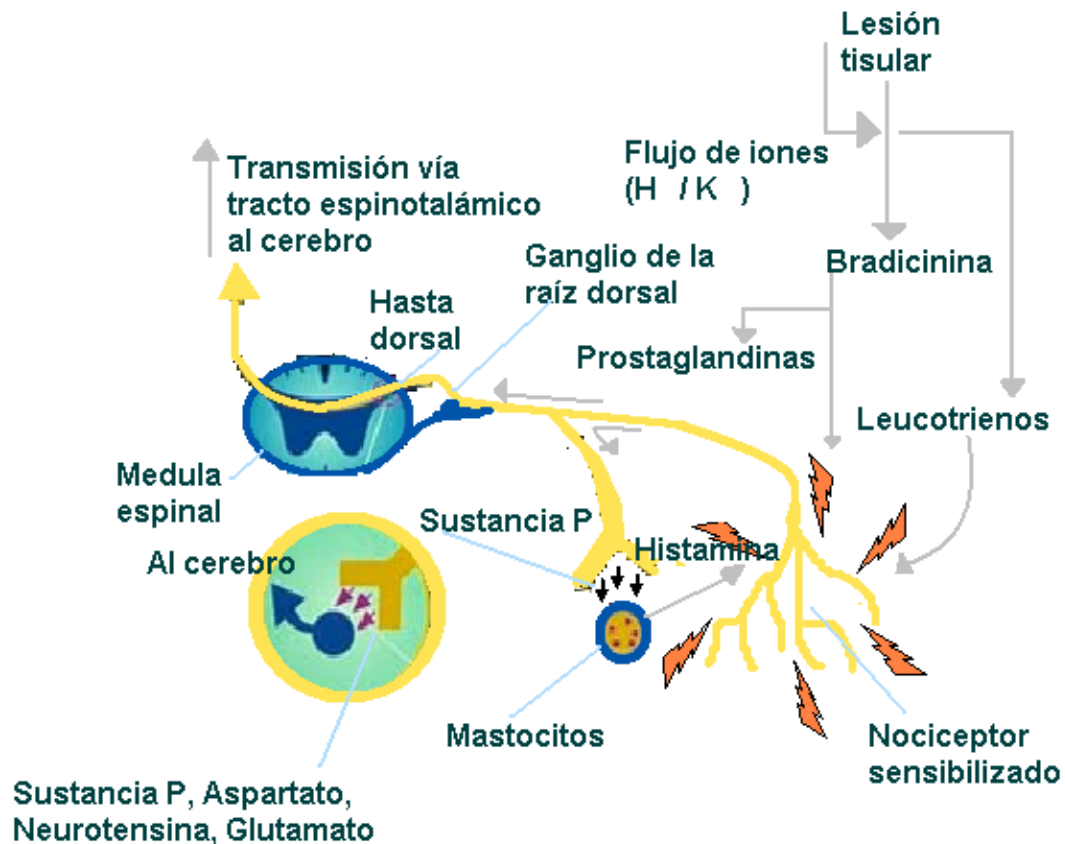


Fig. 2 Activación de nociceptores. [15].

Las Pgs trabajan junto con la BK para potenciar el dolor y la formación del edema. La siguiente ilustración muestra como los mediadores inflamatorios (Pgs, histamina y BK) perpetúan la extensión del dolor por estimular las terminaciones nerviosas libres de los nociceptores para liberar Sustancia P a nivel periférico. Esta sustancia es un neuropéptido que es sintetizado por varios tipos de neuronas incluyendo a los nociceptores. Estimula la degranulación de los mastocitos,

aumentando la cantidad de histamina presente. Esta a su vez estimula a los nociceptores amplificando la señal inflamatoria dolorosa y perpetua la extensión de la inflamación y dolor por estimular nuevos nociceptores para una mayor liberación de SP (Fig. 3) [24].

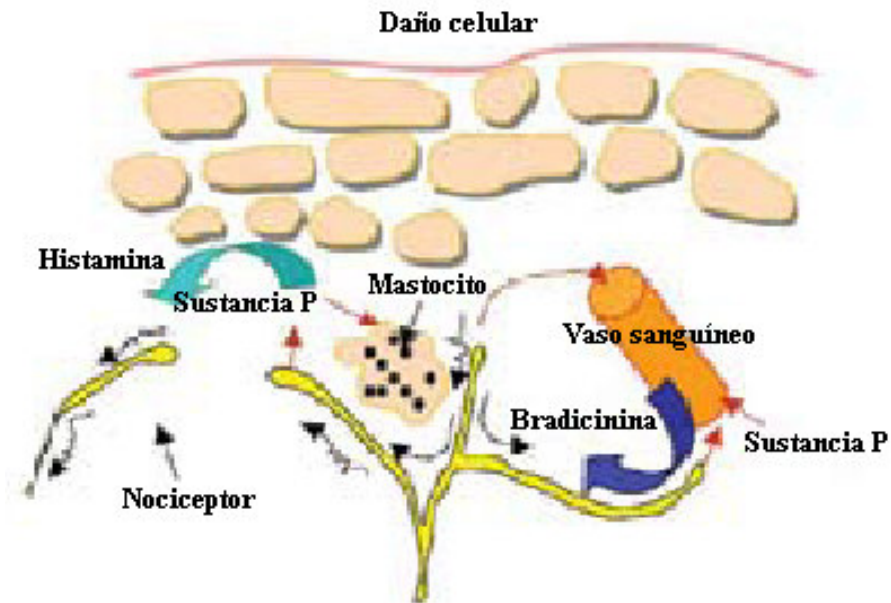


Fig. 3 Amplificación del dolor mediante la acción de la sustancia P. [175].

Iones (H^+ , K^+). Se han descubierto una familia de canales iónicos que se activan al aumentar la acidez del entorno (disminución del pH) 4,5. Se expresan en neuronas sensoriales de pequeño diámetro, convirtiéndolos en candidatos mediadores de la hiperalgesia en los tejidos inflamados [25]. Activan los nociceptores (no se sabe si al aumentar la permeabilidad de la membrana o actuando sobre los receptores específicos) y aumentan los efectos de otros mediadores.

Adenosin-Trifosfato (ATP). Despolariza las neuronas sensoriales y su liberación en el tejido dañado. Puede aumentar la activación de los nociceptores [26].

Quininas (BK). Con efectos proinflamatorios como: liberación de prostanoïdes, citocinas y radicales libres desde gran variedad de células; estimulación de las neuronas simpáticas postganglionares; degranulación de los mastocitos con liberación de histamina que estimula otros mediadores.

Prostanoïdes. biosintetizados a partir de ácidos grasos esenciales no saturados, como el ácido araquidónico, precursor de leucotrienos y tromboxano. Tienen un papel muy importante en la sensibilización de los receptores a otras sustancias. Aumenta la conductancia de la membrana al Na^+ y a través de la liberación de sustancia P sensibiliza las neuronas reduce su umbral de activación y aumenta su respuesta a otros estímulos.

ROS (especies oxígeno reactivas). No activan los nociceptores, aunque sí aumentan los efectos de otros mediadores (BK, PgE_2).

5-HT. Procede de la agregación plaquetaria y degranulación de los mastocitos. Activa las neuronas sensoriales al aumentar la permeabilidad al Na^+ a través de la activación de los receptores 5-HT y disminuye la permeabilidad al K^+ , además sensibiliza los nociceptores disminuyendo su umbral de activación al calor y presión.

Histamina. Produce vasodilatación, extravasación plasmática y edema, con la consiguiente liberación de otros mediadores (BK, 5-HT). Proviene de la degranulación de los mastocitos activada por la sustancia P, IL y el factor de crecimiento nervioso (NGF por sus siglas en inglés), plaquetas y basófilos.

Sustancias neurogénicas. Las neurocininas, sustancia P y neurocinina-A (NKA) contribuyen a la inflamación neurogénica e hiperalgesia en la periferia y a los cambios en la excitabilidad del asta dorsal de la médula asociadas con la transmisión de las señales de dolor [27].

Las citocinas (interleucinas-IL, interferón y FNT-factor de necrosis tumoral) también están relacionadas con la hiperalgesia indirectamente a través de varios mecanismos: liberación de prostanoïdes, expresión de NGF o receptores como BK [28].

El NGF tiene un papel clave no sólo en el desarrollo de las neuronas sensitivas y autonómicas, sino también en el proceso de nocicepción. Este factor,

el cual es regulado al alza por el proceso inflamatorio, es producido en la periferia por los fibroblastos y las células de Schwann y actúa aumentando la excitabilidad de los nociceptores contribuyendo a la hiperalgesia [27].

La investigación básica y clínica ha avanzado mucho en los últimos años en su intento de conocer a fondo los mecanismos íntimos de la nocicepción. Esto ha sido posible gracias a los modelos animales de dolor [29].

1.4 MODELOS ANIMALES DE DOLOR.

En la actualidad, no podemos conocer las sensaciones de un animal, sólo podremos estudiar las reacciones de éstos ante estímulos nocivos de muy diversa naturaleza. Es por ello que Zimmerman [30] adaptó la definición de dolor de la IASP para que pudiera ser aplicada a los animales. Así, el dolor en animales sería: “una experiencia sensorial aversiva causada por una lesión real o potencial que produce reacciones motoras y vegetativas progresivas, desencadena un comportamiento aprendido de evitación y puede modificar comportamientos específicos de la especie, incluyendo los sociales.”

A partir de esta definición se pueden entender los modelos animales de dolor como un medio imprescindible para el estudio del dolor. En este sentido, un modelo de dolor es el procedimiento por el cual se valora la reacción de un animal ante un estímulo nocivo de naturaleza variada o situación patológica inducida que puede ser utilizado en circunstancias fisiológicas o patológicas [29]. Tabla 3.

Tabla 3. Modelos experimentales de dolor.

Modelos de dolor con estímulos de corta duración (dolor fásico o agudo)	
Pruebas basadas en un estímulo térmico	Prueba de retirada de la pata “Paw withdrawal test” [31, 32]. Prueba de la placa caliente “ <i>Hot plate test</i> ” [33]. Prueba de la placa fría “Cold plate test” [34].

Pruebas basadas en un estímulo mecánico	Métodos de presión constante [35]. Métodos de presión creciente [36]. Prueba de presión de la pata “ <i>paw pressure test</i> ” o de la cola “ <i>tail pressure test</i> ” en la rata.
Pruebas basadas en un estímulo eléctrico	Pruebas que utilizan descargas eléctricas largas <ul style="list-style-type: none"> ➤ Cola [37]. ➤ Pata [38, 39]. Pruebas que utilizan choque eléctricos o descargas eléctricas cortas <ul style="list-style-type: none"> ➤ Cola [40, 41, 42, 43]. ➤ Pulpa dental [44, 45]. ➤ En extremidades en animales descerebrados [46, 47, 48].
Modelos de dolor con estímulos de larga duración (dolor tónico o crónico)	
Estimulación a órganos huecos	Colón <ul style="list-style-type: none"> ➤ Formalina en colón de rata [49]. ➤ Glicerol en colón de rata [50]. Útero
Inyección intraperitoneal de sustancias irritantes o “Writhing test”	Ácido acético [32]. Ácido etacrínico [51]. Adrenalina [52]. Benzoquinona [51]. p-Benzoquinona [51]. Cloruro de potasio [53].
Inyección intradérmica	Capsaicina [54]. EDTA [55]. Formalina [56, 57, 58, 59, 60]. Salina hipertónica [61].
Inducción de artritis generalizada	poliartritis inducida por inyección de <i>Mycobacterium butiricum</i> en la base de la cola de la rata [29, 62].

Continuación de la tabla 3. Modelos experimentales de dolor.

1.4.1 PRUEBA DE ESTIRAMIENTO ABDOMINAL (“WRITHING TEST”)

El dolor visceral se caracteriza por reflejarse en la pared corporal [63]. La prueba de contracción o contorsión abdominal es sencilla, requiriendo únicamente la inyección intraperitoneal de sustancias irritantes. Este procedimiento provoca una conducta característica de estiramiento abdominal (estiramiento del torso acompañado de hiperextensión de las extremidades inferiores y arqueado cóncavo de la espalda). La prueba puede considerarse exclusivamente visceral cuando se utilizan sustancias que producen fuertes contracciones de la musculatura lisa visceral (como acetilcolina o suero fisiológico hipertónico). Pero, en estos casos, la respuesta dura muy poco (< 3 min) y, por tanto, tiene una relevancia clínica limitada. Cuando se utilizan irritantes para producir inflamación y obtener así una respuesta más larga, la prueba se convierte en un modelo visceral y somático mixto, porque el peritoneo, que es una estructura parcialmente somática, se ve también afectado [63, 64].

La prueba consiste en inducir nocicepción en el ratón por la administración de ácido acético vía i.p. en un volumen de 10 mg/kg. El número de estiramientos abdominales se contabiliza en un tiempo máximo (20 o 30 minutos) y los datos se analizan cuantitativamente, evaluando la presencia o ausencia de estiramiento, o gradualmente, por conteo del número de estiramientos que ocurren en un intervalo fijo de tiempo.

1.4.2 MODELO DE DISFUNCIÓN INDUCIDA POR DOLOR EN RATA (PIFIR)

En el modelo experimental de disfunción inducida por dolor en rata (**PIFIR** por sus siglas en inglés) [65], se produce una disfunción de tipo artritis gotosa por la inyección intra-articular (i.art) de ácido úrico en la pata posterior derecha de la rata. El análisis histopatológico muestra que el ácido úrico induce una respuesta aguda de inflamación comparable a la que se observa con una inyección i.art. de cristales de urato de sodio [66]. Después de la administración del ácido úrico se genera una disfunción motora en la extremidad inyectada, ya que las ratas evitan

utilizarla cuando son forzadas a caminar. La disfunción que se genera en el modelo es gradual con un máximo del 100% en 2.5 horas aproximadamente. Se ha discutido que la disfunción inducida en este modelo es producida por un proceso inflamatorio, ya que es reversible por agentes anti-inflamatorios; sin embargo se ha observado que fármacos, sin actividad anti-inflamatoria, como la morfina y el paracetamol, muestran una alta eficiencia y potencia; controversialmente, agentes anti-inflamatorios puros como la hidrocortisona, muestran un efecto mucho más lento que la indometacina, la cual tiene propiedades tanto antiinflamatorias como analgésicas. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Okuda y col en 1984, en donde sugieren que la disfunción de la pata se debe a la nocicepción causada por la inflamación aguda.

En este modelo la extremidad no inyectada sirve como control de la extremidad inyectada en la misma rata y se ha comprobado que se pueden inducir diferentes niveles de nocicepción variando las concentraciones de ácido úrico [65]. Además, permite que el tratamiento analgésico se dé cuando el dolor ya se encuentra instalado, a diferencia de los modelos reflejos en donde generalmente el tratamiento analgésico se tiene que dar antes del estímulo nocivo. El procedimiento puede ser considerado como un modelo de nocicepción tónico el cual puede simular un dolor clínico. Éste modelo semeja el daño e inflamación producido por la gota, una enfermedad artrítica.

La artritis afecta más comúnmente las áreas que cubren o rodean las articulaciones. Entre las señales de advertencia de la artritis se encuentran el dolor, la rigidez, la hinchazón ocasional y la dificultad para mover una articulación. El dolor puede ser constante o intermitente, puede tener lugar en una articulación particular o en el cuerpo entero.

Hay más de 100 tipos diferentes de artritis, muchos síntomas y distintos tratamientos. Los tipos más comunes de artritis son: la artritis ósea, la reumática, la gota, fibromialgia, osteoporosis, lupus, bursitis y tendinitis.

1.4.2.1 LA GOTA.

La gota es un desorden metabólico caracterizado por altos niveles de ácido úrico en la sangre (hiperuricemia). Esta hiperuricemia induce el depósito de cristales de urato de sodio en algunos tejidos, especialmente en el riñón y en las articulaciones. La hiperuricemia no siempre produce gota, pero la gota siempre es precedida por hiperuricemia [67]. El ácido úrico es el principal metabolito de las purinas de las nucleoproteínas, de los nucleótidos y de las purinas sintetizadas *de novo* por el organismo humano y en algunas especies animales [66].

La causa de la hiperuricemia es una sobreproducción de ácido úrico relativo a la capacidad de los pacientes para excretarlo. Los ataques agudos son tratados con colchicina, que provoca un decremento en el movimiento de granulocitos dentro del área afectada, y por AINEs, que reducen el dolor y la inflamación [68].

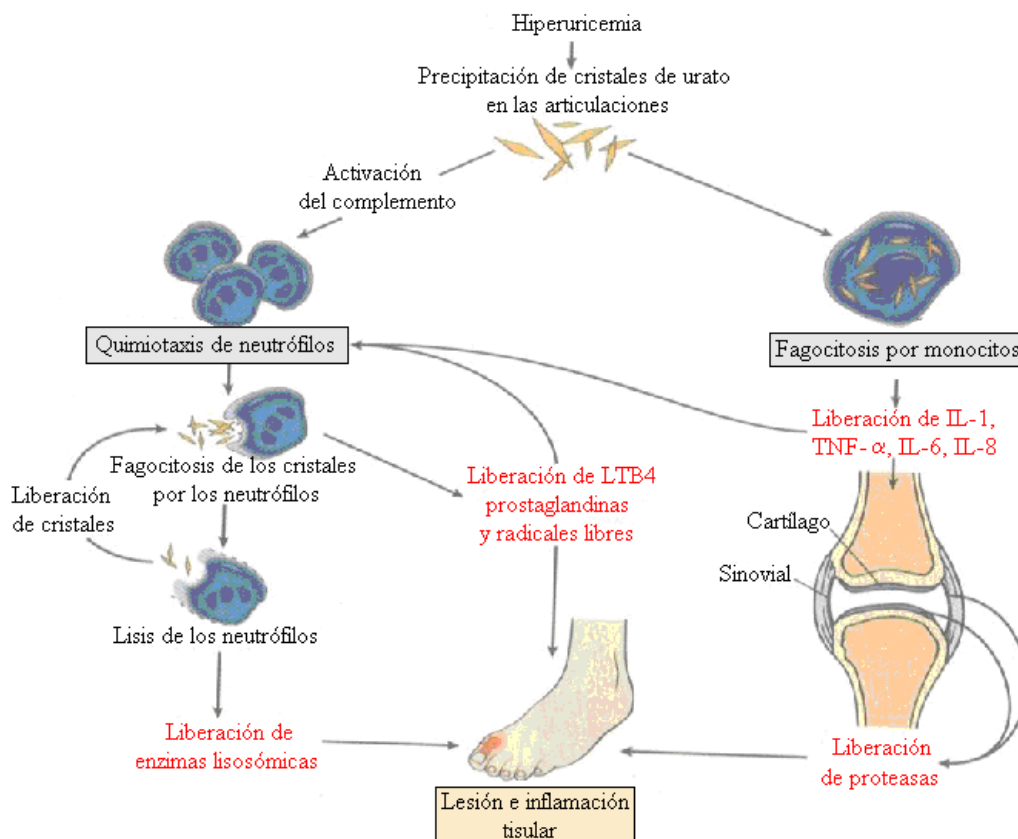


Fig. 4 Patogénesis de la artritis gotosa aguda. [176].

La deposición de cristales de urato de sodio inicia un proceso inflamatorio que involucra la infiltración de granulocitos que fagocitan a los cristales de ácido úrico (Fig. 8). De hecho, existe un incremento en la producción de lactato en los tejidos sinoviales, produciendo un decremento local del pH que fomenta más la deposición de cristales de ácido úrico [68]. La deposición de cristales en el fluido sinovial promueve la liberación de citocinas (entre otros mediadores pro-inflamatorios). Con la contribución de factores humorales, también activados por los cristales, la IL-1 y FNT- α activan notablemente las células endoteliales permitiendo la extravasación de leucocitos y la IL-8 promueve la atracción y activación masiva de leucocitos polimorfos nucleares (neutrófilos) en el sitio de inflamación [69] (Fig. 8).

Es necesario que este tipo de investigaciones se realicen bajo las orientaciones de unas guías éticas para la experimentación con animal consciente.

1.4.3 CONSIDERACIONES ÉTICAS EN EL ESTUDIO DEL DOLOR EN ANIMALES.

Las investigaciones en dolor son necesarias si se quieren conocer nuevos aspectos clínicamente relevantes de los mecanismos de la nocicepción o de nuevos tratamientos farmacológicos. Éstas deben realizarse siguiendo las líneas que marca el Comité para la Investigación y la Ética de la IASP [70], la NOM-062-ZOO-1999 y el Comité de la propia institución donde se realiza (Comité de Investigación y Bioética del Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz).

Los elementos a considerar son:

1. *Justificación.* Los experimentos con animales en dolor son sólo justificables cuando resulta evidente qué puede resultar de la información recogida un beneficio concreto para la salud. Además, el investigador debe estar convencido de que la justificación en que basa la realización de sus experimentos es ética.

2. *Procedimientos*. Detallar anestesia, monitorización, técnica quirúrgica, analgesia postoperatoria, razones para emplear drogas inusuales, métodos de observación conductual y método de sacrificio.

3. *Duración e intensidad del estímulo doloroso*. Deben ser los mínimos, al utilizar los modelos de dolor hay que asegurarse de que los animales son expuestos al mínimo dolor necesario para alcanzar los objetivos del experimento y que la duración del experimento sea lo más corta posible, se debe de tener una adecuada planificación experimental.

4. *Número de animales*. También debe ser el mínimo necesario para demostrar o rechazar la hipótesis de trabajo utilizando métodos estadísticos que dependerán de la precisión del resultado (variabilidad biológica) y el número de grupos a analizar (Por ejemplo: t de Student para dos grupos y análisis de varianza para más de 2 grupos, cuando se trata de análisis paramétrico).

5. *Tipo de experimentación*. Al realizar experimentos en animales conscientes habrá que utilizar los estímulos nocivos menos agresivos e incluso el investigador debe probarlos sobre sí mismo si es posible, y las desviaciones del comportamiento normal de los animales deben ser evaluadas y comunicadas en los manuscritos [29, 71].

1.4.4 CRITERIOS PARA LA VALIDACIÓN DE LOS MODELOS ANIMALES DE DOLOR.

Los modelos animales de dolor deben tratar de reproducir situaciones clínicas o fisiopatológicas que permitan el estudio de alternativas terapéuticas aplicables a la clínica humana. Las características que deberían cumplir estos modelos son:

1. *El modelo ha de tener utilidad clínica*. El modelo debe reproducir situaciones de dolor que se presentan en la práctica clínica o, en todo caso, reproducir aspectos concretos de algún tipo de dolor clínico-.

Sólo de esta forma los resultados obtenidos de la experimentación animal pueden eventualmente transportarse a la clínica humana.

2. *El modelo debe ser cuantificable*. Aunque el dolor es una experiencia subjetiva y puede discutirse si los animales de hasta determinado grado de evolución son

capaces de sentir dolor. Habitualmente, los modelos animales de dolor agudo inducen cambios motores reflejos o conductuales muy elementales (reflejos de retirada, vocalización, cambios vasomotores), mientras que los modelos de dolor crónico producen cambios de conducta más elaborados (autoagresión en forma de rascado, mordisqueo o autotomía; alteraciones en el patrón de ganancia ponderal, de sueño, actividad sexual o aprendizaje).

3. *El modelo debe ser fácilmente reproducible.* Ésta es una condición que asegura la fiabilidad de los resultados permitiendo la comparación de los diversos tratamientos o de las experiencias de diferentes grupos o laboratorios.

4. *El modelo debe tener coherencia interna.* Con esto queremos indicar que debe haber una concordancia entre los aspectos conductuales, neuroquímicos, neurofisiológicos y anatomopatológicos. Este requisito implica un trabajo previo al de la proposición del modelo para su eventual experimentación en el campo del dolor, que consiste en el estudio del propio modelo experimental.

5. *El modelo debe estar validado.* Para ello se pueden usar una serie de procedimientos, como puede ser la utilización de tratamientos de reconocida eficacia en la clínica o buscando en el animal respuestas o cambios conductuales semejantes a los que clínicamente presentan los pacientes con ese tipo de dolor que se intenta reproducir.

6. *El modelo debe cumplir determinados requerimientos de tipo éticos,* (antes mencionados). Con la finalidad de aminorar el sufrimiento del sujeto experimental durante la inducción de nocicepción en un modelo, es factible el uso de anestésicos siempre y cuando el modelo lo requiera y permita [72].

Los modelos de inducción de un proceso nociceptivo involucran la aplicación de diferentes métodos los cuales han sido usados para caracterizar los sistemas que median el proceso patológico, pero además para la búsqueda de terapias analgésicas eficaces y el conocimiento de sus mecanismos de acción [73, 74, 75].

1.5 TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO DEL DOLOR.

El dolor es un estado complejo que implica mecanismos tanto centrales como periféricos. Si bien la Farmacología dispone de numerosos grupos de fármacos con propiedades analgésicas y que pueden ser administrados eventualmente como terapéutica coadyuvante o en determinados dolores específicos (Fig. 5), la base del tratamiento farmacológico del dolor, la constituyen principalmente dos grupos de fármacos:

1) Fármacos opioides, llamados también opiáceos mayores como la morfina o menores como el tramadol.

2) Fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE) Estos fármacos son, en grado variable, según los distintos compuestos, analgésicos, antiinflamatorios y antipiréticos. Se denominan también analgésicos menores [76, 77].

Cabe señalar que existen además fármacos adyuvantes, considerados así porque son aquellos que en asociación con analgésicos potencian su actividad terapéutica. Por ejemplo: corticoides, antidepresivos y anticonvulsivantes que se mencionan más adelante.

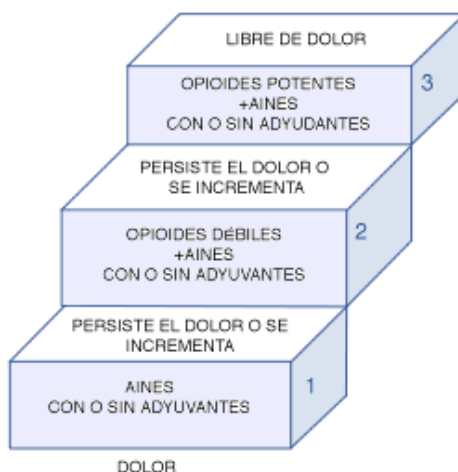


Fig. 5 Tratamiento farmacológico del dolor. [177].

1.5.1 ANALGÉSICOS OPIOIDES.

Los analgésicos opioides se encuentran entre las herramientas terapéuticas de mayor relevancia en el tratamiento del dolor [78], son la clase más importante de analgésicos en el manejo del dolor moderado a severo debido a su efectividad, dosificación fácil y relación riesgo/beneficio favorable. Constituyen un grupo de fármacos que se caracterizan por poseer afinidad selectiva por los receptores opioides y causan analgesia de elevada intensidad [79, 80]. La analgesia inducida por fármacos opioides y opiáceos es debida a su acción sobre diversas estructuras del SNC, tanto a nivel espinal, como supraespinal. En las vías y centros del dolor existen receptores opioides de tres tipos μ (mu), δ (delta) y κ (kappa), cuyo estímulo por sustancias agonistas da lugar a efectos analgésicos [76, 81].

Estos receptores son moléculas endógenas que pertenecen al grupo de receptores celulares de membrana, constituidos por una cadena proteica con siete segmentos transmembrana, asociados a proteínas G. Se encuentran distribuidos a todo lo largo y ancho del sistema nervioso, tanto el central como el periférico y el entérico [79, 82]. Los receptores opioides reciben las señales de sus ligandos naturales, las encefalinas, endorfinas y otros neuropéptidos opioides.

En general, las consecuencias neuronales inmediatas de la activación de estos receptores consisten en una reducción de la actividad neuronal: pierde excitabilidad y pierde capacidad para liberar sus neurotransmisores específicos. Convencionalmente se decidió que todo producto que alivie el dolor previa fijación a dicho receptor, sea denominado analgésico opioide. El término opiáceo queda restringido a los fármacos naturales o sintéticos que derivan del *Papaver somniferum*.

