



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**EVALUACIÓN DEL EFECTO DE HESPERIDINA Y SU
COMBINACIÓN CON KETOROLACO EN UN MODELO
EXPERIMENTAL DE ARTRITIS EN RATAS**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

DANIEL ALEJANDRO TORRES RÁBAGO



MÉXICO, D.F.

2015



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Prof. Elia Brosla Naranjo Rodríguez

VOCAL: Prof. Alejandro Ortiz Osornio

SECRETARIO: Prof. Ana Laura Martínez Martínez

1er. SUPLENTE: Prof. María Eva González Trujano

2° SUPLENTE: Prof. Ruth Ivonne Téllez Ballesteros

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LABORATORIO DE NEUROFARMACOLOGÍA DE PRODUCTOS NATURALES DEL INSTITUTO NACIONAL DE PSIQUIATRÍA "RAMÓN DE LA FUENTE MUÑIZ".

ASESOR DEL TEMA:

Dra. Ana Laura Martínez Martínez

SUSTENTANTE:

Daniel Alejandro Torres Rábago

DEDICATORIAS:

- A mi madre, por todos esos días y noches de trabajo que dio para poder cubrir cada una de mis necesidades; por su disposición para guiarme, cuidarme, acompañarme en cualquier situación adversa, darme su confianza y corregirme en el momento en que fuera necesario.
- A mi abuelo, por siempre ser un apoyo para mí y mi madre, por abrirnos las puertas de su casa todos estos años y por estar conmigo en los buenos tiempos como en los adversos.
- A mi tía Cristina, porque a pesar de la distancia siempre ha estado pendiente de mí y me ha dado su ayuda cuando la he requerido.
- A mis amigos, por permanecer a mi lado y valorarme tanto con mis cualidades como con mis defectos.

AGRADECIMIENTOS:

A la Dra. Ana Laura Martínez Martínez por su paciencia, dedicación, confianza, y por haber compartido conmigo parte de su experiencia y conocimientos para poder realizar el presente trabajo.

A la Dra. María Eva González Trujano por haberme brindado la oportunidad de integrarme al equipo de trabajo que dignamente representa, y darme su apoyo a lo largo de mi estancia en su laboratorio.

Al Dr. Héctor Isaac Rocha González y al M. en C. José Eduardo Roa Coria de la Escuela Superior de Medicina del Instituto Politécnico Nacional por su colaboración en éste trabajo.

ÍNDICE

	Página
Índice de figuras.....	i
Índice de tablas.....	iii
Abreviaturas.....	iv
Resumen.....	vi
1. Marco teórico.....	1
1.1 La artritis.....	1
1.1.1 Tipos de artritis.....	1
1.1.2 Generalidades de la AR.....	3
1.1.2.1 Factores desencadenantes probables.....	3
1.1.2.2 AR y su relación con el dolor.....	4
1.1.2.3 Datos epidemiológicos.....	5
1.1.2.4 Terapéutica de la AR.....	6
1.1.2.4.1 Tratamiento farmacológico.....	6
1.1.2.4.2 Tratamiento alternativo.....	20
2. Justificación.....	32
3. Hipótesis.....	33
4. Objetivos.....	33
5. Metodología.....	34

6. Resultados.....	41
6.1 Índice de artritis experimental.....	41
6.2 Cuantificación de la inflamación.....	44
6.3 Cuantificación de los umbrales nociceptivos.....	49
6.4 Cuantificación de niveles de TNF- α , IL-1 β e IL-6.....	54
6.5 Evaluación del daño gastrointestinal.....	54
7. Discusión.....	57
8. Conclusión.....	63
9. Perspectivas.....	63
10. Bibliografía.....	64
11. Cibergrafía.....	74
12. Anexo 1.....	76

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Ejemplos de algunos tipos de artritis	1
Figura 2. Estructura química de algunos AINEs	7
Figura 3. Mecanismo de acción general de los AINEs y glucocorticoides	8
Figura 4. Estructura química de algunos glucocorticoides	13
Figura 5. Estructura base de los flavonoides	26
Figura 6. Estructuras químicas de los flavonoides	27
Figura 7. Estructuras químicas de hesperidina, hesperetina y rutinosa	30
Figura 8. Estructura molecular de diosmina	31
Figura 9. Pletismómetro	38
Figura 10. Analgesímetro	39
Figura 11. Curso temporal del índice de artritis en ratas hembra con artritis inducida por colágeno	42
Figura 12. Efecto anti-artrítico de la combinación de hesperidina + ketorolaco en ratas hembra con artritis inducida por colágeno	43
Figura 13. Curso temporal del desarrollo de la inflamación en ratas hembra con artritis inducida por colágeno (extremidad posterior derecha)	45
Figura 14. Curso temporal del desarrollo de la inflamación en ratas hembra con artritis inducida por colágeno (extremidad posterior izquierda)	46
Figura 15. Efecto anti-inflamatorio total de la combinación de hesperidina + ketorolaco en ratas hembra con artritis inducida por colágeno (extremidad posterior derecha)	47
Figura 16. Efecto anti-inflamatorio total de la combinación de hesperidina + ketorolaco en ratas hembra con artritis inducida por colágeno (extremidad posterior izquierda)	48
Figura 17. Curso temporal de la hiperalgesia mecánica en ratas hembra con artritis inducida por colágeno (extremidad posterior derecha)	50
Figura 18. Curso temporal de la hiperalgesia mecánica en ratas hembra con artritis inducida por colágeno (extremidad posterior izquierda)	51

Figura 19. Efecto anti-hiperalgésico total de la combinación de hesperidina + ketorolaco en ratas hembra con artritis inducida por colágeno (extremidad posterior derecha)	52
Figura 20. Efecto anti-hiperalgésico total de la combinación de hesperidina + ketorolaco en ratas hembra con artritis inducida por colágeno (extremidad posterior izquierda)	53
Figura 21. Efecto de la combinación de hesperidina + ketorolaco en los niveles de citocinas pro-inflamatorias de suero de ratas hembra con artritis inducida por colágeno	55
Figura 22. Daño gástrico inducido por la administración de la combinación de hesperidina + ketorolaco en ratas hembra con artritis inducida por colágeno	56

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Comparación de los fármacos anti-inflamatorios no esteroideos y coxib utilizados con más frecuencia	10
Tabla 2. Fármacos modificadores de la AR	15
Tabla 3. Agentes biológicos para el tratamiento de la AR	17
Tabla 4. Agentes biológicos para el tratamiento de la AR (continuación)	18
Tabla 5. Agentes biológicos para el tratamiento de la AR (continuación)	19
Tabla 6. Plantas medicinales usadas en el tratamiento de enfermedades reumáticas	21
Tabla 7. Productos naturales que exhiben potencial anti-artrítico en estudios preclínicos y sus blancos moleculares	23
Tabla 8. Algunas fuentes dietéticas de flavonoides	25

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AINE	Anti-inflamatorio no esteroideo
ANADEVA	Análisis de varianza
AR	Artritis reumatoide
bFARME	Fármaco modificador de la enfermedad biológico
°C	Grados Celsius
COX	Ciclooxigenasa
cm	Centímetros
E.E.M.	Error estándar de la media
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas)
g	Gramos
GMCSF	Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor (Factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos)
GSH	Glutación
h	Horas
12-HPETE	Ácido 12-hidroperoxieicosatetraenoico
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (Cromatografía de líquidos de alta eficacia)
IFN	Interferón
IL	Interleucina
i.p.	Intraperitoneal
kg	Kilogramo
LOX	Lipooxigenasa
M	Molar
MAC	Medicina alternativa y complementaria
mg	Miligramos
min	Minutos
mL	Mililitros

μL	Microlitros
NADA	N-araquidonoildopamina
NF-kB	Factor de transcripción nuclear kB
nm	Nanómetros
ON-GMPc-K ⁺	Cascada de señalización clásica del óxido nítrico
PG	Prostaglandinas
pg	Picogramos
pH	-log[H ⁺]
pka	-log[ka]
PIFIR	Modelo de disfunción inducida por dolor en ratas
s	Segundo
s.s.	Solución salina
SNC	Sistema nervioso central
T.G.I.	Tracto gastrointestinal
USD	Dólar americano

RESUMEN

La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad inflamatoria, sistémica, crónica y discapacitante que afecta del 0.3-1.6% la población mexicana en edades productivas, siendo más frecuente en mujeres que en hombres. A pesar de que en la actualidad existen diferentes fármacos para tratar los síntomas y el progreso de ésta enfermedad, su uso crónico está limitado a la eficacia y toxicidad. En países en vías de desarrollo, el uso de fármacos biológicos con eficacia demostrada, tanto en estudios preclínicos como clínicos, resulta de elevado costo y restringe su uso a una gran cantidad de pacientes. Por lo tanto, la investigación de nuevas alternativas terapéuticas para el tratamiento de la artritis reumatoide sigue siendo un reto. Una alternativa a esta problemática de salud es el uso de productos naturales en combinación con fármacos de eficacia comprobada, pero que permitan reducir dosis para que a su vez se disminuyan los efectos adversos; permitiendo así tratar la inflamación y el dolor crónico asociados a la AR de manera efectiva y segura. Por lo anterior, el objetivo de este proyecto de tesis fue evaluar el efecto anti-inflamatorio y anti-hiperalgésico de hesperidina (flavonoide natural) en combinación con ketorolaco (fármaco anti-inflamatorio no esteroideo) utilizando el modelo de artritis experimental inducida por colágeno tipo II. La artritis experimental se indujo en ratas hembra Wistar mediante la inmunización con una emulsión (1:1) de colágeno II en el adyuvante completo de Freund. Los resultados obtenidos muestran que la administración de hesperidina (562.3 mg/kg, i.p.) + ketorolaco (0.56 mg/kg, i.p.) en dosis repetidas durante 5 días (1 diaria) produce un efecto anti-inflamatorio y anti-hiperalgésico significativo en ratas artríticas en comparación con la administración de los tratamientos individuales. La administración de la combinación también redujo los niveles séricos de las citocinas pro-inflamatorias TNF- α , IL-1 β e IL-6 asociadas al desarrollo de la artritis experimental. Adicionalmente, la administración de esta combinación no produjo daño gástrico en comparación con la administración del tratamiento individual con ketorolaco. En conclusión, los resultados del presente proyecto dan evidencia de la interacción sinérgica entre hesperidina y ketorolaco sugiriendo su potencial como alternativa terapéutica para el tratamiento de la artritis reumatoide.

1. MARCO TEÓRICO

1.1 La artritis

La palabra artritis significa inflamación de las articulaciones. Este término se usa para describir más de 100 enfermedades y trastornos reumáticos que afectan las articulaciones, los tejidos que las rodean y otros tipos de tejido conectivo. Las características, gravedad y localización de los síntomas varían según la forma específica de la enfermedad (National Center for Chronic Disease Prevention and Health Promotion, 2011).

1.1.1 Tipos de artritis

Los tipos más comunes de artritis son: artritis juvenil, fibromialgia, gotosa, osteoartritis, artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico (Fig. 1) (National Center for Chronic Disease Prevention and Health Promotion, 2011).



Figura 1. Ejemplos de algunos tipos de artritis (Tomadas de Medline Plus).

a) Artritis Juvenil.- Comprende un grupo diverso de trastornos autoinmunes que afecta a niños menores de 16 años, que comparten como característica común la artritis con duración de al menos 6 semanas (Eisenstein y Berkun, 2014). Estos incluyen la artritis reumatoide juvenil, artritis crónica juvenil y la artritis idiopática juvenil. La artritis juvenil puede implicar una o varias articulaciones y causar otros síntomas como fiebre, erupción cutánea y/o inflamación de ojos. (American College of Rheumatology, 2013).

b) Fibromialgia.- Es una enfermedad caracterizada por dolor crónico generalizado y difuso del músculo esquelético acompañado de fatiga, problemas del sueño, la memoria y del humor. Aunque la fibromialgia se considera una condición relacionada con la artritis, no es realmente una forma de artritis ya que no causa inflamación o daño de las articulaciones, los músculos y otros tejidos. No obstante, si se considera una condición reumática, ya que es una enfermedad que afecta las articulaciones y/o los tejidos blandos produciendo dolor crónico. (National Institute of Arthritis and Musculoskeletal and Skin Diseases, 2014).

c) Artritis gotosa.- La gota es una enfermedad que se ocasiona por la acumulación tisular de grandes cantidades de ácido úrico y productos finales del metabolismo de las purinas. Se caracteriza por episodios recurrentes de artritis aguda, que a veces es acompañada por la formación de agregados cristalinos de gran tamaño llamados tofos, y por la deformación de las articulaciones. Lo anterior es debido a la precipitación de los cristales de urato monosódico desde los fluidos corporales hipersaturados (Kumar y cols., 2008).

d) Osteoartritis.- Es una enfermedad de las articulaciones que con frecuencia avanza con lentitud y generalmente se presenta en personas de mediana edad y de la tercera edad. La enfermedad se produce cuando el cartílago de la articulación se deteriora, con frecuencia debido a la tensión mecánica o las alteraciones biomecánicas, esto hace que el hueso que se encuentra debajo del cartílago funcione de forma inadecuada; tiende a afectar las articulaciones que se utilizan con frecuencia, como las manos, columna y las

articulaciones que soportan el peso corporal, como las caderas y las rodillas. (American College of Rheumatology, 2012).

e) Lupus Eritematoso Sistémico.- Es una enfermedad autoinmune sistémica que afecta predominantemente a las mujeres, producida por una respuesta inmune dirigida contra autoantígenos en su mayoría intranucleares. Afecta múltiples órganos, incluyendo riñones, articulaciones, sistema nervioso y los órganos hematopoyéticos. Las manifestaciones clínicas del lupus incluyen erupciones en la piel, fotosensibilidad, úlceras orales, artritis, serositis (pleuritis o pericarditis), glomerulonefritis, síntomas neurológicos (por ejemplo, convulsiones), anemia hemolítica, leucopenia y trombocitopenia (Crispín y cols., 2010).

f) Artritis Reumatoide (AR).- La AR es una enfermedad inflamatoria, sistémica y crónica que es potencialmente discapacitante que ocasiona sinovitis simétrica de articulaciones grandes y pequeñas que puede conducir a la destrucción articular progresiva (Mendoza y cols., 2013). Las manifestaciones más comunes de la enfermedad incluyen dolor e inflamación crónica, rigidez, disminución de la movilidad de la articulación que resulta en discapacidad e invalidez temporal o permanente, así mismo se asocia con morbilidad y mortalidad en la población (Mould y cols., 2008).

1.1.2 Generalidades de la AR

1.1.2.1 Factores desencadenantes probables

La causa de la AR no se conoce aún pero el sistema inmunológico es importante en la inflamación y el daño que ésta enfermedad le ocasiona a las articulaciones, también existen condicionamientos genéticos en el desarrollo de la AR. La asociación se presenta con HLA-DR4 y sus subtipos DW4, Dwl4 en personas caucásicas (el HLA-DR4 es una molécula de HLA clase II situada en el cromosoma 6). (Hernández-Valero MA & Prieto MA, 2008).

Un factor o factores iniciadores desconocidos serían los que desencadenarían la patogenia de la enfermedad. La presentación de estos antígenos a los linfocitos T CD4

estimularía la expresión de citocinas y de los linfocitos B con la consiguiente producción de anticuerpos. (Hernández-Valero MA & Prieto MA, 2008).

Se cree que la AR resulta de la desregulación de citocinas pro-inflamatorias, enzimas pro-inflamatorias que median la producción de prostaglandinas (PG) (ciclooxigenasa, COX) y los leucotrienos (lipooxigenasa, LOX), junto con la expresión de moléculas de adhesión y metaloproteinasas de la matriz, y la hiperproliferación de fibroblastos sinoviales. Todos estos factores son regulados por la activación del factor de transcripción nuclear kB (NF-kB) (Khana y cols., 2007).

En el sinovio, durante la sinovitis crónica, las citocinas proinflamatorias predominantes son la interleucina 1 beta (IL-1 β), factor de necrosis tumoral α (TNF- α ; por sus siglas en inglés Tumor Necrosis Factor-alpha), interleucina 6 (IL-6) y el factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos (GM-CSF), que son producidas por los fibroblastos y los macrófagos. Las células de la estirpe monocito-macrófago, más que los linfocitos T son fundamentales en el proceso inflamatorio crónico. Las citocinas anteriores por un lado estimulan la producción de moléculas de adhesión y por otro inducen la producción de enzimas proteolíticas responsables de la destrucción del cartílago y del hueso (Hernández-Valero MA & Prieto MA, 2008). En consecuencia, compuestos que supriman la expresión de TNF- α , IL- β , COX, LOX, metaloproteinasas de la matriz o moléculas de adhesión o que supriman el NF-kB, poseen potencial para el tratamiento de la AR (Khana y cols., 2007).

1.1.2.2 AR y su relación con el dolor

El dolor es uno de los síntomas más comunes en pacientes con AR y está asociado con una disminución de la funcionalidad de los miembros afectados, así como con una pobre calidad de vida. La inflamación periférica es la causa más común del dolor en AR. Sin embargo, también otros factores, como los mecanismos centrales del dolor participan en la experiencia dolorosa. A nivel local, los mediadores del dolor y la inflamación que se liberan de la membrana sinovial del hueso y otros tejidos inducen la

sensibilización de los nociceptores articulares, a lo que se le conoce como sensibilización periférica. El correlato clínico de esta sensibilización a nivel periférico es que los síntomas músculo-esqueléticos son localizados con una estrecha relación con estímulos mecánicos tales como caminar o estar de pie (Kidd y cols., 2007). El tratamiento con agentes anti-inflamatorios y con fármacos modificadores de la enfermedad tales como el metotrexato disminuyen el dolor inflamatorio: sin embargo, queda un dolor remanente que en algunos pacientes es de moderado a severo, y se ha sugerido que este dolor puede generar sensibilización central del sistema nervioso. La sensibilización central se manifiesta clínicamente como un incremento en la percepción del dolor en el sitio del daño, así como también con el desarrollo de dolor y sensibilización en tejidos normales adyacentes al sitio del daño (Lee, 2013).

1.1.2.3 Datos epidemiológicos

La AR afecta del 0.5 al 1% de la población en países desarrollados (Gabriel y cols., 2009) y del 0.3-1.6% de la población mexicana; siendo más frecuente en mujeres que en hombres (Peláez y cols., 2011; Rodríguez y cols., 2011). Contrario a lo que se piensa, afecta a la población de adultos jóvenes en edad productiva entre 20-50 años, por lo que representa un grave problema de discapacidad laboral y a su vez, un fuerte cargo económico para las familias (Álvarez y cols., 2012). En ese sentido se ha estimado que se puede destinar hasta el 15% del ingreso familiar a gastos por AR en nuestro país (Mould y cols., 2008). En México, la AR junto con otras enfermedades reumáticas, son una de las principales demandas de consulta en el primer nivel de atención médica y representan un alto costo a los servicios de salud, ya que sumando gastos por conceptos de consultas médicas (\$1178.7 USD), medicamentos (\$464.7 USD), pruebas diagnósticas (\$40.0 USD) y hospitalización (\$40.8 USD) se obtiene un monto total de \$1724.2 USD por paciente (Mould y cols., 2008).

1.1.2.4 Terapéutica de la AR

1.1.2.4.1 Tratamiento Farmacológico

En la actualidad, el tratamiento convencional involucra el uso de los fármacos modificadores de la enfermedad (FARME) con el fin de retardar la evolución de la destrucción del cartílago y hueso (OMS, 2004) y de los analgésicos anti-inflamatorios no esteroides (AINEs), los inhibidores selectivos de la COX-2 y los corticoesteroides, para ofrecer un rápido alivio sintomático del dolor y la inflamación asociados a la AR (Sharma y Pathak, 2012). En México, el tratamiento farmacológico disponible para la AR consta de fármacos que son clasificados como AINEs, glucocorticoides, FARMEs y agentes biológicos (Secretaría de Salud, 2010).

a) AINEs

Los AINEs son un grupo de fármacos químicamente heterogéneo (Fig. 2); sin embargo, comparten ciertas acciones terapéuticas y efectos adversos. Los AINEs son los fármacos más comúnmente usados alrededor del mundo (Conaghan, 2012) por sus propiedades analgésicas, anti-inflamatorias y antipiréticas (Vane, 2000).

- Mecanismo de acción

Los principales efectos terapéuticos de los AINEs derivan de su capacidad para inhibir de manera no selectiva a la enzima prostaglandina G/H sintasa, también conocida como COX. Se ha demostrado que existen al menos dos isoenzimas de la COX. La COX-1 se expresa de manera constitutiva en la mayoría de las células y es la principal fuente (pero no exclusiva) de PGs para las funciones fisiológicas, tales como la citoprotección gástrica y renal, así como en la hemostasis. Por el contrario, la COX-2 es inducida por estímulos inflamatorios, tales como citocinas, tensión de cizallamiento y promotores de tumores, y es la fuente más importante para la síntesis de PGs que contribuyen al dolor y la inflamación. Como resultado, se cree que la inhibición de la COX-2 media en gran parte las acciones terapéuticas de los AINEs, mientras que la inhibición simultánea de la COX-1 explica en gran medida, pero no exclusivamente, los efectos adversos en el T.G.I. que complican la terapia crónica con AINEs (Grosser y cols., 2011) (Fig. 2).

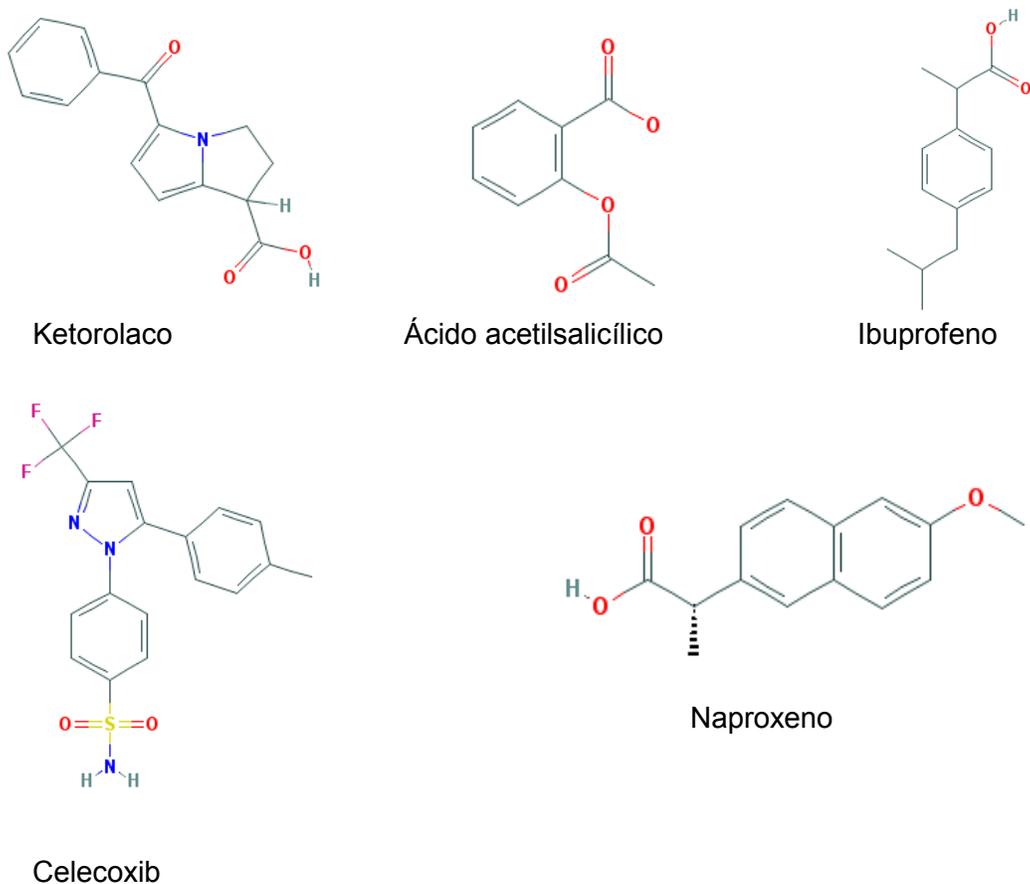


Figura 2. Estructura química de algunos AINEs (Tomadas de Pubchem Database).

La inhibición de la síntesis de PGs en el sistema nervioso central (SNC), y particularmente en la médula espinal (Malmberg y Yaksh, 1992), parece ser una característica de todos los AINEs. Además, el hecho de que ambas isoenzimas de COX se expresen en el SNC (Kaufmann y cols., 1997) y la observación de que la inducción experimental de inflamación periférica está asociada a un aumento en la expresión de COX-2 en la médula espinal (Beiche y cols., 1996) se han utilizado como evidencia que apoya un mecanismo de acción antinociceptivo central de los AINEs (Vanegas, 2002). (Fig. 3)

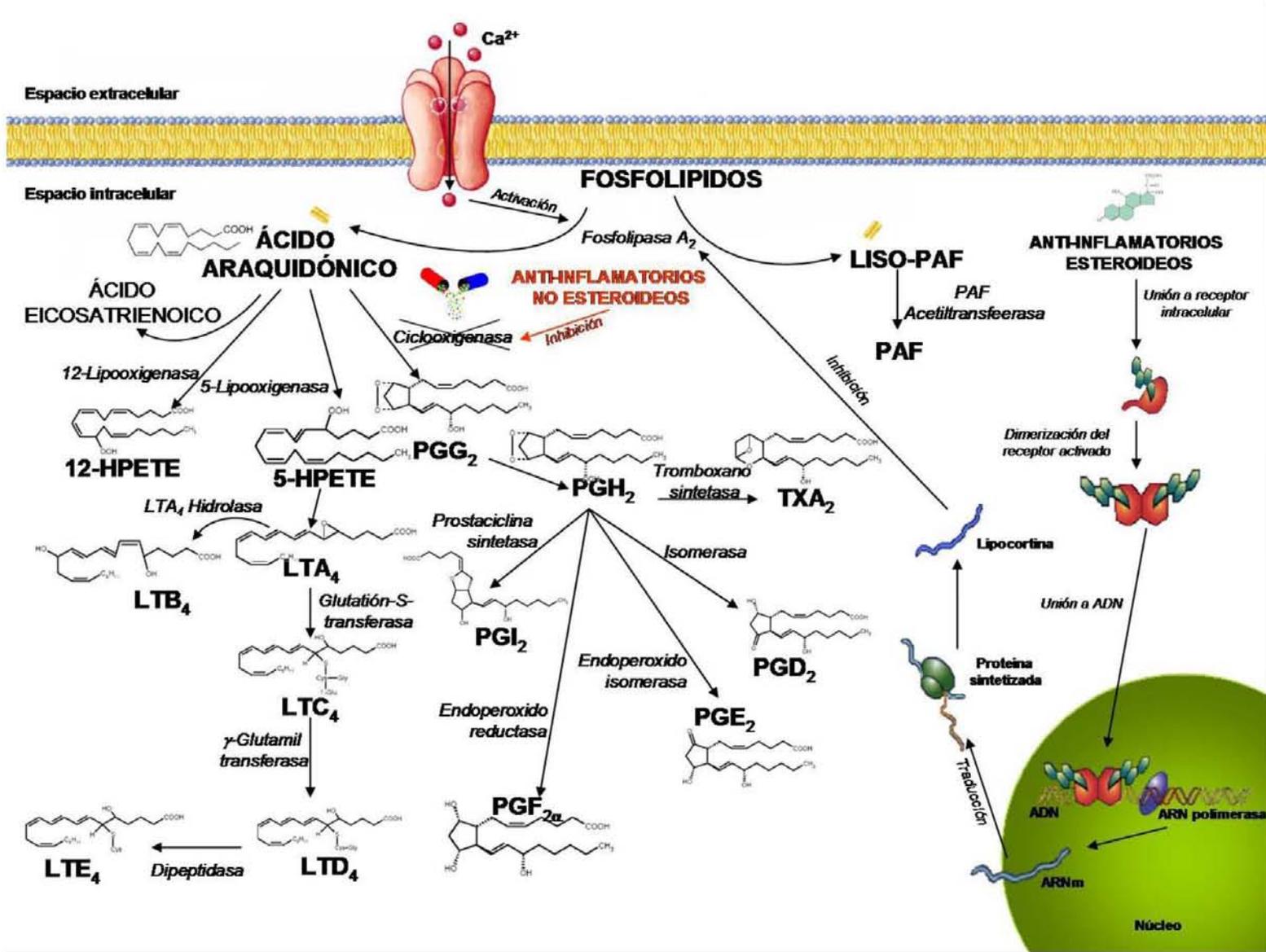


Figura 3. Mecanismo de acción general de los AINEs y glucocorticoides (Modificada de Huerta-Cruz, 2005).

Además, los AINEs también poseen mecanismos de acción independientes de la inhibición de ambas isoformas de COX, incluyendo mecanismos celulares mediados a través de la interferencia con factores de transcripción (Tegeeder y cols., 2001), modulación directa de la actividad de varios canales iónicos (Lee y cols., 2003), activación de la vía L-arginina-ON-GMPc (Déciga y López, 2004), activación de la transmisión serotoninérgica (Pini y cols., 1996), activación de la transmisión adrenérgica (Miranda y cols., 2001), activación de la transmisión opioidérgica (Tortorici y Vanegas, 1994) y disminución de citocinas (Berg y cols., 1999), entre otros mecanismos; aunque cabe destacar que no todos los AINES actúan a través de todos los mecanismos mencionados anteriormente. En la actualidad se comercializan más de 50 AINES diferentes (Rang y cols., 2008), algunos de los compuestos más importantes se enumeran en la tabla 1.

-Ketorolaco

Ketorolaco trometamina cuyo nombre químico es (\pm)-benzoil-2,3-dihidro-1H-pirrolizina-1-ácido carboxílico compuesto con 2-amino-2-(hidroximetil)-1,3-propanediol, es un antiinflamatorio no esteroideo que pertenece a la familia de derivados del ácido heteroaril acético. Es comercializado en forma de mezcla racémica de [-] S y [+] R ketorolaco; el cual puede tener tres formas cristalinas igualmente solubles en agua debido a que tiene un pka de 3.5 y un coeficiente de partición n-octanol/agua de 0.26 (Drugsite Trust, 2015). Su efecto analgésico se debe principalmente a la actividad inhibidora no selectiva sobre COX del isómero-S. Ketorolaco es administrado como tratamiento para el dolor agudo de origen musculoesquelético, dolor postoperatorio y cólico renal (Sinha y cols., 2009). Posee una eficaz actividad analgésica y una moderada actividad antiinflamatoria. En estudios clínicos, una dosis única de ketorolaco es tan efectiva como una de morfina (Buckley & Brogden, 1990). Sin embargo, la frecuente ocurrencia de trastornos gastrointestinales, incluyendo sangrado gastrointestinal, perforación y úlcera péptica limitan su uso crónico. En adición a la inhibición no selectiva de COX, la activación de la vía ON-GMPc-K⁺, conocida como la cascada de señalización clásica

del óxido nítrico, también se ha asociado al efecto antinociceptivo inducido por ketorolaco (Lázaro-Ibáñez y cols. 2001).

Tabla 1. Comparación de los fármacos anti-inflamatorios no esteroideos y coxib utilizados con más frecuencia.

Fármaco	Tipo	ER	Gota	TME	DP	Dis	CyM	Comentarios
Acemetacina	Indol éster	X		X	X			Éster de indometacina
Ácido acetilsalicílico	Salicilato	X		X	X	X	X	Principalmente, aplicación cardiovascular
Ácido mefenámico	Fenamato	X		X	X	X		Actividad moderada
Celecoxib	Coxib	X						Menos T.G.I
Diclofenaco	Fenilacetato	X	X	X	X			Potencia moderada
Diflunisal	Salicilato	X		X	X	X		-
Etodolaco	Piranocarboxilato	X						Posiblemente, menos T.G.I.
Fenoprofeno	Propionato	X		X				Profármaco activado en el hígado
Flurbiprofeno	Propionato	X		X	X	X	X	-
Ibuprofeno	Propionato	X		X	X	X	X	Adecuado para niños
Indometacina	Indol	X	X	X		X		Adecuado en dolor moderado a grave (5-10 en escala numérica).
Ketoprofeno	Propionato	X	X	X	X	X		Adecuado en dolor leve (1-4 en escala numérica)
Ketorolaco	Derivado del ácido heteroaril acético	X	X	X	X	X	X	Adecuado en dolor agudo moderadamente severo (6-8 en escala numérica)
Meloxicam	Oxicam	X	X	X				-
Nabumetona	Naptilalquenona	X						Profármaco activado en el hígado
Naproxeno	Propionato	X	X	X		X		-
Piroxicam	Oxicam	X	X	X				-
Rofecoxib	Coxib	X						Menos T.G.I.
Sulindaco	Indene	X	X	X				Profármaco

ER, enfermedades reumáticas (como artritis reumatoide y artrosis); TME, trastornos músculoesqueléticos; DP, dolor postoperatorio; Dis, Dismenorrea; C, cefalea; M, migraña (Modificada de Rang y cols., 2008).

A través del tiempo, la hipótesis de que el efecto anti-inflamatorio de los AINEs puede ser acompañado de menor potencial ulcerogénico impulsó esfuerzos para diseñar fármacos con mayor selectividad por COX-2 y prácticamente sin efectos sobre COX-1. Estos esfuerzos guiaron a la aprobación y comercialización de rofecoxib, celecoxib y

valdecoxib como inhibidores selectivos de COX-2, conocidos como coxibs, y al desarrollo de otros como etoricoxib y lumiracoxib. En general estos fármacos han demostrado poseer efectos anti-inflamatorios similares a los de los AINEs típicos, pero con menor irritación de la mucosa gástrica (Vane y Warner, 2000).

- Efectos adversos de los AINEs

- Gastrointestinales: Dolor abdominal, náusea, anorexia, erosiones o úlceras gástricas, anemia, hemorragia en el T.G.I., perforación y diarrea.
Nota: Los efectos adversos disminuyen en número con fármacos que muestran selectividad por la COX-2.
- Renales: Retención de sodio y agua, edema, empeoramiento de la función renal en sujetos con nefropatía o cardiopatía y cirrosis, disminución de la eficacia de los antihipertensores y diuréticos, disminución de la excreción de ácido úrico e hiperpotasemia.
- SNC: Cefalalgia, vértigo, mareos, confusión, depresión, disminución del nivel umbral de convulsiones e hiperventilación (salicilatos).
- Plaquetas: Inhibición de la activación de plaquetas, propensión a la aparición de hematomas y mayor riesgo de hemorragia.
Nota: Los efectos adversos están ausentes con fármacos que muestran selectividad por la COX-2.
- Útero: Prolongación de la gestación (hasta más de 42 semanas) y un aumento de un 70 % de la duración del parto.
- Hipersensibilidad: Rinitis vasomotora, edema angioneurótico, asma, urticaria, hiperemia, hipotensión y choque.
- Vasos: Aterosclerosis (Grosser y cols., 2011; Lewis & Schulman, 1973).

-Efectos adversos de inhibidores selectivos de la COX-2

Aunque al parecer los inhibidores selectivos de la COX-2 no afectan el tiempo de sangrado, la inhibición selectiva de la COX-2 podría inducir un desbalance entre la producción del antitrombótico PGI₂, derivado de la COX-2, y el protrombótico TXA₂, derivado de la COX-1, lo que desencadenaría problemas cardiovasculares de tipo trombótico. También se han documentado incrementos en la presión sistólica y diastólica de pacientes que recibieron rofecoxib. Además se han observado problemas “menores” a nivel gastrointestinal y renal, así como un retraso en el tiempo de cicatrización (Lizárraga y cols., 2002).

Es muy probable que los inhibidores selectivos de la COX-2 afecten la remodelación ósea. Sin embargo, resulta difícil predecir si estos efectos serán benéficos o adversos, y muy probablemente dependerán de cada caso. Es factible que sea benéfica en pacientes en los cuales hay una alta formación ósea, pero en otros pacientes bloquearán dicha formación y debilitarán la consolidación ósea, por lo que es necesario determinar para cada inhibidor selectivo de la COX-2 si produce mayor efecto sobre la resorción o formación ósea (Lizárraga y cols., 2002).

b) Anti-inflamatorios esteroides: glucocorticoides

Los glucocorticoides son hormonas sintetizadas y liberadas por la corteza adrenal de forma circadiana y en respuesta al estrés. La secreción de estas hormonas es controlada por el eje hipotálamo-pituitaria-adrenal. Señales internas y externas activan el hipotálamo para inducir la liberación de la hormona liberadora de corticotropina, la cual actúa en la pituitaria anterior para estimular la síntesis y secreción de la hormona adrenocorticotrópica, esta última actúa en la corteza adrenal para estimular la producción y secreción de glucocorticoides. Debido a sus poderosas acciones anti-inflamatorias e inmunosupresoras, los derivados sintéticos de estas hormonas actualmente son usados en la clínica como fármacos eficaces en el tratamiento de la inflamación aguda y crónica en desórdenes autoinmunes como asma, alergia, sepsis, AR, colitis ulcerativa y esclerosis múltiple (Fig. 4). También son prescritos para prevenir el rechazo en trasplantes y el tratamiento de cánceres del sistema linfóide, tales como

leucemias, linfomas y mielomas. Desafortunadamente los beneficios terapéuticos de los glucocorticoides son limitados por los severos efectos adversos desarrollados por el uso crónico (Oakley y Cidlowski, 2013).

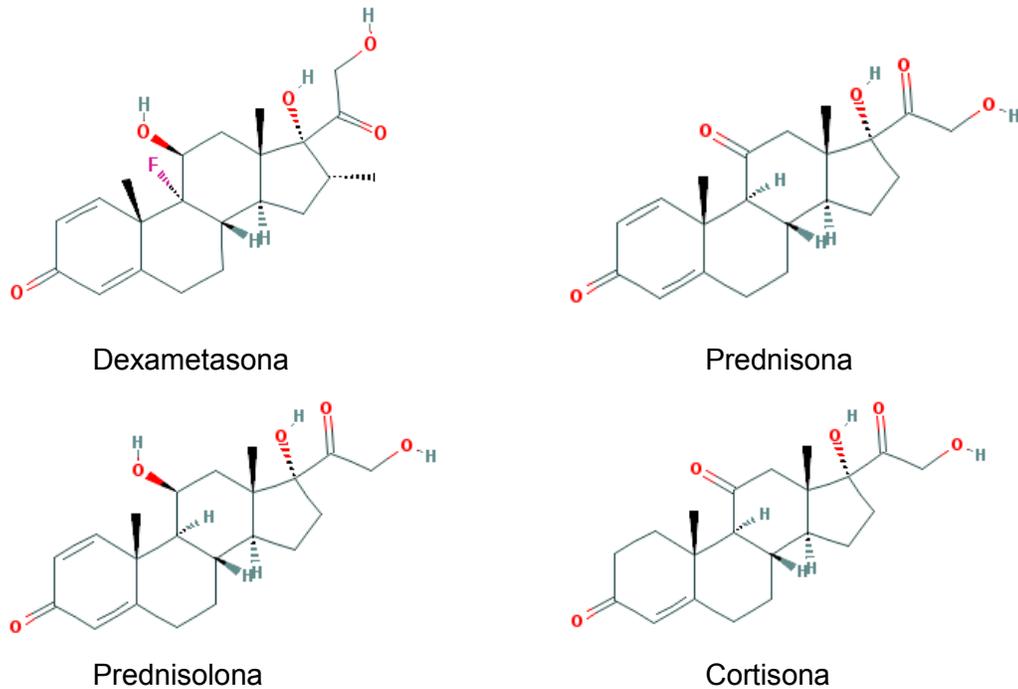


Figura 4. Estructura química de algunos glucocorticoides (Tomadas de Pubchem Database).

- Mecanismo de acción

Las acciones fisiológicas y farmacológicas de los glucocorticoides son mediadas por el receptor de glucocorticoide, un miembro de la superfamilia de receptores nucleares de factores de transcripción dependientes de ligando (Oakley y Cidlowski, 2013).

Los glucocorticoides difunden a través de la membrana celular hacia el citoplasma y se unen al receptor de glucocorticoides. Éste complejo de glucocorticoides-receptor se une reversiblemente a un promotor específico o a sitios supresores de ácido desoxirribonucleico (ADN) en el núcleo, resultando en la producción o inhibición de la transcripción de proteínas anti-inflamatorias (Fig. 3) (Townsend y Saag, 2004).

Una de las principales proteínas cuya producción está regulada positivamente por los glucocorticoides es la lipocortina. Los efectos anti-inflamatorios de la lipocortina son mediados a través de la inhibición de la fosfolipasa A2. Dicha fosfolipasa convierte los fosfolípidos de membrana en ácido araquidónico, con la producción intracelular subsecuente de prostaglandinas, leucotrienos y radicales de oxígeno. Además, mediante la estimulación de la producción de lipocortina, los glucocorticoides también inhiben la producción de varias citocinas proinflamatorias, incluyendo IL-1, IL-2, IL-3, el interferón- γ (IFN- γ), y TNF- α . Los glucocorticoides también han demostrado inhibir la producción de colagenasa, elastasa, y el activador del plasminógeno en los macrófagos. También regula a la baja la activación de COX-2 en células inflamatorias. La disminución en número y función de las células T son otros de los mecanismos propuestos para explicar los efectos de los glucocorticoides en la AR (Townsend y Saag, 2004).

- Efectos adversos

- Parenterales: Irritación del estómago, indigestión, taquicardia, náusea, insomnio y un sabor metálico en la boca.
- Enterales: Aumento de peso, acné, cambios de humor, adelgazamiento de la piel, debilidad muscular, síndrome de Cushing, osteoporosis, diabetes, hipertensión, glaucoma, cataratas, cicatrización lenta, disminución del crecimiento en niños y mayor riesgo de infección (NHS England, 2013).

c) FARMES y agentes biológicos

Los FARMES son un grupo de fármacos con estructuras químicas y mecanismos de acción diferentes, los cuales actúan modificando el proceso de la AR en lugar de combatir los síntomas. No son analgésicos, pero pueden reducir el dolor, la inflamación y la rigidez en un período de semanas a meses al retardar el progreso de la enfermedad y su efecto en las articulaciones ya que inhiben el daño articular, suprimen la respuesta de fase aguda y disminuyen los niveles de anticuerpos (Smolen y cols., 2013).

Los FARMES se dividen en dos clases principalmente: Compuestos químicos sintéticos (sFARMES) (Tabla 2) y agentes biológicos (bFARMES) (Tablas 3, 4 y 5).

Los sFARMES incluyen agentes químicos como el metotrexato, sulfasalacina y leflunomida. De entre éstos, el metotrexato es considerado como un fármaco pilar en el tratamiento de la AR debido a su eficacia y a su perfil de tolerabilidad. Sin embargo, el uso de sFARMES está limitado por su espectro de efectos adversos tales como hepatotoxicidad, pneumonitis intersticial y mielosupresión (Sharma y Pathak, 2012).

Tabla 2. Fármacos modificadores de la AR

sFARMES	Mecanismo de acción	Efectos adversos
Metotrexato (análogo del ácido fólico)	Inhibe de forma competitiva a la enzima dihidrofolato reductasa	Alopecia, fotosensibilidad, rash, sensación de ardor en la piel, dolor abdominal, diarrea, indigestión, náusea, estomatitis, vómito, trombocitopenia, dolor de cabeza, bronquitis, trastorno tromboembólico, síndrome de Steve-Johnson, agranulocitosis, anemia aplásica, cirrosis, fibrosis hepática, hepatitis, hepatotoxicidad aguda, reacción anafiláctica, linfoma maligno, infecciones oportunistas, encefalopatía, convulsiones, falla renal y neumonía intersticial
Leflunomida	Inhibidor de la síntesis de pirimidinas	Alopecia, rash, diarrea, úlceras en la boca, síndrome de Steve-Johnson, agranulocitosis, trombocitopenia, necrosis hepática, aumento de enzimas hepáticas, insuficiencia hepática, anafilaxis, aspergilosis, infecciones oportunistas, enfermedad pulmonar intersticial y neumonía por Pneumocystis
Sulfasalazina	Anti-inflamatorio e inmunosupresor	Prurito, rash, dolor abdominal, náusea, vómito, mareo, dolor de cabeza, oligozoospermia reversible, fiebre, miocarditis, síndrome de Steve-Johnson, anemia aplásica, falla hepática fulminante, hepatotoxicidad, reacción de hipersensibilidad, lupus eritematoso sistémico, fibrosis pulmonar intersticial difusa y neumonía

(Adaptada de Truven Health Analytics Information, 2015).