Los fármacos opiáceos pueden ser de origen *natural*, derivados del fenatreno (morfina, codeína, tebaína), obtenidos estrictamente del opio, jugo extraído de la adormidera *Papaver somniferum*; de origen semisintético, (heroína, dioxina, hidromorfona); obtenidos por introducción de distintos radicales químicos en los compuestos naturales, y de origen sintético, es decir fármacos obtenidos por síntesis química, con analogía estructural o no con los opiáceos naturales, pero

que recuerdan sus acciones farmacológicas, con potencia y eficacia variables (meperidina, metadona, fentanilo, etc.) [76, 79, 81].

1.5.1.1 POTENCIA ANALGÉSICA DE ALGUNOS FÁRMACOS TIPO OPIOIDE

Los agonistas puros μ que tienen un techo analgésico más bajo son frecuentemente llamados opioides menores y se utilizan en dolores leves o moderados, solos o en asociación con analgésicos no opioides. En contraposición, los denominados mayores sirven para dolores de fuerte intensidad. Algunos más modernos como el tramadol se encuentran en posición intermedia [83, 84].

Tramadol. (Fig. 6) Es un analgésico de acción central que ha sido usado en clínica práctica. Es un opioide menor sintético del grupo del aminociclohexanol que se une débilmente, pero con eficacia a receptores μ . El tramadol inhibe la recaptura de NA y 5-HT. Su acción analgésica es solo parcialmente invertida por el bloqueo con naloxona de los receptores μ opioides. Esto indica que el efecto del tramadol no es gobernado principalmente a través de receptores μ opioides, sino que depende de la combinación de sus 2 mecanismos de acción [85], por lo que puede producir analgesia por un mecanismo no-opioide [86], que consiste en un incremento de la concentración extraneuronal de NA y 5-HT. Este mecanismo dual podría ser atribuido a dos isómeros situados en la mezcla racémica, lo cual incrementa la concentración de estos dos neurotransmisores con diferentes afinidades en áreas seleccionadas cerebrales [67, 87].

Provoca menos depresión respiratoria y menos estreñimiento que los demás opioides debido a que el efecto analgésico se debe a la acción simultánea y complementaria de sus dos enantiómeros, mientras que éstos presentan acciones respiratorias y digestivas que se contraponen entre sí [86].

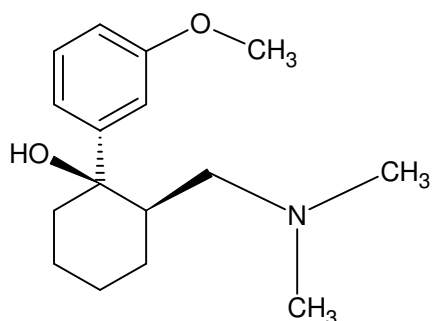


Fig. 6 Estructura química del tramadol.

Codeína. (Fig. 7) Derivado metílico de la morfina, en la cual se convierte parcialmente dentro del organismo, es probablemente el opiáceo más utilizado dentro de este grupo.

A la acción analgésica moderada se unen su acción antitusígena y su capacidad para producir estreñimiento. Con frecuencia la codeína se prescribe en medicamentos que asocian un AAP/AINE como fórmula analgésica, junto con otros fármacos (anticolinérgico, antihistamínico, vasoconstrictor de mucosas) en fórmulas antigripales y anticatarrales [88, 89].

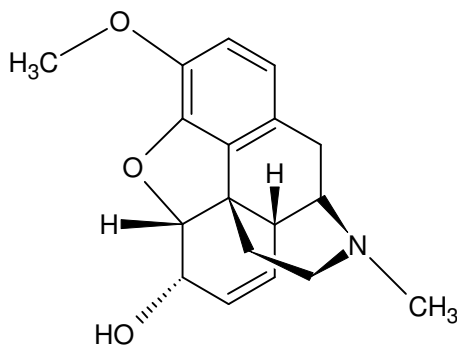


Fig. 7 Estructura química de la codeína.

Morfina. (Fig. 8) Es un opiáceo mayor utilizado en el dolor moderado o intenso. La morfina tiene afinidad fundamentalmente por el receptor μ . en distintos niveles del SNC, tanto en el sistema aferente que transmite la información nociceptiva, como sobre el sistema eferente que la controla [88].

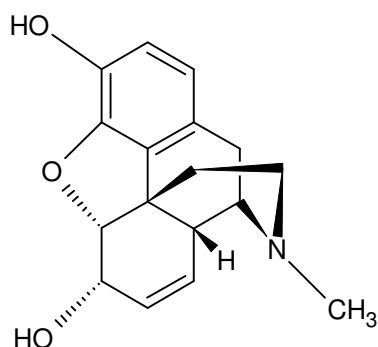


Fig. 8 Estructura química de la morfina.

Pentazocina, butorfanol y nalbufina. (Fig. 9) Son unos ejemplos de opioides de acción mixta. Su uso queda restringido para dolores moderados y de carácter agudo, o bien cuando los agonistas puros son mal tolerados por exceso de sedación o porque inducen prurito, estreñimiento excesivo o espasmos biliares [89, 90].

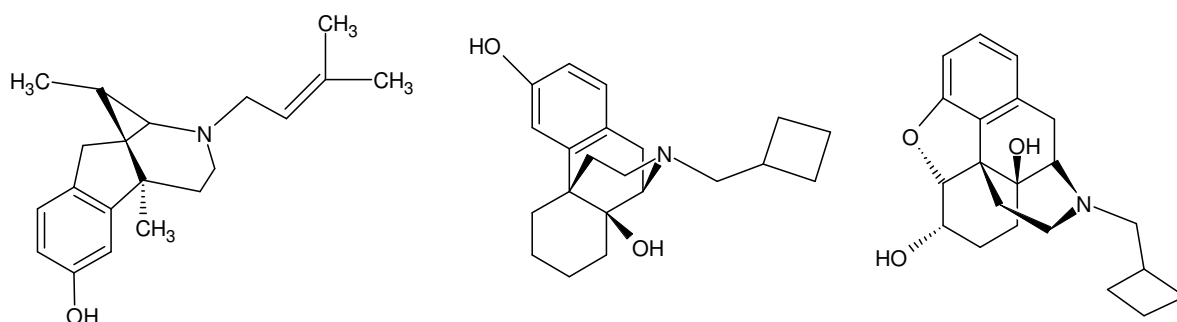
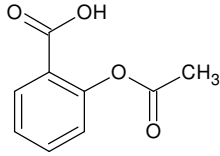
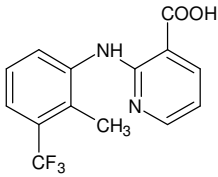
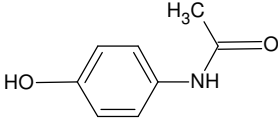
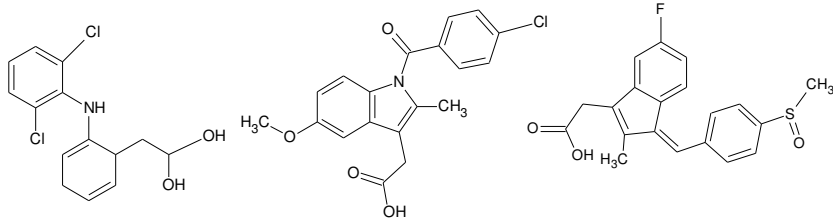
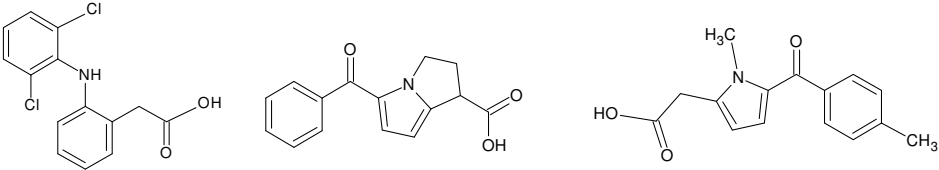
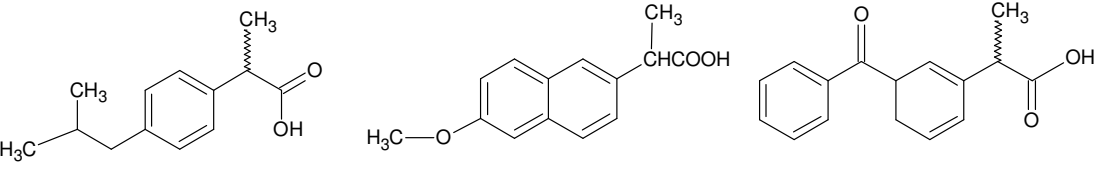
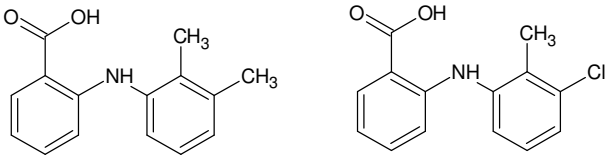


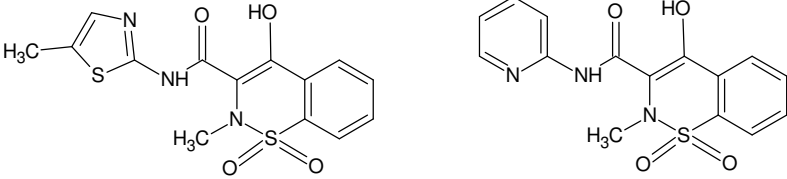
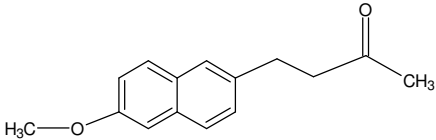
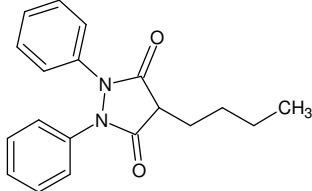
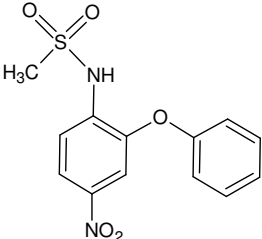
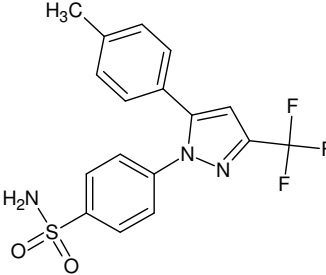
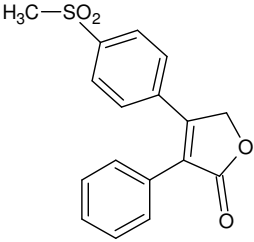
Fig. 9 Estructura química de la pentazocina, butorfanol y nalbufina.

1.5.2 ANALGÉSICOS ANTIINFLAMATORIOS NO ESTEROIDEOS (AINEs).

Los AINEs son los medicamentos más extensamente prescritos en la medicina clínica, son sustancias heterogéneas de estructura química variada no esteroidea [91]. Este grupo de medicamento se indica en el tratamiento del dolor agudo y crónico, se caracterizan por compartir en diversos grados propiedades analgésicas, antiinflamatorias y antipiréticas [92, 93]. Tabla 4.

Tabla 4. Principales AINEs

Salicilatos: ácido acetilsalicílico	
Acidos aminoaminoácidos Meglumina de flunixin	
Paraaminofenoles: Acetaminofen	
Derivados indolacéticos: Etodolaco, Indometacina, Sulindaco	
Derivados heteroarilacéticos: Diclofenaco, Ketorolaco, Tolmetina	
Derivados del ácido propiónico: Ibuprofeno, Naproxeno, Ketoprofeno.	
Derivados del ácido antranílico: Ac. mefenámico, Ac. tolfenámico,	

Derivados enólicos Meloxicam, Piroxicam	
Grupo naftilcanonas: Nabumetona	
Derivados pirazolónicos: Fenilbutazona.	
Grupo sulfonamida: Nimesulida	
Antiinflamatorios inhibidores de la COX-2 (Coxibs): Celecoxib, Rofecoxib.	
	

Continuación tabla 4. Principales AINEs.

1.5.3 FARMACOS ADYUVANTES.

Como previamente se menciona este tipo de fármacos potencian los efectos de los fármacos analgésicos en general y son útiles en el tratamiento sintomático de ciertos síndromes dolorosos.

Anticonvulsivantes. Representados por algunas benzodiazepinas (clonazepam, carbamacepina, vasíproato sódico y la difenilhidantoina), están indicados en dolores lancinantes de origen neuropático [92].

Antidepresivos. Los antidepresivos tricíclicos han mostrado su eficacia en el tratamiento de dolores de origen oncológico, donde la depresión se asocia en un porcentaje importante de pacientes [93].

Neurolépticos. Las fenotiacinas y el haloperidol asociados a los opiáceos, además de neutralizar los efectos eméticos producidos por éstos, potencian sus efectos sedantes y, asociados a los antidepresivos, contribuyen al alivio del dolor neuropático [94].

Ansiolíticos. Las benzodiazepinas pueden ser eficaces en el tratamiento del dolor agudo por espasmo muscular, y como coadyuvantes en los cuadros dolorosos con gran componente de ansiedad y en tratamientos de corta duración. Su uso crónico puede generar dependencia física y psíquica [95].

Corticoesteroides. Por sus efectos antiinflamatorios son eficaces en el dolor asociado a metástasis óseas, cefaleas por aumento de la presión intracraneal, compresión nerviosa, hepatomegalias; por sus efectos euforizantes son útiles en enfermos cancerosos en fase terminal [92].

Otros fármacos ocasionalmente útiles en analgesia son los psicoestimulantes, bloqueantes de receptores adrenérgicos, anticolinérgicos, calcitonina (en dolor óseo metastásico), etc.

Otras alternativas terapéuticas para el tratamiento del dolor son las plantas. Al respecto, cada población en el mundo posee un conocimiento heredado por sus antepasados en relación al uso de plantas con propiedades terapéuticas, las cuales tienen una importante aceptación en la población como una alternativa para resolver problemas de salud como el dolor.

Es así que el conjunto de conocimientos relativos a las propiedades curativas de las plantas, denominado como herbolaria, aún constituye el recurso más conocido y accesible para grandes núcleos de la población (OMS).

1.6 HERBOLARIA.

La herbolaria es una rama de la medicina tradicional que utiliza plantas o partes de ellas, ya sea en su forma natural o preparada de diversa manera con la intención de curar o aliviar diferentes síntomas o enfermedades. Las plantas medicinales contienen compuestos bioquímicos que al entrar en contacto con el organismo humano son capaces de actuar en él produciendo un efecto terapéutico o pueden ser utilizados como materia prima para la producción de medicamentos. Se puede utilizar la planta en su totalidad, partes aéreas, flores o inflorescencias, hojas, tallos, frutos, semillas, etc [96].

La síntesis de medicamentos a partir de los principios activos de las plantas medicinales ha provocado un fuerte impulso en su estudio por parte de los grandes laboratorios farmacéuticos. Sin embargo, con el transcurso del tiempo y la experiencia adquirida se ha observado que en ciertos casos es mayor el número de complicaciones y efectos adversos de los medicamentos de síntesis, por ello ha comenzado a resurgir la utilización de medicamentos naturales [97].

El registro escrito más antiguo sobre plantas medicinales es el llamado “*Códice Badiano*” es el “*Libellus*” que fue escrito en Náhuatl en 1552 por Martín de la Cruz, de Tlatelolco, y traducido al latín por Juan Badiano. Esta obra contiene 185 ilustraciones en color de plantas medicinales y menciona el uso de 270 especies vegetales. Otra obra importante fue hecha por Maximino Martínez denominada “*Las Plantas Medicinales de México*”, publicada en 1934. Ésta constituye un catálogo de la clasificación botánica, descripción, hábitat y usos comunes de 300 plantas medicinales. Existen además algunas recopilaciones bibliográficas sobre la herbolaria medicinal de México, la publicada por el Dr. Xavier Lozoya en 1984 en su ensayo “*Bibliografía básica sobre la herbolaria medicinal de México*”. El “*Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana*”, publicada en 1991, consta de 3 volúmenes y representa la contribución más importante del Instituto Nacional Indigenista (INI). Esta obra proporciona monografías científicas de las plantas medicinales de mayor uso en la medicina tradicional mexicana [98]. En 2001 se escribe la primera Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos

Mexicanos, la cual describe las técnicas y métodos de análisis para la selección y preparación adecuada de los remedios herbolarios.

Por otro lado, de acuerdo a los datos difundidos por la Organización Mundial de la Salud (OMS), las plantas medicinales siguen siendo la principal fuente de medicación para el cuidado general de la salud de la mayoría de la población mundial (el 80%). Este fenómeno se refleja también en la medicina moderna actual, en la que se utilizan cerca de 121 entidades químicas de origen natural, derivadas todas de 95 plantas diferentes y de las cuales, aproximadamente el 60% son de origen tradicional latinoamericano. Se estima que el recientemente integrado mercado mundial de fitofármacos (basado en extractos de plantas medicinales de origen tradicional) asciende ya a unos 50 mil millones de dólares anuales, e incluye tanto a los países en vías de desarrollo como a las naciones más industrializadas. Todos estos parámetros justifican la aparición de un fenómeno mundial que ha sido interpretado como el “regreso” de la investigación científica al campo de las plantas medicinales.

El uso de la medicina tradicional es frecuente en países en vías de desarrollo y éste se incrementa rápidamente hacia países ya desarrollados, por esto en muchas partes del mundo los mercados políticos y profesionales de la salud han cuestionado acerca de la seguridad, eficacia y calidad de este tipo de alternativa médica. La OMS en el 2002 publicó una estrategia de mejora en la regulación de la medicina tradicional en donde pretende definir y desarrollar estrategias para garantizar la seguridad, eficacia y calidad en el uso de este tipo de medicina alternativa [99]. La OMS cuenta también con monografías y control de calidad de algunas plantas medicinales. (*Quality control methods for medicinal plant materials* y *WHO monographs on selected medicinal plants*). Esto ha hecho que la medicina tradicional usada en países en vías de desarrollo tenga un papel importante en difundir el uso de la medicina tradicional [100].

En México donde la búsqueda de nuevos principios activos, se encuentra aún en pleno desarrollo, cientos de plantas de reconocido uso popular ameritan ser investigadas. La bibliografía en relación al uso tradicional de estas plantas es extensa y plantea una serie de investigaciones. Viesca [101] plantea que el

estudio de la herbolaria puede hacerse desde dos perspectivas diferentes: una de ellas es por medio de la investigación farmacológica, y la otra es tratando de reintegrar las plantas medicinales al entorno cultural.

Actualmente se han registrado en México alrededor de 4000 especies con atributos medicinales (15% de la flora total), entre ellas se puede citar a la ilama (*A. diversifolia*).

1.6.1 LA ILAMA “*Annona diversifolia* Saff.”

La identificación de la ilama o *A. diversifolia* fue realizada en México por Francisco Hernández hacia finales del siglo XVI; junto con otra serie de anonas [102], sin embargo, fue hasta 1911 cuando el taxónomo W. E. Safford la describió botánicamente. Safford la llamo entonces *Annona diversifolia* Saff., y dejó con esto información concerniente a su hábitat, cultivo y a las características de su fruto y estructura en general [103]. Estos datos fueron publicados en la revista de la Academia de Ciencias de Washington el 4 de Marzo de 1912 [104].

Se estima que hay 2 200 especies de Anonáceas en el mundo. La ilama (*A. diversifolia*) pertenece a ésta familia [105], es nativa de América Central y del Oeste y Suroeste de México. Se encuentra en forma silvestre en las laderas de las montañas, especialmente en el pie de monte de las Cordilleras Costeras de México, Guatemala y El Salvador. Es conocida también como: “ilama zapote” o “zapote de vieja”, mientras que del Istmo de Tehuantepec a Centroamérica se le conoce como “papauce” o “annona blanca” [102, 106, 107, 108]. Se ha introducido recientemente a Florida y California (E.U.), Colombia, Filipinas y otros países de Centroamérica y el Caribe. Se adapta a diversas regiones tropicales y subtropicales del mundo. Existe una diversidad de tipos acorde a diferentes condiciones de clima y suelo [109].

La *A. diversifolia* o ilama (Fig. 10) es una planta que pertenece a la familia de las Anonáceas, siendo conocida también como “papauce” en el estado de México. Es un árbol pequeño con altura de 7.5 m [102] hasta 15 m [106], es delgado y su tronco mide de 25 cm [104] hasta 45 cm de grosor [106], su corteza es grisácea

oscura y aromática, surcada longitudinalmente. Posee frutos de pulpa rosada y blanca. Es la especie que produce el fruto más fino y exquisito por su sabor.



Fig. 10 Árbol y fruto de la *A. diversifolia*.

Las hojas son ampliamente elípticas a oblongas, redondeadas en el ápice, delgadas y lisas por arriba y glaucas por debajo, mientras que sus flores son solitarias de color marrón o amarillo-verdoso teñidas de color rojo y de 2.5 cm de longitud [108]. El fruto es ovoide-globoso con protuberancias cortas, sus superficie es áspera (rugosa) y el color varía de verde pálido a rosa magenta. El fruto, de unos 12 cm de largo, la pulpa es aromática, blanca o rosada, es comestible, posee un sabor dulce ligeramente ácido y puede contener hasta 60 semillas grandes de color ocre por fruto [108]. Los frutos son muy resistentes, o tal vez completamente inmunes a los ataques del insecto perforador de las semillas [110].

Los frutales de la familia Annonaceae son catalogados dentro de las frutas más deliciosas de América; son de gran aceptación en el mercado y ricas en vitaminas y minerales [111]. Las especies de *Annona* comúnmente cultivadas por sus frutos comestibles son: guanábana (*A. muricata* L), Saramuyo (*A. esquamosa* L) y annona colorada (*A. reticulata* L) en tierras bajas tropicales y Chirimoya (*A. cherimola* Mill) a altitudes superiores en los trópicos y subtrópicos. Dentro de estas especies de mayor importancia en el género están la guanábana y la chirimoya

por las divisas que aportan tanto a los productos como al país. Sin embargo la annona es considerada como uno de los frutos de mayor calidad dentro del género por su agradable sabor y su atractivo color de pulpa [112].

Botánicamente la ilama se clasifica de la siguiente manera [113, 114, 115]:

Reino:	Vegetal	Subreino:	Embroyphyta
División:	Espermatophyta	Subdivisión:	Angiospermae
Clase:	Dicotiledoneae	Orden:	Ranales
Suborden:	Magnolineaes	Familia:	Annonaceae
Género:	Annona	Especie:	diversifolia Saff

El nombre de la familia Annonaceae es derivado del latín y significa “la cosecha anual” [116]. Las características físicas de la fruta madura de *A. diversifolia*, son [117]:

Nombre vulgar	Peso (g)	Tamaño (cm)	Cáscara (%)	Pulpa (%)	Semilla (%)
Papauce blanco	570	11.1x10.2	13	75	12
Papauce rosado	520	10.2 x 9.9	14	73	13

En cuanto a las características del comportamiento fenológico y de los componentes del fruto de la ilama en México [102, 108]:

Época de floración:	Febrero-Abril
Época de cosecha:	Septiembre-October [118]
Diámetro del fruto:	13 cm
Número de semillas:	68
Días para la germinación de las semillas:	40-45
Edad para transplante de semillero a vivero después de la germinación:	50-60 días

La *A. diversifolia* es usada en la medicina tradicional de México y países en colindancia, Guatemala y Belice, para curar diversos padecimientos, tales como: antidiarreico (el fruto verde), anticatarral (las hojas tiernas), para tratar luxaciones (la corteza asada) y como antiépiléptico, analgésico y antiinflamatorio (las hojas) [119]. A diferencia de otras especies como *A. muricata* y *A. cherimolia*, hasta 1997 no existían reportes científicos que demostraran las propiedades farmacológicas de esta especie (Fig. 11). A partir de 1997 se iniciaron las investigaciones sobre los efectos anticonvulsivos de *A. diversifolia* [120, 121, 122]. Sin embargo, hasta el momento no se habían realizado estudios que corroboren sus propiedades como analgésico y/o anti-inflamatorio.

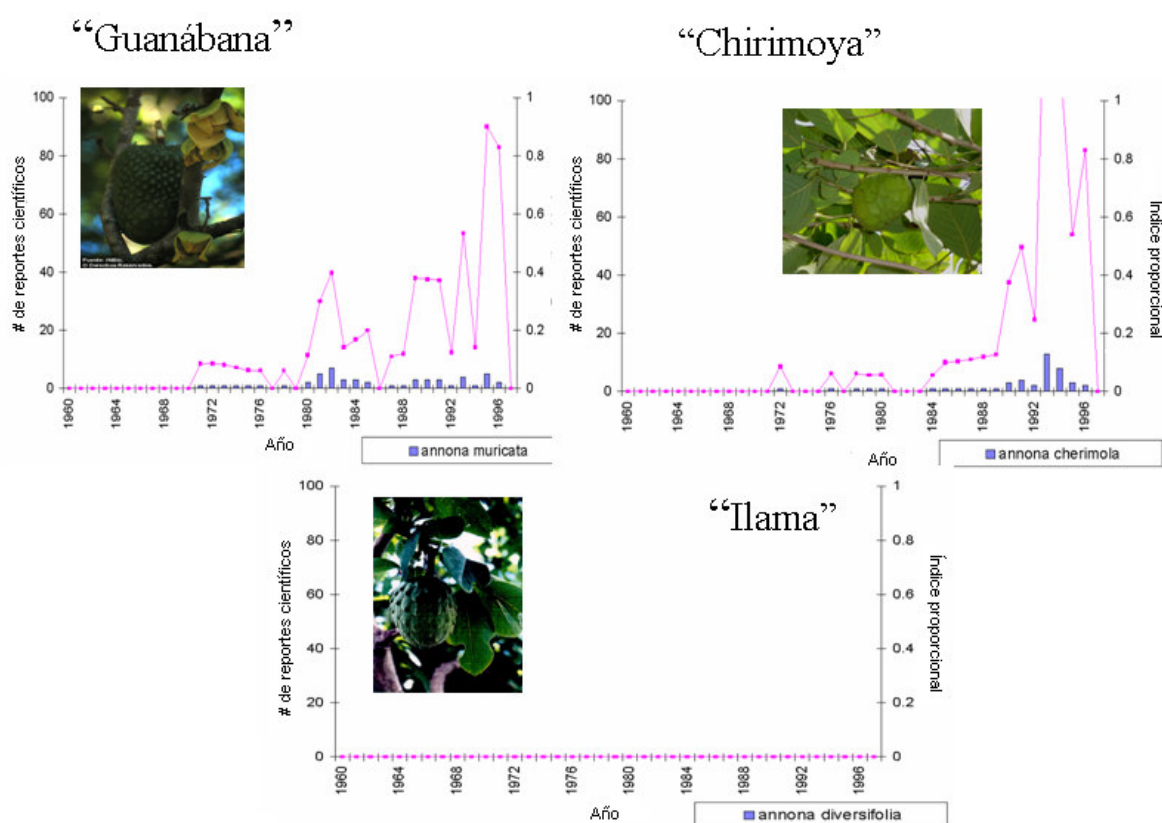


Fig.11 Proporción de reportes científicos de las Annonas publicados de 1960 a 1996.

Los reportes científicos de las annonas (Fig. 11) son esencialmente referentes a sus propiedades como agentes pesticidas, antiparasitarios y antibacterianos [119, 123-126]. Otras propiedades de las annonas es como citotóxicas, esto debido a la

gran cantidad de acetogeninas presentes en dichas plantas [127, 128]. De la *A. diversifolia* hasta el momento no se ha realizado estudios fitoquímicos. Sin embargo, existe la posibilidad de que componentes encontrados en otras especies del mismo género se han compartidos en esta especie.

La *A. squamosa* es una de las más exploradas en cuanto a fotoquímica, de la cual se mencionan componentes como: acetogeninas, alcaloides, flavonoides, aceites esenciales, saponinas, taninos, entre otros, [129-132]. Pero pocos estudios describen sus propiedades farmacológicas [133].