Por otra parte, los bFARMES incluyen fármacos que contienen partes de su molécula diseñada específicamente para actuar sobre células inflamatorias, interacciones celulares y citocinas que median el daño articular relacionado con la AR (Sharma y Pathak, 2012). Los bFARMES incluyen a los cinco inhibidores del TNF- α disponibles en la clínica (adalimumab, pegol, etanercept, golimumab e inflixumab), el inhibidor de la

coestimulación de células T (abatacept), el agente anti-células B (rituximab), el anticuerpo monoclonal inhibidor del receptor de IL-6 (tocilizumab), así como el inhibidor de IL-1 (anakinra) (Smolen y cols., 2013) (Tablas 3, 4 y 5).

Tabla 3. Agentes biológicos para el tratamiento de la AR

bFARME	Blanco molecular	Estructura	Mecanismo de acción	Efectos adversos
Etanercept	TNF- α	Proteína de fusión que consta de p75Fc (porción de reconocimiento de ligandos del receptor de TNF- α) y de la porción Fc de la inmunoglobulina humana IgG1.	Se une con alta afinidad al TNF- α soluble o unido a membrana inhibiendo sus efectos debido al bloqueo de la interacción con el receptor TNF- α	Reacción en el lugar de la inyección, rinitis, infección de vías respiratorias altas, reacciones de hipersensibilidad, enfermedades infecciosas, falla cardíaca congestiva, cáncer, síndrome de Steve-Johnson, anemia aplásica, hepatitis autoinmune, enfermedad desmielinizante del sistema nervioso central, esclerosis múltiple, convulsiones
Infliximab	TNF- α	Anticuerpo monoclonal quimérico (humano-murino) anti-TNF- α	Se une al TNF- α impidiendo su interacción con el receptor de TNF- α	Rash, dolor abdominal, náusea, dolor de cabeza, infección del tracto respiratorio, fatiga, fiebre, reacciones de hipersensibilidad, síndrome coronario agudo, falla cardíaca, síndrome de Steve-Johnson, leucopenia, hepatotoxicidad, cáncer, lupus eritematoso, enfermedad desmielinizante del sistema nervioso central
Adalimumab	TNF- α	Anticuerpo monoclonal recombinante humano anti TNF- α	Se une al TNF- α impidiendo su interacción con el receptor de TNF- α	Reacción en el sitio de inyección, rash, desarrollo de anticuerpos contra el fármaco, anticuerpos antinucleares positivo, dolor de cabeza, sinusitis, infección en vías respiratorias altas, falla cardíaca congestiva, síndrome de Steve-Johnson, agranulocitosis, anemia aplásica, falla hepática aguda, anafilaxis, enfermedades infecciosas, cáncer, reacciones de hipersensibilidad, enfermedad desmielinizante del sistema nervioso central

Tabla 4. Agentes biológicos para el tratamiento de la AR (continuación)

bFARME	Blanco molecular	Estructura	Mecanismo de acción	Efectos adversos
Certolizumab	TNF- α	Fragmento Fab del anticuerpo anti TNF- α unido a polietilenglicol	Unión específica al TNF- α humano soluble y unido a membrana, impidiendo así la unión del TNF- α a sus receptores	Nausea, prurito y reacciones en el lugar de la inyección, infecciones bacterianas y virales, hipertensión, dolor de cabeza, hepatitis, exantema
Golimumab	TNF- α	Anticuerpo monoclonal humano	Forma complejos estables de gran afinidad con las dos formas bioactivas del TNF- α humano, la soluble y la transmembrana, impidiendo así la unión del TNF- α a sus receptores	Hipertensión, rash y reacción en el sitio de la inyección, enfermedades virales, mareo, parestesia, bronquitis, sinusitis, infección de las vías respiratorias superiores, falla cardíaca congestiva, melanoma maligno, carcinoma de células Merkel, sarcoidosis y cáncer de piel, reactivación de hepatitis B, anafilaxis, reacciones de hipersensibilidad, lupus eritematoso, micosis invasiva, infecciones oportunistas, neuropatía desmielinizante periférica
Tocilizumab	IL-6	Anticuerpo monoclonal humanizado anti IL-6R	Unión específica al receptor de IL-6 sIL-6R y mIL-6R	Erupción cutánea, prurito, infecciones del tracto respiratorio superior y nasofaringitis, infecciones del tracto urinario, celulitis, hipertensión
Anakinra	IL-1	Forma recombinante no glicosilada del antagonista humano del receptor IL-1 (IL-1Ra)	Neutraliza la actividad de IL-1 α e IL-1 β	Reacción en el sitio de la inyección, paro cardiorrespiratorio, celulitis bacteriana, cáncer, neutropenia, reacciones de hipersensibilidad, enfermedad infecciosa severa

Tabla 5. Agentes biológicos para el tratamiento de la AR (continuación)

bFARME	Blanco molecular	Estructura	Mecanismo de acción	Efectos adversos
Rituximab	Células B	Anticuerpo monoclonal quimérico (humano-murino) anti-CD20	Depleción de células B por unión a CD20	Hipotensión, edema periférico, sudores nocturnos, prurito, rash, dolor abdominal, diarrea, náusea, vómito, anemia, artralgia, mialgia, dolor de espalda, mareo, dolor de cabeza, neuropatía sensorial, rinitis, incremento de la frecuencia de la tos, fiebre, enfermedades infecciosas, dolor, disritmia cardíaca, shock cardiogénico, falla cardíaca, infarto de miocardio, arritmia supraventricular, dermatitis liquenoide, síndrome de Steve-Johnson, obstrucción intestinal, perforación gastrointestinal, anemia aplásica, hepatitis viral tipo B fulminante, nefrotoxicidad, enfermedades infecciosas severas
Abatacept	Co-estimulación de células T	Proteína de fusión compuesta por una inmunoglobulina fusionada al dominio extracelular del antígeno citotóxico de linfocito T CTLA-4	Inhibe la activación de las células T por unión a CD80 y CD86	Exacerbación aguda de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica, nasofaringitis, infección de vías respiratorias altas, náusea, enfermedades infecciosas, dolor de cabeza, enfermedad infecciosa del tracto urinario, celulitis, sepsis, cáncer.

Modificada y adaptada de Choy, 2012; Atzeni y cols., 2013 y Truven Health Analytics Information, 2015.

1.1.2.4.2 Tratamiento alternativo

En la actualidad, muchos pacientes utilizan la medicina alternativa y complementaria (MAC) como una opción para hacer frente a sus enfermedades. Investigaciones recientes han indicado que las personas que padecen dolor crónico, como lo es en el caso de la AR y pacientes que se sienten insatisfechos con sus tratamientos actuales son más propensos a buscar tratamientos alternativos. Se ha estimado que entre el 60 y 90 % de las personas que sufren de artritis usan la MAC. Entre los tratamientos más usados de la MAC para combatir enfermedades reumáticas se encuentran la herbolaria y la quiropráctica (Soeken y cols., 2003). Precisamente, el crecimiento en el uso de medicamentos herbolarios, indica claramente la necesidad de realizar una investigación más completa sobre la eficacia y seguridad de su uso, ya que varios de estos medicamentos son fáciles de adquirir y su uso está basado en conocimientos tradicionales ancestrales, asumiendo que son seguros sin ningún conocimiento sobre su eficacia clínica o sus efectos secundarios. Los medicamentos herbolarios pueden ser usados de forma individual o en combinación con la medicina alópata prescrita para el tratamiento de la AR; sin embargo, son pocos los estudios que abordan las posibles interacciones entre la combinación de estos tipos de terapia. El conocimiento de los efectos producidos y del mecanismo de acción de los medicamentos herbolarios permitirá a los médicos aconsejar eficazmente sobre su correcto uso, impidiendo la generación de interacciones entre fármacos y anticipando la posible presencia de toxicidad. Aunque son escasos los ensayos clínicos aleatorios que demuestran la eficacia y los efectos adversos asociados con el uso de los remedios herbolarios en el tratamiento de AR, en la Tabla 6 se enlistan algunas plantas medicinales utilizadas para el tratamiento de algunas enfermedades reumáticas (Setty y Sigal, 2005).

Tabla 6. Plantas medicinales usadas en el tratamiento de enfermedades reumáticas

Nombre científico	Nombre común	Indicaciones comunes	Constituyente activo	Efectos secundarios	Contraindicaciones
<i>Oenothera biennis</i>	Onagra	AR, síndrome de Sjogren	Ácido γ -linolénico	Heces blandas, estreñimiento, flatulencia, eructos, convulsiones	Epilepsia del lóbulo temporal; uso durante el embarazo y la lactancia; uso concomitante con anestésicos o fenotiazinas
<i>Boragio officinalis</i>	Borraja		Ácido α -linolénico		
<i>Ribes nigrum</i>	Zarzaparrilla negra		Ácido dihomo- γ -linolénico		
<i>Harpagophytum procumbens</i>	Uña del diablo	Osteoartritis, dolor lumbar, neuralgia, dolor de cabeza, fiebre	Harpagósido, harpagida	Malestar gastrointestinal	Úlcera gástrica o duodenal, cálculos biliares, diabetes
<i>Ocimum americanum</i>	Albahaca lima	Fiebre, dolor de cabeza	Ácido linolénico		Uso durante el embarazo y la lactancia
<i>Ocimum basilicum</i>	Albahaca				
<i>Ocimum sanctum</i>	Albahaca sagrada				
<i>Salix alba</i>	Sauce blanco	Dolor lumbar, osteoartritis	Ácido salicílico, taninos, flavonoides, esteroides de salicina		Úlcera péptica, diabetes, desórdenes hepáticos o renales, alergia a la aspirina, uso en niños
<i>Salix fragilis</i>	Mimbrera frágil				
<i>Salix purpurea</i>	Sauce colorado				
<i>Salix daphnoides</i>	Sauce violeta				
<i>Tanacetum parthenium</i>	Matricaria	Fiebre, AR, migrañas	Partenólido	Úlceras orales, náuseas, vómito, diarrea, flatulencia, emenagogo, puede alterar el tiempo de sangrado	Uso en el embarazo, uso concomitante con anticoagulantes
Canina					
<i>Tripterygium wilfordii</i>	La Vid del Dios del trueno	AR, Lupus eritematoso, espondilitis anquilosante, psoriasis, nefropatía	Triptolida, triptolidina	Diarrea, náusea, vomito, alopecia, boca seca, dolor de cabeza, rash, pigmentación de la piel, úlceras orales, gastritis, ganancia/pérdida de peso, hipertensión diastólica, sangrado vaginal, amenorrea, osteoporosis	Úlcera péptica, menopausia prematura
<i>Uncaria tomentosa</i>	Uña de gato	Lupus eritematoso, síndrome de fatiga crónica, osteoartritis, bursitis	Alcaloides, flavonoides, proantocianidinas, taninos, glucósidos de ácido quinóico y esteroides	Nefrotoxicidad	Enfermedad renal subyacente
<i>Uncaria guianensis</i>		Alopecia, eczema, gota, urticaria, rinitis alérgica, AR, hipertrofia prostática benigna			
<i>Urtica dioica</i>	Ortiga mayor			Urticaria, malestar estomacal	Uso con sedantes, medicamentos para la diabetes y antihipertensivos
<i>Zingiber officinale</i>	Jengibre	Osteoartritis, antiemético, mareo por movimiento, vértigo	Gingeroles, β -caroteno, capsaicina, ácido cafeico y curcumina	Dispepsia, náusea	Posible efecto en el tiempo de sangrado
<i>Alpinia officinarum</i>					

Tomada de Setty y Sigal, 2005.

Por otra parte es importante destacar que la eficacia de los remedios herbolarios puede ser debido a la acción sinérgica de varios compuestos o por un balance entre las acciones sinérgicas y antagónicas de varios de ellos. Sin embargo, es importante la identificación de los principales compuestos responsables de la eficacia de los extractos consumidos por los pacientes, ya que la elucidación de sus estructuras y de sus mecanismos de acción son fundamentales para el descubrimiento de nuevas entidades químicas para la síntesis de nuevos fármacos y para la identificación de nuevos blancos moleculares (Zareba, 2009).

Diferentes estudios han sugerido que la supresión de la expresión de TNF- α , IL- β , COX, LOX, metaloproteinasas de la matriz, moléculas de adhesión o NF-kB podría resultar exitosa en el tratamiento de la AR. Numerosos compuestos derivados de plantas pueden suprimir estos intermediarios de la señalización celular. Algunos ejemplos incluyen flavonoides, terpenos, quinonas, catequinas, alcaloides, antocianinas y antoxantinas (Tabla 7), de los cuales son reconocidos sus efectos anti-inflamatorios. Varios estudios preclínicos y clínicos sugieren que algunos productos naturales incluyendo curcumina (obtenida de la cúrcuma), resveratrol (obtenido de la uvas rojas, arándanos y cacahuates), polifenoles del té negro, genisteína (obtenida de la soya), quercetina (obtenida de la cebolla), silimarina (obtenida de la alcachofa); entre otros, tienen potencial para el tratamiento de la AR (Khana y cols., 2007).

Tabla 7. Productos naturales que exhiben potencial anti-artrítico en estudios preclínicos y sus blancos moleculares

Producto natural	Fuente	Naturaleza química	Blanco molecular
Ácido boswélico	<i>Boswellia serrata</i>	Triterpeno	NF-kB, COX-2, 5-LOX, MMP-9, ICAM-1
Ácido rosmarínico	<i>Rosmarinus officinalis</i>	Ácido hidroxinámico	NF-kB, COX-2, TNF- α , AMs
Ácido ursólico	<i>Ocimum sanctum</i>	Triterpeno	NF-kB, COX-2, MMP-9
Berberina	<i>Berberis vulgaris</i>	Alcaloide	NF-kB, COX-2, TNF- α , IL-1 β , IL-6
Celastrol	<i>Tripterygium wilfordii</i>	Triterpeno	NF-kB, COX-2, MMP-9, TNF- α , AMs
Cucurbitacina R	<i>Cayaponia tayuya</i>	Esterol	NF-kB, COX-2, TNF- α
Curcumina	<i>Curcuma longa</i>	Flavonoide	NF-kB, COX-2, 5-LOX, TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, MMPs, AMs
Estatinas	<i>Aspergillus terreus</i>		NF-kB, COX-2, MMP-9, AMs
Eugenol	<i>Syzygium aromaticum</i>	Ácido fenólico	NF-kB, COX-2, 5-LOX, TNF- α , IL-1 β
Gugulsterona	<i>Commiphora mukul</i>	Esterol	NF-kB, COX-2, MMP-9
Genisteína	<i>Glycine max</i>	Flavonoide	NF-kB, TNF- α , IL-1 β , IL-6
Luteolina	<i>Thymus vulgaris</i>	Flavonoide	NF-kB, COX-2, TNF- α
Morina	<i>Chlorophora tinctoria</i>	Flavonoide	NF-kB, COX-2, 5-LOX, MMP-9, TNF- α , IL-1 β , IL-6
Polifenoles del té negro	<i>Camellia sinensis</i>	Ácidos fenólicos, taninos, flavonoides	NF-kB, COX-2, TNF- α , 5-LOX, AMs, MMPs
Quercetina	<i>Allium cepa</i>	Flavonoide	NF-kB, COX-2, 5-LOX, TNF- α , IL-1 β , AMs
Resveratrol	<i>Vitis vinifera</i>	Flavonoide	NF-kB, COX-2, TNF- α , 5-LOX, AMs
Silimarinas	<i>Silybum marianum</i>	Flavonoide	NF-kB, COX-2, TNF- α , 5-LOX, AMs
Witanóolidos	<i>Withania somnifera</i>	Esteroles	NF-kB, COX-2, MMP-9, ICAM-1

Tomada de Khana y cols., 2007.

En estudios previos nuestro grupo de investigación realizó un estudio en el cual se mostró que el extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis* L. (romero) produce antinocicepción en diferentes modelos experimentales de dolor en roedores (González-Trujano y cols., 2007). Estudios subsecuentes mostraron que el extracto etanólico de romero contiene triterpenos y flavonoides como metabolitos activos. Posteriormente, mediante la técnica de HPLC se identificó que un flavonoide correspondía a la hesperidina (Martínez y cols., 2011), mientras que los triterpenos fueron ácido ursólico, ácido oleanólico y ácido micromérico (Martínez y cols., 2012). Además, se realizaron

estudios para evaluar la actividad antinociceptiva de hesperidina sola y en combinación con ketorolaco utilizando el modelo de disfunción inducida por dolor en ratas (PIFIR, por sus siglas en inglés Pain-Induced Functional Impairment model in the Rat) y en el modelo de nocicepción inducida por capsaicina. En este estudio, la administración individual de 562.3 mg/kg de hesperidina produjo un efecto antinociceptivo del 11.3 ± 4.8 %, mientras que la administración individual de 0.56 mg/kg de ketorolaco produjo un efecto del 26.0 ± 4.8 %. Por otra parte, la administración de 15 combinaciones de hesperidina + ketorolaco resultó en diferentes grados de efecto (adición, sinergismo y antagonismo), siendo la combinación de 562.3 mg/kg de hesperidina + 0.56 mg/kg de ketorolaco la que produce el mayor efecto sinérgico (58.9 ± 7.9 %) observado entre estos fármacos en el modelo experimental de artritis gotosa sin la generación de daño gástrico como efecto adverso (Martínez y cols., 2012) (Anexo 1).

a) Flavonoides.- Los flavonoides son un grupo de compuestos polifenólicos con características y estructura químicas diversas que se encuentran en forma natural en las plantas. Son constituyentes importantes de la dieta humana (Miean y Mohamed, 2001) y son componentes que consumimos en las frutas, vegetales, cereales, especias, té y vino (Manach y cols., 2004), también se encuentran en cantidades importantes en muchas plantas medicinales (Tabla 8).

Tabla 8. Algunas fuentes dietéticas de flavonoides

<ul style="list-style-type: none"> • Flavanol <ul style="list-style-type: none"> ○ Epicatequina ○ Catequina ○ Epigallocatequina ○ Epicatequina galato ○ Epigallocatequina galato • Flavanona <ul style="list-style-type: none"> ○ Naringina ○ Taxifolina • Flavonol <ul style="list-style-type: none"> ○ Canferol ○ Quercetina • Flavona <ul style="list-style-type: none"> ○ Miricetina • Flavona <ul style="list-style-type: none"> ○ Crisina ○ Apigenina • Antocianidinas <ul style="list-style-type: none"> ○ Malvidina ○ Cianidina ○ Apigenidina 	<p>Vino tino, té verde y té negro.</p> <p>Cáscaras de cítricos. Cítricos.</p> <p>Escarola, puerro, brócoli, rábano, té negro. Cebolla, lechuga, brócoli, arándano, piel de manzana, bayas, oliva, té, vino tinto. Arándano, uva, vino tinto.</p> <p>Cáscaras de frutas. Apio, perejil.</p> <p>Uvas rojas, vino tinto. Cereza, frambuesa, fresa, uva. Frutas y cáscaras de color.</p>
--	--

Tomado de Rice-Evans, 1996.

Los flavonoides se caracterizan por poseer como estructura común el anillo benzo- γ -pirona (Fig. 5). Esta estructura base permite una variedad de patrones de sustitución conduciendo a varias subclases de flavonoides. Dependiendo del estado de oxidación del anillo pirano, de su patrón de hidroxilación y de la sustitución en la posición 3; los flavonoides se subdividen en: 1) flavonoles (ej. quercetina, canferol), que se encuentran en la cebolla, poro, brócoli, 2) flavonas (ej. apigenina, luteolina) del perejil y apio, 3) isoflavonas (ej. daidzeína, genisteína) de la soya y sus productos, 4) flavanonas (ej. hesperetina, naringenina) que se encuentran principalmente en la frutas cítricas y en el tomate, 5) flavanoles (ej. catequina, epicatequina, epigallocatequina) son abundantes en el té verde, vino rojo, chocolate y 6) antocianidinas (ej. cianidina, malvidina) que se encuentran en el vino rojo y en frutas del bosque (Spencer, 2008a) (Fig. 6). Más de 4000 flavonoides diferentes han sido identificados (Cook y Samman, 1996).

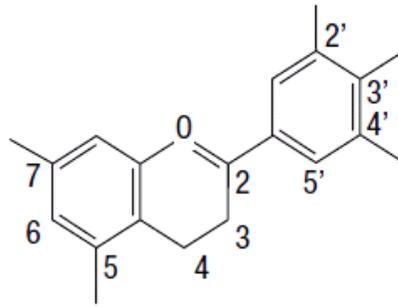


Figura 5. Estructura base de los flavonoides. Modificada de D'Archivio y col., 2007.

Estos se han encontrado en diferentes partes de las plantas, especialmente en las partes aéreas o en la fruta; ya que su biosíntesis es estimulada por la luz (D'Archivio y cols., 2007). Los flavonoides tienen importantes funciones fisiológicas y bioquímicas en las plantas, como antioxidantes, inhibidores de enzimas, precursores de sustancias tóxicas y pigmentos. Además, éstos compuestos están involucrados en la fotosensibilización y transferencia de energía, regulación del crecimiento de las plantas, control de la respiración, fotosíntesis, morfogénesis, y en la determinación del sexo, así como defensa contra infecciones (Middleton y cols., 2000). Los flavonoides se pueden encontrar en la naturaleza en forma libre (agliconas); sin embargo, en su mayoría se encuentran ligados a moléculas de carbohidratos, formando glicósidos y algunas veces como derivados metilados, sulfatos, dímeros y polímeros.

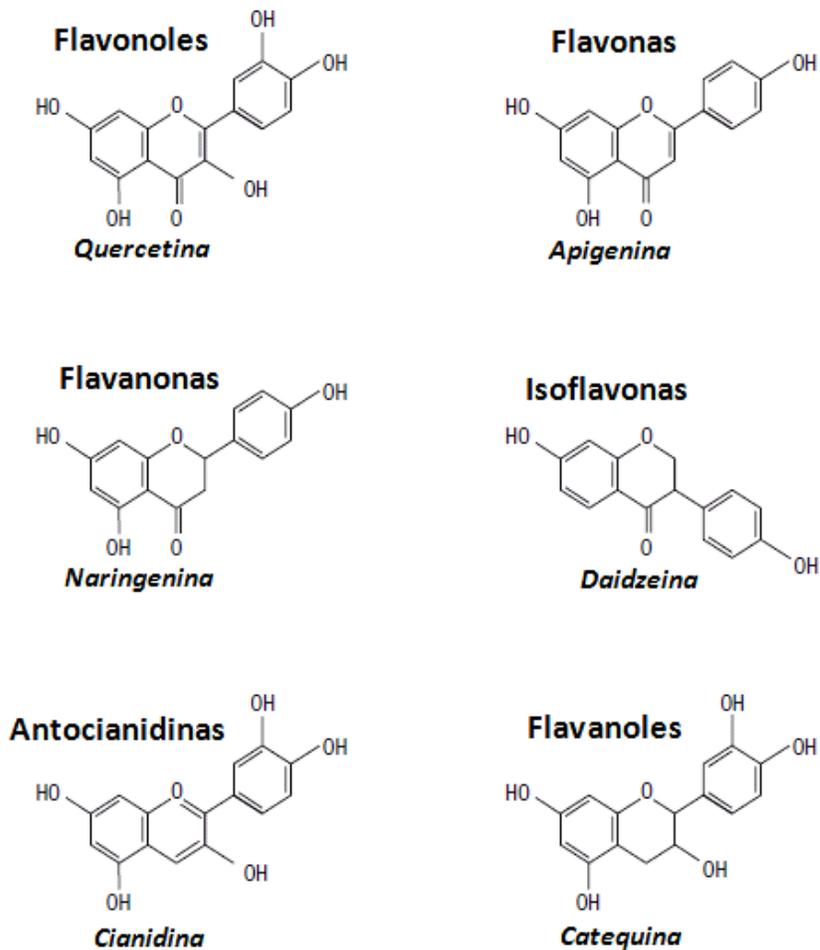


Figura 6. Estructuras químicas de los flavonoides. Modificada de D'Archivio y cols., 2007.