De las hojas de *A. squamosa* se reportan la presencia de: aminoácidos (β -fenilalanina, arginina, metionina, prolina); carbohidratos (2-carboxiarabinitol, xilosa); alcanol (1-octacosanol, 1-triacontano, 1-traconsanol); aceite esencial 7,0-0,28 % (monoterpenos: α -terpineol 0,09 %; timol) y flavonoides (quercetina) [129-131, 134-138]. También se ha reportado la presencia de alcaloides y leucoantocianinas; así como de ácido cianhídrico, quinonas [123], saponinas y taninos en toda la planta [133]. Varios estudios informan la presencia de acetogeninas en las hojas de *A. muricata* con propiedades citotóxicas [139], al igual que la presencia de alcaloides y diterpenos del tipo kaurano [140].

1.6.1.1 PRINCIPALES COMPONENTES BIOACTIVOS PRESENTES EN LAS ANNONACEAS

Las características de los componentes más comunes reportados para la familia Annonaceae se mencionan a continuación (en la Fig. 12 se muestran las estructuras representativas de los principales metabolitos encontrados en las annonas):

Las **acetogeninas** son una serie de C-35/C-37 productos naturales de policétidos derivados de ácidos grasos. Su estructura es caracterizada por una larga cadena de alquilo que porta una γ -lactona en el metilo terminal insaturado (algunas veces cambia a un propano γ -lactona), uno o dos anillos de tetrahydrofurano, sustituyentes oxigenados hidroxilo, cetona y en algunos casos un doble enlace y/o

un grupo epoxi. Hasta ahora, estas acetogeninas solo han sido aisladas de las Annonaceas [141].

A estos compuestos se les han atribuido propiedades como fungicidas, bactericidas, antihelmínticos, antivirales e insecticidas. . Además de sus efectos como antiparasitarios y antitumorales, las acetogeninas son importantes por la baja tasa de resistencia que podrían generar los insectos frente a ellas [142]. Su acción esta basada en su capacidad para inhibir con cierta especificidad el complejo I de la respiración mitocondrial [142]. Otros componentes de gran importancia farmacológica son los alcaloides, flavonoides, taninos, terpenoides y saponinas, de los cuales ya han sido aislados e identificados algunos en diferentes especies de annonas. Ver apéndice A y B.

Los **alcaloides** son metabolitos secundarios nitrogenados, generalmente de carácter básico y fisiológicamente activos. La mayoría de estos compuestos son biosintetizados a partir de aminoácidos. En las plantas, los alcaloides pueden existir en estado libre, o bajo la forma de sales. La mayoría de los alcaloides son cristalizables, algunos son líquidos a temperatura ambiente y son volátiles por lo que los hace destilables. Presentan notables propiedades fisiológicas y toxicológicas, que se ejercen fundamentalmente sobre el SNC, como depresores o estimulantes. Por estas razones pueden ser usados como fármacos [98]. El uso prolongado de alguno de estos de estos compuestos produce en el hombre acostumbamiento, que constituyen verdaderas toxicomanías, con dependencia física y psíquica y un aumento de la tolerancia [141].

Los **flavonoides** son pigmentos casi universales en los vegetales. Casi siempre hidrosolubles, son responsables de la coloración de las flores, frutos y a veces de las hojas, con la finalidad de proteger a los tejidos contra los efectos nocivos de las radiaciones ultravioletas. Se ubican principalmente en las hojas y en el exterior de las plantas. Estos compuestos poseen en su estructura química un número variable de grupos hidroxilo fenólicos y excelentes propiedades de quelación del hierro y otros metales de transición, lo que les confiere una gran capacidad antioxidante. Por ello, desempeñan un papel esencial en la protección frente a los fenómenos de daño oxidativo, lo que les confiere propiedades terapéuticas [143]

como vasculoprotectores y venotónicos. También en pruebas *in Vitro*, se han utilizado como antiinflamatorios, antialérgicos, hepatoprotectores, antiespasmódicos, hipocolesterolemiantes, diuréticos, antibacterianos, antivirales, etc [141].

Los **taninos** son polímeros polifenólicos producidos en las plantas como compuestos secundarios, son hidrosolubles y presentan la propiedad de formar complejos con proteínas, polisacáridos, ácidos nucleicos, esteroides, alcaloides y saponinas [144]. Se disuelven en agua formando disoluciones coloidales, pero su solubilidad varía según el grado de polimerización. En los vegetales superiores se distinguen, generalmente, dos grupos diferentes de taninos tanto por su estructura como por su origen biogénico: taninos hidrolizables y taninos condensados.

Poseen actividad terapéutica debido a la astringencia, efecto vasoconstrictor, regeneración de tejidos en caso de heridas superficiales o quemaduras, antidiarreico, antiséptico, antibacteriano y antifúngico, antioxidante, inhibidor enzimático, entre otros [141].

Los **terpenos** son productos obtenidos mediante la destilación y evaporación de los aceites esenciales. Existe un gran número de aplicaciones para este producto como son: solventes industriales, saborizantes, diluyentes, componentes aromáticos y como síntesis de otros valiosos compuestos químicos [141].

Con el nombre de terpenos se conoce a un grupo importante de componentes vegetales que tienen un origen biosintético común. Todos, aunque con estructuras químicas muy distintas, proceden de la condensación, en número variable, de unidades isoprenicas [98, 141].

Desde el punto de vista farmacéutico, los grupos de principios activos de naturaleza terpénica más interesantes son: monoterpenos y sesquiterpenos, derivados de monoterpenos correspondientes a los iridoides, lactonas sesquiterpénicas que forman parte de los principios amargos, algunos diterpenos que poseen actividades farmacológicas de aplicación a la terapéutica y por último, triterpenos y esteroides entre los que se encuentran las saponinas y los heterósidos cardiotónicos [145, 146].

Los **aceites esenciales** son mezclas complejas, normalmente líquidas, que presentan una característica: su volatilidad, por tanto son extraíbles en corriente de vapor de agua. En general son los responsables del olor de las plantas. Se definen como: “productos obtenidos a partir de una materia prima vegetal, bien por arrastre con vapor, bien por procedimientos mecánicos a partir del epicarpio de los *Citrus*, o bien por destilación seca”. Químicamente están formados principalmente por terpenos, monoterpenos y sesquiterpenos (hidrocarburos, alcoholes, cetonas, etc. que pueden ser acíclicos, monocíclicos, bicíclicos, tricíclicos...), en ocasiones llevan también derivados del fenilpropano y, raramente cumarinas [147]. Poseen ciertas propiedades farmacológicas: poder antiséptico, propiedades espasmolíticas, sedantes e irritantes [141].

Las **saponinas** poseen propiedades tensoactivas, pues al disolverse en agua y por agitación forman espuma persistente, tienen propiedades detergentes. Muchas de ellas tienen además propiedades hemolíticas debido a que alteran la permeabilidad de las membranas biológicas resultando tóxicas para animales de sangre fría. Por esta razón, algunas plantas que contienen estos principios activos, han sido empleadas desde la antigüedad en el arte de la pesca. Sin embargo no todos los saponósidos cumplen estas características [141, 148].

Estos compuestos tienen interés farmacéutico a dos niveles. Por un lado, debido a su actividad farmacológica, pueden ser de aplicación directa a la terapéutica, ya que poseen actividad antibiótica, citotóxica, antitumoral, antiinflamatorias y antiedematosas [141]. O bien pueden ser utilizados indirectamente como precursores para la obtención de fármacos por semisíntesis química (como ocurre en el caso de los saponósidos esteroídicos de diversas especies del género *Dioscorea* utilizados para la obtención de anticonceptivos orales), o bien pueden ser empleados como herramientas farmacotécnicas debido principalmente a sus propiedades físicas (tensoactividad) [148, 149].

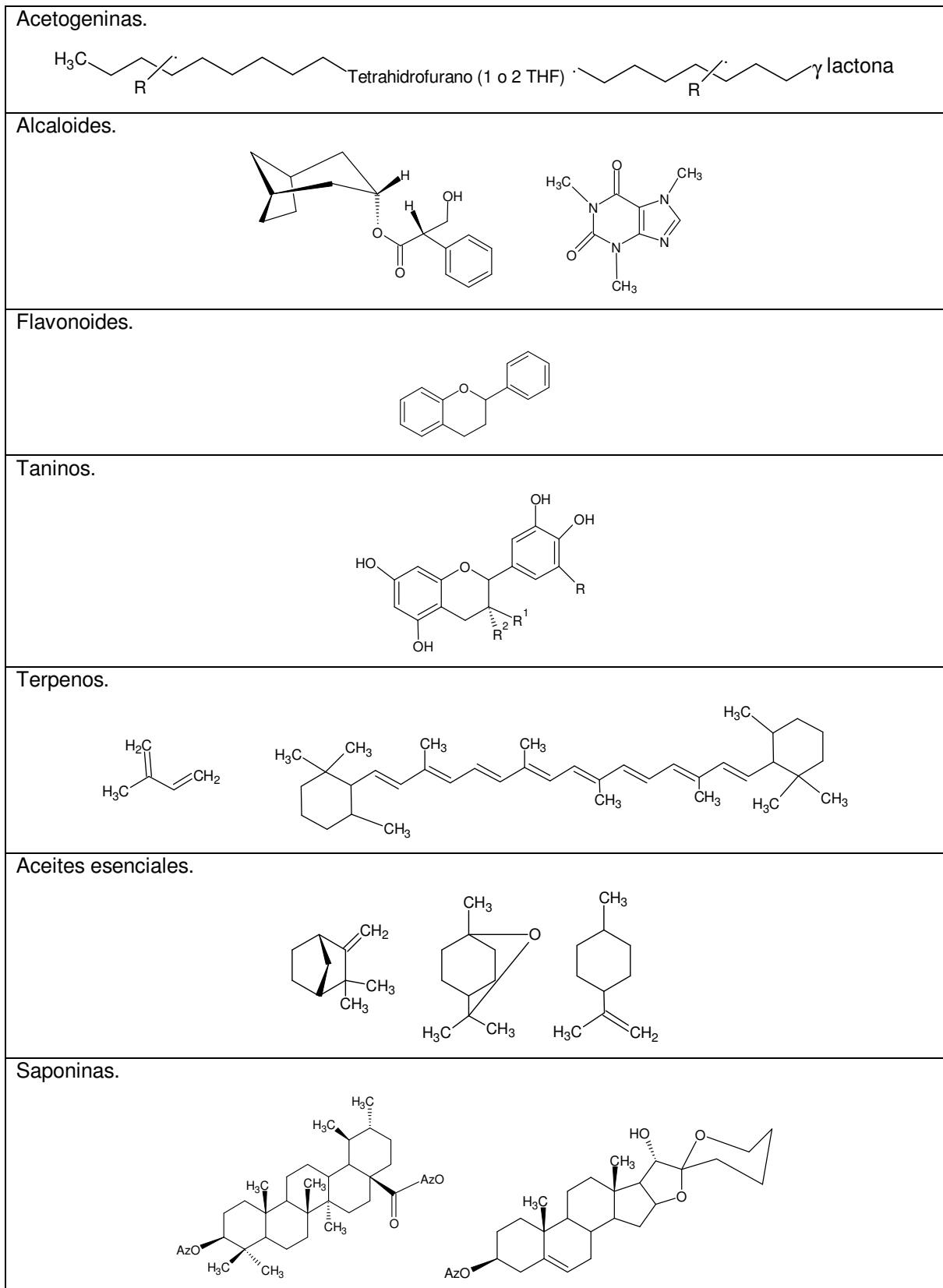


Fig. 12 Estructuras químicas de los principales metabolitos secundarios aislados en las plantas medicinales

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Actualmente, a nivel mundial y según información de la IASP, el dolor se considera una epidemia invisible y un grave problema de salud pública, ya que un importante porcentaje de la población presenta algún tipo de dolor. Es así que existe una imperante necesidad en su tratamiento y/o alivio, el cual se puede lograr mediante diferentes estrategias, la más común y efectiva es la administración de analgésicos.

De acuerdo a los datos difundidos por la OMS, las plantas medicinales siguen siendo la principal fuente de medicación para el cuidado general de la salud de la mayoría de la población mundial (el 80%). Este fenómeno se refleja también en la medicina moderna actual, en la que se utilizan cerca de 121 entidades químicas de origen natural, derivadas todas de 95 plantas diferentes y de las cuales, aproximadamente el 60% son de origen tradicional latinoamericano. Se estima que el recientemente integrado mercado mundial de fitofármacos (basado en extractos de plantas medicinales de origen tradicional) asciende ya a unos 50 mil millones de dólares anuales, e incluye tanto a los países en vías de desarrollo como a las naciones más industrializadas. Todos estos parámetros justifican la aparición de un fenómeno mundial que ha sido interpretado como el “regreso” de la investigación científica al campo de las plantas medicinales.

En nuestro país existen varias especies utilizadas en medicina popular para el tratamiento del dolor, entre ellas se puede citar a la ilama (*A. diversifolia* Saff.) es una especie cuya infusión de hojas o la maceración en etanol se utiliza en la medicina tradicional como analgésico y anti-inflamatorio para tratar tipos de dolor gástrico y artrítico, principalmente se hace mención para la artritis gotosa. En el presente trabajo de tesis se propone comprobar que *A. diversifolia* Saff., posee actividad analgésica, de manera que se compruebe que el uso que se le da en la medicina tradicional es adecuado determinando las dosis a las cuales se presenta dicha actividad en dos modelos experimentales: uno de dolor visceral y el otro de dolor tipo gotoso, así como determinar su efecto letal (DL_{50}) para que de esta manera se establezca el margen de seguridad de sus efectos.

3. HIPÓTESIS.

Las hojas de *A. diversifolia* Saff. (ilama) se usan en la medicina tradicional para el alivio del dolor, por tanto se espera que el extracto etanólico de las mismas produzca efecto antinociceptivo dosis-dependiente en modelos experimentales de dolor.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL.

⇒ Evaluar el efecto antinociceptivo del extracto etanólico de las hojas de *Annona diversifolia* Saff. en dos diferentes modelos experimentales de dolor en roedores.

4.2 OBJETIVOS PARTICULARES.

- Preparar extractos crudos hexánico y etanólico de las hojas de *A. diversifolia* Saff.
- Evaluar el efecto antinociceptivo de los extractos crudos para seleccionar el más activo utilizando los modelos experimentales de dolor de estiramiento abdominal y PIFIR.
- Realizar el fraccionamiento biodirigido del o los extracto(s) activo(s) utilizando mezclas de disolventes.
- Identificar y agrupar fracciones comunes mediante cromatografía en capa fina.
- Determinar la dosis efectiva 50 (DE₅₀) del extracto activo de *A. diversifolia* Saff.
- Determinar la dosis letal 50 (DL₅₀) del extracto etanólico de *A. diversifolia* Saff. y de tramadol.

5. METODOLOGÍA

5.1 MATERIAL.

5.1.1 EQUIPO.

- Evaporador rotatorio (Büchi RE 111)
- Balanza analítica (Sartorius BL 2105)
- Balanza para el pesado de animales (Ohaus triple beam 700/800 series)
- Cronómetros (Diagger)
- Cajas de acrílico (20 x 30 x 15 cm)
- Cajas de acrílico (22 x 40 x 20 cm)
- Jeringas y agujas de diferentes calibres (Terumo)
- Sondas metálicas
- Columna cromatográfica de 80 x 3 cm (Kimax)
- Frascos viales (Wheaton)

5.1.2 REACTIVOS.

- Extracto etanólico de las hojas de *A. diversifolia*.
- Tramadol (Tradol®)
- Ácido acético (J.T. Baker)
- Ácido úrico (Sigma)
- Cloruro de Sodio (Merck)
- Tween 80 (Sigma)
- Etanol (J.T. Baker)
- Gel sílice (Merck)
- Acetona (J.T. Baker)
- Metanol (J.T. Baker)
- Hexano (J.T. Baker)

5.1.3 MATERIAL BIOLÓGICO.

Ratones hembra Taconic (SW) de 25-30 g y ratas machos Wistar y de 180 a 200 g de peso corporal, mantenidos a temperatura controlada de $25^{\circ} \pm 2^{\circ}$ C con ciclo de luz/oscuridad de 12 horas y libre acceso al alimento y al agua (*ad libitum*). Cuando fue necesario retirar el alimento esto se realizó al menos 12 h antes de los experimentos. Todo el protocolo experimental siguió las recomendaciones de la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio), del “Comité de Investigación y Ética de la Asociación Internacional para el Estudio del Dolor” (publicadas en: Pain 9, 1980) y de los Lineamientos y Estándares Éticos para la Investigación del Dolor Experimental en Animales, así como del Comité de Bioética del Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz.

5.1.4 MATERIAL VEGETAL.

Las partes aéreas de *A. diversifolia*, se colectaron en la región de Tejupilco, Edo. de México en Septiembre del 2006. La identificación de la planta se realizó por botánicos de la Universidad Autónoma Chapingo. El número de identificación del espécimen (AN9702) se encuentra en el Herbario de Plantas Útiles Efraím Hernández de dicha universidad.

5.2 METODOLOGÍA.

5.2.1 OBTENCIÓN DEL EXTRACTO

Las partes aéreas de *A. diversifolia*, secas y molidas (1.5 kg) se colocaron en maceración a temperatura ambiente con 2 L de hexano por 3 veces consecutivas y posteriormente el residuo se maceró con etanol absoluto 3 veces consecutivas. Los respectivos extractos se filtraron por gravedad para posteriormente ser concentrados en un evaporador rotatorio hasta la eliminación

del disolvente. El rendimiento de extracto hexánico y etanólico crudos fue de 42g (2.8%) y 89g (5.9%) respectivamente.

5.2.2 FRACCIONAMIENTO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE *A. diversifolia*.

El fraccionamiento del extracto crudo etanólico (30g) se realizó mediante la aplicación de percolación con 2L de hexano, acetona y metanol respectivamente. Esto con la finalidad de separar los componentes menos polares (fracción hexano 11.7%) de los medianamente polares (fracción acetona 19.8%) y de los más polares (fracción metanol 34.4%), además de residuos sólidos insolubles 5.43%.

5.2.3 CROMATOGRAFÍA EN COLUMNA PARA LA SEPARACIÓN DE SUB-FRACCIONES ACTIVAS OBTENIDAS DE LA FRACCIÓN ACETONA DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE *A. diversifolia*.

Se preparó una columna cromatográfica para las fracciones de hexano (1g) y acetona (5g). Para la fracción hexánica se requirió de 100 ml de volumen muerto de disolvente (hexano), 30g de gel sílice. Se obtuvieron 18 sub-fracciones de la fracción hexánica. Para la columna de la fracción de acetona se requirió de 100 mL de volumen muerto de disolvente (hexano) y 36g de gel sílice. Se recolectaron 24 sub-fracciones de la fracción de Acetona. (Tablas 5 y 6)

Tabla 5. Rendimiento obtenido de las sub-fracciones de la fracción de hexano.

FRACCIÓN	CANTIDAD OBTENIDA (mg)	RENDIMIENTO (%)	FRACCIÓN	CANTIDAD OBTENIDA (mg)	RENDIMIENTO (%)
1-32	1.0	0.1	59-60	507.4	50.6
33	15.6	1.56	61-66	74.1	7.4
34	0.1	0.86	67-72	18.3	1.83
35-38	190.2	19	73-78	11.1	1.1
39-44	145.2	14.5	79-83	1.8	0.18
45-48	53.2	5.31	84	2.8	0.3
49-52	39.7	4	85	128.1	12.8
53-56	25.8	2.6	86-90	11.0	1.1
57-58	12.7	1.3	91-95	5.6	0.56

Tabla 6. Rendimiento obtenido de las sub-fracciones de la fracción de acetona.

FRACCIÓN	CANTIDAD OBTENIDA (mg)	RENDIMIENTO (%)	FRACCIÓN	CANTIDAD OBTENIDA (mg)	RENDIMIENTO (%)
1-4	7.9	0.16	117-118	610.2	12.0
5-16	19.1	0.37	119-120	215.5	4.22
17-19	1.6	0.31	121-122	120.4	2.36
20-27	18.1	0.36	123-136	491.8	9.65
28-31	8.1	0.16	137-141	26.2	0.51
32-37	5.6	0.71	142-151	113.4	2.22
38-45	28.2	0.55	152-192	270.1	5.28
46-53	54.0	1.06	193-214	1420.5	27.9
59-64	32.3	0.63	215-260	288.3	5.65
65-79	38.4	0.75	261-270	23.9	0.47
80-94	18.9	0.37	271-277	476.7	9.35
95-116	9.9	0.19	278-304	68.2	1.34

5.2.4 PREPARACIÓN DEL EXTRACTO Y LOS FÁRMACOS.

Las sustancias administradas se suspendieron en el vehículo que consistió en tween 80 al 0.5% en solución salina (s.s.) o s.s. sola. El extracto crudo se resuspendió en el vehículo para su administración por vía intraperitoneal (i.p). El fármaco de prueba: tramadol (Grünenthal de México, S.A. de C.V.) se preparó a partir de una solución de 100 mg/mL diluido con s.s. y se administró por vía i.p. Las soluciones se administraron siempre de reciente preparación y se administraron en un volumen de 0.1 mL/10g para ratón y de 0.1 mL/100g para rata.

5.2.5 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTINOCICEPTIVA.

Para la evaluación del efecto antinociceptivo se utilizaron dos modelos experimentales: el estiramiento abdominal inducido por ácido acético en ratones, y el modelo PIFIR en ratas. En todos los experimentos se utilizaron grupos de 6 ratones o ratas, respectivamente.

5.2.5.1 GRUPOS EXPERIMENTALES.

En el caso de los ratones, los grupos control recibieron el vehículo o s.s. sola, mientras que los grupos tratamiento recibieron la administración de los extractos crudos de *A. diversifolia*. Primero se hizo una comparación de la dosis de 100 mg/kg para seleccionar el más activo, posteriormente el etanólico que produjo mayor efecto se evaluó en dosis de 3, 30, 100 y 300 mg/Kg i.p. y se comparó con el efecto de tramadol en dosis de 3, 10, 17.8 y 30 mg/Kg i.p. El extracto etanólico se fraccionó y las fracciones de hexano, acetona y metanol obtenidas se probaron en la dosis de 100 mg/kg i.p. La fracción de hexano y acetona fueron las que presentaron mayor actividad, por tanto se fraccionaron nuevamente y las subfracciones obtenidas se probaron a la dosis equivalente a su correspondiente contenido en cada fracción.

La DL₅₀ vía i.p. para el extracto etanólico (activo) y el extracto hexánico (no activo) de *A. diversifolia*; así como para el tramadol se determinó en ratones por el método de Lorke [150].

En el caso de las ratas, los grupos control recibieron el vehículo o s.s, mientras que los grupos tratamiento recibieron la administración de los extractos crudos de *A. diversifolia* Saff. en la dosis de 100 mg/kg, tanto vía i.p. como p.o. El extracto etanólico, que mostró la misma eficacia por vía i.p. y p.o., se evaluó en dosis de 3, 30, 100, 300 y 600 mg/Kg p.o. Esta vía se eligió porque reduce la presencia de efectos adversos. El efecto antinociceptivo del extracto se comparó con ASA (31.62, 56.23, 100, 177.82, 316.23, 562.32 mg/kg p.o.) o tramadol (1, 5, 10, 17.78 y 31.62 mg/kg i.p.). Las fracciones del extracto etanólico: hexano, acetona y metanol se evaluaron en dosis de 300 mg/kg p.o.

5.2.5.2 MODELO DE ESTIRAMIENTO ABDOMINAL INDUCIDO POR ÁCIDO ACÉTICO "Writhing".

La nocicepción se indujo por la inyección i.p. de ácido acético al 1% en un volumen de 0.1ml/10g. Los parámetros que se registraron fueron la latencia al primer estiramiento abdominal y la frecuencia de estiramientos abdominales

realizados cada 5 minutos durante 20 minutos. El aumento en la latencia y una reducción en el número de estiramientos fueron indicativos de antinocicepción.

5.2.5.3 MODELO PIFIR.

Para este modelo, las ratas se anestesiaron con éter inhalado y la nocicepción se indujo por la administración i. Art. (pata posterior derecha) de una inyección de 50 μ L de ácido úrico al 20% (fig. 13). Éste se preparó agregando 2.0 g de ácido úrico con 10 ml de aceite mineral en un mortero mezclando hasta obtener una composición homogénea a temperatura ambiente. La inyección intraarticular se realizó a través de un ligamento patelar usando una jeringa de 1 ml y con una aguja No. 24 de 5 mm. Inmediatamente, un electrodo se colocó en cada planta de ambas patas traseras.

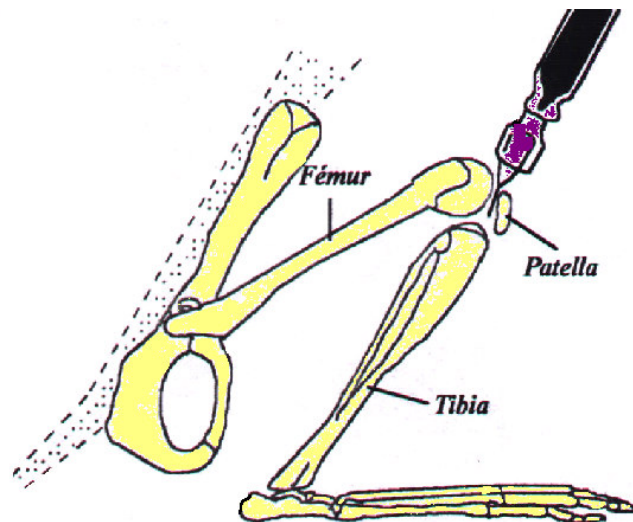


Fig. 13 Sitio de la administración intraarticular (i.art.) de la suspensión de ácido úrico en la extremidad posterior derecha de la ratona para producir nocicepción en el modelo PIFIR.

Después de la recuperación completa de la anestesia, los animales se colocaron en cilindros rotatorios de acero inoxidable de 30 cm de diámetro. Los cilindros rotan a 4 rpm forzando a las ratas a caminar. La medida variable fue el tiempo de contacto entre cada una de las patas traseras del animal y el cilindro. Cada vez que el electrodo colocado en la pata trasera del animal realiza contacto

con el piso del cilindro un circuito cerrado registra el tiempo de contacto de la pata lesionada con respecto a la no lesionada en una computadora (Apple II plus, con tarjeta convertidora AD/DA "Mountain") (fig. 14).

Posteriormente, con estos datos se obtienen los índices de funcionalidad en porcentaje con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ I.F.} = (\text{TCPD} / \text{TCPI}) (100)$$

En donde:

% I.F. = porcentaje de índice de funcionalidad.

TCPD = tiempo de contacto de la pata derecha (con ácido úrico), y

TCPI = tiempo de contacto de la pata izquierda (sin ácido úrico)

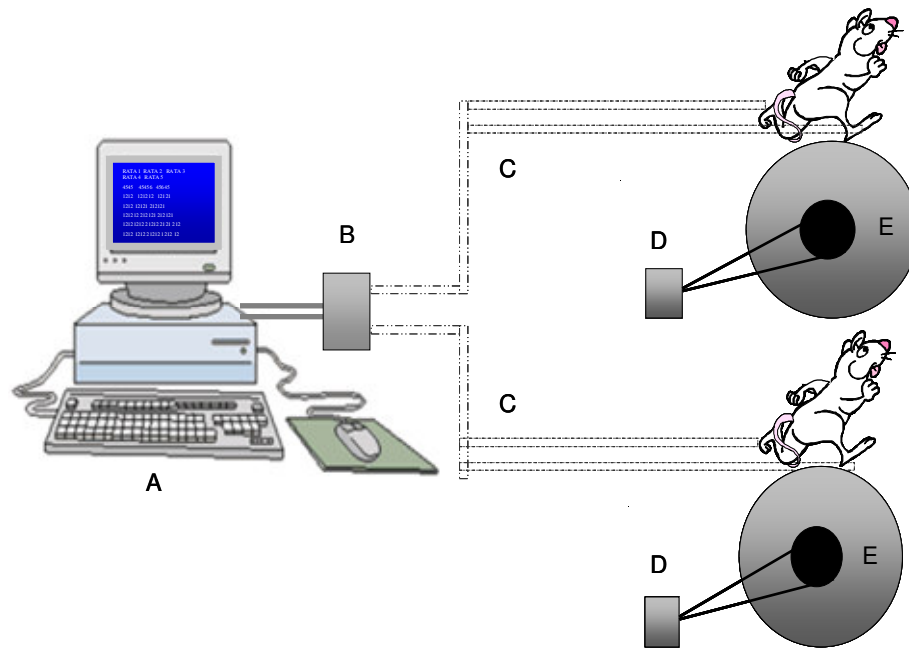


Fig. 14 Esquema del sistema de registro del tiempo de contacto de las extremidades traseras de la rata, en donde: A es el dispositivo contador de tiempo, B es la caja con switch de dos posiciones, C son los electrodos, D es el motor que mueve a los tambores y E son los tambores o cilindros de acero inoxidable.