La mayoría de los flavonoides glicosilados, y en algunos casos las agliconas, presentes en los alimentos derivados de plantas son extensamente metabolizados y conjugados durante la fase de absorción. En particular, existe bastante evidencia de metabolismo de fase I (deglicosilación) y metabolismo de fase II que resulta en glucurónidos, sulfatos y *O*-metil agliconas formados durante su paso a través del intestino delgado y el hígado. Además, también pueden sufrir al menos tres tipos de metabolismo intracelular: 1) metabolismo oxidativo, 2) metabolismo relacionado con el citocromo P450 y 3) conjugación con tioles, particularmente glutatión (GSH) (Spencer y cols., 2001).

Diferentes estudios *in vitro* e *in vivo* han indicado que dependiendo de su lipofilidad algunos flavonoides y algunos de sus metabolitos son capaces de cruzar la barrera hematoencefálica. De acuerdo a esto, se estima que la entrada de los metabolitos

menos polares (*O*-metilados) puede ser mayor que la de sus agliconas patrón. Por la misma razón, los metabolitos más polares (glucurónidos), los cuales poseen bajos valores de permeabilidad en la barrera hematoencefálica (Youdim y cols., 2003) pueden no tener fácil acceso al cerebro. No obstante, existen evidencias que sugieren que ciertos glucurónidos de fármacos pueden cruzar la barrera hematoencefálica (Aasmundstad y cols., 1995) y ejercer efectos farmacológicos (Kroemer y Klotz, 1992), sugiriendo que puede existir un mecanismo específico de recaptura para glucurónidos. Además de la lipofilidad de los flavonoides, su capacidad para entrar al cerebro puede ser influenciada por su interacción con transportadores de eflujo específicos expresados en la barrera hematoencefálica. Uno de estos transportadores es la glicoproteína-P, la cual desempeña un papel importante en la absorción y recaptura de fármacos en el cerebro (Lin y Yamazaki, 2003).

- Efectos biológicos producidos por los flavonoides

Los flavonoides exhiben un amplio espectro de efectos biológicos, tales como; antioxidante, antibacterial, antitrombótico, vasodilatador, anti-edad, anticarcinogénico, anti-inflamatorio; además, disminuyen los niveles de colesterol y mejoran la resistencia de los huesos (Harbone y Williams, 2000; Middleton y cols., 2000), también producen efectos neurofarmacológicos (Viola y cols., 1994) como analgésicos, potenciadores del sueño (Picq y cols., 1991; Fernández y cols., 2005), neuroprotectores (Spencer, 2008a), anticonvulsivos, ansiolíticos y sedantes (Marder y cols., 1996); así como también para mejorar la memoria y la función cognitiva (Spencer, 2008b).

Los efectos de los flavonoides en el SNC son complejos e involucran diferentes mecanismos de acción (Goutman y cols., 2003), éstos incluyen acciones en receptores o canales iónicos de membrana. En estudios *in vitro* han demostrado su capacidad para modificar la actividad de varios sistemas enzimáticos incluyendo cinasas, fosfolipasas, ATPasa, lipooxigenasas, ciclooxigenasas, fosfodiesterasas, entre otros (Benavente-García y Catillo, 2008).

- Reacciones adversas

Las reacciones adversas producidas por los flavonoides en los seres humanos son raras. Estudios de Salma y Mueller-Eckhart (1987) indicaron que la (+)-catequina y sus metabolitos pueden unirse firmemente a las membranas de los eritrocitos y con esto generar nuevos sitios antigénicos con el consecuente desarrollo de anticuerpos que presuntamente pueden ser la causa de la anemia hemolítica en seis pacientes que habían tomado catequina. La anemia hemolítica desapareció después de la interrupción del consumo de catequina aunque los sujetos continuaron con la ingesta de flavonoides en la dieta (Middleton y cols., 2000).

Numerosos flavonoides son capaces de formar quinonas, lo cual puede generar una reacción alérgica de la piel. Sin embargo, los flavonoides no se consideran potentes alérgenos de la piel y no se han distinguido como sensibilizadores de la piel en la literatura dermatológica, a pesar de que prácticamente todos los humanos tengan algún tipo de contacto con flavonoides de alimentos y plantas. Hausen y cols. (1990) han descrito el desarrollo de alergia en la piel con la madera negra australiana, la cual es conocida como un importante factor que puede provocar dermatitis; varias hidroxiflavonas han resultado ser alergénicas.

Si bien existe una impresión popular de que los flavonoides poseen propiedades que evitan el envejecimiento, posiblemente a través de su actividad antioxidante, se debe tener en cuenta que la quercetina puede reducir significativamente la vida de los ratones (Middleton y cols., 2000).

En resumen, los flavonoides parecen ser nutrientes seguros con un amplio espectro de actividades bioquímicas y farmacológicas lo que sugiere firmemente su posible papel como promotores de la salud y como suplementos alimenticios que previenen enfermedades. (Middleton y cols., 2000).

- Hesperidina

Hesperidina (hesperidina- β -7-rutinósido) es una flavanona glicosilada (Fig. 7), compuesta de la aglicona hesperetina o metil eriodictiol y el disacárido rutinosa. La unidad de disacárido ($C_{12}H_{22}O_{10}$) se compone de una molécula de ramnosa y una de glucosa. Su nombre sistemático es 5,7,3'-trihidroxi-4'-metoxiflavanona-7-ramnoglucósido. Se encuentra de manera abundante en las frutas cítricas (familia Rutaceae) y se ha reportado que está presente en muchas otras plantas (Garg y cols., 2001).

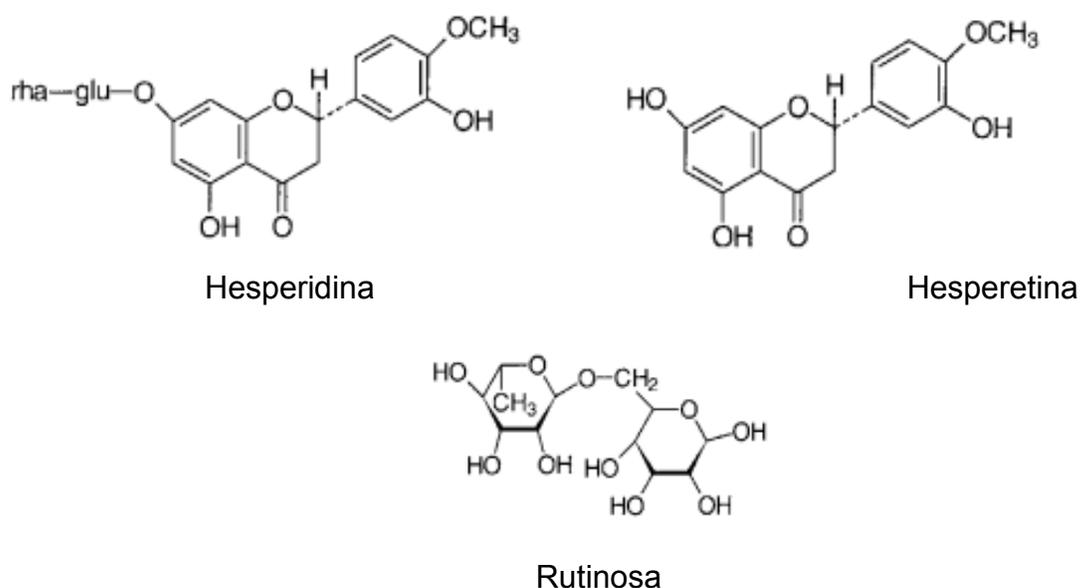


Figura 7. Estructuras químicas de hesperidina, hesperetina y rutinosa (tomada de Garg y cols., 2001).

Este compuesto fue inicialmente llamado “vitamina P” para indicar que podía disminuir la fragilidad y permeabilidad capilar. En adición, varios reportes han indicado que hesperidina puede prevenir la extravasación vascular por su acción vasoprotectora a través de la inhibición de la enzima hialuronidasa y se ha demostrado que es capaz de disminuir la agregación plaquetaria (Garg y cols., 2001). Además de su efecto sobre la permeabilidad vascular, este flavonoide produce una amplia gama de efectos farmacológicos tales como sedante y potenciador del sueño (Fernández y cols., 2005), antioxidante (Hirata y cols., 2005), hipolipidémico (Monforte y cols., 1995),

antihipertensivo y diurético (Galati y cols., 1996), anticancerígeno (Tanaka y cols., 1997), anti-inflamatorio y analgésico (Galati y cols., 1994; Hirata y cols., 2005; Martínez y cols., 2011).

Varios mecanismos de acción se han propuesto para explicar los efectos producidos por hesperidina. Recientemente han sido implicados la participación de los receptores A₁ y A₂ de adenosina en el efecto sedante (Guzmán-Gutiérrez y Navarrete, 2009). Por otra parte se ha reportado la participación de los receptores opioides en el efecto sedante y antinociceptivo (Loscalzo y cols., 2008), y nuestro grupo de investigación ha sugerido la participación del receptor TRPV1 en el efecto antinociceptivo producido por hesperidina (Martínez y cols., 2011). Se ha sugerido que el efecto hipotensor de hesperidina podría ser producido por vasodilatación mediada por óxido nítrico (Yamamoto y cols., 2008).

Actualmente es utilizada en combinación con diosmina (Fig. 8) para el tratamiento de la insuficiencia venosa crónica. El producto más ampliamente utilizado es Daflon[®] – 500 mg, el cual contiene hesperidina (50 mg) y diosmina (450 mg). La diosmina es otro flavonoide con un peso molecular de 608.6 daltons y es químicamente diosmetina-7-ramnoglucósido. La aglicona ha sido descrita con el nombre sistemático de 3',5,7-trihidroxi-4'-metoxiflavona o 5,7-dihidroxi-2-(3-hidroxi-4-metoxipentil)-4H-l-benzopiran-4-ona. Se diferencia de la hesperidina solo en que tiene un doble enlace entre C2 y C3, siendo de esta manera una flavona, mientras que la hesperidina es una flavanona

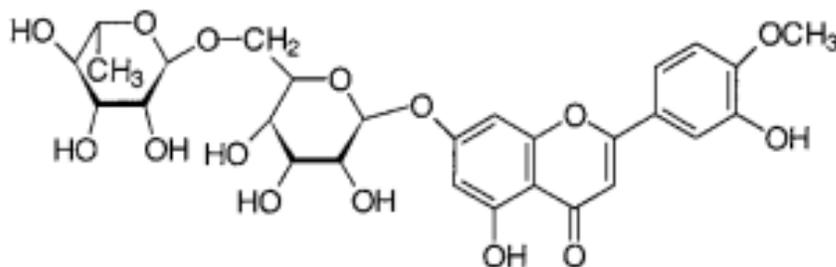


Figura 8. Estructura molecular de diosmina (tomada de Garg y cols., 2001).

2. JUSTIFICACIÓN

La artritis reumatoide (AR) se caracteriza por la presencia de dolor e inflamación crónica, y la destrucción progresiva de las articulaciones pequeñas de manos y pies. Las consecuencias de la AR a corto y largo plazo incluyen dolor crónico, disminución de la funcionalidad de los miembros afectados, disminución de la calidad de vida y de la esperanza de vida. En México, la AR y otras enfermedades reumáticas son una de las principales demandas de consulta en el primer nivel de atención médica y representan un alto costo a los servicios de salud. Contrario a lo que se piensa, afecta a la población de adultos jóvenes en edad productiva entre 20-50 años, por lo que representa un grave problema de discapacidad laboral y un fuerte cargo económico para las familias.

La etiología y patogénesis de la AR no son completamente comprendidas, lo que resulta en un tratamiento poco adecuado de la enfermedad. En la actualidad, el tratamiento convencional no es completamente exitoso por qué no mitiga ni previene el progreso de la enfermedad, adicionalmente la presencia de efectos adversos limita su uso crónico. En países desarrollados, se utiliza con éxito la terapia biológica, lo cual ha mejorado considerablemente la calidad de vida de las personas que padecen AR. Sin embargo, en países en vías de desarrollo los pacientes no tienen acceso a este tipo de terapia debido al alto costo de los medicamentos. Es por estas razones, que es necesario continuar con la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas que no solo resuelvan el problema del dolor y la discapacidad, sino que también minimicen la presencia de efectos adversos y el costo de la terapia. En este sentido, la combinación de fármacos utilizados para el tratamiento del dolor y la inflamación podría proporcionar un alivio satisfactorio con una menor incidencia de efectos adversos. Claramente, esto es cierto si la interacción de los fármacos es a favor del efecto deseado, en lugar de la toxicidad. Así, en el presente proyecto de tesis se propone evaluar el efecto anti-hiperalgésico y anti-inflamatorio de la combinación del flavonoide hesperidina con ketorolaco en un modelo experimental de artritis reumatoide.

3. HIPÓTESIS

Si la administración individual de hesperidina o ketorolaco produce un efecto antinociceptivo moderado en animales con artritis experimental entonces la administración de la combinación de estos fármacos producirá un efecto anti-inflamatorio y anti-hiperalgésico sinérgico en animales con artritis experimental, sin la generación de daño gástrico.

4. OBJETIVOS

- Evaluar el efecto anti-hiperalgésico y anti-inflamatorio de hesperidina y ketorolaco administrados de manera individual y en una combinación utilizando el modelo experimental de artritis inducida por colágeno en ratas.
- Cuantificar la concentración de TNF- α , IL-1 β e IL-6 en el suero de los animales tratados con los diferentes fármacos en forma individual y en su combinación mediante la técnica de ELISA.
- Evaluar el área de daño gástrico como posible efecto adverso producido por la administración individual de hesperidina y ketorolaco o en combinación.

5. METODOLOGÍA

5.1 MATERIAL

5.1.1 Equipo

- Balanza analítica (Sartorius BL 2105).
- Balanza granataria (Ohaus triple beam 700/800 series).
- Cronómetros (Diagger).
- Jeringas y agujas de diferentes calibres (Terumo).
- Pletismómetro (Modelo 7150; Ugo Basile, Italia).
- Analgesímetro (Randall-Selitto test, Modelo 12083, Ugo Basile, Italia).
- Micropipeta multicanal (Labnet)
- Lector de microplacas (Biorad, imark)
- Kit de ELISA de TNF- α para rata (Invitrogen Rat TNF- α ELISA Kit cat. no. KRC3011 Invitrogen Corporation CA, USA).
- Kit de ELISA de IL-1 β para rata (Rat IL-1 β ELISA Cat. No. EIA-4911 DRG International, Inc, USA DRG diagnostics).
- Kit de ELISA de IL-6 para rata (PromoKine Rat IL-6, Cat. No. PK-EL-61606R, PromoCell GmbH Heidelberg, Germany).
- Cajas de acrílico.
- Cámara de éter.
- Tubos de polietileno.
- Ultracongelador (REVCO ULT790-3-A32).

5.1.2 Reactivos

- Adyuvante completo de Freund (Mycobacterium tuberculosis inactivo, H37Ra, ATCC 25177, 1 mg/mL).
- Colágeno II derivado de pollo (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA).
- Ketorolaco tris 99% mínimo (Sigma).
- Hesperidina, aproximadamente 80% (Sigma).
- Dexametasona fosfato sódico (Decorex ®, PISA Farmacéutica).
- Ácido acético glacial (J.T. Baker).

5.1.3 Material biológico

5.1.3.1 Animales

Ratas hembra de la cepa Wistar provenientes del bioterio del Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz (150-160 g de peso corporal al inicio del experimento) mantenidas $25^{\circ} \pm 2^{\circ}$ C con ciclo de luz/oscuridad de 12 h con libre acceso al alimento y agua (*ad libitum*). Todos los protocolos experimentales se realizaron siguiendo las recomendaciones de la Guía de los Estándares Éticos de la Asociación Internacional para el Estudio del Dolor (IASP) para la Investigación del Dolor Experimental en Animales (Zimmermann, 1983) y la Norma Oficial Mexicana para el cuidado y uso de animales de laboratorio (NOM-062-ZOO-1999). En adición, el protocolo experimental fue aprobado por el Comité de Ética del Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz proyecto No. **NC113281.0**

5.2 Métodos

5.2.1 Diseño experimental

Las ratas se colocaron en 6 grupos al azar con una $n = 8$ y a cada grupo se le asignó uno de los siguientes tratamientos:

- No inmunizado: No se le administró ningún fármaco, ni se les indujo la artritis experimental.
- Artritis + vehículo: Se les indujo la artritis experimental y se les administró el vehículo (tween 80 al 0.2% en solución salina (s.s.) al 0.9%) por vía intraperitoneal (i.p.).
- Artritis + hesperidina: Se les indujo la artritis experimental y se les administró hesperidina (562.3 mg/kg) resuspendida en el vehículo (tween 80 al 0.2 % en s.s.) por vía i.p.
- Artritis + ketorolaco: Se les indujo la artritis experimental y se les administró ketorolaco (0.56 mg/kg) disuelto en s.s. por vía i.p.

- Artritis + combinación: Se les indujo la artritis experimental y se les administró hesperidina (562.3 mg/kg) más ketorolaco (0.56 mg/kg) en el vehículo (tween 80 al 0.2% en s.s.) por vía i.p.
- Artritis + dexametasona: Se les indujo la artritis experimental y se les administró dexametasona (0.1 mg/kg) vía i.p. diluida en s.s.

Los tratamientos fueron administrados en dosis únicas durante 5 días consecutivos.

Las dosis administradas de hesperidina y ketorolaco fueron seleccionadas de acuerdo con resultados observados por Martínez y cols. (2011). En dicho estudio se observó que la administración aguda de la combinación de 562.3 mg/kg de hesperidina más 0.56 mg/kg de ketorolaco produce efecto antinociceptivo supraditativo máximo en un modelo de artritis gotosa, sin la inducción de daño gástrico (Anexo 1).

5.2.2 Inducción de artritis experimental

La artritis experimental se indujo mediante la inmunización con 200 μ L de una emulsión (1:1) de colágeno II en el adyuvante completo de Freund (*Mycobacterium tuberculosis* H37 RA, 1 mg/ml, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). El colágeno II derivado de pollo (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) se disolvió en ácido acético 0.1 M hasta lograr una concentración final de 1 mg/mL. La emulsión fue preparada por la homogenización de una parte (por ejemplo, 1 mL) de la solución de colágeno II y una parte (por ejemplo 1 mL) del adyuvante completo de Freund a 4 °C. Las ratas se inmunizaron con dos inyecciones subcutáneas de la emulsión de colágeno II combinado con el adyuvante completo de Freund. Así, el día cero las ratas recibieron una inyección por vía subcutánea de 200 μ L de la emulsión a 10 cm de la base de la cola y el día 7 los animales se administraron con una segunda inyección de 200 μ L de la emulsión. Previo a la inmunización los animales fueron anestesiados con vapores de éter. La artritis se desarrolló aproximadamente 15 días después de la primera inmunización (Campo y cols., 2003).

5.2.3 Evaluación macroscópica del progreso de la artritis experimental inducida por colágeno

Para evaluar la progresión de la artritis y la inflamación, las ratas se evaluaron en forma macroscópica utilizando:

5.2.3.1 Índice de artritis experimental

En esta escala se asignaron valores numéricos de 0 a 4 para indicar el progreso de la artritis experimental en ratas, donde 0 = sin presencia de signos de artritis, 1 = inflamación y/o enrojecimiento de un grupo de articulaciones (del tobillo o muñeca), 2 = presencia de inflamación y/o enrojecimiento en dos grupos articulaciones (por ejemplo, del tobillo o muñeca y los dedos), 3 = presencia de inflamación y/o enrojecimiento en más de dos grupos de articulaciones (por ejemplo, del tobillo o muñeca, dedos y rodilla o codo) y 4 = artritis severa en la extremidad completa. El índice de artritis para cada rata se calculó por adicionar los puntos de cada extremidad. La máxima puntuación para cada rata fue de 16 puntos (Campo et al., 2003).

5.2.3.2 Cuantificación del grado de inflamación y umbrales nociceptivos

a) Cuantificación de la inflamación

El grado de inflamación se determinó como el incremento en los volúmenes de las extremidades posteriores de los animales con ayuda de un pletismómetro (Modelo 7150; Ugo Basile, Italia) (Fig. 9). La evaluación se realizó el día 0 (valor basal) y cada tres días a partir de la primera inmunización y hasta el día 29. Con los valores obtenidos se calculó el % de inflamación de acuerdo a la siguiente formula:

$$\% \text{ Inflamación} = \left(\frac{a - x}{b - y} \right) \times 100$$

donde 'x' y 'a' son los valores promedio del volumen de las extremidades posteriores de los animales administrados con los diferentes fármacos antes y después de la primera

inmunización, respectivamente. Mientras que 'y' y 'b' corresponden a los valores promedio de las extremidades posteriores de los animales del grupo tratado con el vehículo antes y después de la primera inmunización, respectivamente.