Cuando la rata muestra el 0% de funcionalidad, se administra el tratamiento correspondiente y se evalúa su recuperación durante 4 horas, registrando en intervalos de 15 min la primera hora y posteriormente cada 30 minutos el % I.F hasta el final del estudio.

5.2.6 EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD AGUDA (DL₅₀)

La dosis letal 50 (DL₅₀) se determinó utilizando la vía intraperitoneal siguiendo el método descrito por Lorke [150]. Este método consistió en administrar dosis crecientes del extracto etanólico de las hojas de *A. diversifolia* hasta encontrar la dosis a la cual se produce muerte en los ratones (toxicidad aguda). El método consta de dos etapas: en la etapa inicial se administraron dosis entre 100 y 1000 mg/Kg para determinar el rango de dosis en el cual se produce toxicidad aguda. Si en este primer rango de dosis no se observa toxicidad se continúa con la segunda etapa en la que se utilizó un rango de dosis mayor (1600 a 5000 mg/Kg). La tabla 7 muestra las dosis a utilizar para la determinación de la DL₅₀. En cada nivel de dosis se utilizaron 3 animales y la determinación se realizó durante 14 días en los que se registró el peso de cada ratón y al final se efectuó una revisión macroscópica de los órganos internos previa dislocación cervical.

La DL₅₀ se determinó calculando la media aritmética de las dosis en las cuales se produce el 0% y 100% de mortalidad. La DL₅₀ para los resultados que no coincidieron con los señalados en la tabla se calculó utilizando la media geométrica de las dosis de acuerdo a lo sugerido por Lorke [150].

TABLA 7. Determinación de la dosis letal 50 (DL₅₀)

DOSIS EVALUADAS EN LA PRIMERA ETAPA (mg/kg)						DOSIS EVALUADAS EN LA SEGUNDA ETAPA (mg/kg)		
10	100	140	200	600	1000	1600	2900	5000
Número de animales que murieron/ Número de animales usados.								

5.2.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Los datos se presentan como la media \pm error estándar de la media. Para determinar la diferencia entre los tratamientos, tanto para los datos obtenidos en el modelo del “writhing” como los obtenidos en el modelo PIFIR se calculó el área

bajo la curva (ABC) utilizando el método de los trapecios [151]. El análisis estadístico se realizó mediante análisis de la prueba de normalidad (Kolmogorov-Smirnov) y varianza (ANADEVA) seguido de la prueba t de Dunnett en la comparación contra el control para un nivel de significancia $P < 0.05$, utilizando el programa de computo Sigma Stat [152].

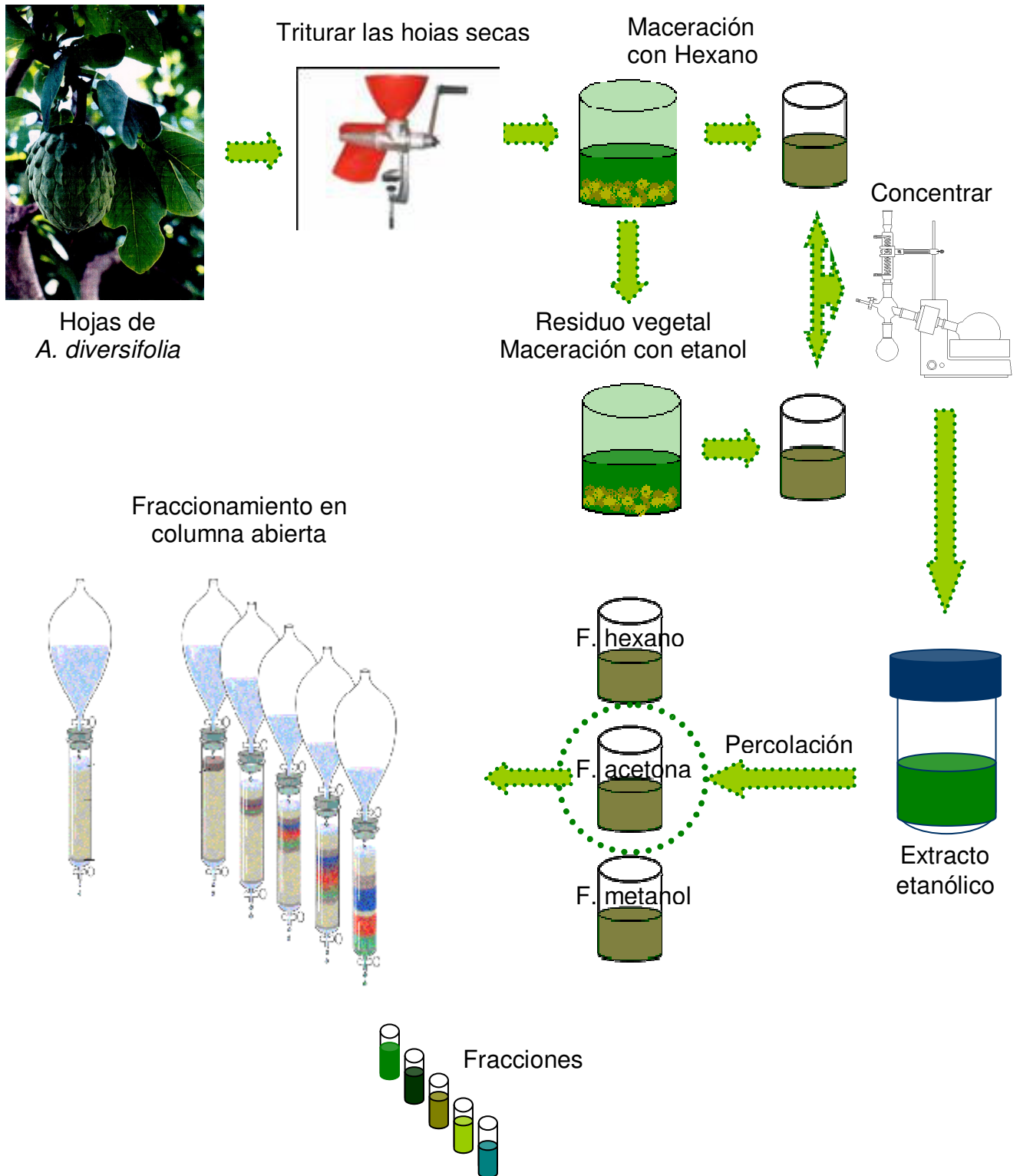


Figura 15. Preparación y fraccionamiento biodirigido de las hojas de *A. diversifolia*

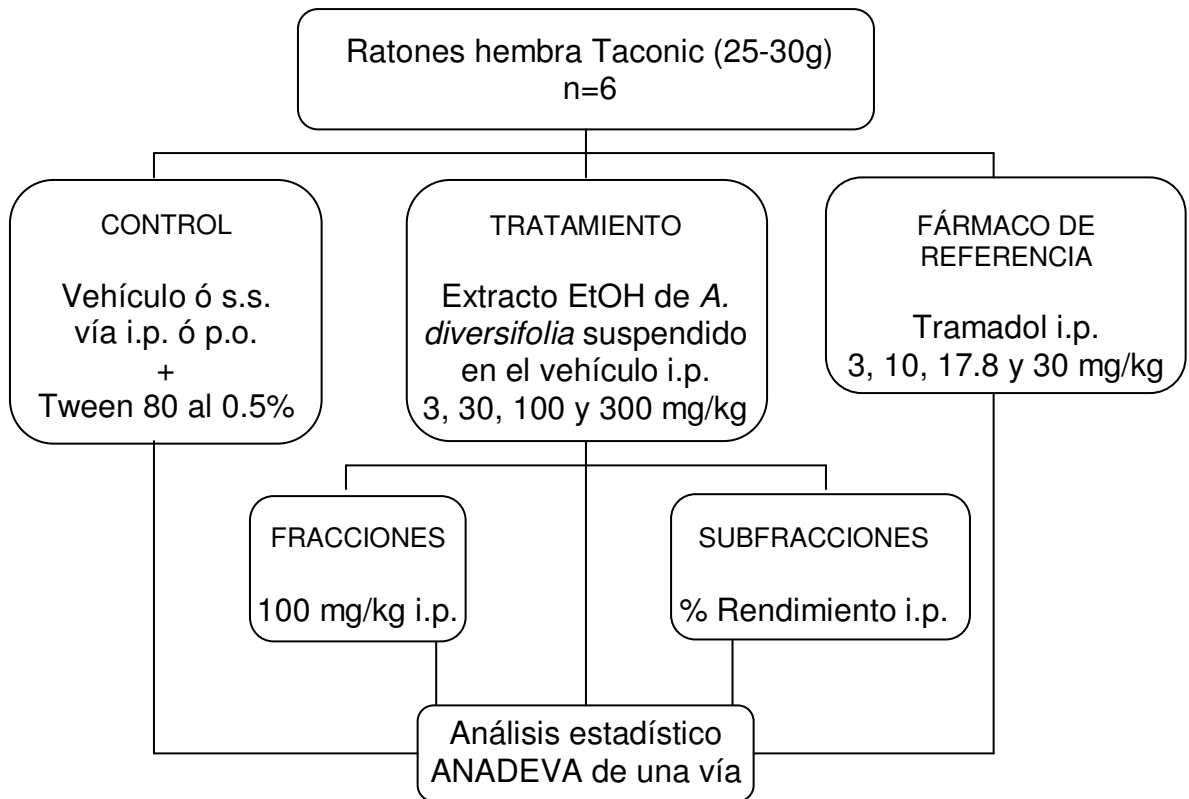


Figura 16.- Diseño experimental en el modelo “writhing”

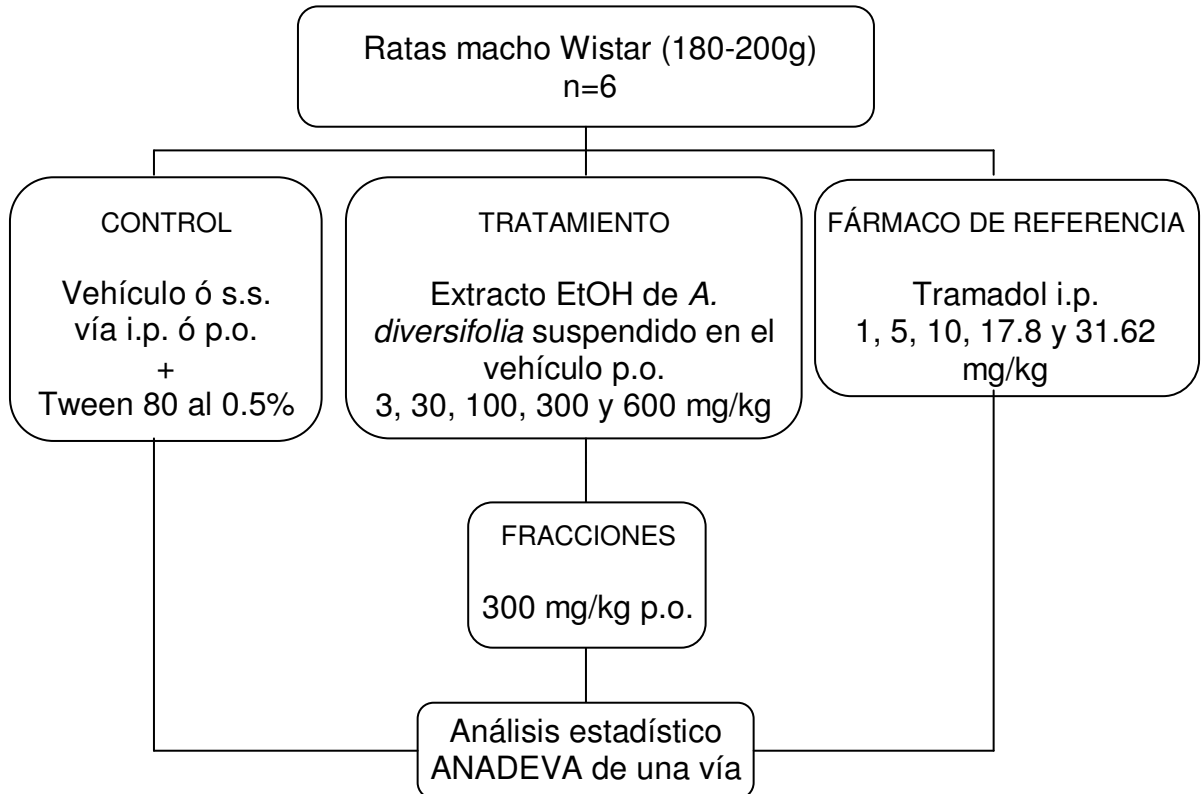


Figura 17.- Diseño experimental en modelo PIFIR.

6. RESULTADOS.

6.1 COMPARACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTINOCICEPTIVA DE EXTRACTOS CRUDOS DE *A. diversifolia* EN EL MODELO DE ESTIRAMIENTO ABDOMINAL.

En la figura 18 se muestra el curso temporal del efecto antinociceptivo producido por los extractos hexánico y etanólico de *A. diversifolia* a una dosis de 100 mg/kg en comparación con el grupo control. Los animales tratados con el vehículo presentaron un máximo de 32 ± 2.7 contracciones abdominales transcurridos 10 minutos después de la administración del agente nociceptivo. En tanto que los grupos tratados con los extractos hexánico y etanólico mostraron un máximo de 23 ± 1.3 y 7 ± 2.1 contracciones abdominales a los 15 y 10 min, respectivamente. La latencia al primer estiramiento abdominal para el grupo control fue de 3 min. Mientras que para los grupos que recibieron extracto hexánico o etanólico el primer estiramiento abdominal se observó a los 1 y 2 min, correspondientemente.

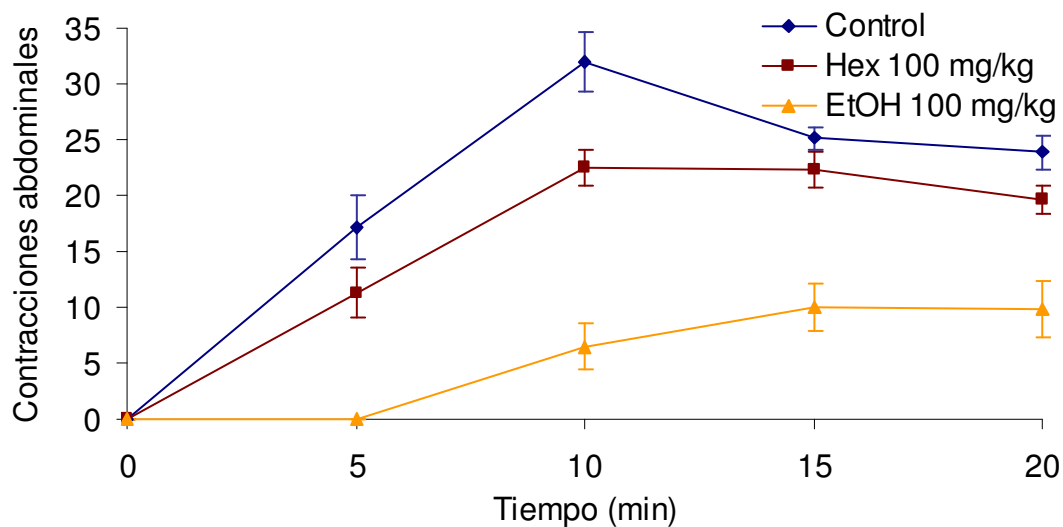


Fig. 18 Curso temporal del efecto antinociceptivo de los extractos etanólico y hexánico de *A. diversifolia* i.p. en comparación con el grupo control en la nocicepción inducida con ácido acético al 1% i.p. Cada punto representa el promedio \pm EEM de 6 animales.

La figura 19 muestra el efecto antinociceptivo, representado como ABC (c.a*min), para los animales tratados con los extractos hexánico o etanólico en comparación con el grupo control. En este gráfico se observa que ambos extractos producen un efecto estadísticamente significativo ($F_{2,15}= 44.0$, $P<0.001$) en comparación con el grupo control. Adicionalmente se observa que el extracto etanólico produce mayor efecto antinociceptivo ($F_{2,15}= 44.0$, $P<0.001$) que el extracto hexánico.

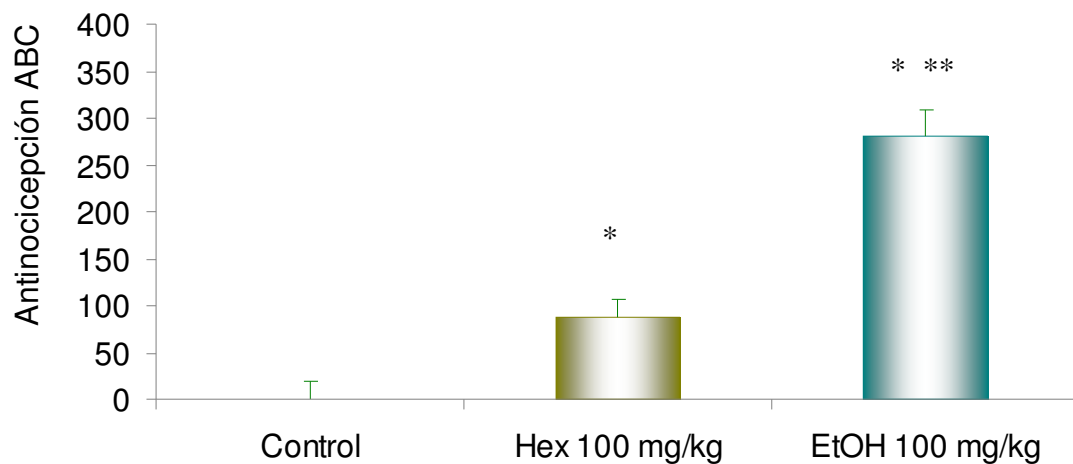


Fig. 19 Efecto antinociceptivo de los extractos etanólico y hexánico de *A. diversifolia* i.p. en comparación con el grupo control en la nocicepción inducida con ácido acético al 1% i.p. Las barras representan el promedio del ABC \pm EEM. * $p<0.001$ ANADEVVA seguida de la prueba de Dunnett vs control. ** $p<0.001$ ANADEVVA seguida de la prueba de Dunnett en comparación con el extracto hexánico.

6.1.1 ACTIVIDAD ANTINOCICEPTIVA DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE *A. diversifolia*.

En la figura 20 se muestra el curso temporal del efecto antinociceptivo producido por el extracto etanólico en comparación con el grupo control. El máximo de contracciones abdominales que se observó a los 10 min para el control (32 ± 2.7) y la dosis de 3 mg/kg (23 ± 5.1), esta conducta nociceptiva se reduce conforme se aumenta la dosis.

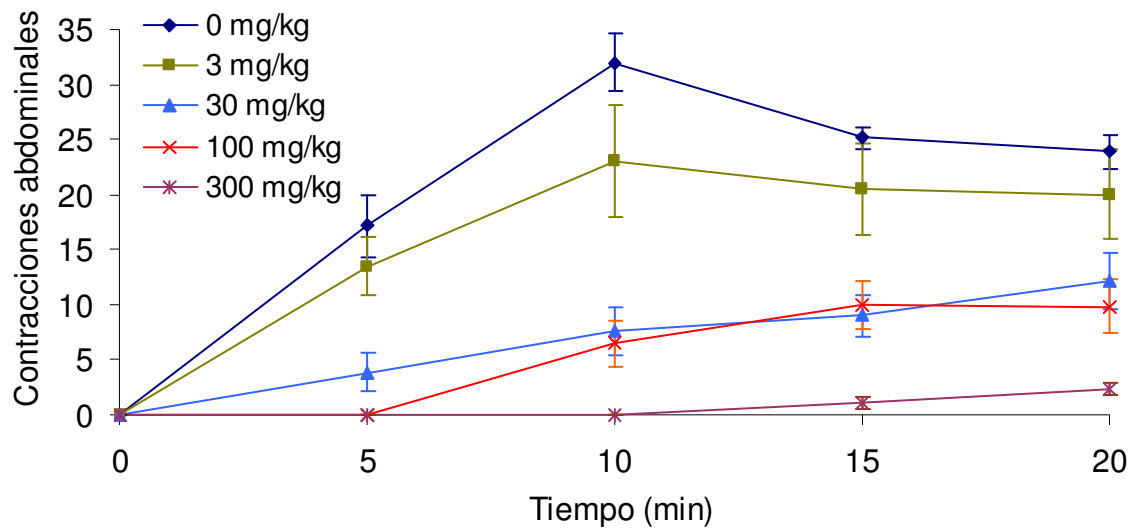


Fig. 20 Curso temporal del efecto antinociceptivo del extracto etanólico de *A. diversifolia* i.p. en comparación con el grupo control en la nocicepción inducida con ácido acético al 1% i.p. Cada punto representa el promedio \pm EEM de 6 animales.

En la figura 21 se observa que este efecto antinociceptivo es dosis dependiente y significativo ($F_{4,25}=23.7$, $P<0.001$) a partir de la dosis de 30 mg/kg, produciendo una inhibición casi total en la dosis de 300 mg/kg. ABC (c.a*min).

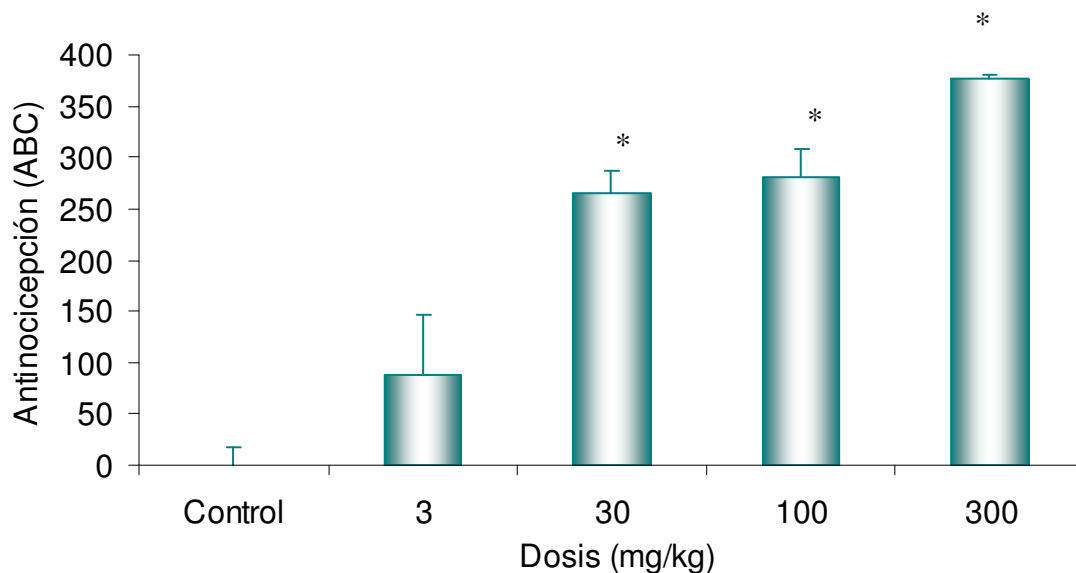


Fig. 21 Curva dosis-respuesta del efecto antinociceptivo del extracto etanólico de *A. diversifolia* i.p. en comparación con el grupo control en la nocicepción inducida con ácido acético al 1% i.p. Las barras representan el promedio del ABC \pm EEM. * $p<0.001$ ANADEVIA seguida de la prueba de Dunnett.

La figura 22 muestra el efecto antinociceptivo producido por el fármaco de referencia tramadol en comparación con el grupo control. De manera similar al extracto, el tramadol produjo una respuesta dosis dependiente mediante el aumento de la antinocicepción a partir de la dosis de 3 mg/kg dando un máximo de 28 ± 2.9 contracciones abdominales.

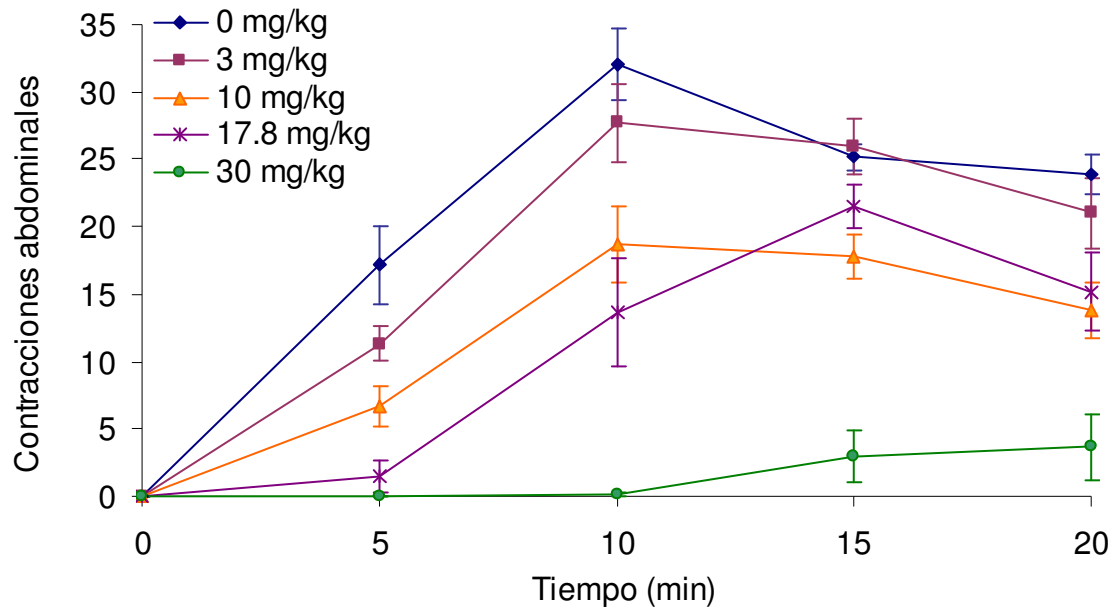


Fig. 22 Curso temporal del efecto antinociceptivo producido por el fármaco de referencia tramadol i.p. en comparación con el grupo control en la nocicepción inducida con ácido acético al 1% i.p. Cada punto representa el promedio \pm EEM de 6 animales.

En la figura 23 se presenta la curva dosis respuesta del efecto antinociceptivo producido por tramadol, donde se observa que éste es significativo ($F_{4,25}=32.5$, $P<0.001$) a partir de la dosis de 10 mg/kg, efecto que al probar la dosis de 17.8 mg/kg permanece sin cambio, mientras que el aumento de la dosis a 30 mg/kg prácticamente previene el efecto nociceptivo. ABC (c.a.*min).