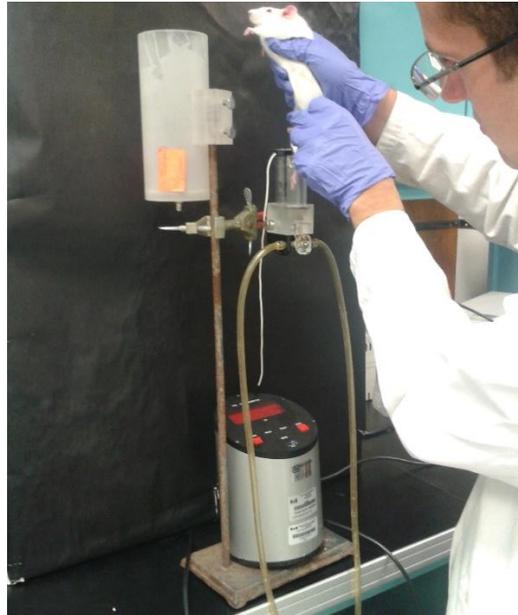


Figura 9. Pletismómetro.

b) Cuantificación de los umbrales nociceptivos

La cuantificación de los umbrales nociceptivos de presión mecánica en las extremidades posteriores de la rata se realizó utilizando un analgesímetro (modelo 12083, Ugo Basile, Italia) (Fig. 10), siguiendo el método descrito por Randall y Selitto (1957). Pevio a la primera inmunización con colágeno, las ratas fueron inmovilizadas y habituadas al procedimiento de medición durante 3 días. Transcurrido este tiempo, se determinó el umbral mecánico basal de las dos extremidades posteriores y después de la primera inmunización se midieron los cambios en el umbral mecánico cada 3 días por un periodo de 29 días. Para ello la extremidad posterior de la rata fue colocada en una plataforma de teflón y se aplicó una fuerza lineal mecánica creciente (velocidad constante de 48 g/s) en la parte media del dorso de la extremidad posterior de la rata con una cuña de punta roma hasta observar una respuesta de retiro y en seguida la fuerza final aplicada (en gramos) fue registrada. El sitio de aplicación de la fuerza fue

marcado con tinta indeleble antes de realizar la prueba para garantizar que todas las mediciones fueran tomadas en la misma área. La fuerza de corte fue de 450 g en condiciones normales y de 250 g en condiciones de inflamación para evitar cualquier daño tisular en los animales. Durante una sola sesión de evaluación la fuerza fue aplicada tres veces, a intervalos de 1 min entre mediciones, y los resultados fueron expresados como la media de las tres medidas.

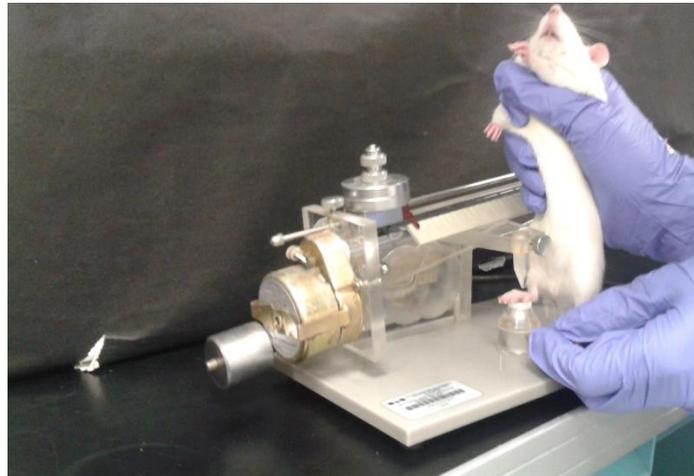


Figura 10. Analgesímetro.

5.2.4 Cuantificación de niveles de TNF- α , IL-1 β e IL-6

Los niveles de TNF- α , IL-1 β e IL-6 fueron cuantificados en el suero de ratas artríticas y administradas con los diferentes tratamientos utilizando kits comerciales. Para esto el día 29 después de la inducción de la artritis, las ratas fueron sacrificadas y se obtuvieron 5 ml de sangre por punción cardiaca. La sangre colectada fue almacenada en tubos de polietileno. Para obtener el suero, las muestras de sangre se centrifugaron durante 10 min a 3000 g a 4 °C. Los sueros fueron congelados a -80°C hasta su análisis. La cuantificación de las citocinas pro-inflamatorias se realizó de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. Brevemente, para el ensayo 100 μ L de los estándares, muestras y controles fueron colocados en los diferentes pozos y se incubaron por 3 h a 24 °C. Una vez transcurrido este tiempo el líquido fue decantado del microplato, y se colocaron 100 μ L del anticuerpo anti-TNF- α /IL-1 β /IL-6 biotinilado a cada pozo. El microplato se incubó nuevamente durante 45 min a 24°C. Después los anticuerpos se

eliminaron de los pozos y enseguida fueron agregados 100 μ L del conjugado estreptavidina-peroxidasa de rábano y este fue incubado durante 45 min. Posteriormente, fueron eliminados de los pozos los excedentes a través de lavados y finalmente se adicionaron 100 μ L del cromógeno. Inmediatamente fue determinada la absorbancia de cada pozo a una longitud de onda de 450 nm y la concentración de TNF- α /IL-1 β /IL-6 se calculó a través de la interpolación en la curva estándar. Las concentraciones de citocinas se expresaron en pg/mL.

5.3 Evaluación del daño gastrointestinal

Los estómagos de los animales administrados con una dosis diaria de s.s., hesperidina (562.3mg/kg, i.p.), ketorolaco (0.56 mg/kg, i.p.), hesperidina (562.3 mg/kg, i.p.) + ketorolaco (0.56 mg/kg, i.p.) y dexametasona (0.1 mg/kg, i.p.) durante cinco días consecutivos se examinaron al día 29 del experimento. A los animales previamente sacrificados en una cámara de CO₂ se les disecó el estómago desde el esófago hasta la porción del píloro y se llenaron con 10 ml de formaldehído al 4%. Después de un reposo de 15 min para fijar las capas gástricas íntima y superficial, los estómagos se seccionaron a lo largo de la curvatura mayor. Las lesiones hemorrágicas fueron fotografiadas y posteriormente escaneadas para cuantificar el daño gástrico expresado como el área de la lesión gástrica (mm²) en el cuerpo del estómago.

5.4 Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó mediante análisis de varianza (ANADEVA) de dos vías seguido de una prueba de Bonferroni en la comparación contra el control para un nivel de significancia $P < 0.05$ para los cursos temporales y ANADEVA de una vía seguida de la prueba de Tukey para un nivel de significancia $P < 0.05$ para la comparación de los efectos totales, para lo cual se utilizó el programa de computo GraphPad Prism (GraphPad Software, 2007).

6. RESULTADOS

6.1 Índice de artritis experimental

El curso temporal muestra que la inmunización con colágeno induce artritis experimental en ratas hembra (Fig. 11). La evaluación visual de los animales evidenció la presencia de eritema periarticular y edema, acompañado de enrojecimiento, hinchazón y reducción de la funcionalidad de las extremidades posteriores de los animales como clara manifestación del desarrollo de la inflamación de forma similar a los signos clínicos de artritis. El inicio de la artritis experimental se observó 18 días posteriores a la primera inmunización en comparación con el grupo no inmunizado que no presentó algún síntoma, por lo que el valor de índice de artritis fue igual a 0 durante todo el experimento.

El progreso de la enfermedad aumentó en frecuencia y severidad de forma dependiente del tiempo en los animales inmunizados con colágeno II observándose una meseta del índice de artritis entre los días 24 y 29. En el grupo control se observa que el índice de artritis aumentó de manera significativa en comparación con el grupo no inmunizado, sin la recuperación espontánea de los animales a lo largo del estudio (Fig. 11A). Por otra parte, la administración repetida de la combinación de hesperidina + ketorolaco, una dosis diaria durante 5 días (del día 24 al día 28) (Fig. 11B) redujo de forma significativa el índice de artritis ($P < 0.0001$). Dicha reducción fue semejante a la producida por el fármaco de referencia dexametasona. Mientras que la administración individual de hesperidina o ketorolaco reduce en menor grado el índice de artritis.

En la Fig. 12 se muestra que la administración del vehículo no modifica el índice de artritis en las ratas inmunizadas. En tanto que la administración de la combinación de hesperidina + ketorolaco produjo un claro efecto de sinergismo, ya que el efecto resulta mayor al producido por la administración individual de los fármacos y similar al inducido por el fármaco de referencia dexametasona.

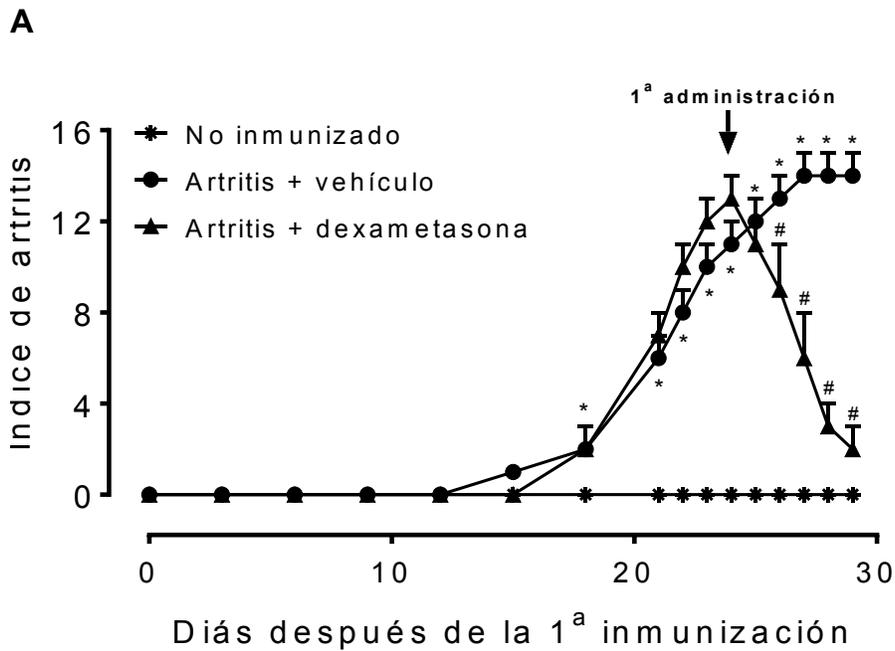


Figura 11. Curso temporal del índice de artritis en ratas hembra con artritis inducida por colágeno. **A)** No inmunizado (*), artritis + vehículo (●), artritis + dexametasona (▲). **B)** artritis + hesperidina (■), artritis + ketorolaco (▼) artritis + combinación (◆). Cada punto representa la media + E.E.M. de 8 ratas. * $P < 0.0001$, ANDEVA de dos vías seguido de la prueba de Bonferroni (no inmunizado vs artritis + vehículo). # $P < 0.0001$, ANDEVA de dos vías seguido de la prueba de Bonferroni (artritis + vehículo vs tratamientos).

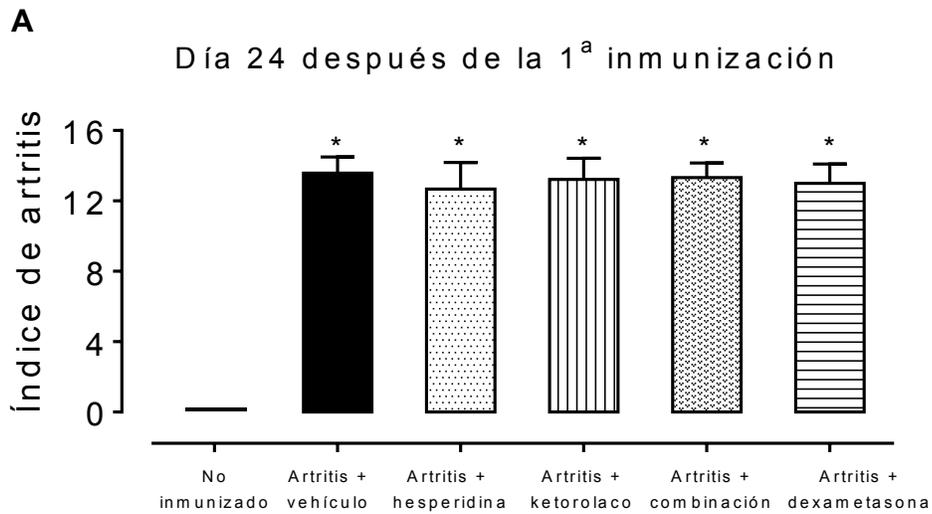


Figura 12. Efecto anti-artrítico de la combinación de hesperidina + ketorolaco en ratas hembra con artritis inducida por colágeno. **A)** Índice de artritis 24 días después de la primera inmunización que corresponde al inicio de la administración de los diferentes tratamientos: vehículo, hesperidina, ketorolaco, combinación de hesperidina + ketorolaco y dexametasona. La existencia de una diferencia estadística significativa entre el grupo no inmunizado y los diferentes grupos inmunizados con colágeno tipo II indica el desarrollo de artritis experimental. **B)** Índice de artritis 29 días después de la primera inmunización que corresponde al fin de la administración de los diferentes tratamientos (5 dosis/1día). La diferencia estadística significativa con respecto al grupo tratado con el vehículo sugiere un efecto anti-artrítico. * $P < 0.0001$, ANDEVA de una vía seguido de la prueba de Tukey.

6.2 Cuantificación de la inflamación

En las Figs. 13 y 14 se muestran el incremento en el porcentaje de inflamación de ambas extremidades posteriores de las ratas hembra. Se observó que la frecuencia y severidad de la inflamación fue dependiente del tiempo con un máximo de $59.8 \pm 2.5 \%$ para la extremidad posterior derecha y $57.8 \pm 3 \%$ para la extremidad posterior izquierda entre los días 24 y 29, como se observó en el grupo a cuyos animales se les administró el vehículo (Figs. 13A y 14A). La inflamación en ambas extremidades posteriores de las ratas con artritis experimental inducida por colágeno fue reducida de forma significativa ($P < 0.0001$) en las ratas administradas con la combinación de hesperidina + ketorolaco durante 5 días consecutivos (Figs. 13B y 14B). Esta reducción de la inflamación inicio el día 25, un efecto comparable al producido por la administración de dexametasona (Figs. 13 y 14). Además, la administración individual de hesperidina siguiendo el mismo esquema de dosificación también reduce de manera significativa ($P < 0.0001$) la inflamación a partir del día 27 (Figs. 13B y 14B) mientras que la administración individual de ketorolaco resulto ineficaz en reducir la inflamación en ratas artríticas (Figs. 13B y 14B).

En las Figs. 15 y 16 se muestra el efecto anti-inflamatorio total producido por la administración de los diferentes tratamientos en animales con artritis experimental. Las gráficas muestran que la administración de la combinación de hesperidina + ketorolaco produce un efecto anti-inflamatorio sinérgico ya que el efecto resulta mayor al producido por la administración individual de los fármacos y similar al inducido por el fármaco de referencia dexametasona.

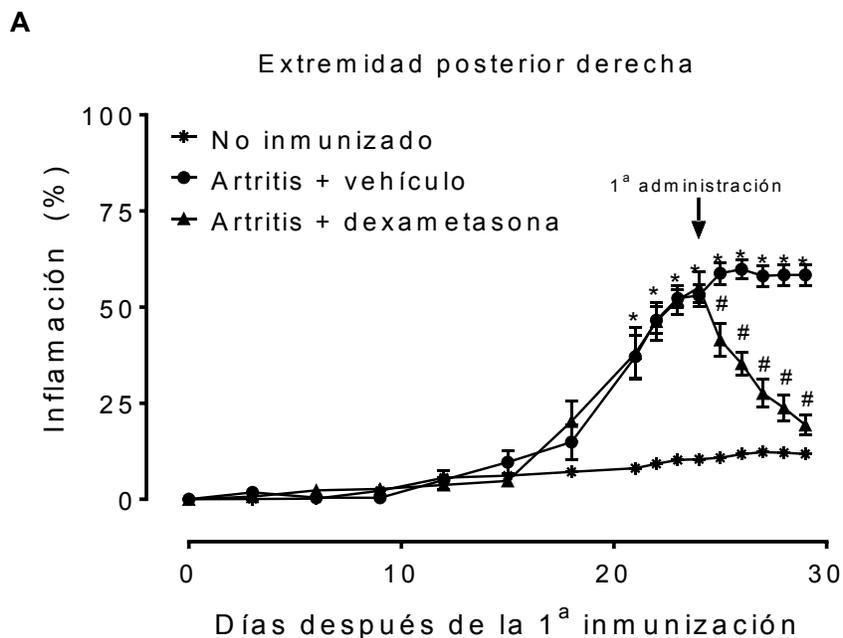


Figura 13. Curso temporal del desarrollo de la inflamación en ratas hembra con artritis inducida por colágeno. La gráfica muestra el progreso de la inflamación de la extremidad posterior derecha de ratas artríticas. **A)** No inmunizado (*), artritis + vehículo (●), artritis + dexametasona (▲). **B)** Artritis + hesperidina (■), artritis + ketorolaco (▼), artritis + combinación (◆). Los tratamientos fueron administrados durante 5 días consecutivos. Cada punto representa la media + E.E.M. de 8 animales. * $P < 0.0001$, ANDEVA de dos vías seguido de la prueba de Bonferroni (no inmunizado vs artritis + vehículo). # $P < 0.0001$, ANDEVA de dos vías seguido de la prueba de Bonferroni (artritis + vehículo vs tratamientos).

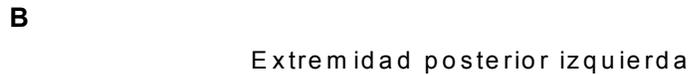
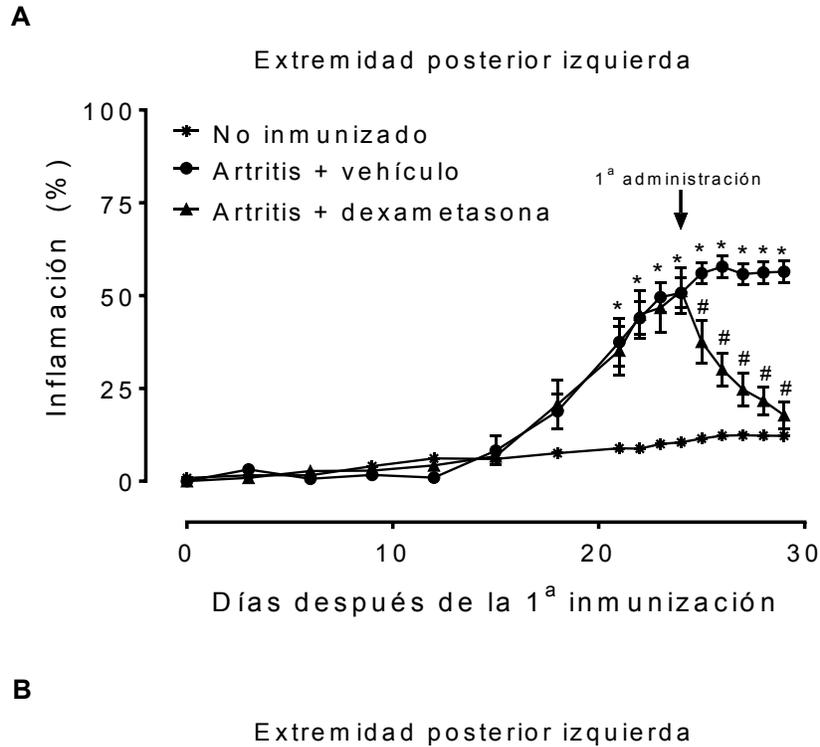
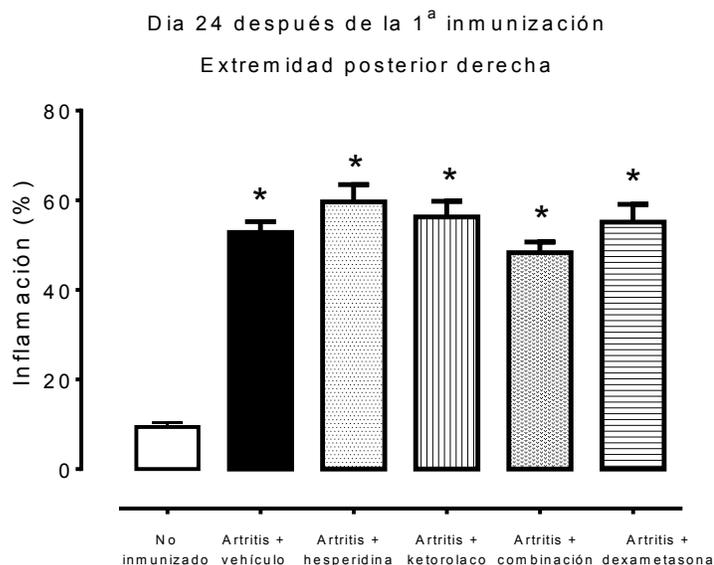


Figura 14. Curso temporal del desarrollo de la inflamación en ratas hembra con artritis inducida por colágeno. La gráfica muestra el curso temporal del progreso del porcentaje de inflamación de la extremidad posterior izquierda de ratas artríticas. **A**) No inmunizado (+), artritis + vehículo (●), artritis + dexametasona (▲). **B**) Artritis + hesperidina (■), artritis + ketorolaco (▼), artritis + combinación (◆). Los tratamientos fueron administrados durante 5 días consecutivos. Cada punto representa la media + E.E.M. de 8 animales. * $P < 0.0001$, ANDEVA de dos vías seguido de la prueba de Bonferroni (no inmunizado vs artritis + vehículo). # $P < 0.0001$, ANDEVA de dos vías seguido de la prueba de Bonferroni (artritis + vehículo vs tratamientos).

A

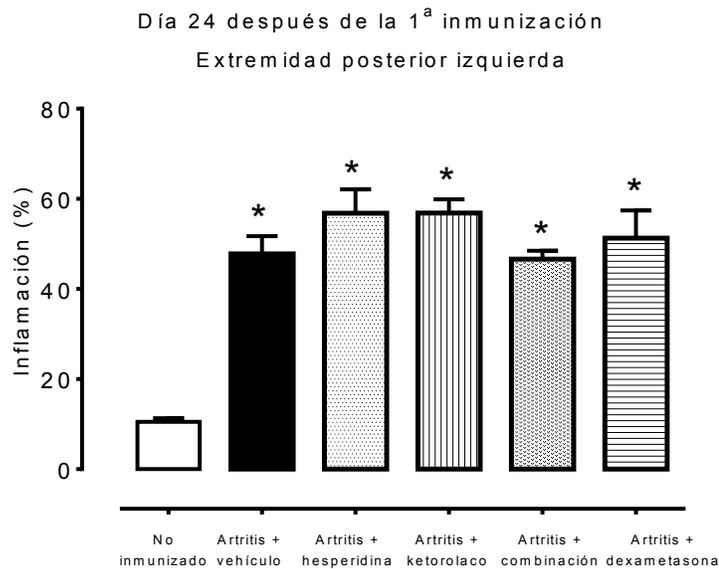


B

Día 29 después de la 1^a inmunización
Extremidad posterior derecha

Figura 15. Efecto anti-inflamatorio total de la combinación de hesperidina + ketorolaco en ratas hembra con artritis inducida por colágeno. La gráfica muestra el porcentaje de inflamación de la extremidad posterior derecha. **A)** Porcentaje de inflamación 24 días después de la primera inmunización que corresponde al inicio de la administración de los diferentes tratamientos: vehículo, hesperidina, ketorolaco, combinación y dexametasona. La existencia de una diferencia estadística significativa entre el grupo no inmunizado y los diferentes grupos inmunizados con colágeno tipo II indica el desarrollo de inflamación. **B)** Índice de artritis 29 días después de la primera inmunización que corresponde al fin de la administración de los diferentes tratamientos (5 dosis/1 día). La existencia de una diferencia estadística significativa con respecto al grupo tratado con el vehículo sugiere un efecto anti-inflamatorio. * $P < 0.0001$, ANDEVA de una vía seguido de la prueba de Tukey.