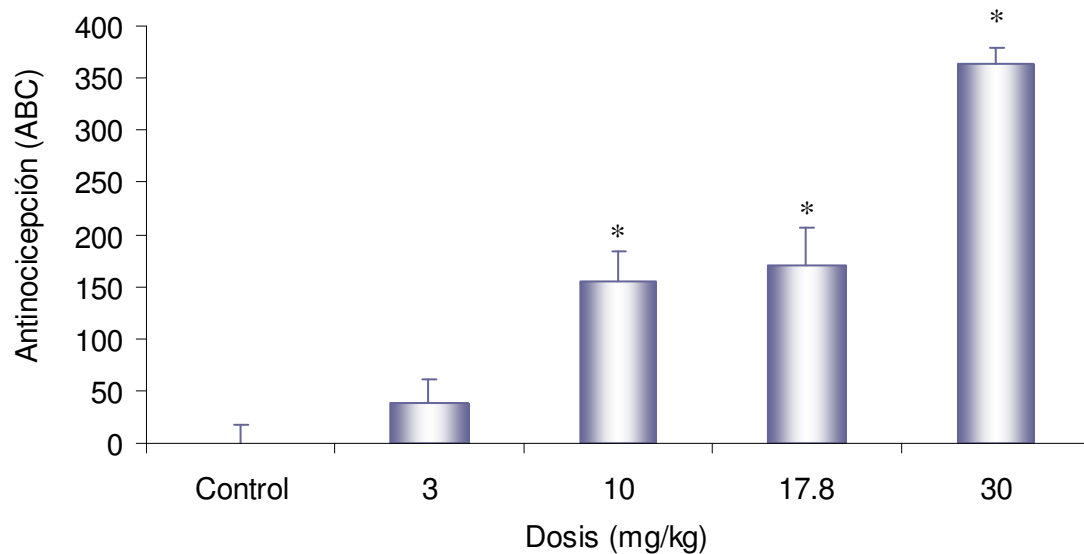


Fig. 23 Curva dosis-respuesta del efecto antinociceptivo del fármaco de referencia tramadol i.p. en comparación con el grupo control en la nocicepción inducida con ácido acético al 1% i.p. Las barras representan el promedio del ABC \pm EEM. * $p < 0.001$ ANADEVIA seguida de la prueba de Dunnett.

6.1.2 ACTIVIDAD ANTINOCICEPTIVA DE LAS FRACCIONES OBTENIDAS DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE *A. diversifolia*.

Un fraccionamiento biodirigido del extracto etanólico de *A. diversifolia* se realizó mediante percolación obteniendo 4 fracciones (hexano, acetona, metanol, residuos sólidos). Cada una de las fracciones se evaluó a una dosis de 100 mg/kg, de las cuales los animales que recibieron la fracción obtenida con acetona presentó mayor antinocicepción con un máximo de 8 ± 1.9 contracciones abdominales mientras que en el grupo tratado con la fracción obtenida con hexano o los residuos sólidos presentaron un máximo de 7 ± 1.4 y 12 ± 1.9 contracciones abdominales, respectivamente, en comparación con el grupo control (32 ± 2.7) ($F_{5,30}=37.9$, $P < 0.001$). a los 10 min después de la administración del agente nociceptivo, respectivamente (Fig. 24).

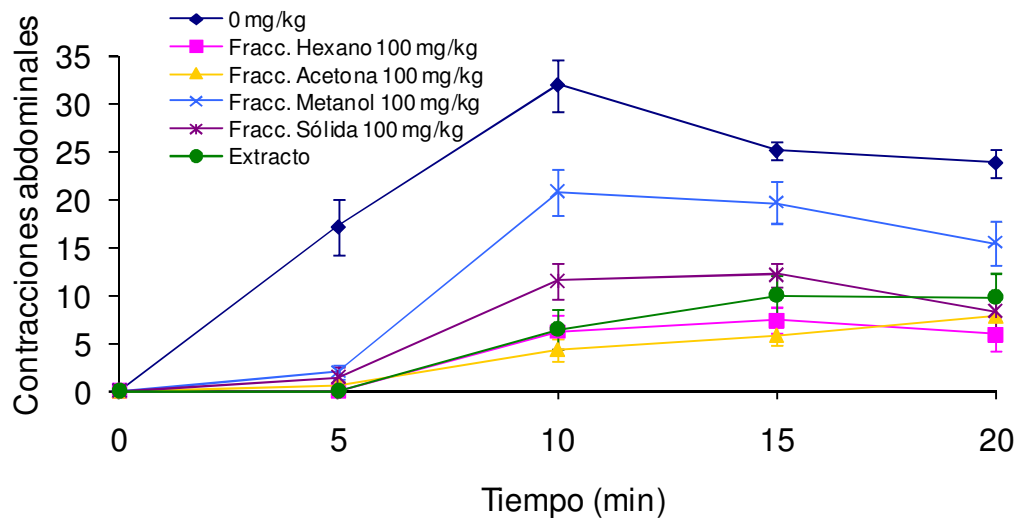


Fig. 24 Curso temporal del efecto antinociceptivo producido por las fracciones obtenidas del extracto etanólico de *A. diversifolia* i.p. en comparación con el grupo control en la nocicepción inducida con ácido acético al 1% i.p. Cada punto representa el promedio \pm EEM de 6 animales.

La diferencia en la respuesta antinociceptiva en el tratamiento con las fracciones y el grupo control o el que recibió el extracto etanólico crudo se observa en la representación dosis respuesta del ABC (c.a.*min) (Fig. 25).

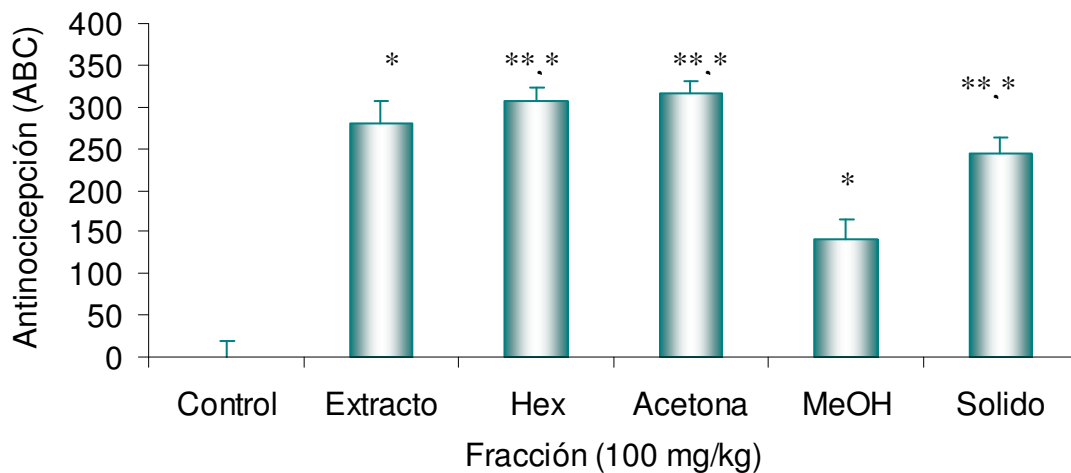


Fig. 25 Curva dosis-respuesta del efecto antinociceptivo de las fracciones obtenidas del extracto etanólico de *A. diversifolia* i.p. en comparación con el grupo control en la nocicepción inducida con ácido acético al 1% i.p. Las barras representan el promedio del ABC \pm EEM. * $p < 0.001$ ANADEVa seguida de la prueba de Dunnett en comparación con el vehículo. *** $p < 0.001$ ANADEVa seguida de la prueba de Dunnett en comparación con el extracto etanólico.

6.1.3 ACTIVIDAD ANTINOCICEPTIVA DE LAS SUB-FRACCIONES OBTENIDAS DE LA FRACCIÓN DE ACETONA DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE *A. diversifolia*.

De la fracción acetona se realizó una columna cromatográfica para la obtención de subfracciones, Se obtuvieron 304 subfracciones que se redujeron a 24 después de realizar cromatografía en capa fina para agrupar aquellas que presentaban similar perfil cromatográfico. Estas fracciones fueron evaluadas en el modelo de estiramiento abdominal para determinar su actividad, de lo cual se observó que la mayoría presentó antinocicepción (Fig. 26).

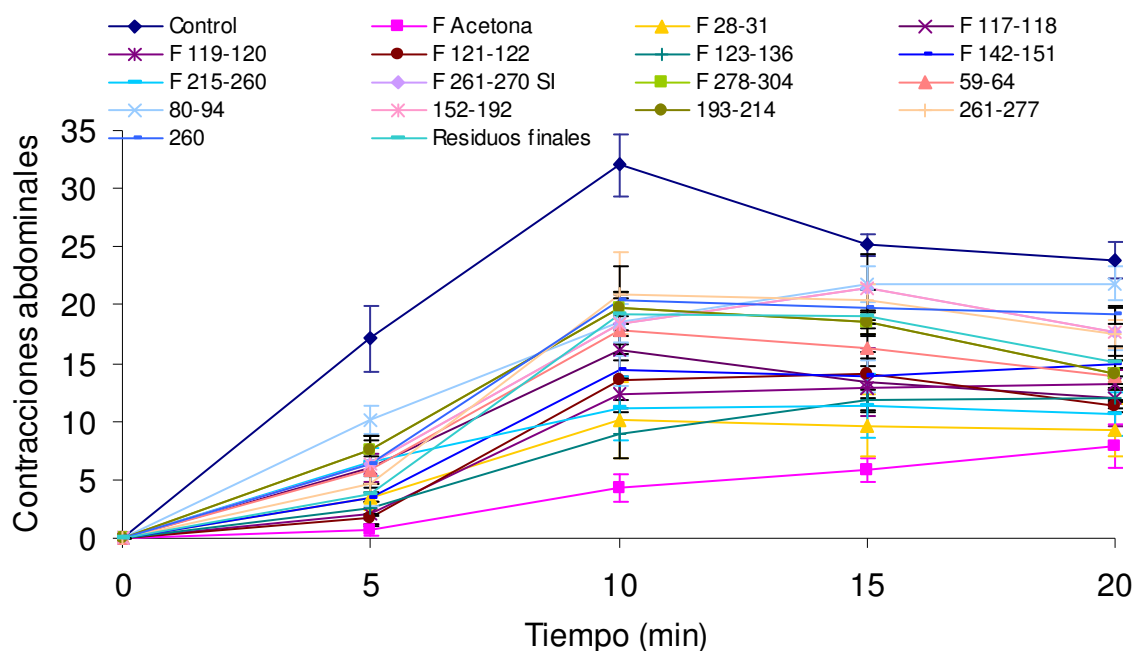


Fig. 26 Curso temporal del efecto antinociceptivo de las sub-fracciones obtenidas de la fracción de acetona del extracto etanólico de *A. diversifolia* i.p. en comparación con el grupo control en la nocicepción inducida con ácido acético al 1% i.p. Cada punto representa el promedio \pm EEM de 6 animales.

Algunas fracciones que presentaron diferencia significativa en la inhibición de contracciones abdominales respecto al grupo control no fueron significativamente diferentes en comparación con la fracción de acetona, este fue el caso de las subfracciones: 28-31 [10 ± 3 contracciones abdominales (c.a.)], 119-

120 (13±2 c.a.), 121-122 (14±2 c.a.), 123-136 (12+1 c.a.), 142-151 (11±3 c.a.) y 278-304 (9+4 c.a.), considerando un pico máximo de contracciones abdominales entre los 10 y 15 minutos. Esto se observa en los resultados representados como ABC (c.a.*min) en la figura 27, donde la significancia del efecto antinociceptivo de cada una de las sub-fracciones se compara tanto con el vehículo ($F_{19,100}=8.09$, $P<0.001$) como con la fracción de acetona ($F_{19,100}=8.09$, $P<0.001$).

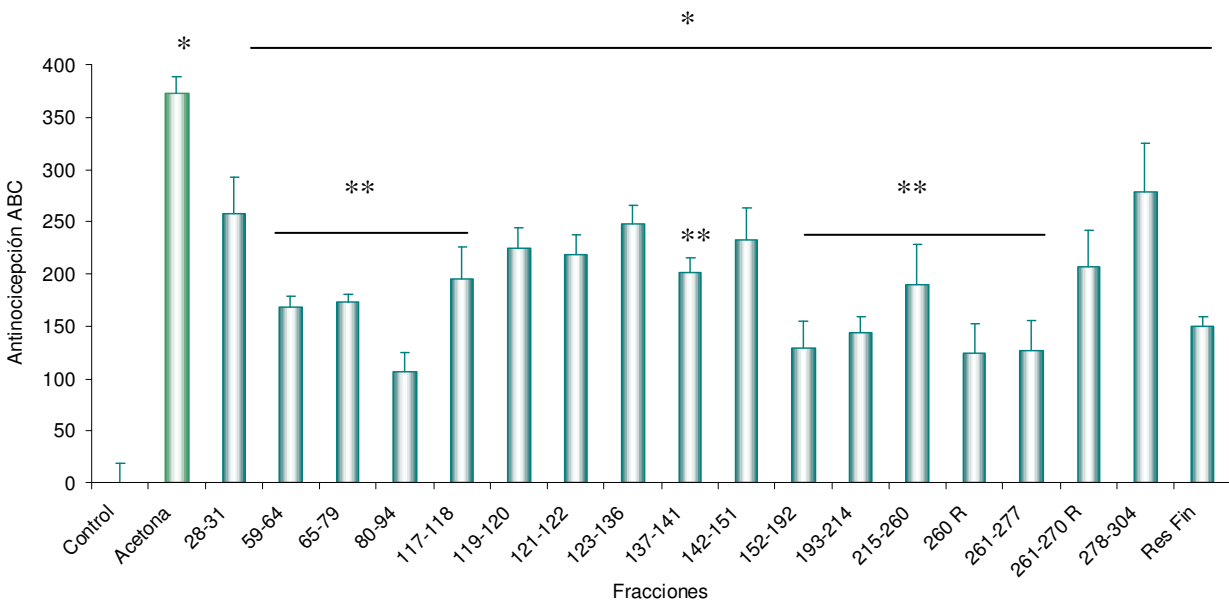


Fig 27 Curva dosis-respuesta del efecto antinociceptivo de las sub-fracciones obtenidas de la fracción de acetona del extracto etanólico de *A. diversifolia* i.p. en comparación con el grupo control en la nocicepción inducida con ácido acético al 1% i.p. Las barras representan el promedio del ABC ± EEM. * $p<0.001$ ANADEVa seguida de la prueba de Dunnett en comparación con el grupo control. ** $p<0.001$ ANADEVa seguida de la prueba de Dunnett en comparación con la fracción de acetona.

De todas las comparaciones, la fracción de acetona fue la que presentó mayor diferencia significativa respecto al vehículo, al extracto etanólico y a su vez con las subfracciones evaluadas (Tabla 8).

Tabla 8. Efecto antinociceptivo de las subfracciones obtenidas de la fracción de Acetona de *A. diversifolia* en el modelo writhing. (n=6)

FRACCIÓN	DOSIS	NOCICEPCIÓN (ABC _{0-20 MIN})	% ANTINOCICEPCIÓN
VEHÍCULO		488.33±37.30UA	
FRACCIÓN DE ACETONA	100	91.67±19.45*	81
F(28-31)	5	131.25±35.25*,**	73
F(59-64)	5	220.00±10.35*	55
F(65-79)	0.75	215.42± 7.54*	56
F(80-94)	5	281.67±18.27*	43
F(117-118)	12	192.50±29.74*	61
F(119-120)	4.2	163.75±19.96*,**	66
F(121-122)	2.4	170.00±18.92*,**	65
F(123-136)	10	140.42±17.47*,**	71
F(137-141)	2.2	187.08±13.68*	62
F(142-151)	2.2	155.42±30.12*,**	68
F(152-192)	5.3	259.20±25.66*	47
F(193-214)	28	244.60±15.23*	50
F(215-260)	5.6	198.33±37.71*	59
F(261-270)	1	181.25±34.79*	63
F(278-304)	1.3	109.58±46.32*,**	77

*,**F_{1,100}=8.09, P<0.001, ANADEVVA seguida de la prueba de Dunnett en comparación con el grupo control. Y la fracción acetona, respectivamente.

6.2 COMPARACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTINOCICEPTIVA DEL EXTRACTO CRUDO DE *A. diversifolia* EN EL MODELO PIFIR.

En la figura 28 se muestra el % I.F del efecto antinociceptivo producido por el extracto etanólico al ser comparado con el vehículo y a su vez con el extracto hexánico de *Annona*. Los resultados muestran que el extracto etanólico tuvo un

máximo de % I.F de 33.29 ± 7.37 a los 30 minutos después de la administración del extracto. Este efecto máximo se redujo al 5% después de 1.0 h manteniéndose así hasta el final del experimento. El % I.F del extracto hexánico fue menor al 5% a lo largo del experimento ($F_{2,15}=8.7$, $P<0.003$).

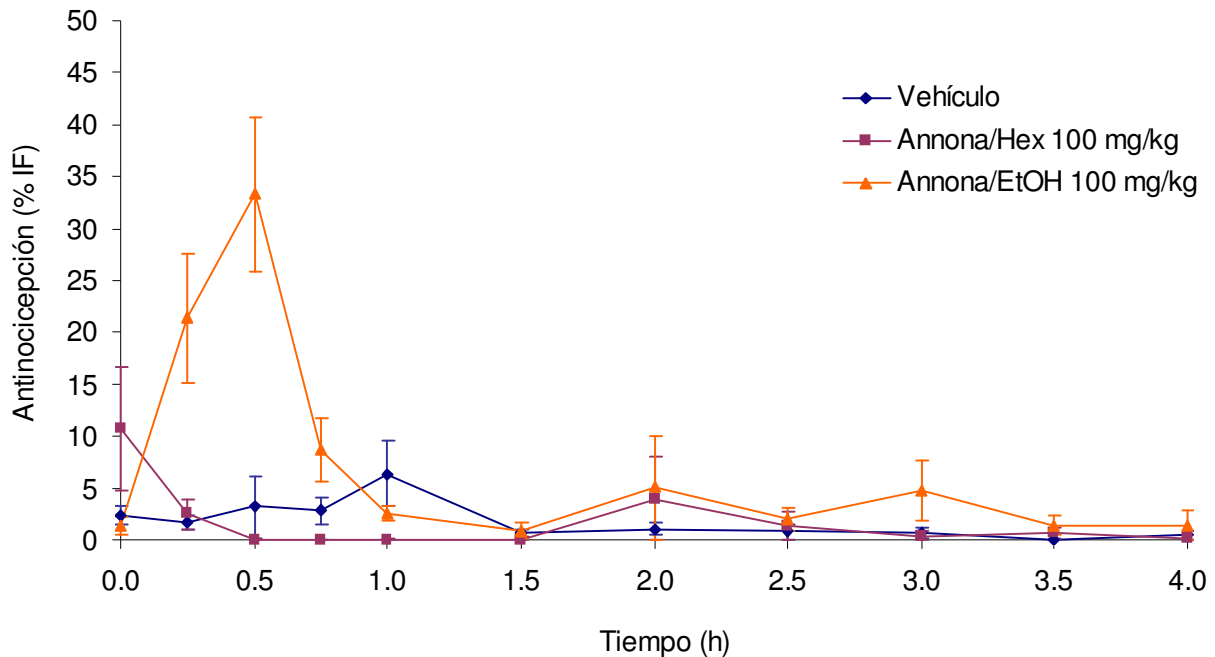


Fig. 28 Curso temporal del efecto antinociceptivo del extracto etanólico vs. El extracto hexánico de *A. diversifolia* p.o. en comparación con el vehículo, en la disfunción inducida por el ácido úrico al 20%. Cada punto representa el promedio \pm EEM de 6 animales.

En la figura 29 se muestra el ABC (%I.F.*h) donde se puede observar que el extracto etanólico de *A. diversifolia* produce un efecto antinociceptivo y significativo para la dosis de 100 mg/kg al ser comparado con el extracto hexánico a la misma dosis.

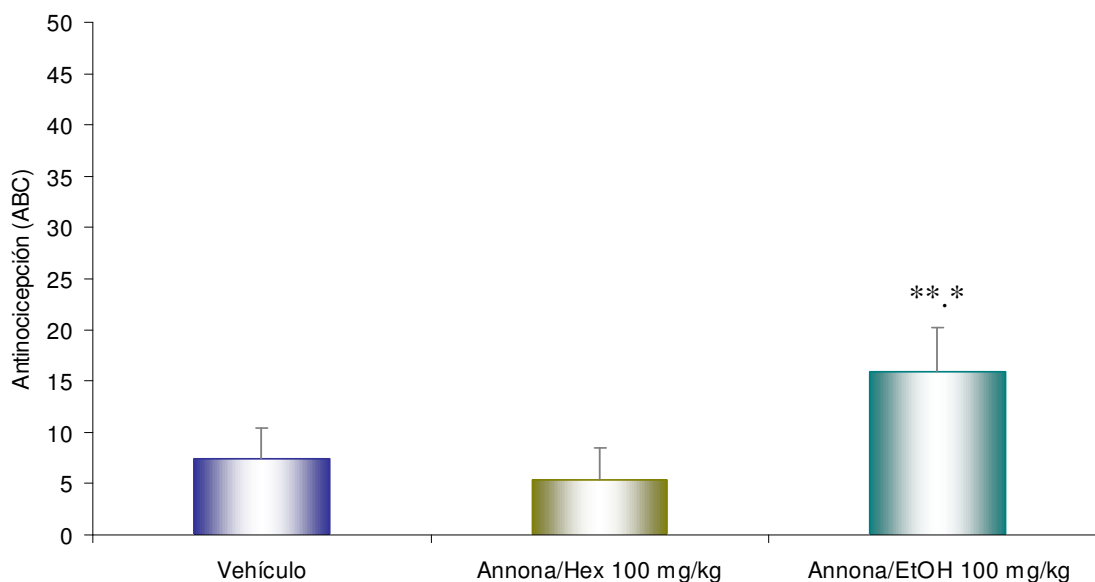


Fig. 29 Curva Dosis-Respuesta del efecto antinociceptivo del extracto etanólico vs. El extracto hexánico de *A. diversifolia* p.o. en comparación con el vehículo en la disfunción inducida por el ácido úrico al 20%. Las barras representan el promedio del ABC \pm EEM. * $p < 0.05$ ANADEVa seguida de la prueba de Dunnett en comparación con el vehículo. ** $p < 0.003$ ANADEVa seguida de la prueba de Dunnett en comparación con el extracto hexánico.

6.2.1 ACTIVIDAD ANTINOCICEPTIVA DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE *A. diversifolia*.

En la figura 30 se muestra el efecto antinociceptivo producido por la administración del extracto etanólico de *A. diversifolia* en ratas y su evaluación en el modelo PIFIR. En ésta se observa que el grupo control y aquel que recibió la dosis de 30 mg/kg de extracto etanólico no presentaron recuperación espontánea de la funcionalidad de la pata lesionada con ácido úrico durante las 4 h de evaluación. En contraste, con la administración del extracto en dosis de 600 mg/kg, se observó una recuperación significativa ($H=19.9$, 4 gl, $P < 0.001$) de acuerdo con los valores de %I.F. = 49 ± 12 . Los efectos máximos se redujeron al 21% al paso de una 1.0 h manteniéndose así hasta el final del experimento. No se observó manifestación alguna de efectos secundarios tales como disminución de la actividad exploratoria o de la coordinación motora en las ratas hasta la dosis de

600 mg/kg. Las dosis de 30, 100 y 300 mg/kg no presentan diferencia significativa respecto al vehículo.

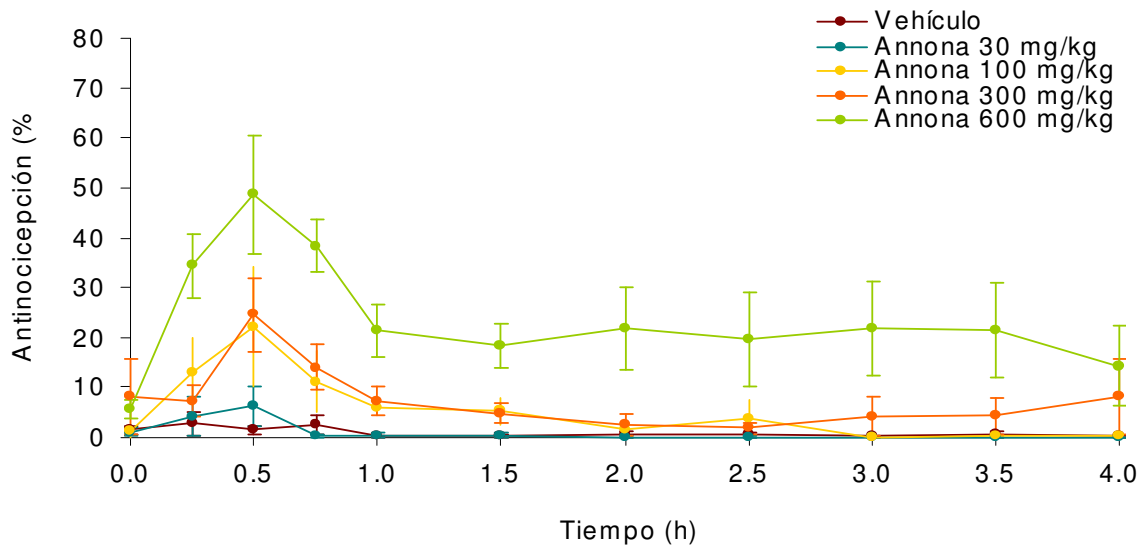


Fig. 30 Curso temporal del efecto antinociceptivo del extracto etanólico de *A. diversifolia* p.o. en comparación con el vehículo en la disfunción inducida por el ácido úrico al 20% en ratas. Cada punto representa el promedio \pm EEM de 6 animales

En la gráfica 31, la representación de ABC (%I.F.*h) correspondiente al curso temporal permite apreciar el efecto antinociceptivo dosis-dependiente producido por la administración del extracto.

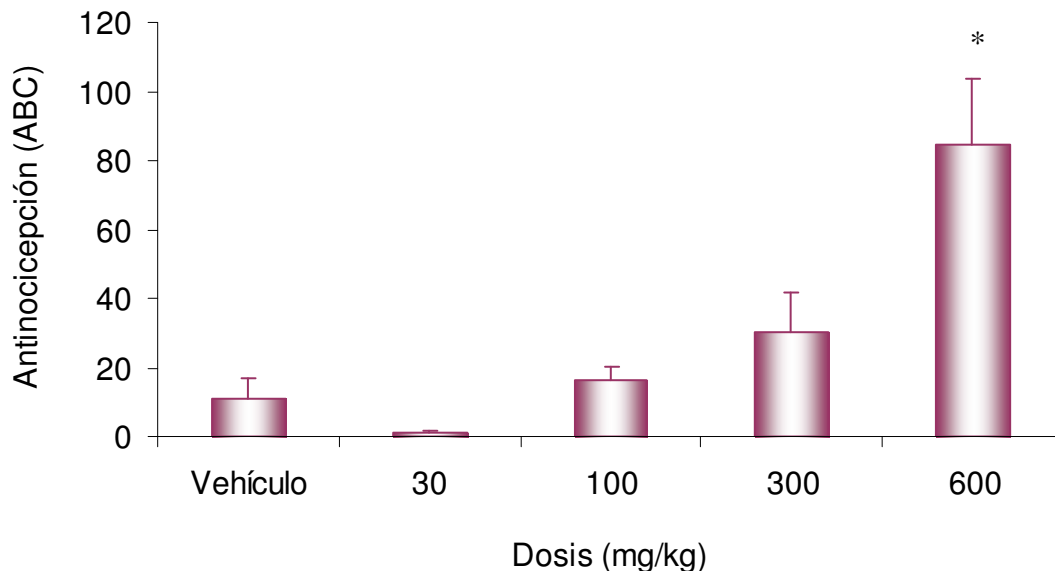


Fig. 31 Curva Dosis-Respuesta del efecto antinociceptivo del extracto etanólico de *A. diversifolia* p.o. en comparación con el vehículo en la disfunción inducida por el ácido úrico al 20%. Las barras representan el promedio del ABC \pm EEM. * $p < 0.001$ ANADEVa por rangos seguida de la prueba de Dunn's.

En lo que respecta al tramadol, en la figura 32 se muestran las curvas del curso temporal de su efecto antinociceptivo, el cual se produce con un máximo entre los 30 y 45 min después de su administración. En la dosis de 5.62, 10 y 17.78 mg/kg, el tramadol indujo un máximo del %I.F.= 60 ± 10 , 81 ± 10 y 75 ± 10 , a los 15, 30 y 45 minutos, respectivamente, después de la administración. Estos valores disminuyeron progresivamente hasta alcanzar un % I.F.= 7 ± 4 , 14 ± 8 y 30 ± 3 , respectivamente, en el transcurso de 3 horas y se mantuvieron así hasta la conclusión del experimento. En la dosis de 31.62 mg/kg, se observó un máximo % I.F.= 86 ± 5 a los 60 min, el cual se redujo hasta alcanzar un % I.F.= 57 ± 11 al final del experimento.

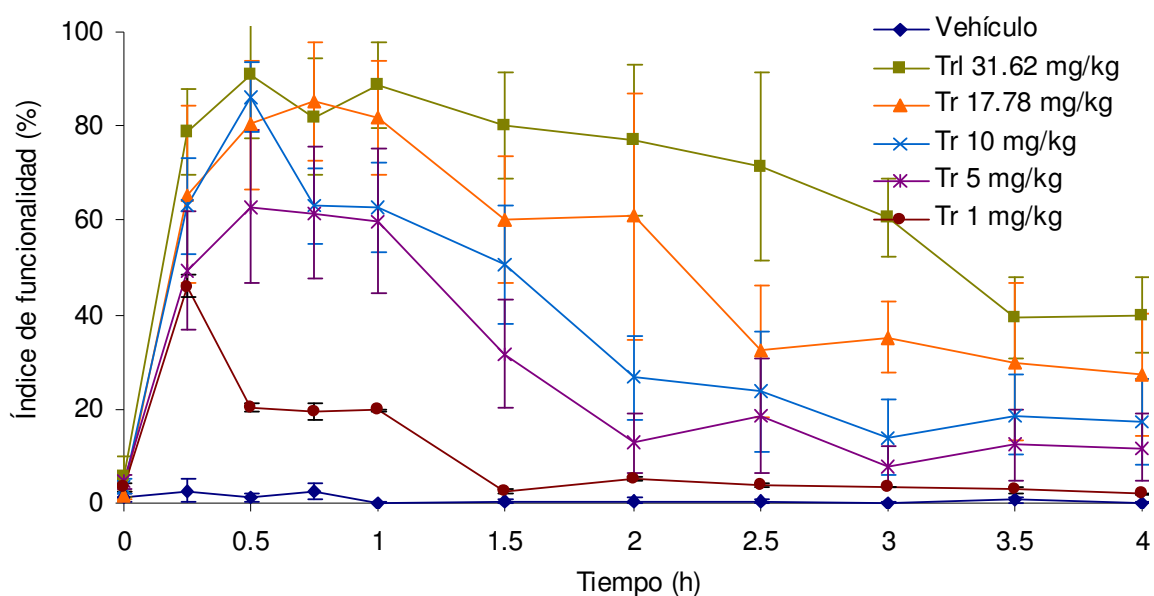


Fig. 32 Curso temporal del efecto antinociceptivo del fármaco de referencia tramadol i.p. en comparación con el vehículo en la disfunción inducida por el ácido úrico al 20% en ratas. Cada punto representa el promedio \pm EEM de 6 animales

En la figura 33, la representación de los datos como ABC (%I.F.*h) muestran que el efecto antinociceptivo de tramadol es dosis dependiente y significativo a partir de la dosis de 10 mg/kg.

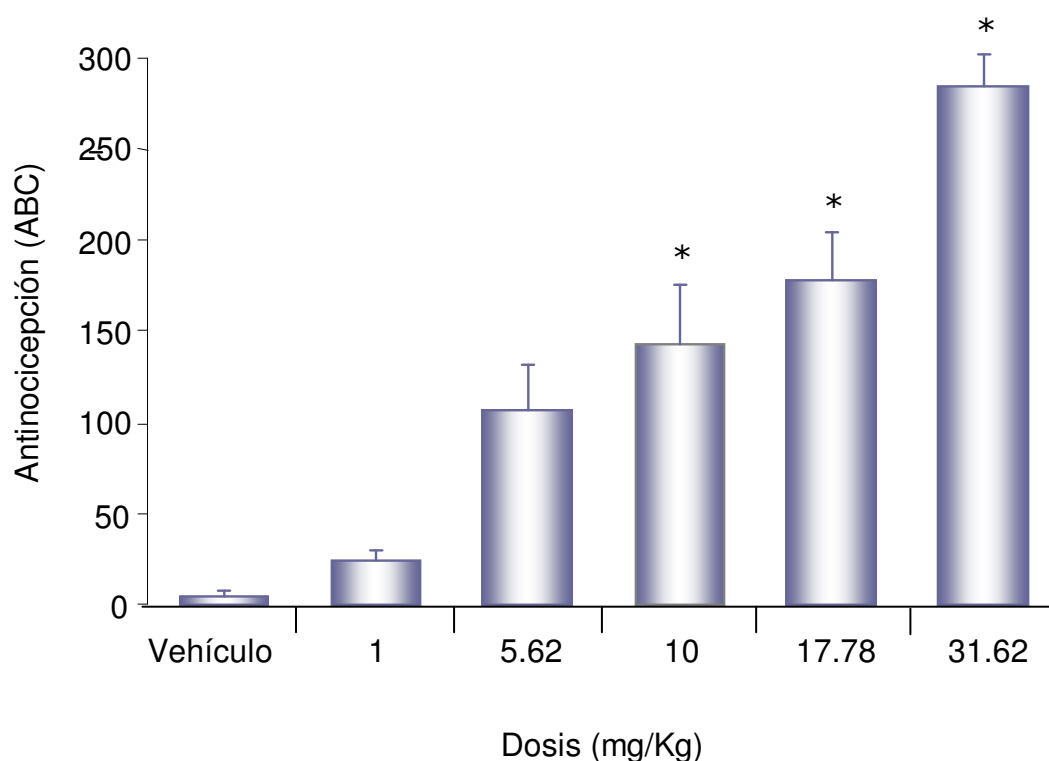


Fig. 33 Curva dosis-respuesta del efecto antinociceptivo del fármaco de referencia tramadol i.p. en comparación con el vehículo en la disfunción inducida por el ácido úrico al 20%. Las barras representan el promedio del ABC \pm EEM. * $p < 0.001$ ANADEVa seguida de la prueba de Dunnett.

6.2.2 ACTIVIDAD ANTINOCICEPTIVA DE LAS FRACCIONES OBTENIDAS DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE *A. diversifolia*.

En la figura 34 se muestra el % I.F del efecto antinociceptivo de las fracciones obtenidas por percolación del extracto etanólico y evaluadas a la dosis de 300 mg/kg. La fracción obtenida con acetona fue la más activa al producir un mayor %I.F = 35 ± 12 a los 45 min después de la administración en comparación con el grupo que recibió el vehículo %I.F = 2.68 ± 0.99 . La fracción hexánica se probó a una dosis de 300 y 600 mg/kg produciendo un efecto de % I.F = 20 ± 10 y 45 ± 13 a los 30 min, respectivamente. Mientras que la fracción metanólica y los

residuos sólidos de esta misma fracción produjeron un % I.F = 31.78 ± 6.80 y 32.84 ± 16.42 , respectivamente.

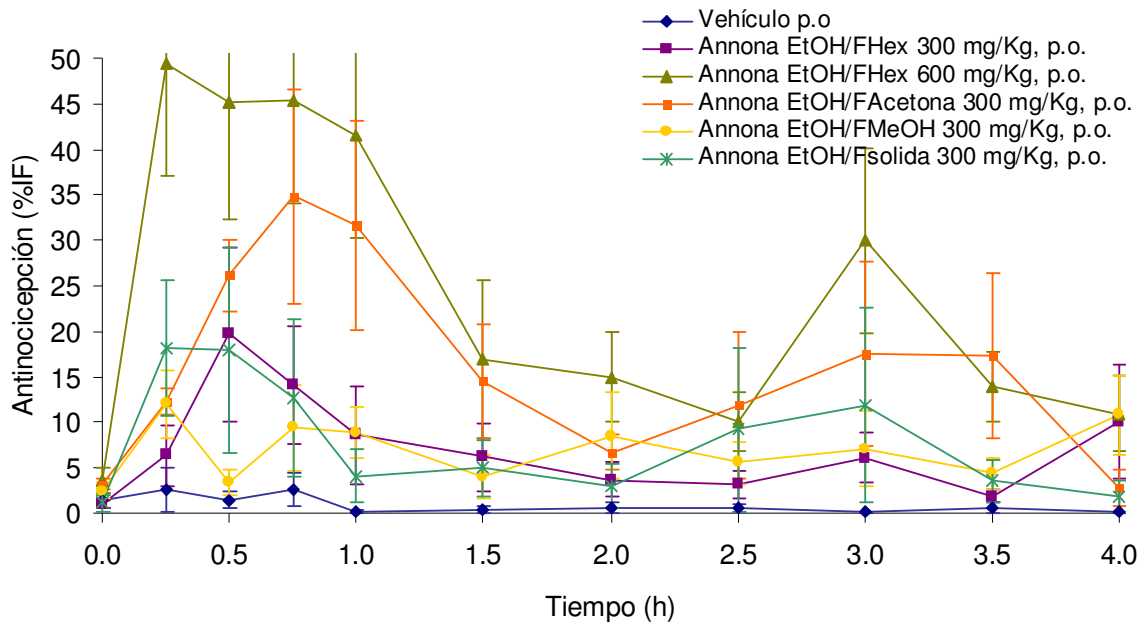


Fig. 34 Curso temporal del efecto antinociceptivo de las fracciones obtenidas del extracto etanólico de *A. diversifolia* p.o. en comparación con el vehículo en la disfunción inducida por el ácido úrico al 20%. Cada punto representa el promedio \pm EEM de 6 animales.

En la figura 35, la representación del ABC (%I.F.*h) demuestra que las fracciones obtenidas con hexano y acetona produjeron mayor efecto antinociceptivo que el obtenido con el extracto crudo. Este efecto fue mayor en la fracción acetona, seguida de la fracción hexánica que muestra una respuesta dosis-dependiente. Los efectos son significativos ($F_{5,30}=3.8$, $P<0.009$) para la dosis de 300 y 600 mg/kg de la fracción acetona y hexano, respectivamente.

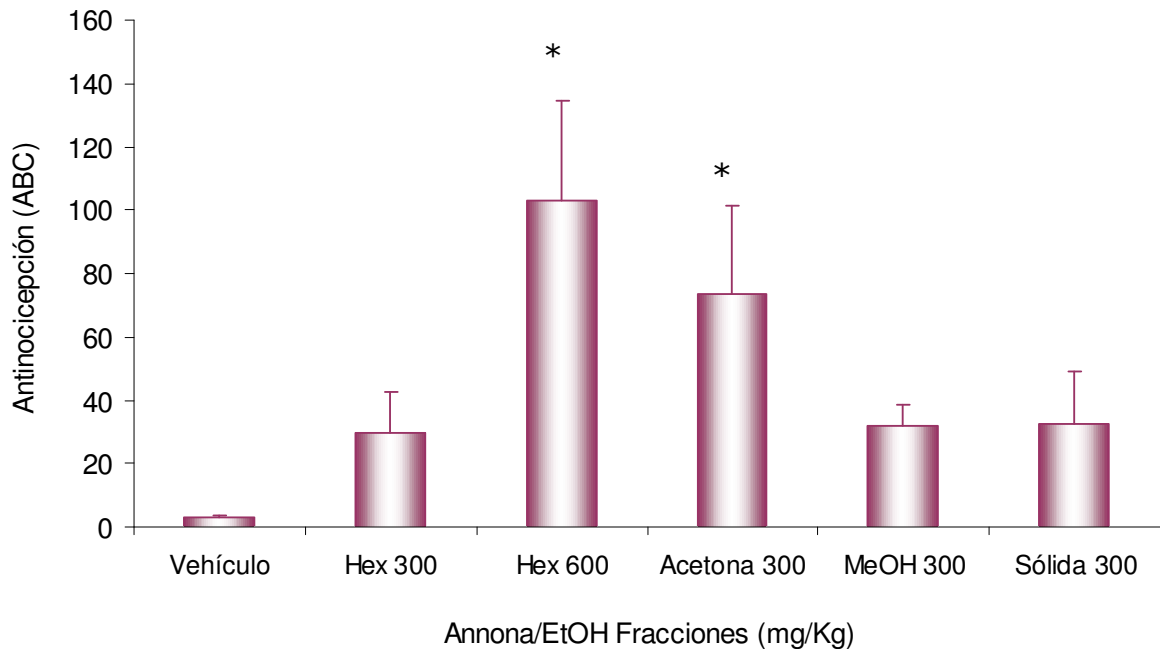


Fig. 35 Curva dosis-respuesta del efecto antinociceptivo de las fracciones obtenidas del extracto etanólico de *A. diversifolia* p.o. en comparación con el vehículo en la disfunción inducida por el ácido úrico al 20%. Las barras representan el promedio del ABC \pm EEM. * $p < 0.009$ ANADEVVA seguida de la prueba de Dunnett.

6.3 EVALUACIÓN DE LA DOSIS EFECTIVA 50 (DE₅₀) DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE *A. diversifolia*.

A partir de las curvas dosis respuesta presentadas anteriormente para el extracto etanólico de *A. diversifolia* y el tramadol tanto en el modelo writhing como en el PIFIR, se calcularon las respectivas dosis efectivas cincuenta (DE₅₀). La DE₅₀ para el extracto etanólico de *A. diversifolia* fue de 15.3 mg/kg y para el tramadol de 12.4 mg/kg en el modelo “writhing” (Fig 36).

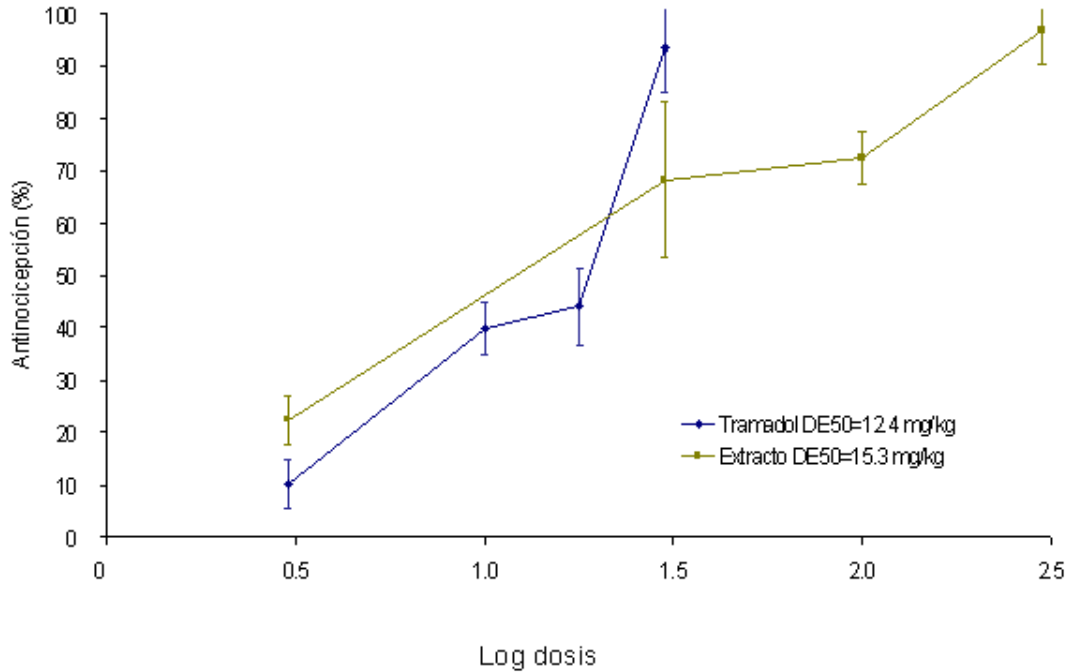


Fig. 36 Curva dosis-respuesta y DE_{50} i.p. del efecto antinociceptivo del extracto etanólico de *A. diversifolia* en comparación con tramadol en el modelo "writhing".

En el modelo PIFIR, la DE_{50} para el tramadol fue de 16.12 mg/kg, mientras que para el caso del extracto la DE_{50} no se pudo determinar ya que hubo un máximo de respuesta del 25% a las dosis probadas. Por tanto, la $DE_{25}= 684.71$ mg/kg p.o. fue obtenida para el extracto en comparación con la de ASA $DE_{25}= 230.71$ p.o. o para obtener la mayor eficacia se probó tramadol i.p. obteniéndose una $DE_{25}= 4.65$ mg/kg (Fig. 37).

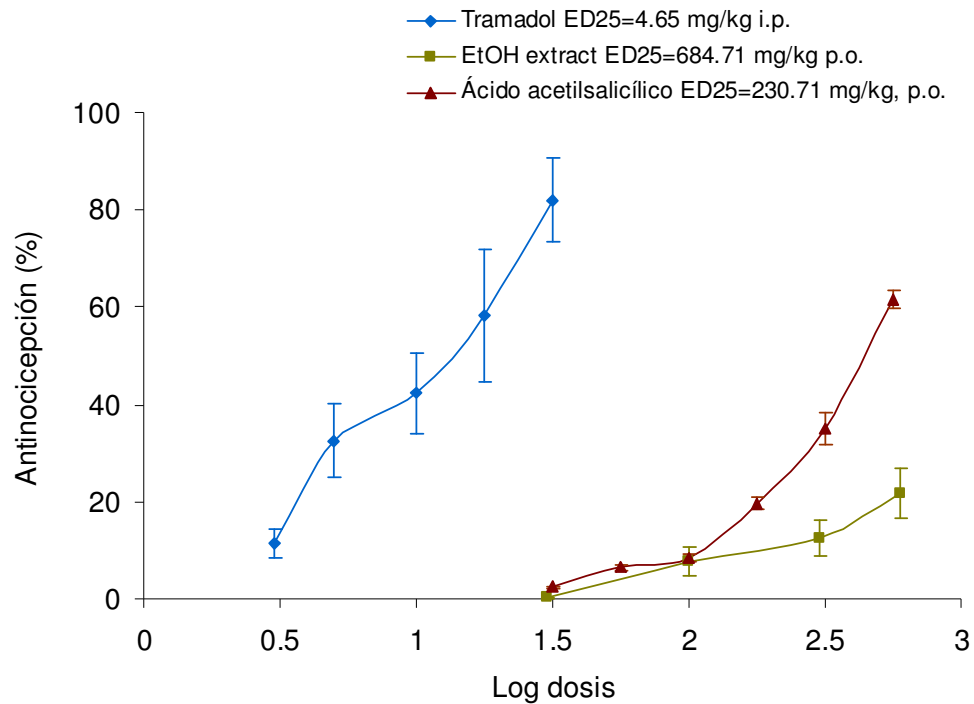


Fig. 37 Curva dosis-respuesta y DE_{25} del efecto antinociceptivo del extracto etanólico de *A. diversifolia* p.o. y AAS p.o. en comparación con el tramadol i.p. en el modelo PIFIR.

6.4 EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD AGUDA: DOSIS LETAL 50 (DL_{50}) DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE *A. diversifolia*.

En el estudio de toxicidad aguda se observó mediante el método de Lorke, la $DL_{50} = 141.4$ mg/kg para el extracto hexánico (no activo), $DL_{50}=928.3$ mg/kg para el extracto etanólico (activo) y $DL_{50} = 118.3$ mg/kg para el fármaco de referencia tramadol administrados vía i.p. obtenidos en ratones, no se observó ningún daño macroscópico o pérdida de peso después de 14 días de la administración aguda del extracto. (Tabla 9)

Tabla 9. Evaluación de la Dosis Letal Cincuenta (DL₅₀), vía intraperitoneal.

TRATAMIENTO	DOSIS (mg/kg)	NÚMERO DE ANIMALES QUE MURIERON / NÚMERO DE ANIMALES USADOS	DL ₅₀ (mg/kg)
Tramadol	100	0/6	118.3
	140	3/3	
	200	3/3	
	600	3/3	
	1000	3/3	
Extracto etanólico	100	1/3	928.3
	1600	1/3	
	2900	1/3	
	5000	1/3	
Extracto hexánico	100	0/3	141.4
	200	3/3	
	600	3/3	
	1000	3/3	

7. DISCUSIÓN.

Como ha sido mencionado, los preparados como infusión o decocción y la maceración de las hojas de especies de *annona* son utilizadas en la medicina tradicional por sus propiedades como analgésico y anti-inflamatorio [153], anti-espasmódico, astringente y para diversas alteraciones gástricas [124, 126]. Previos estudios ya han reportado actividad farmacológica sobre el SNC de algunas especies de *annona*; por ejemplo, sus efectos como sedante o ansiolítico [120, 122, 154] y como anticonvulsivo [121, 122]. Sin embargo, en nuestro conocimiento no existen estudios que corroboren los efectos analgésicos y anti-inflamatorios que se atribuyen a estas especies. En el presente estudio preclínico se evaluaron las propiedades antinociceptivas de extractos crudos, fracciones y subfracciones del extracto más activo obtenidos de las hojas de *A. diversifolia* utilizando técnicas cromatográficas y los modelos de nocicepción de estiramiento abdominal en ratones y disfunción inducida por dolor en ratas (por sus siglas en inglés PIFIR). Los efectos se compararon con aquellos producidos por tramadol, un fármaco analgésico utilizado en la clínica. Además, de manera preliminar se determinó su toxicidad aguda en ratones.

Para este proyecto se utilizó el modelo de estiramiento abdominal ya que es considerado como un modelo de nocicepción o dolor de tipo visceral [64], donde se puede detectar analgesia, mediada a nivel central y periférico ante diversos mediadores involucrados en el dolor tanto en humanos como en animales experimentales [155, 156]. Mientras que el modelo PIFIR que consiste en la inyección i.art. de ácido úrico en la rótula inferior derecha produce una inflamación local aguda similar a lo observado en la patología de la artritis gotosa [65] según análisis histopatológico demostrando infiltración inflamatoria y edema en membranas sinoviales sin efecto sobre el cartílago conjunto [63]. En este tipo de dolor, la deposición de cristales de urato de sodio inicia un proceso inflamatorio que involucra la infiltración de granulocitos que fagocitan a los cristales de ácido úrico. De hecho, existe un incremento en la producción de lactato en los tejidos

sinoviales, produciendo un decremento local del pH que fomenta más la deposición de cristales de ácido úrico [68]. La deposición de cristales en el fluido sinovial promueve la liberación de citocinas (entre otros mediadores proinflamatorios). Con la contribución de factores humorales, también activados por los cristales, la IL-1 y FNT- α activan notablemente las células endoteliales permitiendo la extravasación de leucocitos y la IL-8 promueve la atracción y activación masiva de leucocitos polimorfos nucleares (neutrófilos) en el sitio de inflamación [69]. Estas citocinas se cree que estimulan la producción de enzimas degradativas y perturban el equilibrio entre tales enzimas y sus inhibidores, produciendo daño al tejido [157].

Para poder elegir el extracto con mayor actividad antinociceptiva, se hizo una comparación de los extractos hexánico y etanólico obtenidos de la *A. diversifolia* utilizando ambos modelos. En ambos casos se observó una respuesta antinociceptiva significativa con el extracto etanólico. Esto concuerda con el uso que se le da a esta especie, ya que la gente acostumbra tomar esta planta como medicinal en forma de infusión o decocción denominadas como “Tés”, o incluso preparada como maceración en etanol [120, 153]. Como el solvente natural utilizado es agua o el propio etanol al 96%, se esperaba que el extracto activo fuera de naturaleza polar, suposición que se corrobora con el resultado obtenido en este experimento.

En el modelo de estiramiento abdominal, la actividad antinociceptiva del extracto etanólico de *A. diversifolia* se demostró por una disminución en la frecuencia de estiramientos abdominales inducidos por el ácido acético al 1%. La actividad antinociceptiva del extracto etanólico produce antinocicepción dosis-dependiente y significativa a partir de la dosis de 30 mg/kg, mientras que para el tramadol la actividad antinociceptiva es significativa a partir de la dosis de 10 mg/kg en comparación con el vehículo. La diferencia en el rango de las dosis administradas de extracto respecto al de tramadol que producen una eficacia máxima fue de 10 veces. Sin embargo, se observó similar potencia sobre la

nocicepción visceral en los ratones, ya que para el extracto etanólico de *A. diversifolia* la $DE_{50}=15.35$ mg/kg, mientras que para el tramadol fue $DE_{50}=12.42$ mg/kg. Ambos tratamientos demostraron eficacia en este tipo de nocicepción que se asocia con el dolor visceral, corroborando el uso que se le da a esta especie como antiespasmódico.

El extracto etanólico fue el que presentó mayor actividad, por lo tanto se le realizó un fraccionamiento por percolación con la finalidad de tener una fracción menos compleja y que produjera mayor efecto antinociceptivo. De las 3 fracciones obtenidas y un residuo sólido, la fracción de acetona seguida de la de hexano fueron las más activas en ambos modelos. Posteriormente a la fracción de acetona se le realizó un fraccionamiento más fino del cual se obtuvieron 24 subfracciones que se evaluaron sólo en el modelo de contracciones abdominales ya que fue en el que se observó mayor respuesta antinociceptiva. Varias fracciones presentaron actividad antinociceptiva, a pesar de que ninguna fue mayor a la observada con la fracción de acetona, hay que considerar que las dosis a las que fueron administradas las subfracciones fue mucho menor que la administrada por la fracción de acetona, por lo que el aislamiento de los componentes del extracto produjo un aumento en su propiedad antinociceptiva. Las pruebas cualitativas realizadas en el laboratorio al extracto crudo y fracciones permitieron observar la presencia de componentes tanto de naturaleza flavonoide como alcaloide.

El tramadol es un fármaco utilizado en la clínica para tratar el dolor crónico. Su capacidad antinociceptiva se pudo confirmar en ambos modelos utilizado como fármaco de referencia. El mecanismo de acción específico de este fármaco analgésico es aun desconocido. Sin embargo, se ha descrito que su actividad analgésica es mediada por más de un mecanismo de acción [158]. Se reporta que su acción es mediada parcialmente por la acción sobre receptores μ -opioides y que además inhibe la recaptura de monoaminas como la noradrenalina y la serotonina en el SNC [158, 159]. Parte del interés en conocer los mecanismos de acción de fitofármacos es encontrar alternativas de tratamiento para el dolor pero

con reducidos efectos adversos como lo son la tolerancia y la dependencia de opiáceos, o bien la toxicidad gastrointestinal como en el caso de los antiinflamatorios no esteroidales [160].

Con respecto al efecto del extracto etanólico de *A. diversifolia* en el modelo PIFIR, este produce una eficacia máxima de 25% utilizando dosis con las que no se observó toxicidad, su DE_{25} calculada es de 684.74 mg/kg p.o. en comparación con la $DE_{25} = 230.81$ mg/kg de un AINE como el ácido acetilsalicílico p.o. [160] ó $DE_{25} = 4.65$ mg/kg de tramadol i.p. Cabe señalar que el efecto observado para la dosis de 100 mg/kg de *A. diversifolia* por vía i.p. ($ABC = 65.99 \pm 21.29$) no fue diferente del obtenido con la vía p.o. ($ABC = 48.24 \pm 14.34$). Por lo tanto, esta última vía se consideró en los experimentos, ya que las ratas presentaban efecto de incoordinación motora y depresión respiratoria en dosis de 100 a 300 mg/kg en la vía i.p. La importancia de estos experimentos es que se pudo observar el efecto farmacológico por una vía que es comúnmente utilizada en la medicina tradicional para el tratamiento del dolor. Aunque para el dolor de tipo artrítico se ha descrito que las hojas de *A. diversifolia* también se utilizan preparadas en maceración en etanol, el cual es frotado sobre el área deseada [161]. Cabe hacer mención que además del factor vía de administración, la intensidad del dolor artrítico y visceral es diferente y los mecanismos involucrados en cada proceso también lo son. De ahí que la respuesta antinociceptiva observada para esta especie también se presente de manera desigual. Los resultados obtenidos en el modelo PIFIR nos permiten sugerir que el uso de esta especie también aplica para tratar el dolor de tipo inflamatorio, específicamente del tipo artrítico gotoso, el cual es reproducido en este modelo, aunque con menor eficacia que para tratar el dolor visceral.