A



B

Día 29 después de la 1ª inmunización
Extremidad posterior izquierda

Figura 16. Efecto anti-inflamatorio total de la combinación de hesperidina + ketorolaco en ratas hembra con artritis inducida por colágeno. La gráfica muestra el porcentaje de inflamación de la extremidad posterior izquierda. **A)** Porcentaje de inflamación 24 días después de la primera inmunización que corresponde al inicio de la administración de los diferentes tratamientos: vehículo, hesperidina, ketorolaco, combinación y dexametasona. La existencia de una diferencia estadística significativa entre el grupo no inmunizado y los diferentes grupos inmunizados con colágeno tipo II indica el desarrollo de inflamación. **B)** Índice de artritis 29 días después de la primera inmunización que corresponde al fin de la administración de los diferentes tratamientos (5 dosis/1 día). La existencia de una diferencia estadística significativa con respecto al grupo tratado con el vehículo sugiere un efecto anti-inflamatorio. * $P < 0.0001$, ANDEVA de una vía seguido de la prueba de Tukey.

6.3 Cuantificación de los umbrales nociceptivos

La inmunización con colágeno tipo II resultó en el desarrollo de hiperalgesia mecánica en las extremidades posteriores de ratas hembra (Figs. 17A y 18A), observándose disminución significativa ($P < 0.0001$) en el umbral de retiro de ambas extremidades en comparación con el grupo no inmunizado. El desarrollo de la hiperalgesia mecánica incrementó de forma dependiente del tiempo, observándose una reducción máxima en el umbral de retiro entre los días 24 y 29 en el grupo administrado con el vehículo. La administración de los tratamientos individuales con hesperidina o ketorolaco no produce cambios en el umbral nociceptivo inducido por el desarrollo de artritis experimental (Figs. 17B y 18B). Sin embargo, se produjo un efecto anti-hiperalgésico de $82.6 \pm 8.1\%$ para la extremidad posterior derecha y de $86.5 \pm 7.8\%$ para la extremidad posterior izquierda cuando se administró la combinación de hesperidina + ketorolaco durante 5 días consecutivos. Las figuras 19 y 20 muestran un efecto anti-hiperalgésico sinérgico, ya que el efecto de la combinación resulta mayor al producido por la administración individual de los fármacos. Adicionalmente, la administración de dexametasona revierte el desarrollo de hiperalgesia mecánica en el modelo de artritis inducida por colágeno en menor proporción en comparación con la administración de hesperidina + ketorolaco (Figs. 19 y 20).

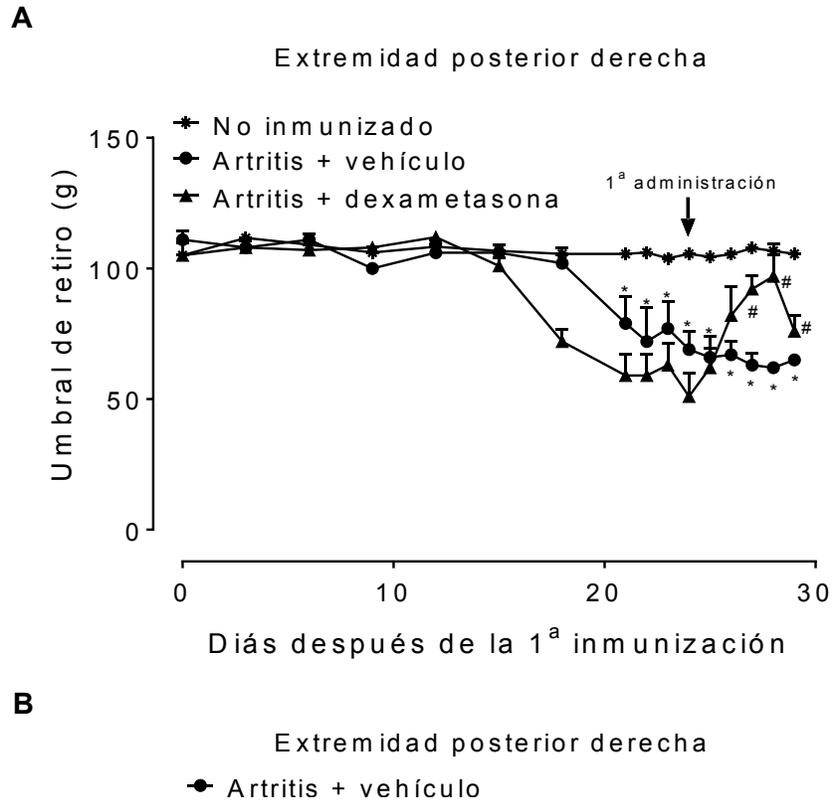


Figura 17. Curso temporal de la hiperalgesia mecánica en ratas hembra con artritis inducida por colágeno. La gráfica muestra el desarrollo de la hiperalgesia mecánica evaluada por el método Randall-Selitto en la extremidad posterior derecha de ratas artríticas. **A)** No inmunizado (*), artritis + vehículo (●), artritis + dexametasona (▲). **B)** Artritis + hesperidina, artritis + ketorolaco (▼), artritis + combinación (◆). Los tratamientos fueron administrados durante 5 días consecutivos. Cada punto representa la media + E.E.M. de 8 animales. *P<0.0001, ANDEVA de dos vías seguido de la prueba de Bonferroni (no inmunizado vs artritis + vehículo). #P<0.0001, ANDEVA de dos vías seguido de la prueba de Bonferroni (artritis + vehículo vs tratamientos).

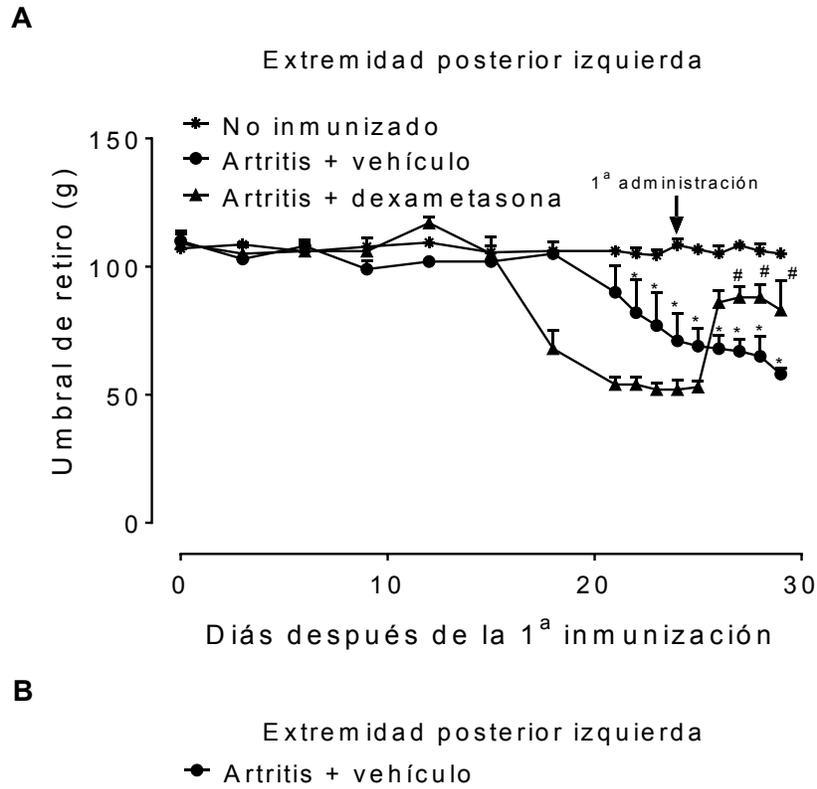
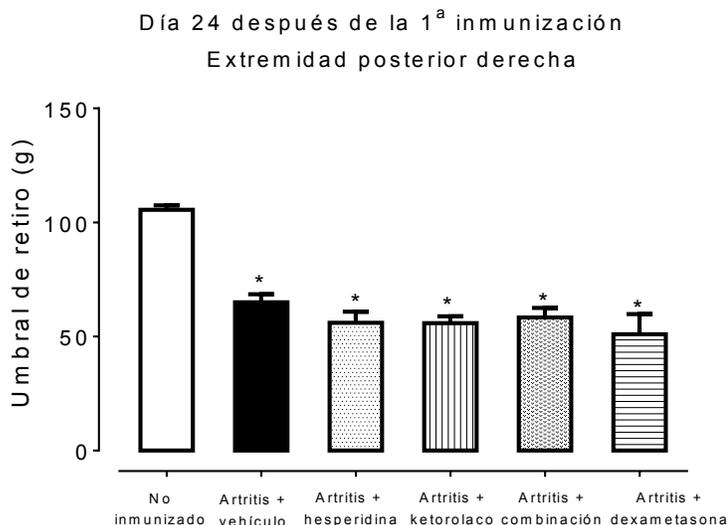


Figura 18. Curso temporal de la hiperalgesia mecánica en ratas hembra con artritis inducida por colágeno. La gráfica muestra el desarrollo de la hiperalgesia mecánica evaluada por el método Randall-Selitto en la extremidad posterior izquierda de ratas artríticas. **A)** No inmunizado (◻), artritis + vehículo (●), artritis + dexametasona (▲). **B)** Artritis + hesperidina (■), artritis + ketorolaco (▼), artritis + combinación (◆). Los tratamientos fueron administrados durante 5 días consecutivos. Cada punto representa la media + E.E.M. de 8 animales. * $P < 0.0001$, ANDEVA de dos vías seguido de la prueba de Bonferroni (no inmunizado vs artritis + vehículo). # $P < 0.0001$, ANDEVA de dos vías seguido de la prueba de Bonferroni (artritis + vehículo vs tratamientos).

A

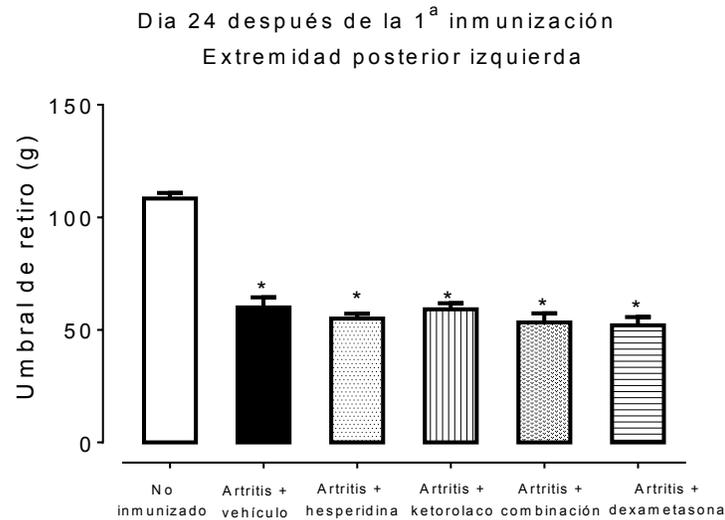


B

Día 29 después de la 1^a inmunización
Extremidad posterior derecha

Figura 19. Efecto anti-hiperalgésico total de la combinación de hesperidina + ketorolaco en ratas hembra con artritis inducida por colágeno. La gráfica muestra el umbral mecánico de retiro expresado en gramos de la extremidad posterior derecha. **A)** Umbral mecánico de retiro 24 días después de la primera inmunización que corresponde al inicio de la administración de los diferentes tratamientos: vehículo, hesperidina, ketorolaco, combinación y dexametasona. La existencia de una diferencia estadística significativa entre el grupo no inmunizado y los diferentes grupos inmunizados con colágeno tipo II indica el desarrollo de hiperalgesia mecánica. **B)** Índice de artritis 29 días después de la primera inmunización que corresponde al fin de la administración de los diferentes tratamientos (5 dosis/1 día). La existencia de una diferencia estadística significativa con respecto al grupo tratado con el vehículo sugiere un efecto anti-hiperalgésico. * $P < 0.0001$, ANDEVA de una vía seguido de la prueba de Tukey.

A



B

Día 29 después de la 1^a inmunización
Extremidad posterior izquierda

Figura 20. Efecto anti-hiperalgésico total de la combinación de hesperidina + ketorolaco en ratas hembra con artritis inducida por colágeno. La gráfica muestra el umbral mecánico de retiro expresado en gramos de la extremidad posterior izquierda. **A)** Umbral mecánico de retiro 24 días después de la primera inmunización que corresponde al inicio de la administración de los diferentes tratamientos: vehículo, hesperidina, ketorolaco, combinación y dexametasona. La existencia de una diferencia estadística significativa entre el grupo no inmunizado y los diferentes grupos inmunizados con colágeno tipo II indica el desarrollo de hiperalgesia mecánica. **B)** Índice de artritis 29 días después de la primera inmunización que corresponde al fin de la administración de los diferentes tratamientos (5 dosis/1 día). La existencia de una diferencia estadística significativa con respecto al grupo tratado con el vehículo sugiere un efecto anti-hiperalgésico. * $P < 0.0001$, ANDEVA de una vía seguido de la prueba de Tukey.

6.4 Cuantificación de niveles de TNF- α , IL-1 β e IL-6

Los niveles de las citocinas pro-inflamatorias TNF- α , IL-1 β e IL-6 se incrementaron en el suero de las ratas con artritis de manera significativa en comparación con el grupo no inmunizado. Por otra parte, los niveles séricos de estas citocinas fueron reducidos significativamente a valores similares a los observados en el grupo no inmunizado en las ratas tratadas con la combinación de hesperidina + ketorolaco y con los tratamientos individuales con hesperidina, ketorolaco y dexametasona ($P < 0.0001$) (Fig. 21).

6.5 Evaluación del daño gastrointestinal

En la Fig. 22 se muestra que la administración de s.s., la combinación de hesperidina + ketorolaco o la administración individual de hesperidina durante 5 días consecutivos no produjo úlceras o erosiones en la mucosa gástrica. En contraste, la administración de ketorolaco o dexametasona generó úlceras gástricas.

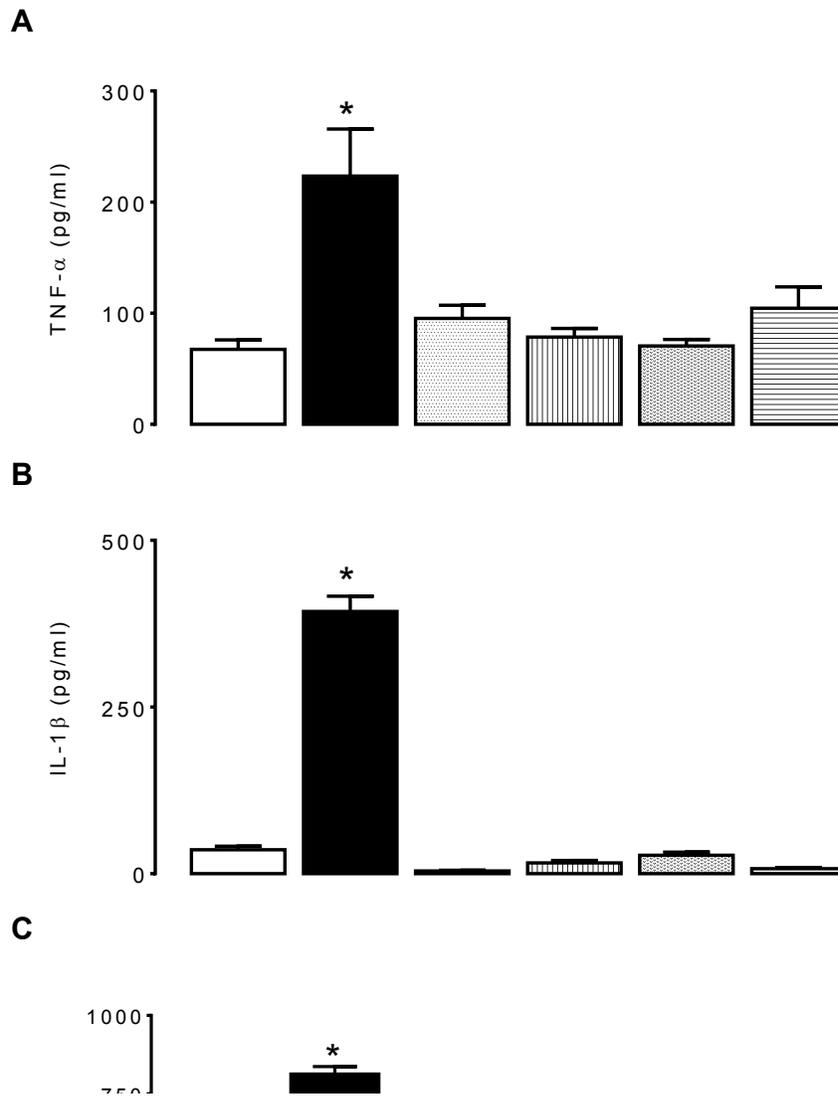


Figura 21. Efecto de la combinación de hesperidina + ketorolaco en los niveles de citocinas pro-inflamatorias de suero de ratas hembra con artritis inducida por colágeno. La gráfica muestra la concentración de citocinas expresada en (pg/ml) de ratas artríticas tratadas durante 5 días consecutivos con: vehículo, hesperidina, ketorolaco, combinación y dexametasona. **A)** TNF- α . **B)** IL-1 β y **C)** IL-6. Cada barra representa la media \pm E.E.M. de 8 animales.* $P < 0.0001$, ANDEVA seguida de la prueba de Tukey (no inmunizado vs tratamientos).

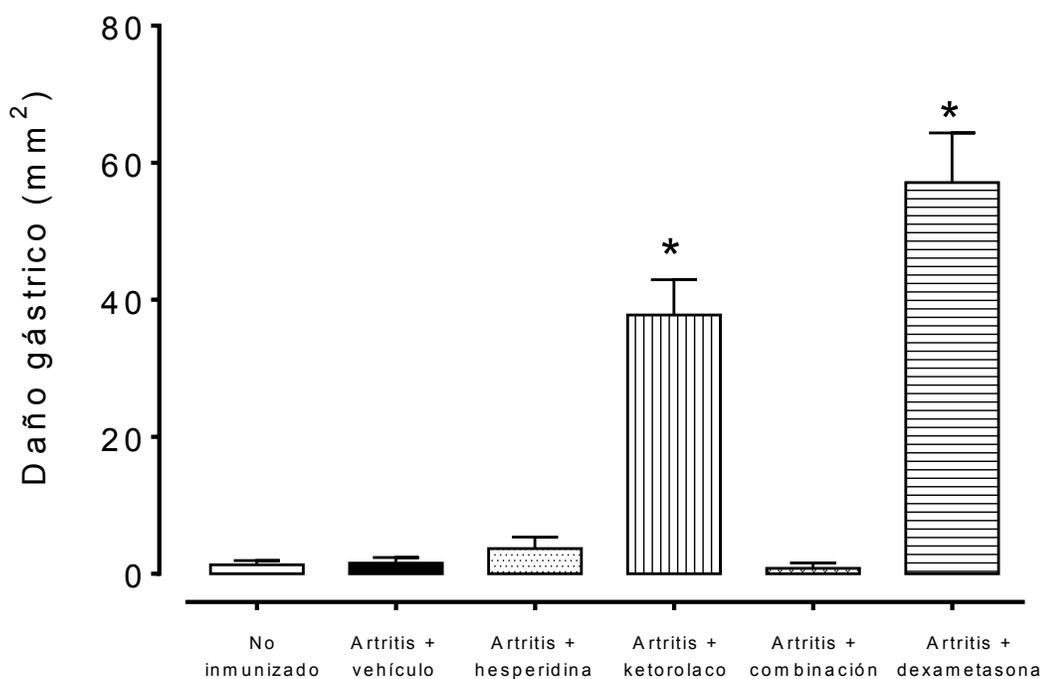


Figura 22. Daño gástrico inducido por la administración de la combinación de hesperidina y ketorolaco en ratas hembra con artritis inducida por colágeno. La gráfica muestra el daño gástrico inducido por la administración de una dosis diaria de los tratamientos durante 5 días consecutivos: vehículo (tween 80 al 0.2% en s.s.), hesperidina (562.3 mg/kg, i.p.), ketorolaco (0.56 mg/kg, i.p.), combinación (hesperidina 562.3 mg/kg y ketorolaco 0.56 mg/kg, i.p.) y dexametasona (0.1 mg/kg, i.p.). Cada barra representa la media \pm E.E.M. de 8 animales.* $P < 0.0001$, ANDEVA seguida de la prueba de Tukey.

7. DISCUSIÓN

Existen diferentes estudios tanto preclínicos como clínicos que proporcionan evidencia de los efectos benéficos del uso de plantas medicinales y productos naturales en el tratamiento del dolor. Sin embargo, la eficacia, seguridad e interacción positiva entre fármacos-herbolaria o fármacos-productos naturales requiere de estudios científicos que lo confirmen. Los extractos de plantas medicinales o productos naturales usados como medicina alternativa por pacientes pueden interactuar con los medicamentos alópatas prescritos, generando un incremento o disminución de los efectos terapéuticos. Es por esta razón que se requiere la realización de estudios farmacológicos preclínicos y clínicos que amplíen el conocimiento científico acerca de los efectos de la medicina herbolaria y los productos naturales para conocer el valor terapéutico real, así como los potenciales riesgos del uso de este tipo de medicina alternativa sola o en combinación con medicina alópata para el tratamiento del dolor (Zareba, 2009). Así en el presente estudio se investigó el efecto anti-inflamatorio y anti-hiperalgésico producido por el bioflavonoide hesperidina en combinación con el anti-inflamatorio no esteroideo, ketorolaco en un modelo de artritis experimental inducida por colágeno.