Como se mencionó anteriormente, las fracciones hexano y acetona también produjeron mayor respuesta antinociceptiva que el extracto, por lo que en un futuro será conveniente obtener mayor cantidad de las subfracciones, que en sí fue lo que limitó su evaluación en este modelo en rata, y evaluar aquellas que

dieron positivo en el modelo writhing con mayor % de antinocicepción. Asimismo, valdrá la pena identificar algunos de los componentes específicos involucrados como responsables en la actividad antinociceptiva del extracto crudo. En un futuro será importante hacer el análisis de mecanismo de acción con antagonistas para conocer que sistemas de neurotransmisión participan o que mediadores del dolor ya mencionados podrían estar involucrados.

La *A. diversifolia* no ha sido estudiada fitoquímicamente. No obstante, existen de este género estudios fitoquímicos para la chirimoya (*A. cherimolia*), guanábana (*A. muricata*), por citar algunas otras annonas, de las cuales se han identificado compuestos con actividad terapéutica los cuales se enlistan en los apéndices A y B. Los componentes químicos se reportan dependiendo de si encontrados en las hojas, las raíces, la corteza, el fruto y/o semillas. Los constituyentes más comúnmente reportados son: las acetogeninas, alcaloides, terpenos, flavonoides y aceites. Algunas acetogeninas tiene propiedades insecticidas, citotóxicas, antitumorales, antibacterial, inmuno-supresor, pesticida o antihelmíntico [162]. Alcaloides, terpenos y flavonoides son de los componentes más usados en medicina. Actualmente, las acetogeninas son conocidas por sus estudios sobre las propiedades anti-cancerígenas, ya que poseen efectos citotóxicos [128, 163-165]. Los flavonoides son agentes antioxidantes, se tiene evidencia que estos flavonoides también disminuyen la incidencia de tumores [166]. Las raíces contienen alcaloides los cuales producen efectos relajantes debido al bloqueo de circulación de calcio a través de canales de la membrana celular e interrupción de α -1 adreno-receptores [167]. Las hojas contienen aceites esenciales con propiedades antiparasitarias, antidiarreicos, reumatológicas y antineurálgicas [168]. Las infusiones de las hojas tienen propiedades antiespasmódicas, astringentes y gástricas [124, 126], ayudan al tratamiento de la diabetes y úlceras gástricas [126]. Los pétalos y flores son usados para el alivio de inflamaciones oculares [126, 169].

El estudio de toxicidad aguda es el primer paso en la investigación de una sustancia desconocida dentro de un enfoque farmacológico. El método usado en este estudio se basa en la suposición de que la toxicidad del extracto investigado es completamente desconocida y en el propósito de determinar el índice de toxicidad aguda (DL_{50}) empleando un número mínimo de animales experimentales [150].

Acerca de la toxicidad, *A. diversifolia* mediante el método de Lorke, la $DL_{50}=141.4$ mg/kg para el extracto hexánico (no activo), $DL_{50}=928.3$ mg/kg para el extracto etanólico (activo) y $DL_{50}=118.3$ mg/kg para el fármaco de referencia tramadol administrados vía i.p. obtenido en ratones. De acuerdo con *Victoria et, al. 2006* [133] la administración del extracto acuoso de *A. Squamosa* L. por vía oral tampoco produce toxicidad aguda probado en ratas y ratones en dosis de 10 y 15.67 g/kg, respectivamente. Para *A. squamosa* se reportó que el extracto acuoso produce una toxicidad moderada en los ojos de conejos, mientras que no hubo efectos probado en las orejas [132]. De hecho, la toxicidad de las annonas parece depender de la parte de la planta, por sus componentes químicos y del modelo experimental utilizado. La toxicidad de las annonas en algunos casos es benéfica: por ejemplo, las acetogeninas son tóxicas para microorganismos, parásitos o insectos ya que se han reportado sus actividades como insecticidas, citotóxicas útiles como antitumorales antibacterianas, pesticidas o antihelmínticas [162, 170]. Pero en lo que corresponde a los humanos, se debe tener cuidado en su consumo crónico o en altas concentraciones ya que una especie de Parkinsonismo se ha asociado con el consumo de infusiones o decocciones de las hojas de la guanábana (*A. muricata*) posiblemente por su contenido en acetogeninas como la anonacina, la cual se considera potencialmente tóxica por inducir lesiones cerebrales en ratas [171] y neurodegeneración específicamente en los ganglios basales sobre neuronas dopaminérgicas como se ha observado en la patología humana [172, 173]. Hay que considerar que estos experimentos se realizaron con infusión intravenosa en las ratas. Como se ha mencionado la vía de administración es importante y para el consumo de tés de annonas es más segura la vía oral. Sin embargo, estudios de toxicidad más detallados tanto para administración aguda

como crónica son sugeribles para demostrar la seguridad en el uso de estas especies con utilidad terapéutica para tratar el dolor.

Los resultados de esta tesis permiten tener un cernimiento preliminar de la eficacia y potencia del efecto analgésico del extracto de *A. diversifolia* en comparación con el analgésico tramadol y permiten corroborar las propiedades farmacológicas que se le atribuyen a esta especie en la medicina tradicional. Considerando que las dosis a las cuales se observan efectos adversos en los ratones son relativamente altas y que rebasan las concentraciones que podría consumir el humano, su uso como planta medicinal es seguro. Sin embargo, lo más conveniente es realizar más pruebas de toxicidad para reforzar la seguridad de su uso, sobre todo por el contenido de alcaloides y acetogeninas, que se sabe están presentes en las especies de *Annona*.

8. CONCLUSIÓN.

Los resultados obtenidos en este estudio permiten presentar un cernimiento preliminar de la eficacia y potencia antinociceptiva que posee el extracto de *A. diversifolia* en comparación con tramadol en situaciones de dolor visceral y dolor agudo e inflamatorio de tipo artritis gotoso. Lo anterior debido a que el efecto antinociceptivo se probó en los modelos experimentales de estiramiento abdominal “writhing” en ratones y el modelo PIFIR en ratas en los que se evalúan dichos tipos de dolor, respectivamente. Por lo que las conclusiones son que:

- ⌘ Se corroboran las propiedades de las hojas de *A. diversifolia* atribuidas en la medicina tradicional para el tratamiento del dolor de tipo visceral y artrítico gotoso.
- ⌘ Considerando que el extracto etanólico de *A. diversifolia* fue el más activo y se encontró que diferentes fracciones y subfracciones mantienen la actividad, ello permite suponer que más de un componente químico está mediando la propiedad farmacológica atribuida a esta especie.
- ⌘ La eficacia antinociceptiva del extracto en comparación con la de tramadol es igualmente adecuada para disminuir la nocicepción visceral, mientras que para la nocicepción de tipo gotoso el extracto es menos eficaz.
- ⌘ Toxicidad observada solo a altas dosis en ratones permite sugerir seguridad en la administración aguda de esta planta en la medicina tradicional.

9. PERSPECTIVAS.

El presente estudio farmacológico corrobora los efectos del extracto de *A. diversifolia* sobre el SNC; esto permite considerarlo candidato para estudios que conlleven a aislar fracciones y/o compuestos puros de utilidad terapéutica en las afecciones de este sistema. Los estudios a proponer son:

- ⌘ Fraccionamiento biodirigido del extracto etanólico de las hojas de *A. diversifolia*.
- ⌘ Estudio fitoquímico del extracto de las hojas de *A. diversifolia*.
- ⌘ Caracterización e identificación de los compuestos activos contenidos en el extracto de las hojas de *A. diversifolia*.
- ⌘ Búsqueda de los mecanismos de acción de los compuestos activos.
- ⌘ Búsqueda de otras actividades farmacológicas.

10. BIBLIOGRAFÍA.

1. Covarrubias G. Las clínicas del dolor en México. *Rev Mex Anestesiología*. 2008. 31: 66-70.
2. Bassols A, Bosch F, *et al*. Epidemiología del dolor en la población general. *Dolor*. 2000. 15: 149-58.
3. Smith H, Elliot M, *et al*. The impact of chronic pain in the community. *Family Practice*. 2001. 18: 292-9.
4. González A, Condón J. Incapacidad por dolor lumbar en España. *Med Clin Barc*. 2000. 114: 491-2.
5. Breivik H. *et al*. Survey of chronic pain in Europe: Prevalence, impact on daily life, and treatment. *Eur J of Pain*. 2006. 10: 287–333.
6. Bistre S. El dolor crónico en América Latina. *Rev Iberoamericana del Dolor*. 2007. 3: 7-9.
7. Catalá E, Reig E, *et al*. Prevalence of pain in the Spanish population: telephone survey in 5 000 homes. *Eur J Pain*. 2002. 6: 133-140.
8. Verhaak M, Kerssens J, *et al*. Prevalence of chronic benign pain disorder among adults: a review of the literatura. *Pain*. 1998. 77: 231-9.
9. Herr A, Garand L. Assessment and measurement of pain in older adults. *Clin Geriatr Med*. 2001. 17: 457-478.
10. Helme D, Gibson J. The epidemiology of pain in elderly people. *Clin Geriatr Med*. 2001. 17: 417-431.
11. Houssay A, Angolani H. Fisiología Humana. 7ª edición. Editorial El Ateneo. Buenos Aires, Argentina. 2000.

12. Kalant H, Roschlau W. Principios de Farmacología Médica. 6ª Edición. Oxford University Press. México S.A de C.V. México D.F. 2002
13. Guyton A. Tratado de Fisiología Médica. Editorial. Interamericana Mc Graw Hill. 9ª edición. México D.F. 1996.
14. Gannong W. F. Fisiología Médica. 20ª edición. Editorial. El Manual Moderno. México D.F. 2006.
18. Tamorri E. Neurociencias y Deporte. Psicología deportiva. Procesos mentales del atleta. Edit. Paidotribo. Barcelona España. 2004.
22. Villoria C, Madrid L. Bases anatómicas, fisiológicas y biológicas del dolor. Teorías. Estudio y tratamiento del dolor agudo y crónico Tomo I. Editorial. Libro del año. 1994.
23. Fields H, Martin B. Dolor, fisiopatología y tratamiento: Harrison: Principios de Medicina Interna, 13ª edición. Editorial. Interamericana Mc Graw-Hill. vol. I. 1994.
24. Rubin I, Papich G. Clinical uses nonsteroidal anti-inflammatory drugs in companion animal practice – Part I: The inflammatory response and mechanism of action. *Canine practice*. 1990. 15: 29-33.
25. Petruska K, Tominaga D, *et al*. Molecular biology of pain: should clinicians care? *Rev Soc Esp Dolor*. 2001. 8: 332-336
26. Jahr, C.E. and Jessell, T.M. ATP Excites a subpopulation of rat dorsal horn neurons. *Nature* 304, 730-733.
27. Lewis T. Pain, 1ª edition. Editorial Macmillan, New York, 1942.
28. Padi S, Kulkarni K. Minocycline prevents the development of neuropathic pain, but not acute pain: Possible anti-inflammatory and antioxidant mechanisms. *Eur J Pharmacol*. 2008. PMID: 18952075.

29. Ortega A, Roca A. *et al.* Animal models of pain. A critical view. *Rev Soc Esp Dolor.* 2002. 9: 447-453.
30. Zimmermann M. Behavioural investigations of pain in animals. In: Duncan IJH, Molony Y, eds. *Assessing pain in farm animals.* Bruxelles: *Office for Official Publications of the European Communities.* 1986. pp. 16–29.
31. Micó A, Ortega A. Modelos animales de dolor. *Reumatol Clin.* 2006. 2: S2-4.
32. Hargreaves K, Dubner R, Brown F, Flores C, Joris J. A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. *Pain* 1988. 32: 77-88.
33. Woolfe G, MacDonald AL. The evaluation of the analgesic action of pethidine hydrochloride. *J Pharmacol Exp Ther.* 1944. 80: 300-307.
34. Jasmin L, Kohan L, Franssen M, Janni G, Goff JR. The cold plate as a test of nociceptive behaviors: description and application to the study of chronic neurophatic and inflammatory pain models. *Pain* 1998. 75: 367-382.
35. Collier HO, Warner BT, Skerry RJ. Multiple toe pinch for testing analgesic drugs. *Br J Pharmacol* 1961. 17: 28-40.
36. Green AF, Young PA, Godfrey EI. A comparison of heat and pressure analgesimetric methods in rats. *Br J Pharmacol* 1951 6: 572-585.
37. Borszez GS, Johnson CP, Fahey KA. Comparison of motor reflex and vocalization thresholds following systemically administered morphine, phentanyl and diazepam in the rat: assessment of sensory and performance variables. *Pharmacol Biochem Behav* 1994. 49: 827-834.
38. Evans WO. A new technique for the investigation of some drugs on a reflexive behavior in the rat. *Psychopharmacology (Berl)* 1961. 2: 318-325.

39. Blake L, Graeme ML, Sigg EB. Grid shock test for analgesics in mice. *Med Exp* 1963. 9: 146-150.
40. Charpentier J. On a new psychophysiological method of quantitative measurement of painful reactions in the rat. *C R Seances Soc Biol Fil* 1961. 155: 727-731.
41. Charpentier J. Research on the mechanism of action of certain central analgesics (morphine, pethidine and dextromoramide). *Psychopharmacologia* 1964. 12: 182-197.
42. Charpentier J. Etudes neuro-pharmacologique et électrophysiologique du comportement à la douleur chez le rat. Paris: Librairie Arnette; 1965.
43. Charpentier J. Methods for evaluating analgesics in laboratory animals. En: Soulairac A, Kahn J, Charpentier J, editores. Pain: proceedings of the international symposium on pain organised by the Laboratory of Psychophysiology. New York. Academic Press; 1968. p. 171-200.
44. Accornero N, Bini G, Lenzi GL, Manfredi M. Selective activation of peripheral nerve fibre groups of different diameter by triangular shaped stimulus pulses. *J Physiol (Lond)* 1977. 273: 539-560.
45. Fang ZP, Mortimer JT. Selective activation of small motor axons by quasi-trapezoidal current pulses. *IEEE Trans Biomed Eng* 1991. 38: 168-174.
46. McClane TK, Martin WR. Effects of morphine, nalorphine, cyclazocine and naloxone on the flexor reflex. *Int J Neuropharmacol* 1967. 6: 89-98.
47. Bell JA, Martin WR. The effect of the narcotic antagonists naloxone, naltrexone and nalorfine on spinal cord C-fiber reflexes evoked by electrical stimulation on radiant heat. *Eur J Pharmacol* 1977. 42: 147-154.
48. Duggan AW, Morton CR, Johnson SM, Zhao ZQ. Opioid antagonists and spinal reflexes in the anaesthetized cat. *Brain Res* 1984. 297: 33-40.

49. Miampamba M, Chery-Croze S, Gorry F, Berger F, Chayvialle JA. Inflammation of the colonic wall induced by formalin as a model of acute visceral pain. *Pain* 1994. 57: 327-334.
50. Botella A, Fioramonti J, Eeckhout C, Bueno L. Intracolonic glycerol induces abdominal contraction in rats: role of 5-HT₃ receptors. *Fundam Clin Pharmacol* 1998. 12: 619-623.
51. Jaques R. Antagonism of non-steroidal anti-inflammatory drugs and narcotic analgesics against ethacrynic acid induced writhing. *Arzneimittelforschung* 1977. 27: 1698-1700.
52. Matsumoto C, Nickander R. Epinephrine-induced writhing in mice. *Fed Proc* 1967. 26: 619.
53. Collier HO, Dinneen LC, Johnson CA, Schneider C. The abdominal constriction response and its suppression by analgesic drugs in mouse. *Br J Pharmacol* 1968. 32: 295-310.
54. Sakurada T, Katsumata K, Tan-Ko K, Sakurada S, Kisara K. The capsaicin test in mice for evaluating tachykinin antagonists in the spinal cord. *Neuropharmacol* 1992. 31: 1279-1285.
55. Teiger DG. A test for antinociceptive activity of narcotic and narcotic antagonist analgesics in the guinea pig. *J Pharmacol Exp Ther* 1976. 197: 311-316.
56. Abbot FV, Franklin KB, Westbrook RF. The formalin test: scoring properties of the first and second phases of the pain response in rats. *Pain* 1995. 60: 91-102.
57. Abbot FV, Ocvirk R, Najafee R, Franklin KB. Improving the efficiency of the formalin test. *Pain* 1999. 83: 561-569.

58. Hunskaar S, Fasmer OB, Hole K. Formalin test in mice, a useful technique for evaluating mild analgesics. *J Neurosci Meth* 1985. 14: 69-76.
59. Hunskaar S, Hole K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. *Pain* 1987. 30: 103-114.
60. Rosland JH, Tjølsen A, Mæhle B, Hole K. The formalin test in mice: effect of formalin concentration. *Pain* 1990. 42: 235-242.
61. Lewis T, Kellgren JH. Observations relating to referred pain visceromotor reflexes and other associated phenomena. *Clin Sci* 1939. 4: 47-71.
62. Le Bars D, Gozariu M, *et al.* Animal models of nociception. *Pharmacol Rev.* 2001. 53: 597-652.
63. Cervero F, Laird M. Visceral pain. *Lancet.* 1999. 353: 2145-2148.
64. Koster R., Anderson, M, *et al.* Acetic acid analgesic screening. *Fed Proc.* 1959. 18: 418-420.
65. López F, Salazar A, *et al.* A new model to asses analgesic activity: "Pain-induced functional impairment in the rat (PIFIR)". *Drug Dev Res.* 1993. 28: 169-172.
66. Faires S, McCarty J. Acute arthritis in man and dog after antrasynovial injection of sodium urate crystals. *Lancet.* 1962. 2: 682-686
67. Rojas M, Berrocoso E, *et al.* Role of 5-HT_{1A} and 5-HT_{1B} receptors in the antinociceptive effect of tramadol. *Eur J Pharmacol.* 2005. 21: 21-26.
68. Lozano A. Hiperuricemia y gota: clasificación, clínica y tratamiento. *Offarm.* 2004. 23: 82-89.
69. Guerne A. Mechanisms of microcrystalline inflammation. *Rev Prat.* 1994 44: 161-166.

70. IASP. Ethical Guidelines for Investigations of Experimental Pain in Conscious Animals. *Pain*. 1980. 16: 109-110.
71. González-Darder J. Animal pain models and ethical issues regarding animal experimentation. *Rev Soc Esp Dolor*. 2000. 7: 313-318.
72. González-Darder J. Valor predictivo de los modelos experimentales de dolor crónico, En Carlos S y Baos JE (eds): El Tratamiento del Dolor: del Laboratorio a la Clínica. Doyma, Barcelona. 1994.
73. Becker, A. y Grecksch G. "Flunarizine its effect on cognitive disturbances". *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 1995. 52. 765-769.
74. Vane R, Bottino R. Inflammation and the mechanisms of action of anti-inflammatory drugs. *J Faseb*. 1987. 1: 89-96.
75. Willard E, Lange A, *et al*. The use of aspirin in ischemic heart disease, *N Engl J Med*. 1992. 327: 175-181.
76. Lorenzo P, Leza C, *et al*. Analgésicos opiáceos, en *Velázquez Farmacología*, A. Velasco, P. Lorenzo, J. Serrano y F. De Andrés-Trelles (Eds.), 16ª edición. Mc Graw Hill Interamericana. 1993.
77. Gyires K, Zádori S, *et al*. Pharmacological analysis of inhomogeneous static magnetic field-induced antinociceptive action in the mouse. *Bioelectromagnetics*. 2008. 29: 456-462.
78. González B, Escarpín E, *et al*. Bases moleculares del tratamiento del dolor con fármacos opioides. *Rev Esp Med Quir*. 2004. 9: 6-11.
79. Dhawan N, Cesselin F, *et al*. International Union of Pharmacology. XII. Classification of opioid receptors. *Pharmacol Rev*. 1996. 48: 567-592.
80. Jacox A. Carr B, *et al*. Management of cancer pain. Clinical Practice Guideline No. 9. AHCPR Publication No. 94-0592. Rockville, MD. Agency for

- Health Care Policy and Research. U.S. Department of Health and Human Services. *Public Health Service*. 1994.
81. Florez, J. Fármacos analgésicos opiáceos, en *Farmacología Humana*, J. Florez (Ed.), 2ª edición. Masson Salvat, 1992.
 82. Flórez J. Fármacos analgésicos opioides. En: Flórez J, Armijo JA, Mediavilla A, eds. *Farmacología Humana*. 3ª edición. Barcelona: Masson SA, 1997.
 83. Florez J, Faura C. Analgésicos opioides. En: Torres LM, ed. *Medicina del Dolor*. Barcelona: Masson SA, 1997;
 84. Martin, XV. R: Pharmacology of opioids, *Pharmacol Rev*. 1983. 35: 283-323.
 85. Mehlisch R. The efficacy of combination analgesic therapy in relieving dental pain. *J Am Dent Assoc*. 2002. 133: 861-871.
 86. Dayer P, Desmeules J, *et al*. Pharmacologie du tramadol. *Drugs*. 1997. 53: 18-24.
 87. Berrocoso E, Rojas M, *et al*. Differential role of 5-HT_{1A} and 5-HT_{1B} receptors on the antinociceptive and antidepressant effect of tramadol in mice. *Psychopharmacology (Berl)*. 2006. 188:111-118.
 88. Faura C, Moore A, *et al*. Morphine and morphine-6-glucuronide plasma concentrations and effect in cancer pain. *J Pain Symptom Manag*. 1996. 11: 1-8.
 89. Santacaba E, Aliaga L, *et al*. Tratamiento con opioides en el dolor crónico no neoplásico. *Dolor* 1998. 13: 6-22.
 90. Morley S, Makin K. The use of methadone in cancer pain poorly responsive to other opioids. *Pain Rev* 1998. 5: 51-58.
 91. Pablos J. Antiinflamatorios no esteroideos y analgésicos en las enfermedades articulares. *Medicine* 2005. 9: 2117–2123.

-
92. López F. Tratamiento del Dolor en Etiología Oncológica, *FOMECO*. 1994. 2: 515.
93. Dworkin H. y Gitlin J. Clinical aspects of depression in chronic pain patients. *Clin J Pain*. 1991. 7: 79-94.
94. Macíewitch R, Bouckoms A, *et al*. Drug therapy of neuropathic pain», *Clin J Pain*. 1985. 1: 39-49.
95. Schweitzer E, Case G, *et al*. Benzodiazepine dependence and withdrawal in the elderly, *Am J Psychiatry*. 1989. 146: 529-531.
98. Mata R, Rivero F. Curso teórico de Farmacognosia. 2ª versión. UNAM. Facultad de Química. México D. F. 2000.
101. Viesca C. La herbolaria medicinal en el México prehispánico. En: La investigación científica de la Herbolaria Medicinal Mexicana. *Sec de Salud*. México. 1993. 19-34.
102. Morton J. Fruits of warm climates. Ed. Media Incorporated. USA. 1987.
103. Safford E. Classification of the genus *Annona* with descriptions of new and imperfectly known species. *Contributions from the United States National Herbarium*. 1914. 18: 1-68.
104. Popenoe W. Manual of tropical and subtropical fruits. Ed. Hafner Press. N.Y, U.S.A. 1920.
106. Pennington D, Sarukhan J. Manual para la identificación de campo de los principales árboles tropicales de México. INIF-FAO. México, D.F. 1968.
107. Mahdeem H. *Annonas* (*Annona* sp) En: Cultivos marginados (Otra perspectiva de 1942). Hernández, B., J.E. y León, J (Eds) Producción y protección vegetal. FAO, Roma, Italia. 1992. 26: 83-90.

108. Estrada A. Caracterización de la ilama (*Annona diversifolia* Saff) en Salitre Palmarillos, Opio, de Amatepec, Edo de México. Tesis profesional, Departamento de Fitotecnia-UACH. Chapingo, México. 1994. 80 pps.
111. Reyes J. Algunas recomendaciones para el control de perforados de las semillas de annonaceas (*Bephrata* sp. Orden hymenoptera). *Agricultura tropical*. 1967. 23: 530-531.
112. IBPGR. *Annona* spp. In: Genetic Resources of Tropical and Subtropical Fruits and Nuts. ED. *Excluding Resours*. 1986. 20-22.
113. Ibarra R. Clasificación alfabética de las familias de la división angiospermae. México, D.F. 1979.
114. Ibar L. Cultivo del aguacate, chirimoya, mango, papaya. Biblioteca agrícola Aedos. Barcelona, España. 1982.
115. Sánchez O. La flora del valle de México. Ed. Herrero. México, D.F. 1979.
116. Rocha G. Cultivo de la Chirimoya y resultados experimentales alcanzados. Ministerio de agricultura (Ed) Servicio de Investigación y Promoción Agraria. Boletín Técnico No. 59. Lima, Perú. 1965.
117. Arriola F, Menchu C. Caracterización, manejo y almacenamiento de algunas frutas tropicales. Ed. ICAITI. Instituto Centroamericano de Investigación y Tecnología Industrial. Guatemala, Guatemala. 1976.
118. Vidal L. La reproducción sexual y multiplicación vegetativa de las annonaceas. Ed. AGROFRUT Xalapa, Veracruz, México. 1993.
119. Luna M, Gonzáles R. Actividad antibacteriana de extractos de *Annona diversifolia* Safford y *Annona purpurea* Mociño & Sessé Ex Dunal. *Polibotánica*. 2008. 25: 121-125.

120. González M, Navarrete A, *et al.* Some pharmacological effects of the ethanol extract of leaves of *Annona diversifolia* on the central nervous system in Mice. *Phytoterapy Research*. 1998. 12:600–602.
121. González M, Navarrete A, *et al.* Anticonvulsant properties and bio-guided isolation of palmitone from leaves of *Annona diversifolia* Saff. *Plant Med*. 2001. 67: 136–141.
122. González M, Martínez L, *et al.* Palmitone isolated from *Annona diversifolia* induces an anxiolytic-like effect in mice. *Planta Medica*. 2006. 72: 703–707.
123. Narayana L, Sundari T, *et al.* Chemotaxonomy of some Annonaceae. *Curr Sci*. 1981. 50: 1079-1080.
124. Khan R, Kornine K, *et al.* Antibacterial activity of some Annonaceae. Part I. *Fitoterapia*. 1997. 69: 367-369
125. Londershausen M, Leicht W, *et al.* Annonins-Mode of action of acetogenins from *Annona squamosa*. *Pesticide Science*. 1991. 30: 443-445.
126. Calzavara B, Müller H. *Fruticultura Tropical: A. graviroleira (Annona muricata L.)*. Portuguese Belém, EMBRAPA-CPATU, Documentos. 1987. 47: 36.
127. Chang R, Chen L, *et al.* Acetogenins from seeds of *Annona reticulata* L. *Phytochemistry*. 1998. 47: 1057-1061.
128. Cortés D, Figadere B, *et al.* Bis-Tetrahydrofuran Acetogenins from Annonaceae. *Phytochemistry*. 1993. 32: 1467-1473.
129. Joshi D, Baxi A, Baxi J. Free amino acids and sugars of *Annona squamosa* Linn. *Asian J Chem*. 1992. 4: 49-52.
130. Fujimoto Y, *et al.* Annonaceous Acetogenins from the Seeds of *Annona squamosa*. Non-adjacent Bis-tetrahydrofuranic Acetogenins. *Chem. Pharm. Bull*. 1994. 42: 1175-1184.