La artritis reumatoide es una enfermedad autoinmune, inflamatoria, crónica, y progresiva que afecta principalmente a las articulaciones y se caracteriza por la presencia de hiperplasia sinovial, reclutamiento de células inflamatorias y la destrucción progresiva del cartílago y hueso (Choy, 2012). El modelo de artritis inducida por colágeno es un modelo animal de artritis reumatoide dependiente de células T, en este modelo las ratas desarrollan artritis experimental después de la inmunización con colágeno tipo II heterólogo derivado de cartílago (Rioja y cols., 2004). Este modelo experimental es un modelo animal ampliamente utilizado como modelo de poliartritis con características clínicas y patológicas similares a las que se presentan en la artritis reumatoide en humanos, en particular sinovitis, formación de *pannus* y erosión del cartílago y hueso articular. Es por estas razones que este modelo experimental ha sido ampliamente usado para la evaluación farmacológica de fármacos con potencial

antirreumático (Jonas y cols., 1982). Las diversas cepas de ratas poseen diferente susceptibilidad genética a la inducción de artritis por colágeno, así en cada cepa podemos encontrar animales que responden a la inmunización y animales que no responden (Kim & Moudgil, 2009). En este estudio, la administración subcutánea de la emulsión (1:1) de colágeno II derivado de cartílago de pollo y el adyuvante completo de Freund (*Mycobacterium tuberculosis* inactivada por calor) en la base de la cola de ratas hembra de la cepa Wistar, generó el 55.5% de animales artríticos con un pico de respuesta inflamatoria que afecta todas las extremidades del animal entre la semana 3-4 después de la primera inmunización.

La administración de la combinación de hesperidina y ketorolaco redujo el índice de artritis, inflamación e hiperalgesia de las extremidades posteriores de los animales artríticos a valores cercanos a los presentados por el grupo no inmunizado. Hesperidina (5,7,3'-trihidroxi-4'-metoxi-flavanona 7-ramnoglucósido) es una flavanona glicosilada frecuentemente encontrada en frutas cítricas (Garg y cols., 2001) y en plantas medicinales tales como *Rosmarinus officinalis* (Okamura y cols., 1994; Martínez y cols., 2011), *Citrus sinensis* (Guzmán-Gutiérrez & Navarrete, 2009) *Mentha piperita* (McKay & Blumberg, 2006) y *Byrsomina crassifolia* (Herrera-Ruiz y cols., 2011), utilizadas en la medicina tradicional por sus propiedades anti-inflamatorias y analgésicas. Diversos estudios han demostrado que la administración individual de hesperidina produce efectos anti-inflamatorios en el modelo de edema inducido tanto por carragenina como por dextran (Emim y cols., 1994; Galati y cols., 1994); artritis inducida por el adyuvante de Freund (Guardia y cols. 2001; Rotelli y cols., 2003); analgésicos en el modelo de estiramiento abdominal inducido por ácido acético (Loscalzo y cols. 2008); modelo de plancha caliente (Loscalzo y cols., 2011) y modelo de disfunción inducida por artritis gotosa (Martínez y cols., 2011).

En el modelo de artritis inducida por colágeno, la activación de la inmunidad mediada por células resulta en la secreción de citocinas relacionadas a células Th-1 y a la producción de radicales libres que provocan la degeneración articular (Sharma y cols., 2012). Se ha sugerido que la supresión de mediadores inflamatorios y del estrés

oxidativo puede ser usada como un tratamiento para la artritis reumatoide. El mecanismo de acción de hesperidina no es completamente comprendido. Sin embargo, hesperidina inhibe de manera significativa la síntesis de PGs *in vivo* (Damon y cols., 1987) y también reduce de manera dosis dependiente la producción de óxido nítrico, TNF- α , IL-12 inducidas por lipopolisacáridos e INF- γ , efectos que podrían asociarse al mecanismo de acción a través del cual hesperidina reduce la inflamación y la nocicepción en varios modelos experimentales (Rao y cols., 2008).

Por otra parte, las citocinas han sido directamente implicadas en muchos procesos inmunes asociados a la patogénesis de la artritis reumatoide. Tanto en la artritis reumatoide como en el modelo de artritis inducida por colágeno el sitio de inflamación primario es el tejido sinovial, el cual puede liberar citocinas a la circulación sistémica. Las citocinas implicadas directamente en los procesos patofisiológicos de la artritis reumatoide son TNF- α , IL-1 β e IL-6 (Choy, 2012), entre otras; las cuales son mediadores claves en la migración celular y la inflamación en la artritis reumatoide. El TNF- α está presente en la mayoría de las biopsias sinoviales y su inhibición suprime las manifestaciones clínicas de la patología en varios modelos de artritis experimental, mientras que la sobreexpresión de TNF- α induce artritis inflamatoria erosiva de manera espontánea (Keffer y cols., 1991). El TNF- α induce la activación de los leucocitos y células endoteliales, activación y supervivencia de fibroblastos sinoviales, sensibilización de los nociceptores y angiogénesis, todas ellas características patológicas claves de la artritis reumatoide. El bloqueo terapéutico del TNF- α produce una respuesta clínica en aproximadamente el 70% de los pacientes con artritis reumatoide establecida, y resulta en una rápida (< 24 h) disminución en los niveles de IL-6 y proteínas de fase aguda, supresión de la migración de leucocitos, desactivación de la células endoteliales y recuperación tanto de la función reguladora como del fenotipo de las células T (McInnes & Schett, 2007). Por otra parte, la IL-6 es una citocina efectora importante derivada de los monocitos; es una citocina requerida para la generación de la artritis experimental inducida por colágeno. La IL-6 induce la activación de osteoclastos, reclutamiento de neutrófilos, formación de *pannus* mediante la promoción de la producción del factor de crecimiento endotelial vascular, proliferación

de células B, producción de anticuerpos, proliferación y diferenciación de células T, y la producción de proteínas de fase aguda que a su vez contribuyen a la inflamación y a la destrucción de hueso (McInnes & Schett, 2007; Choy, 2012). Por su parte, la IL-1 β aumenta la liberación de citocinas, quimiocinas, metaloproteinasas de la matriz extracelular y PGs de los fibroblastos sinoviales, induce la activación de los osteoclastos y la expresión de moléculas de adhesión en las células endoteliales (McInnes & Schett, 2007). Además, IL-1 α e IL-1 β son expresadas en el sinovio de pacientes con artritis reumatoide. También se ha observado que en ratones deficientes del antagonista del receptor IL-1 (también conocido como IL-1RA o IL1RN) se desarrolla artritis erosiva espontánea asociada a la inducción de células T_H17 (Horai y cols., 2000; Dayer & Bresnihan, 2002). Los resultados de este estudio muestran que la administración de la combinación de hesperidina y ketorolaco reduce los niveles de TNF- α , IL-1 β e IL-6 en comparación con el grupo artritis + vehículo. Por lo tanto, es posible especular que la combinación de hesperidina y ketorolaco ejerza un efecto regulador negativo de estas citocinas pro-inflamatorias en la artritis experimental inducida por colágeno, lo que puede reducir la respuesta inflamatoria. Así resulta razonable sugerir que parte del efecto anti-inflamatorio producido por esta combinación pueda ser mediado a través de la inhibición de TNF- α , IL-1 β e IL-6.

El método de Randall & Selitto (1957), permite cuantificar el umbral mecánico de retiro al aplicar una fuerza mecánica lineal en el dorso de las extremidades posteriores del animal. Esta prueba fue introducida como una herramienta para evaluar la capacidad de los fármacos analgésicos para modificar la respuesta umbral a una estimulación mecánica en tejidos inflamados. De acuerdo a los resultados obtenidos es poco probable que la reducción en la inflamación inducida por la administración de la combinación de hesperidina y ketorolaco sea responsable del efecto anti-hiperalgésico observado, ya que dexametasona no fue capaz de reducir significativamente la hiperalgesia mecánica presente en las ratas artríticas a pesar de haber inducido un efecto anti-inflamatorio. Estudios recientes han sugerido que el receptor TRPV1 expresado neuronalmente está involucrado en la inflamación crónica y en el dolor asociado a la artritis (Szabo y cols., 2005). En un estudio previo nuestro grupo de

investigación se demostró que el pre-tratamiento con capsazepina, un antagonista selectivo TRPV1, parcialmente reduce el efecto antinociceptivo inducido por la administración de hesperidina en el modelo experimental PIFIR, un modelo de artritis gotosa (Martínez y cols., 2011). El receptor vanilloide TRPV1 es un canal catiónico no selectivo con elevada preferencia por calcio que responde a estímulos mecánicos, térmicos y químicos. El receptor TRPV1 es activado por capsaicina, resiniferatoxina, calor nocivo ($> 43\text{ }^{\circ}\text{C}$), pH bajo (≈ 5.2), voltaje y por varios lípidos endógenos como la anandamida, ácido 12-hidroperoxieicosatetraenoico (12-HPETE) y N-araquidonoil dopamina (NADA) (Ramsey, 2006). Este receptor está involucrado en la transmisión y modulación del dolor, así como en la integración de varios estímulos dolorosos (Cui y cols., 2006). En estudios previos se ha reportado la participación del receptor TRPV1 en el efecto antinociceptivo de algunos flavonoides. Sui y cols. (2010) reportaron que el flavonoide baicalina induce una regulación a la baja del receptor TRPV1 en neuronas del ganglio de la raíz dorsal, lo cual puede contribuir a su mecanismo de antinocicepción. Además, se ha reportado que el flavonoide 6-hidroxi-7-metoxi-3-(4'-hidroxibencil) cromona inhibe las corrientes iónicas en neuronas aisladas del ganglio de la raíz dorsal de manera reversible y no competitiva (Wang y cols., 2008). Otro estudio mostró que el flavonoide eriodictiol reduce la nocicepción en la prueba de la capsaicina, así como la hiperalgesia térmica y alodinia mecánica inducida por la administración del adyuvante de Freund. Adicionalmente, este flavonoide fue capaz de desplazar la unión de ^3H -resiniferatoxina y de inhibir el influjo de calcio mediado por capsaicina, sugiriendo que eriodictiol actúa como un antagonista TRPV1 (Rosato y cols., 2011).

Otros mecanismos de acción antinociceptiva se han sugerido para hesperidina. Loscalzo y cols., 2008 reportaron que la administración de naltrexona (5 mg/kg, i.p.) inhibió de manera significativa el efecto antinociceptivo de hesperidina en el modelo experimental de dolor visceral en ratones, sugiriendo la participación del sistema opioide. No obstante, la administración de naloxona 1 y 10 mg/kg no redujo el efecto de hesperidina sobre la nocicepción inducida en el modelo experimental de artritis gotosa (Martínez y cols., 2011). Lo anterior sugiere que el mecanismo de acción de hesperidina

podría depender de los mediadores involucrados en el tipo de nocicepción inducida experimentalmente.

Aunque los flavonoides comparten ciertos mecanismos de acción con los AINEs, incluyendo la inhibición de las enzimas involucradas en la generación de eicosanoides y la capacidad para inhibir la expresión de moléculas pro-inflamatorias y factores de transcripción (Kim y cols., 2004), es posible que más de un mecanismo de acción participe en el sinergismo observado entre hesperidina y ketorolaco en este estudio.

Ketorolaco es un anti-inflamatorio no esteroideo que pertenece a la familia de derivados del ácido heteroaril acético. Es comercializado en forma de racemato. Su efecto analgésico se debe principalmente a la actividad inhibitoria sobre COX del isómero-S. Ketorolaco es administrado como tratamiento para el dolor agudo de origen musculoesquelético, dolor postoperatorio y cólico renal (Sinha y cols., 2009). Posee una eficaz actividad analgésica y una moderada actividad anti-inflamatoria. En estudios clínicos, una dosis única de ketorolaco es tan efectiva como una de morfina (Buckley & Brogden, 1990). Sin embargo, la frecuente ocurrencia de trastornos gastrointestinales, incluyendo sangrado gastrointestinal, perforación y úlcera péptica limitan su uso crónico. En adición a la inhibición no selectiva de COX, la activación de la vía ON-GMPc-K⁺, conocida como la cascada de señalización clásica del óxido nítrico, también se ha asociado al efecto antinociceptivo inducido por ketorolaco (Lázaro-Ibáñez y cols. 2001).

Finalmente, con respecto al daño gástrico evaluado como efecto adverso, se ha reportado que la administración aguda 1 mg/kg de ketorolaco en ratas produce 26% de daño gástrico (López-Muñoz y cols., 2004). Sin embargo, la administración de la combinación de hesperidina y ketorolaco no produjo daño gástrico cuando esta fue administrada durante 5 días consecutivos. Demostrando que la combinación de estos fármacos con propiedades antinociceptivas y anti-inflamatorias puede producir efectos terapéuticos sinérgicos sin el aumento de los efectos adversos.

8. CONCLUSIÓN

El sinergismo observado en el efecto anti-inflamatorio y anti-hiperalgésico producido por la combinación del bioflavonoide hesperidina y el anti-inflamatorio no esteroideo ketorolaco sin la generación de algún daño gástrico como efecto adverso en el modelo de artritis inducida por colágeno sugiere su potencial en el tratamiento de la artritis reumatoide.

9. PERSPECTIVAS

En general la terapia combinada se entiende como la combinación de dos o más fármacos, los cuales pueden poseer mecanismos de acción complementarios, que aumentan la gama de opciones terapéuticas para el tratamiento de casi todas las enfermedades humanas. No obstante, durante la realización de este estudio no se llevó a cabo ningún diseño experimental orientado a detectar los mecanismos que expliquen la potenciación antinociceptiva o que puedan descartar la presencia de efectos adversos de distinta naturaleza al que se estudió en el presente trabajo; sin embargo, estos estudios son necesarios y será interesante realizar su investigación en el futuro.

10. BIBLIOGRAFÍA

1. Aasmundstad TA, Morland J, Paulsen RE (1995). Distribution of morphine 6-glucuronide and morphine across the blood–brain barrier in awake, freely moving rats investigated by in vivo microdialysis sampling. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 275, 435-441.
2. Álvarez E, Peláez I, Boonen A, Vázquez J, Hernández A, Rivera FC, Teran L, Ventura L, Ramos C, Skinner C, Goycochea MV, Bernard AG, Burgos R (2012). Catastrophic health expenses and impoverishment of households of patients with rheumatoid arthritis. *Reumatología clínica*, 8(4),168-173.
3. Atzeni F, Benucci M, Sallì S, Bongiovanni S, Boccassini L, Sarzi-Puttini P (2013). Different effects of biological drugs in rheumatoid arthritis. *Autoimmunity Reviews*, 12(5), 575-9.
4. Beiche F, Scheuerer S, Brune K, Geisslinger G, Goppelt-Struebe M (1996). Up-regulation of cyclooxygenase-2 mRNA in the rat spinal cord following peripheral inflammation. *FEBS Letters*, 390, 165-169.
5. Benavente-García O, Castillo J (2008). Update on uses and properties of citrus flavonoids: New findings in anticancer, cardiovascular, and anti-inflammatory activity. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 56(15), 6185-6205.
6. Berg J, Fellier H, Christoph T, Graup J, Stimmeder C (1999). The analgesic NSAID lornoxicam inhibits cyclooxygenase (COX)-1/2, inducible nitric oxide synthase (iNOS), and the formation of interleukin (IL)-6 in Vitro. *Inflammation Research*, 48(7), 369-379.
7. Buckley MM, Brogden RN (1990). Ketorolac. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic potential. *Drugs*, 39, 86-109.
8. Campo GM, Avenoso A, Campo S, Ferlazzo AM, Altavilla D, Calatroni A (2003). Efficacy of treatment with glycosaminoglycans on experimental collagen-induced arthritis in rats. *Arthritis Research & Therapy*, 5(3), R122-131.
9. Choy E (2012). Understanding the dynamics: pathways involved in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Rheumatology*, 51, v3-v11.

10. Conaghan PG (2012). A turbulent decade for NSAIDs: update on current concepts of classification, epidemiology, comparative efficacy, and toxicity. *Rheumatol International*, 32(6), 1491-502.
11. Cook NC, Samman S (1996). Flavonoids- Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 7(2), 66-76.
12. Crispin J, Liossis S, Kis-Toth K, Lieberman L, Kyttaris V, Juang Y et al. (2010). Pathogenesis of human systemic lupus erythematosus: recent advances. *Trends in Molecular Medicine*, 16(2), 47-57.
13. Cui M, Honore P, Zhong C, Gauvin D, Mikusa J, Hernandez G, Chandran P, Gomtsyan A, Brown B, Bayburt EK, Marsh K, Bianchi B, McDonald H, Niforatos W, Neelands TR, Moreland RB, Decker MW, Lee CH, Sullivan JP, Faltynek CR (2006). TRPV1 receptors in the CNS play a key role in broad-spectrum analgesia of TRPV1 antagonists. *Journal of Neuroscience*, 26, 9385-9393.
14. Damon M, Flandre O, Michel F, Perdrix L, Labrid C, Crastes de Paulet A (1987). Effect of chronic treatment with a purified flavonoid fraction on inflammatory granuloma in the rat. Study of prostaglandin E2 and F2 alpha and thromboxane B2 release and histological changes. *Arzneimittel-forschung/Drug Research*, 37, 1149-1153.
15. D'Archivio M, Filesi C, Di Benedetto R, Gargiulo R, Giovannini C, Masella R (2007). Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Annali dell'Istituto Superiore di Sanita*, 43(4), 348-361.
16. Dayer JM, Bresnihan B (2002). Targeting interleukin-1 in the treatment of rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatism*, 46(3), 574-578.
17. Déciga M, López FJ (2004). Participation of the L-arginine-nitric oxide-cyclic GMP-ATP-sensitive K⁺ channel cascade in the antinociceptive effect of rofecoxib. *European Journal of Pharmacology*, 26:484(2-3), 193-199.
18. Eisenstein EM & Berkun Y (2014). Diagnosis and classification of juvenile idiopathic arthritis. *Journal of Autoimmunity*, 48-49, 31-33.
19. Emim JA, Oliveira AB, Lapa AJ (1994). Pharmacological evaluation of the anti-inflammatory activity of a citrus bioflavonoid, hesperidin, and the isoflavonoids,

- duartin and claussequinone, in rats and mice. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 46, 118-122.
20. Fernández SP, Wasowski C, Paladini AC, Marder M (2005). Synergistic interaction between hesperidin, a natural flavonoid, and diazepam. *European Journal of Pharmacology*, 512(2-3), 189-98.
 21. Formulario Modelo de la OMS 2004. OMS, 2004.
 22. Gabriel SE, Michaud K (2009). Epidemiological studies in incidence, prevalence, mortality, and comorbidity of the rheumatic diseases. *Arthritis Research & Therapy*, 11(3), 229.
 23. Galati EM, Monforte MT, Kirjavainen S, Foretieri AM, Tripodo MM (1994). Biological effects of hesperidin, a citrus flavonoid. (note I): anti-inflammatory and analgesic activity. *Farmaco*, 49, 709-712.
 24. Garg A, Garg S, Zaneveld L, Singla A (2001). Chemistry and Pharmacology of the citrus bioflavonoid hesperidin. *Phytotherapy Research*, 15, 655-669.
 25. González-Trujano ME, Peña EI, Martínez AL, Moreno J, Guevara-Fefer P, Déciga-Campos M, López-Muñoz FJ (2007). Evaluation of the antinociceptive effect of *Rosmanirus officinalis* L. using three different experimental models in rodents. *Journal of Ethnopharmacology*, 111(3), 476-482.
 26. Goutman JD, Waxemberg MD, Doñate-Oliver F, Pomata PE, Calvo DJ (2003). Flavonoid modulation of ionic currents mediated by GABA(A) and GABA(C) receptors. *European Journal of Pharmacology*, 461(2-3), 79-87.
 27. Guardia T, Rotelli AE, Juárez AO, Pelzer LE (2001). Anti-inflammatory properties of plant flavonoids. Effects of rutin, quercetin and hesperidin on adjuvant arthritis in rat. *Farmaco*, 56(9), 683-687.
 28. Guzmán-Gutiérrez SL, Navarrete A (2009). Pharmacological exploration of the sedative mechanism of hesperidin identified as the active principle of *Citrus sinensis* flowers. *Planta Medica*, 75, 295-301.
 29. GraphPad Prism 5.01® GraphPad Software (2007), San Diego California USA.
 30. Grosser T, Smyth E, FitzGerald GA (2011). Anti-inflammatory, antipyretic, and analgesic agents; pharmacotherapy of gout. En: Laurence Brunton L, Chabner B,

- Knollman B (Eds.). *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*. Mc Graw Hill, Colombia, 959-992.
31. Harborne JB, Williams CA (2000). Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*, 55(6), 481-504.
 32. Hausen BM, Bruhn G, Tilsey DA (1990). Contact allergy to Australian blackwood (*Acacia melanoxylon* R. Br) Isolation and identification of new hydroxyflavan sensitizers. *Contact Dermatitis*, 23, 33–39.
 33. Hernández-Valero MA, Prieto MA (2008). Dolor por artritis reumatoide. En: Muriel C, Cevallos C, Díaz R, Díez A, García E, García A, Hernández-Valero MA, Lozano F, Llorca G, Montero B, Muriel J, Nuñez A, Prieto MA, Rodríguez C, Sánchez-Montero F, Santos J, Zapico N. *Dolor Crónico*. Arán Ediciones, México, Módulo 3, 63-90.
 34. Herrera-Ruiz M, Zamilpa A, González-Cortazar M, Reyes-Chilpa R, León E, García MP, Tortoriello J, Huerta-Reyes M (2011). Antidepressant effect and pharmacological evaluation of standardized extract of flavonoids from *Byrsonima crassifolia*. *Phytomedicine*, 18, 1255-1261.
 35. Hirata A, Murakami Y, Shoji M, Kadoma Y, Fujisawa S (2005). Kinetics of radical-scavenging activity of hesperetin and hesperidin and their inhibitory activity on COX-2 expression. *Anticancer research*, 25(5), 3367-74.
 36. Horai R, Saijo S, Tanioka H, Nakae S, Sudo K, Okahara A, Ikuse T, Asano M, Iwakura Y (2000). Development of chronic inflammatory arthropathy resembling rheumatoid arthritis in interleukin 1 receptor antagonist-deficient mice. *Journal of Experimental Medicine*, 191, 313-320.
 37. Huerta-Cruz JC (2005). Tesis de maestría: Determinación de la importancia antinociceptiva en dolor intenso de la asociación de inhibidores preferentemente selectivos COX-2 y un opioide. CINVESTAV-Sede Sur, México. pp.56.
 38. Jones SA, Kennedy AJ, Roberts NA (1982). Assessment of drugs for activity in established type II collagen arthritis. *Agents Actions*, 12(5-6), 650-656.
 39. Kaufmann WE, Andreasson KI, Isakson PC, Worley PF (1997). Cyclooxygenases and the central nervous system. *Prostaglandins*, 54, 601-624.