131. Rai C, Muthana MS. Essential oil from the leaves of *Annona squamosa* . *J Indian Inst Sci.* 1954. 36: 117.
132. Sookvanichsilp N, Gritsanapan W, *et al.* Toxicity testing of organic solvent extracts from *Annona squamosa*: effects on rabbit eyes and ear skin. *Phytother Res.* 1994. 8: 365-368.
133. Victoria C, Morón F, *et al.* Tamizaje fitoquímico, actividad antiinflamatoria y toxicidad aguda de extractos de hojas de *Annona squamosa* L. *Rev Cuba Plantas Med.* 2006. 11: 1-12
134. Moore D, Isidoro E, *et al.* Distribution of 2-carboxyarabinitol among plants. *Phytochemistry.* 1993. 34: 703-707.
135. Sharma K, Behari M. Screening of the compounds isolated from the leaves of *Annona squamosa* for antibacterial activity. *Acta Cienc Indica Chem.* 1992.18: 249-252.
136. Sharma K. Phytosterols: wide-spectrum antibacterial agents. *Bioorg Chem.* 1993. 21: 49-60.
137. Balbaa I, Haggag Y, *et al.* Study of volatile oil content of the leaves of *Annona squamosa* growing in Egypt . *Egypt J Pharm Sci.* 1977. 18: 1-8.
138. Seetharaman R. Flavonoids from the leaves of *Annona squamosa* and *Polyalthia longifolia*. *Fitoterapia.* 1986. 57:198-199.
139. Kim G, Zeng L, *et al.* Muricoreacin and murihexocin C, mono-tetrahydrofuran acetogenins, from the leaves of *Annona muricata*. *Phytochemistry.* 1998. 49: 565-571.
140. Valencia C. Fundamentos de fitoquímica. Edit Trillas S.A. México D. F. 1995.
141. Bruneton J. Farmacognosia; Fitoquímica, Plantas Medicinales. 2ª edición. Edit. Acribia, S. A. España. 2001.

142. Robledo P, González R, *et al.* Evaluación de la toxicidad de acetogeninas anonáceas sobre ninfas de *Periplaneta americana* L. *Boletín del museo de Entomología de la Universidad del Valle*. 2008. 9: 54-61.
143. Martínez S, González J, *et al.* Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutr. Hosp. XVII*. 2002. 6: 271-278.
144. Tsitsa E, Loukis A, *et al.* Polyphenolic compounds of *Ephedra Campylopoda*. *Fitoterapia*. 1987. 58: 200.
145. Kako M, Miura T, *et al.* Hypoglycemic activity of some triterpenoid glycosides. *J Nat Prod*. 1997. 60: 604-605.
146. Bouskela E, Cyrino Z, *et al.* Possible mechanisms for the inhibitory effect of *Ruscus* extract on increased microvascular permeability induced by histamine in hamster cheek pouch. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1994. 24: 281-285.
147. Cherif S, Rahal N, *et al.* A clinical trial of a titrated *Olea* extract in the treatment of essential arterial hypertension. *J. Pharm. Belg*. 1996. 51: 69-71.
148. Estrada A, Katselis S, *et al.* Isolation and evaluation of immunological adjuvant activities of saponins from *Polygala senega* L. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 2000. 23: 27-43.
149. Yoshikawa M, Murakami T, *et al.* Bioactive saponins and glycosides. II. *Senegae Radix*. (2): Chemical structures, hypoglycemic activity, and ethanol absorption-inhibitory effect of E-senegasaponin c, Z-senegasaponin c, and Z-senegins II, III, and IV. *Chem Pharm Bull Tokio*. 1996. 44: 1305-1313.
150. Lorke D. A new approach to practical acute toxicology testing. *Arch Toxicol*. 1983. 54: 275-287.
151. Rowland M, Toser N. Clinical pharmacokinetics: concepts and applications, 2nd ed. Lea and Febiger, *Philadelphia*. 1989. 115-118.

152. Sigma Stat 2.0[®] Statistical Software, 1997, SPSS Inc. Chicago, IL.
153. Estrada L. Jardín Botánico de Plantas Medicinales Maximino Martínez. Ed. Universidad Autónoma Chapingo. *Depto. de Fitotecnia*. 1985. 15-20.
154. López C, Piña B, *et al.* Anxiolytic-like actions of the hexane extract from leaves of *Annona cherimolia* in two anxiety paradigms: possible involvement of the GABA/benzodiazepine receptor complex. *Life Sciences*. 2006. 78: 730-737.
155. Ma W, Quirion R. Up-regulation of interleukin-6 induced by prostaglandin E2 from invading macrophages following nerve injury: an *in vivo* and *in vitro* study. *J Neurochem*. 2005. 93: 664-673.
156. Ribeiro A, Vale L, *et al.* Involvement of resident macrophages and mast cells in the writhing nociceptive response induced by zymosan and acetic acid in mice. *Eur. J. Pharmacol.* 2000. 387: 111-118.
157. Miller E, Rogers K, *et al.* Detection of tumor necrosis factor alpha and interleukin-1 beta in the rheumatoid osteoarthritic cartilage-pannus junction by immunohistochemical methods. *Reumatol Int.* 1993. 13: 77-82.
158. Koga A, Fujita T, Totoki T, *et al.* .Tramadol produces outward currents by activating mu-opioid receptors in adult rat substantia gelatinosa neurones. *Brit J of Pharmacol.* 2005. 145: 602–607.
159. Hara K, Minami K, *et al.* The effects of Tramadol and its metabolite on glycine, gamma-aminobutyric acid A, and N-methyl-d-aspartate receptors expressed in *Xenopus oocytes*. *Anesthesia & Analgesia*. 2005. 100: 1400–1405.
160. González M, Peña E, *et al.* Evaluation of the antinociceptive effect of *Rosmarinus officinalis* L. using three different experimental models in rodents. *J Ethnopharmacol.* 2007. 111: 476–482

161. Martínez L, González E. Antinociceptive activity of *Tilia americana* var. mexicana inflorescences and quercetin in the formalin test and in an arthritic pain model in rats. *Neuropharmacology*. 2009. 56: 564-71.
162. Rupprecht K, Huy H. *et al.* Annonaceous acetogenins: A review. *J Nat Prod*. 1990. 53: 237-278.
163. Cortés D, Myinth S, *et al.* Bioactive Acetogenins from seeds of *Annona cherimolia*. *Phytochemistry*. 1993. 32: 1475-1482.
164. Sahpaz S. González C, *et al.* Annosenegalin and Annogalene: Two cytotoxic mono tetrahydrofuran Acetogenins from *Annona senegalensis* and *Annona cherimolia*. *Phytochemistry*. 1993. 42: 103-107.
165. Chen Y, Chang R, *et al.* Amides from stems from *Annona cherimolia*. *Phytochemistry*. 1998. 49: 1443-1447.
166. Cassady M. Natural products as a source of potential cancer: chemotherapeutic and chemopreventatives agents. *J Nat Prod*. 1990. 53:23-41.
167. Chulía S, Ivorra D, *et al.* Relaxant activity of three aporphine alkaloids from *Annona cherimolia* on isolated aorta of rat. *J Pharmac Pharmacol*. 1995. 47: 647-650
168. Moura J. V. A cultura da graviola em áreas irrigadas. [Portuguese] In: Uma nova opção. Fortaleza, DNOCS.
169. Pinto A. C de Q, *et al.* *Annona* especies. Internacional centre for under utilised crops, University of Southampton SO17 1BJ, UK. 2005.
170. Alali F, Kaakeh W, *et al.* Annonaceous acetogenins as natural pesticides: Potent toxicity against insecticide-susceptible and-resistant German cockroaches (Dictyoptera: Blattellidae) *J Econ Entomol*. 1998. 91: 641-649.

171. Champy P, Höglinger G, *et al.* Annonacin, a lipophilic inhibitor of mitochondrial complex I, induces nigral and striatal neurodegeneration in rats: possible relevance for atypical parkinsonism in Guadeloupe. *J. Neurochem.* 2004. 88: 63-69.
172. Champy P, Melot A, *et al.* Quantification of acetogenins in *Annona muricata* linked to atypical parkinsonism in guadeloupe. *Mov. Disord.* 2005. 20: 1629-1633.
173. Lannuzel A, Höglinger GU, *et al.* M. Is atypical parkinsonism in the Caribbean caused by the consumption of Annonaceae? *J Neural Transm Suppl.* 2006. 153-157.

11. CIBERGRAFÍA

15. <http://fundacionannavazquez.files.wordpress.com/2007/08/dolorneurochem.jpg&imgrefurl>.
16. http://apuntesenfermeria3.iespana.es/2006/sistema_nervioso_periferico.pdf
17. <http://www.anatomia.tripod.com/sistemanervioso.htm>
19. <http://escuela.med.puc.cl/publ/Histologia/paginas/ne40945.html>
20. www.aibarra.org/.../Nervioso/
21. <http://tratado.uninet.edu.c1202b.html>.
58. <http://www.who.int/medicines/areas/traditional/definitions/en/index.html>
59. <http://www.16deabril.sld.cu/apuntes/mnt>
61. <http://www.who.int> Key points: WHO Traditional Medicine Strategy 2002-2005.
62. <http://www.who.int> General guidelines for methodologies on research and evaluation of traditional medicine.
67. http://www.camagro.com/Frutales/pubs/Oportunidades_de_Inversion/Anona.asp
71. <http://www.euroresidentes.com/Alimentos/definiciones/anona-blanca.htm>
72. http://www.rlc.fao.org/es/agricultura/produ/cdrom/contenido/libro09/Cap2_5.htm
174. <http://to2aclick.com/.../2007/06/dolorlamina.jpg>
175. <http://fundacionannavazquez.files.wordpress.com/2007/08/dolorneurochem.jpg>

176. <http://www.webveterinaria.com/virbac/news11/metacam.pdf>
177. (html.rincondelvago.com/gota.html)
178. (www.drscope.com/pac/anestesia-1/b4/an1b4_p17.htm)

APÉNDICE A.

Componentes químicos comunes encontrados en *annonas* [169].

Tabla 10. Algunos de los más comunes compuestos químicos encontrados en diferentes partes de la *Annona cherimolia*, *A. reticulata*, *A. muricata*, *A. senegalensis* y *A. esquamosa*.

COMPUESTOS	REFERENCIAS	A.c.	A.r.	A.m.	A.se.	A.sq.
Acetogeninas						
4-deoxyannoreticuín	Hopp et al., 1998					c
Alumunequin	Cortés et al., 1993b; Duret et al., 1994	r, s				
Annocherin	Woo et al., 2000	s				
Annogalene	Sahpaz et al., 1996	s				
Annoncherimolin	Kim et al., 2001	s				
Annomolin	Kym et al., 2001	s				
Annomonicin	Chang et al., 1993		h			
Annomuracins A, B	Wu et al., 1995 a c			h		
Annomuracin E	Kym et al., 1998			h		
Annonacin 10 one	Wu et al., 1995 a c; Rieser et al., 1996			h,s		
Annonacin A	Wu et al., 1995 a c			s		
Annomuricatin B cyclopeptide	Vhao-Ming et al., 1998			s		
Annonastatin	Nonfon et al., 1990					s
Annopentocin A, B, C	Zeng et al., 1996			h		
Annoreticuín	Chang et al., 1993; Chang et al., 1998		h,s			
Annoreticuín 9	Hopp et al., 1997					c
Annoreticuín 9 one	Chang et al., 1993; Chang et al., 1998		h,s			
Annosenegalín	Sahpaz et al., 1996				s	
Annosquamosins A, B cyclopeptides	Chao-Ming et al., 1997					c
Anonacins	Nonfon et al., 1990					s

Compuestos	Referencias	A.c.	A.r.	A.m.	A.se.	A.sq.
Anonins	Nonfon et al., 199 ; Pinto & Silva, 1994		s	h,s		s
Arianacin	Reiser, 1996			s		
Aromin A	Chen et al., 1999	t,h,s				
Asimicin	Nonfon et al., 1990					s
Bullatacin	Li et al., 1990; Hernandez & Angel, 1997; Hang et al., 1999		s			c,s
Bullatacinone	Li et al., 1990; Duret et al., 1994; Hernandez & Angel, 1997	r				c,s
Chermolin 1	Cortés et al., 1993 b	s				
Cherimolin 2	Cortés et al., 1993 b	s				
Cis-4-deoxyannoreticuín	Hopp et al., 1998					c
Cis-annonacin	Reiser, 1996; Woo et al., 1999 a			s		
Cis-annoarin 10 one	Reiser, 1996			s		
Cis-and trans annomuricin C,D,E	Kim et al., 1998 a			h		
Cis-goniothalamycin	Wu et al., 1995 c; Rieser, 1996			h,s		
Cis,trans-bullatacinone	Chang et al., 1998		s			
Cis,transisomurisolenin	Chang et al., 1998		s			
Cis,trans-murisolinone	Chang et al., 1998		s			
Cyclopeptide muricatonins A,B	Wu et al., 1995 c			s		
Donhexocin	Yu et al., 1998			s		
Epomuricenins A,B	Roblot et al., 1993			s		
Gigantetrocin A	Wu et al., 1995 c			h,s		
Isoannoreticuín	Chang et al., 1993		h			
Isocherimolin 1	Duret et al., 1994	r				
Isomolvizarin 1	Duret et al., 1994	r				
Isomolvizarin 2	Duret et al., 1994	r				

Compuestos	Referencias	A.c.	A.r.	A.m.	A.se.	A.sq.
Javoricin	Reiser, 1996			s		
Liriodenine	Philipov et al., 1994			s		
Laherradurin	Cortés et al., 1993 b	s				
Molvizarin	Hishamet al., 1994		ct			
Muricapentocin	Kim et al., 1998 a			h		
Muricatocins A,B,C	Wu et al., 1995 c			h		
Muricin	Pinto &Silva, 1994			t,h,s		
Muricinin	Pinto &Silva, 1994			s		
Muricatetrocins A,B	Wu et al., 1995 b			h,s		
Muricoreacin	Kim et al., 1998 b			h		
Murihexocin C	Kim et al., 1998 b			h		
Murihexol	Yu et al., 1998			s		
Otivarin	Cortés et al., 1993 a	s				
Panatellin	Gleye et al., 1998			r		
Reticulatacin	Gleye et al., 1998			r		
Reticulatacin 10 one	Gleye et al., 1998			r		
Reticulacinone	Hisham et al., 1994		ct			
Rolliniastatin	Chang et al., 1993		h			
Rolliniastatin 2	Hisham et al., 1994		ct			
Sabedelin	Gleye et al., 1998			r		
Solamin	Myint et al., 1991; Chang et al., 1993; Gleye et al., 1998		h,s	r,s		
Squamocin	Duret et al., 1994; Hernandez & Angel, 1997	r	s			s
Squamone	Li et al., 1990; Chang et al., 1993		h			c
Squamotacin	Hopp et al., 1996					c
Uvariamicin I	Gleye et al., 1998			r		
Uvariamicin IV	Gleye et al., 1998			r		
2,4-cis, trans- annocherinone	Woo et al., 2000	s				
2,4-cis, trans- isoannonacin	Wu et al., 1995 b; Woo et al., 1999 a	s		h		

Compuestos	Referencias	A.c.	A.r.	A.m.	A.se.	A.sq.
2,4-cis, trans-squamoxinone	Hopp et al., 1997					c
2,4-cis, trans-mosinone A	Hopp et al., 1997					c
Alcaloides						
(-) Roemerine	Bhakuni et al., 1972; Oliver-Bever, 1986; Cassady, 1990; You et al., 1995; Chuliá et al., 1995; Fatope et al., 1996	r	h,s		h	h
Anonaine	Yang & Chen, 1970; Bhakuni et al., 1972; Fresno & Cañavate, 1983; Bridg, 1984; Philipov et al., 1995	r,ct,h, p,c,s	r,c	h	r,h,c	r,h,c
Aporphine	Cassady, 1990; Salluja et al., 1990; Maeda et al., 1993; Chuliá et al., 1995; You et al., 1995; Fatope et al., 1996	r	s		h	h
Benzylloquinoline	Maeda et al., 1993		s			
Caffeine	Lizana & Reginato, 1990	s				
Corydine	Oliver-Bever, 1986		h,s			c,r,t,s
Dehydroroemerine	Chuliá et al., 1995	r				
α-Glaucine	Oliver-Bever, 1986					c,r,t,s
Isoboldine	Philipov et al., 1995				r,h,c	
Isocorydine	Oliver-Bever, 1986					c,r,t,s
Isoquinoline	Leboeuf et al., 1981; Maeda et al., 1993		s	h,s,r,c		
Lanuginosine	Fresno &Cañavate, 1983	ct,h,p, c,s				

Compuestos	Referencias	A.c.	A.r.	A.m.	A.se.	A.sq.
Liriodenin	Fresno &Cañavate, 1983; Morton, 1987; Philipov et al., 1995	ct,h,p, c,s	r,c	s	r,h,c	
Norcorydine	Oliver-Bever, 1986					c,r,t,s
Norisocoryline	Bhakuni et al., 1993					h
Pyrimidine- β -carboline	Maeda et al., 1993		s			
Otros compuestos						
β -farnesene essential oil	Leal, 1990					h
α -pirene essential oil	Leal, 1990					h
β -pirene essential oil	Leal, 1990					h
Aliphatic ketone	You et al., 1995				h	
Alkanes	You et al., 1995				h	
Alkanols	You et al., 1995				h	
Aminoacids	You et al., 1995				c	
Amyl caproic acid	Pinto & Silva, 1994			p		
Amyloids	Kooiman, 1967			s		
Annosquamosins A,B diterpenoids	Wu et al., 1996		s			f,c
Cherimoline	Chen et al., 1998	t,h				
Cherimonaine	Chen et al., 1998	t,h				
Coclamine	Khan et al., 1997			p		
Couximine	Khan et al., 1997			p		
Cohibins A,B	Gleye et al., 1997			r		
Dihydroferuloyltyramine	Chen et al., 1998	t,h				
Diterpenes	Mukhophadhyay et al., 1993					r,ct
Ent-kaurenoides	Fatope et al., 1996				cr,t,s,c	
Essential oils (others)	Bridg, 1964; MacLeod & Pieris1981; Jivoretz et al., 1998	h,s	h,r	f	f	s,h
Esthers	Idstein et al., 1984; You et al., 1995	p				

Compuestos	Referencias	A.c.	A.r.	A.m.	A.se.	A.sq.
Flavonoids	Cassady, 1990; Langanson et al., 1994				h	
Geranyl caproic acid	Pinto & Silva, 1994				h	
Kaurane diterpenoids	Adeogan & Durodola, 1976; Maeda et al., 1993; Wu et al., 1996	t,h	s		c	f,r
Lactam amide	Chen et al., 1998	t,h				
Limorene essential oil	Leal, 1990					s
Monoterpenoids	You et al., 1995				h	
Murisolin	Khan et al., 1997			p		
n-trans-caffeoyltyramine	Chen et al., 1998	t,h				
n-cis-caffeoyltiramine	Chen et al., 1998	t,h				
n-cis-feruloylmethoxytyramine	Chen et al., 1998	t,h				
n-cysferuloyltyramine	Chen et al., 1998	t,h				
n-fatty acyl tryptamine	Maeda et al., 1993		s			
n-p-coumaroyltyramine	Chen et al., 1998	t				
n-trans feruloylmethoxytyramine	Chen et al., 1998	t,h				
n-trans feruloyltyramine	Chen et al., 1998	t,h				
Purine	Chen et al., 1998	t				
Reticulin	Khan et al., 1997			p		
Rhamnoside	Salluja et al., 1990					h,s
Saponins	Salluja et al., 1990; Langanson et al., 1994				h	s
Sesquiterpenoids	You et al., 1995				h	
Stepharine	Khan et al., 1997			p		
Steroids	Chen et al., 1998	t				
Sterols	You et al., 1995				h	
Tannins	Burkill, 1996; Langanson et al., 1994	h	h	p	h	

Compuestos	Referencias	A.c.	A.r.	A.m.	A.se.	A.sq.
Trans orimene essential oils	Leal, 1990					s
Volatiles (terpenes hydrocarbons, esters, carbonyls)	Idstein et al., 1984	p				
<p>Abreviaturas : r-raíces ; cr-corteza de raíz; t-tallo; ct-corteza del tallo; h-hoja; f-fruta; p-pulpa; c-corteza; s-semilla.</p> <p>A.c- <i>A. cherimolia</i>; A.r- <i>A. reticulata</i>; A.m- <i>A. muricata</i>; A.se- <i>A. senegalensis</i> y A.sq- <i>A. squamosa</i>.</p>						

APÉNDICE B

Especies de *Annona* usados en la Medicina actual [169].

Tabla 11. Algunos usos de especies de *Annona* en la medicina actual.
Annona cherimolia, *A. reticulata*, *A. muricata*, *A. senegalensis* y *A. esquamosa*.

EFFECTOS BIOACTIVOS EN HUMANOS	COMPUESTOS	REFERENCIAS	A.c.	A.r.	A.m.	A.se.	A.sq.
Aborto	Desconocido	Salluja & Santini, 1990; Asolkar et al., 1992				s	s
Prolapso anal	Desconocido	Chao-Ming et al., 1997			h		h
Antibacterial	Murisolin, couxine, couclamine, stepharine, reticuline	Asolkar et al., 1992; Khan et al., 1997			h		+
Anti-VIH	16 β 17 dihydroxy kauran19oic acid	Wu et al., 1996					f
Propiedades antineuralgicas	Aceites esenciales	Calzavara et al., 1987; Moura, 1988			h		
Actividad antiparasitaria y anhelmintica	Probablemente acetogeninas y aceites esenciales	Calzavara et al., 1987; Bories et al., 1991; Philipov et al., 1994	s		s,h		
Antiespasmodico	Probablemente flavonoides, alcaloides, taninos y saponinas	Moura, 1988; Philipov et al., 1994; Chuliá et al., 1995	r		h,s		
Antiulceroso	Flavonoides	Langanson et al., 1994				h	

efectos bioactivos en humanos	Compuestos	Referencias	A.c.	A.r.	A.m.	A.es.	A.sq.
Astringente	Desconocido	Calzavara et al., 1987; Asokar et al., 1992; Khan et al., 1997	f	c	h,f		
Dispepsia atónica	Desconocido	Calzavara et al., 1987; Khan et al., 1997			f		
Contra piojos y chinches	Acetogeninas, alcaloides, flavonoides, taninos y saponinas	Rupprecht et al., 1990; Bories et al., 1991; Asolkar et al., 1992; Langanson et al., 1994; Hernandez & Angel, 1997; abubaka & Abdurham, 1998	s	h,s,p	s	h,s,f	s
Ardor de garganta	Resinas	Lizana & Reginato, 1990	s		h		
Tratamiento contra el cancer	Cauranos, diterpenoides, acetogeninas	Cassady, 1990; Asolkar et al., 1992; Chang et al., 1993; Hopp et al., 1994; Wu et al., 1995; You et al., 1995; Fatope et al., 1996; Hopp et al., 1996; Reiser et al., 1996; Sahpaz et al., 1996; Zeng et al., 1996; Hopp et al., 1997; Kim et al., 1998 a	s	s,h,c		s,r,ct, h,c	c
Catarsis	Desconocido	Lizana & Reginato, 1990; Asolkar et al., 1992	s				
Agentes quimiopreventivos	Flavonoides	Cassady, 1990	h,c, f,r,s	h,c,f, r,s	h,c,f, r,s	h,c,f, r,s	h,c,f,r ,s
Dolor de pecho	Desconocido	You et al., 1995				r,h	
Colicos	Murisolin, couxine, couclamine, stepharine, reticulín	Khan et al., 1997			f		
Convulsiones	Desconocido	You et al., 1995				r,h	

Efectos bioactivos en humanos	Compuestos	Referencias	A.c.	A.r.	A.m.	A.se.	A.sq.
Depresion (sedante, ansiolitico)	Alcaloides, otros	Bories et al., 1991; Chao-Ming et al., 1997	h		h		r
Diabetes	Desconocido	Calzavara et al., 1987			h		
Diarrea, disenteria	Alcaloides, murisolin, couxine, couclamine, stepharine, reticulín	Calzavara et al., 1987; Leal et al, 1990; Asolkar et al., 1992; Philipov et al., 1995; You et al., 1995; Khan et al., 1997		c	h,f,r	r,c,h	+
Diuretico	Desconocido	Calzavara et al., 1987; Khan et al., 1997			f		
Emetico	Resinas	Calzavara et al., 1987; Lizana & Reginato, 1990; Asolkar et al., 1992;	s		s	+	
Inflamación ocular	Alcaloides, flavonoides, taninos, saponinas	Calzavara et al., 1987; Philipov et al., 1995			f	h	
Filariosis	Desconocido	You et al., 1995; Fatope et al., 1996				r,h	
Procesos gástricos y digestivos, enfermedades intestinales en general, como tonico o laxante	Alcaloides, flavonoides, taninos, saponinas	Leal et al, 1990; Langanzon et al., 1994; Voight et al., 1995; Philipov et al., 1995; You et al., 1995; Khan et al., 1997	h		h	r,c,h	h,r
Hemolisis de globulos rojos	Saponinas	Salluja & Santani, 1990					s
Inmunosupresor	Acetogeninas	Ruprecht et al., 1990	r,s	s	r,h,s	h,s	s
Fotofobia intensa	Resinas	Liza & Reginato, 1990	s				

Efectos bioactivos en humanos	Compuestos	Referencias	A.c.	A.r.	A.m.	A.se.	A.sq.
Enfermedad del hígado, ictericia	Ácidos	Calzavara et al., 1987			p		
Malaria	Murisolin, couxine, couclamine, stepharine, reticulín	Khan et al., 1997			f		
Impotencia sexual masculina	Alcaloides	You et al., 1995				r,h	
Nausea y vómito	Resinas	Calzavara et al., 1987; Lizana & Reginato, 1990; Khan et al., 1997	s		f,s		
Edema	Murisolin, couxine, couclamine, stepharine, reticulín	Khan et al., 1997			f		
Pie de atleta	Ácidos	Calzavara et al., 1987; Asolkar et al., 1992; Philipov et al., 1995	s		p		
Úlceras pépticas	Murisolin, couxine, couclamine, stepharine, reticulín	Khan et al., 1997			f		
Neumonía	Desconocido	Williamson, 1974; Vogt, 1995				c,h	+
Dilatación de la pupila	Resinas	Lizana & Reginato, 1990	s				
Purgante	Alcaloides	Leal, 1990					r

Efectos bioactivos en humanos	Compuestos	Referencias	A.c.	A.r.	A.m.	A.se.	A.sq.
Erupciones, llagas, enfermedades de la piel	Murisolin, couxine, couclamine, stepharine, reticulín	Asolkar et al., 1992; Khan et al., 1997; Voght, 1995; Chen et al., 1998			h		
Problemas reumatológicos	Aceites esenciales	Calzavara et al., 1987; Moura, 1988			h		
Escorbuto	Probablemente vitamina C	Calzavara et al., 1987; Khan et al., 1997			f		
Mordedura de serpiente	Alcaloides	Philipov et al., 1995; Vogt, 1995; You et al., 1995				c,h	
Enfermedad de la columna vertebral	Alcaloides	Chao-Ming et al., 1997					r
Hinchazón	Desconocido	Chao-Ming et al., 1997					h
Tripanosomiasis	Alcaloides, flavonoides, tros	You et al., 1995; Fatope et al., 1996				h	
Enfermedades venereas	Alcaloides	Asolkar et al., 1992; Philipov et al., 1995; Vogt, 1995; You et al., 1995				r,h	+
Infeccion por gusanos	Aceites esenciales, alcaloides, flavonoides, acetogeninas	Nonfon et al., 1990; Bories et al., 1991; Asolkar et al., 1992; Cortés et al., 1993; Philipov et al., 1995; Vogt, 1995; You et al., 1995	s	s	h,s	r,c	

Abreviaturas : r-raíces ; cr-corteza de raíz; t-tallo; ct-corteza del tallo; h-hoja; f-fruta; p-pulpa; c-corteza; s-semilla, + - Planta completa.