40. Keffer J, Probert L, Cazlaris H, Georgopoulos S, Kaslaris E, Kioussis D, Kollias G (1991). Transgenic mice expressing human tumour necrosis factor: a predictive genetic model of arthritis. *EMBO Journal*, 10, 4025-4031.
41. Khanna D, Sethi G, Seok Ahn K, Pandey MK, Kunnumakkara AB, Sung B, Aggarwal A, Aggarwal BB (2007). Natural products as a gold mine for arthritis treatment. *Current Opinion in Pharmacology*, 7(3), 344-351.
42. Kidd BL, Langford RM, Wodehouse T (2007). Arthritis and pain. Current approaches in the treatment of arthritic pain. *Arthritis Research & Therapy*, 9(3), 214.
43. Kim EY, Moudgil KD (2009). The determinants of susceptibility/resistance to adjuvant arthritis in rats. *Arthritis Research & Therapy*, 11, 239.
44. Kim HP, Son KH, Chang HW, Kang SS (2004). Anti-inflammatory plant flavonoids and cellular action mechanisms. *Journal of Pharmacological Sciences*, 96, 229-245.
45. Kroemer HK, Klotz U (1992). Glucuronidation of drugs. A reevaluation of the pharmacological significance of the conjugates and modulating factors. *Clinical Pharmacokinetics*, 23, 292-310.
46. Kumar V, Abbas A, Fausto N, Mitchell R (2008). *Robbins Patología Humana*. El sevier, España, 834-835.
47. Lázaro-Ibáñez GG, Torres-López JE, Granados-Soto V (2001). Participation of the nitric oxide-cyclic GMP-ATP-sensitive K(+) channel pathway in the antinociceptive action of ketorolac. *European Journal of Pharmacology*, 426, 39-44.
48. Lee HM, Kim HI, Shin YK, Lee CS, Park M, Song JH (2003). Diclofenac inhibition of sodium currents in rat dorsal root ganglion neurons. *Brain Research*, 992, 120-127.
49. Lee YC (2013). Effect and treatment of chronic pain in inflammatory arthritis. *Current Rheumatology Reports*, 15(1), 300.
50. Lewis RB, Schulman JD (1973). Influence of acetylsalicylic acid, an inhibitor of prostaglandin synthesis, on the duration of human gestation and labour. *Lancet*, 2, 1159-61.

51. Lin JH, Yamazaki M (2003). Role of P-glycoprotein in pharmacokinetics: clinical implications. *Clinical Pharmacokinetics*, 42, 59-98.
52. Lizárraga I, Sumano H, Castillo F (2002). Inhibidores selectivos de la ciclooxigenasa 2: Usos potenciales en perros. *Veterinaria México*, 33(2), 285-307.
53. López-Muñoz FJ, Díaz-Reval MI, Terrón JA, Déciga-Campos M (2004). Analysis of the analgesic interactions between ketorolac and tramadol during arthritic nociception in rat. *European Journal of Pharmacology*, 484:157-165.
54. Loscalzo LM, Wasowski C, Paladini AC, Marder M (2008). Opioid receptors are involved in the sedative and antinociceptive effects of hesperidin as well as in its potentiation with benzodiazepines. *European Journal of Pharmacology*, 580, 306-313.
55. Loscalzo LM, Yow TT, Wasowski C, Chebib M, Marder M (2011). Hesperidin induces antinociceptive effect in mice and its aglicone, hesperetin, binds to μ -opioid receptor and inhibits GIRK1/2 currents. *Pharmacology Biochemistry & Behavior*, 99(3), 333-341.
56. Malmberg AB, Yaksh TL (1992). Antinociceptive actions of spinal nonsteroidal anti-inflammatory agents on the formalin test in the rat. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 263, 136-146.
57. Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jiménez L (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition*, 79(5), 727-747.
58. Marder M, Viola H, Wasowski C, Wolfman C, Waterman PG, Cassels BK, Medina JG, Paladini AC (1996). 6-Bromoflavone, a high affinity ligand for the central benzodiazepine receptors is a member of a family of active flavonoids. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 223(2), 384-389.
59. Martínez A, González M, Chávez M, Pellicer F. (2012). Antinociceptive effectiveness of triterpenes from rosemary in visceral nociception. *Journal of Ethnopharmacology*, 26; 142(1), 28-34.
60. Martínez A, González M, Chávez M, Pellicer F, Moreno J, López F (2011). Hesperidin produces antinociceptive response and synergistic interaction with ketorolac in an arthritic gout-type pain in rats *Pharmacology. Biochemistry and Behavior*, 97, 683-689.

61. McInnes IB, Schett G (2007). Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Nature Reviews Immunology*, 7, 429-442.
62. McKay DL, Blumberg JB (2006). A review of the bioactivity and potential health benefits of peppermint tea (*Mentha piperita* L.). *Phytotherapy Research*, 20, 619-33.
63. Mendoza G, Rocha A, Guerra A, Ramírez M, González A (2013). Artritis Reumatoide y dislipidemias. *El Residente*, 8(1), 12-22.
64. Middleton E, Kandaswami C, Theoharides T (2000). The Effects of Plant Flavonoids on Mammalian Cells: Implications for Inflammation, Heart Disease, and Cancer. *Pharmacological Reviews*, 52(4), 673-751.
65. Miesan KH, Mohamed S (2001). Flavonoid (myricetin, quercetin, kaempferol, luteolin, and apigenin) content of edible tropical plants. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 49(6), 3106-3112.
66. Miranda HF, Sierralta F, Pinaridi G (2001). An isobolographic analysis of the adrenergic modulation of diclofenac antinociception. *Anesthesia & Analgesia*, 93(2), 430-435.
67. Mould J, Pelaez I, Vázquez J, Terán L, Esquivel JA, Ventura L, Aceves FJ (2008). El costo de las principales enfermedades reumáticas inflamatorias desde la perspectiva del paciente en México. *Gaceta Médica de Mexico*, 144 (3), 225-231.
68. Oakley RH, Cidlowski JA (2013). The biology of the glucocorticoid receptor: New signaling mechanisms in health and disease. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 132(5), 1033–1044.
69. Okamura N, Haraguchi H, Hashimoto K, Yagi A (1994). Flavonoids in *Rosmarinus officinalis* leaves. *Phytochemistry*, 37, 1463-1466.
70. Peláez I, Sanin LH, Moreno J, Álvarez J, Burgos R, Garza M, Rodríguez J, Goycochea MV, Madariaga M, Zamudio J, Santana N, Cardiel MH (2011). Epidemiology of the rheumatic diseases in Mexico. A study of 5 regions based on the COPCORD methodology. *Journal of Rheumatology*, 38 Suppl. 86, 3-6.
71. Picq M, Cheav SL, Prigent AF (1991). Effect of two flavonoid compounds on central nervous system. Analgesic activity. *Life Science*, 49(26), 1979-1988.

72. Pini LA, Sandrini M, Vitale G (1996). The antinociceptive action of paracetamol is associated with changes in the serotonergic system in the rat brain. *European Journal of Pharmacology*, 308, 31-40.
73. Ramsey IS, Delling M, Clapham DE (2006). An introduction to TRP channels. *Annual Review of Physiology*, 68, 619-647.
74. Randall LO, Selitto J (1957). A method for measurement of analgesic activity of inflamed tissue. *Archives Internationales de Pharmacodynamie et de Thérapie*, 111, 209-219.
75. Rang HP, Dale MM, Ritter JM., Flower RJ. (2008). *Farmacología*. Elsevier, España, 239-240.
76. Rao YK, Fang SH, Tzeng YM (2008). Antiinflammatory activities of flavonoids and a triterpene caffeate isolated from *Bauhinia variegata*. *Phytotherapy Research*, 22, 957-962.
77. Rice-Evans C, Miller N, Paganga G (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology & Medicine*, 20(7), 933-956.
78. Rioja I, Bush KA, Buckton JB, Dickson MC, Life PF (2004). Joint cytokine quantification in two rodent arthritis models: kinetics of expression, correlation of mRNA and protein levels and response to prednisolone treatment. *Clinical and experimental immunology*, 137(1), 65-73.
79. Rodríguez J, Peláez I, Sanin LH, Esquivel JA, Burgos R, Pérez L, Riega J, Garza MA (2011). Epidemiology of rheumatic diseases. A community-based study in urban and rural populations in the state of Nuevo Leon, Mexico. *Journal of Rheumatology Supplement*, 86(1), 9-14.
80. Rossato MF, Trevisan G, Walker CI, Klafke JZ, de Oliveira AP, Villarinho JG, Zanon RB, Royes LF, Athayde ML, Gomez MV, Ferreira J (2011). Eriodictyol: a flavonoid antagonist of the TRPV1 receptor with antioxidant activity. *Biochemical Pharmacology*, 81, 544-551.
81. Rotelli AE, Guardia T, Juárez AO, de la Rocha NE, Pelzer LE (2003). Comparative study of flavonoids in experimental models of inflammation. *Pharmacological Research*, 48, 601-606.

82. Salama A, Mueller-Eckhardt C (1987). Cyanidanol and its metabolites bind tightly to red cells and are responsible for the production of auto- and/or drug dependent antibodies against these cells. *British Journal of Haematology*, 66, 263–266.
83. Setty AR, Sigal LH (2005). Herbal medications commonly used in the practice of rheumatology: mechanisms of action, efficacy, and side effects. *Seminars in arthritis and rheumatism*, 34(6), 773-84.
84. Sharma S, Sahu D, Das HR, Sharma D (2012). Amelioration of collagen-induced arthritis by *Salix nigra* bark extract via suppression of pro-inflammatory cytokines and oxidative stress. *Food & Chemical Toxicology*, 49, 3395-3406.
85. Sharma P, Pathak K (2012). Are biological targets the final goal for rheumatoid arthritis therapy? *Expert Opinion on Biological Therapy*, 12, 1611-1622.
86. Sinha VR, Kumar RV, Singh G (2009). Ketorolac tromethamine formulations: an overview. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 6, 961-975.
87. Soeken KL, Miller SA, Ernst E (2003). Herbal medicines for the treatment of rheumatoid arthritis: a systematic review. *Rheumatology (Oxford)*, 42(5), 652-9.
88. Spencer JP (2008b). Flavonoids: modulators of brain function? *British Journal of Nutrition*, 99 E Suppl 1, ES60-77.
89. Spencer JP (2008a). Food for thought: the role of dietary flavonoids in enhancing human memory, learning and neuro-cognitive performance. *Proceedings of the Nutrition Society*, 67(2), 238-252.
90. Spencer JPE, Schroeter H, Crossthwaithe AJ, Kuhnle G, Williams RJ, Rice-Evans C (2001). Contrasting influences of glucuronidation and O-methylation of epicatechin on hydrogen peroxide-induced cell death in neurons and fibroblasts. *Free Radical Biology & Medicine*, 31, 1139-1146.
91. Sui F, Zhang CB, Yang N, Li LF, Guo SY, Huo HR, Jiang TL (2010). Antinociceptive mechanism of baicalin involved in intervention of TRPV1 in DRG neurons in vitro. *Journal of Ethnopharmacology*, 129, 361-366.
92. Szabo A, Helyes Z, Sandor K, Bite A, Pinter E, Nemeth J, Banvolgyi A, Bolcskei K, Elekes K, Szolcsanyi J (2005). Role of transient receptor potential vanilloid 1 receptors in adjuvant-induced chronic arthritis: in vivo study using gene-deficient mice. *Journal of Pharmacology & Experimental Therapeutics*, 314, 111-119.

93. Tanaka T, Makita H, Ohnishi M (1997). Chemoprevention of 4-nitroquinoline-1-oxide-induced oral carcinogenesis in rats by flavonoids diosmin and hesperidin, each alone and in combination. *Cancer Research*, 57, 246-252.
94. Tegeder I, Niederberger E, Israr E, Gühring H, Brune K, Euchenhofer C, Grösch S, Geisslinger G (2001). Inhibition of NF- κ B and AP-1 activation by R- and S-flurbiprofen. *FASEB*, 15, 595-597.
95. Tortorici V, Vanegas H (1994). Putative role of medullary off- and on-cells in the antinociception produced by dipyrrone (metamizol) administered systemically or microinjected into PAG. *Pain*, 57(2), 197-205.
96. Townsend HB, Saag KG (2004). Glucocorticoid use in rheumatoid arthritis: Benefits, mechanisms, and risks. *Clinical and Experimental Rheumatology*, 22 Suppl. 35, S77-S82.
97. Vane JR, Warner TD (2000). Nomenclature for COX-2 inhibitors. *Lancet*, 356(9239), 1373-4.
98. Vanegas H (2002). Bases for a spinal analgesic action of cyclooxygenase inhibitors. *Proceedings of the Western Pharmacology Society*, 45, 225-227.
99. Viola H, Wolfman C, Levi de Stein M, Wasowski C, Peña C, Medina JH, Paladín AC (1994). Isolation of pharmacologically active benzodiazepine receptor ligands from *Tilia tomentosa* (Tiliaceae). *Journal of Ethnopharmacology*, 44, 47-53.
100. Wang ST, Chen S, Guo M, Liu XM (2008). Inhibitory effect of cochinchinenin B on capsaicin-activated responses in rat dorsal root ganglion neurons. *Brain Research*, 1201, 34-40.
101. Yamamoto M, Suzuki A, Hase T (2008). Short-term effects of glucosyl hesperidin and hesperetin on blood pressure and vascular endothelial function in spontaneously hypertensive rats. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology (Tokyo)*, 54(1), 95-98.
102. Youdim KA, Dobbie MS, Kuhnle G, Proteggente AR, Abbott NJ, Rice-Evans C (2003). Interaction between flavonoids and the blood-brain barrier: in vitro studies. *Journal of Neurochemistry*, 85, 180-192.
103. Zareba G (2009). Phytotherapy for pain relief. *Drugs Today (Barc)*, 45, 445-467.

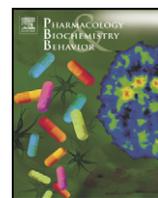
104. Zimmermann M (1983). The guidelines on ethical standards for investigation of experimental pain in animals. *Pain*, 16, 109-110.

11. CIBERGRAFÍA

1. American College of Rheumatology (2013). Arthritis in Children. Consultado el 07 de Enero del 2015, de:
http://www.rheumatology.org/practice/clinical/patients/diseases_and_conditions/juvenilearthritis.asp
2. American College of Rheumatology (2012). Osteoarthritis. Consultado el 08 de Enero del 2015, de:
http://www.rheumatology.org/Practice/Clinical/Patients/Diseases_And_Conditions/Osteoarthritis/
3. Drugsite Trust (2015). Drugs.com Database (electronic version). Consultado el 12 de Abril de 2015, de:
<http://www.drugs.com/pro/ketorolac.html>
4. México: Secretaría de Salud (2010). Diagnóstico y Tratamiento de Artritis Reumatoide del Adulto. Consultado el 14 de Enero de 2015, de:
www.cenetec.salud.gob.mx/interior/gpc.html
5. National Center for Biotechnology Information (2015). Pubchem Database (electronic version). Consultado el 14 de Enero de 2015, de:
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>
6. National Center for Chronic Disease Prevention and Health Promotion, Division of Population Health (2011). Arthritis. Consultado el 07 de Enero de 2015, de
<http://www.cdc.gov/arthritis/index.htm>
7. National Institute of Arthritis and Musculoskeletal and Skin Diseases (2014). Fibromyalgia. Consultado el 07 de Enero del 2015, de:
http://www.niams.nih.gov/Health_Info/Fibromyalgia/
8. NHS England (2013). Corticosteroids. Consultado el 13 de Enero de 2015, de :
[http://www.nhs.uk/Conditions/Corticosteroid-\(drugs\)/Pages/Introduction.aspx](http://www.nhs.uk/Conditions/Corticosteroid-(drugs)/Pages/Introduction.aspx)

9. Smolen J, Landewé R, Breedveld F, Buch M, Burmester G, Dougados M, Emery P, Gaujoux-Viala C, Gossec L, Nam J, Ramiro S, Winthrop K, de Wit M, Aletaha D, Betteridge N, W J Bijlsma J, Boers M, Buttgereit F, Combe B, Cutolo M, Damjanov N, M W Hazes J, Kouloumas M, K Kvien T, Mariette X, Pavelka K, L C M van Riel P, Rubbert-Roth A, Scholte-Voshaar M, L Scott D, Sokka-Isler T, B Wong J, van der Heijde D (2013). EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs: 2013 update. Consultado el 19 de Enero del 2015, de: <http://ard.bmj.com/>
10. Sociedad Española de Reumatología (2007). Guía de práctica clínica para el manejo de la artritis reumatoide en España. Consultado el 13 de Enero de 2015, de: www.ser.es/ArchivosDESCARGABLES/Proyectos/GUIPCAR_2007/GUIPCAR2007-Guiarapida.pdf
11. Truven Health Analytics information (2015). Micromedex Database (electronic version). Consultado el 14 de Enero de 2015, de: www.micromedexsolutions.com.pbidi.unam.mx:8080/

ANEXO 1



Hesperidin produces antinociceptive response and synergistic interaction with ketorolac in an arthritic gout-type pain in rats

Ana Laura Martínez^{a,b}, Ma. Eva González-Trujano^{a,*}, Marco Chávez^d, Francisco Pellicer^a, Julia Moreno^c, Francisco J. López-Muñoz^b

^a Dirección de Investigaciones en Neurociencias, Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz, Av. Mexico-Xochimilco No. 101, Col. San Lorenzo Huipulco 14370, México, D.F., México

^b Departamento de Farmacobiología, Cinvestav-Sur, Calz. De los Tenorios No. 235, Col. Granjas Coapa, C.P. 14330, México, D.F., México

^c Departamento de Análisis Clínicos, Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz, Av. Mexico-Xochimilco No. 101, Col. San Lorenzo Huipulco 14370, México, D.F., México

^d Unidad de Investigación en Enfermedades, Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS, Av. Cuauhtémoc 330, Col. Doctores, México, D.F., México

ARTICLE INFO

Article history:

Received 25 August 2010

Received in revised form 18 October 2010

Accepted 12 November 2010

Available online 27 November 2010

Keywords:

Antinociception

Flavonoids

Hesperidin

Ketorolac

Rosmarinus officinalis L.

Synergism

TRPV1 receptor

ABSTRACT

Hesperidin occurs in greatest concentration in plants from the Rutaceae and Lamiaceae families. In human nutrition it contributes to the integrity of blood vessels and its deficiency in the diet has been linked to abnormal capillary leakiness as well as pain. In this study, the bioflavonoid hesperidin was identified as an active compound in an ethanolic extract of the *Rosmarinus officinalis* aerial parts tested in the pain-induced functional impairment model in the rat (PIFIR) as an assay of inflammatory and chronic nociception similar to that observed in clinical gout. Hesperidin produced a dose-dependent and significant response with an ED₂₅ = 1666.72 mg/kg in comparison to an ED₂₅ = 302.90 mg/kg for the extract or an ED₂₅ = 0.47 mg/kg for the reference drug ketorolac in the PIFIR model. Although the antinociceptive response of *R. officinalis* was reverted in presence of the opioid antagonist naloxone (10 mg/kg, s.c.) and the 5HT_{1A} antagonist WAY100635 (0.12 mg/kg, s.c.), the hesperidin response was not modified by naloxone (10 mg/kg), WAY100635 (0.12 mg/kg), bicuculline (1 mg/kg, s.c.), flumazenil (10 mg/kg, i.p.) or caffeine (1 mg/kg, s.c.). Nevertheless, it was reduced in presence of capsazepine (10 or 20 mg/kg, s.c.) suggesting the participation of the TRPV1 receptor, which was reinforced when hesperidin significantly reduced the capsaicin-induced nociceptive response. A synergistic interaction was also observed when antinociceptive doses of hesperidin were combined with those of ketorolac producing 15 combinations mainly in additive and supra-additive responses. These results provide evidence for the antinociceptive activity of hesperidin and demonstrate synergistic response when combined with ketorolac, possibly by involvement of the TRPV1 receptor, suggesting their clinical potential in pain therapy.

© 2010 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Hesperidin is a flavonoid previously called “vitamin P” to indicate that it could decrease capillary permeability and fragility (Morii, 1939). It has been reported that hesperidin prevents vascular leakage through the inhibition of the enzyme hyaluronidase; it also decreases the amount of blood cells and platelet aggregation (Beiler and Martin, 1948; Garg et al., 2001). Besides its effect on vascular permeability, this flavonoid exhibits a wide range of pharmacological activities such as sedative (Fernández et al., 2005; Guzmán-Gutiérrez and Navarrete, 2009), antioxidant (Hirata et al., 2005; Zhang et al., 2002), anticarcinogenic (Hirata et al., 2005; Tanaka et al., 1997), as well as exhibiting anti-inflammatory and analgesic properties (Hirata et al., 2005; Galati et al., 1994; Benavente-García and Castillo, 2008). A preventive effect was also previously reported on the development of

adjuvant arthritis, a rat model of rheumatoid arthritis by using Freund's complete adjuvant (Guardia et al., 2001; Li et al., 2008).

Hesperidin is abundantly found in citrus fruits (family Rutaceae) (Benavente-García and Castillo, 2008) and in many plants of the genera Lamiaceae (Garg et al., 2001; Kokkalou and Kapetanidis, 1988). *Rosmarinus officinalis* L. is a plant species of the family Lamiaceae; it is an aromatic evergreen shrub native to the Mediterranean area and now grown in many countries. It is well-known around the world and widely used for flavoring food and beverages, as well as an ingredient in cosmetic products (Al-Sereiti et al., 1999; Altinier et al., 2007); in folk medicine it is mainly used as an antispasmodic, in renal colic, dysmenorrhoea and abdominal colic (Al-Sereiti et al., 1999; Peng et al., 2007). In Mexico, *R. officinalis* aerial parts are prepared as maceration in ethanol and used in topical administration to relief rheumatic pain. A tea made of the boiled leaves is used to improve digestion and to relief stomach-ache (Martínez, 1989). Several phytochemical studies have shown that *R. officinalis* contains essential oils, phenols, diterpenoids, terpenoids and especially flavonoids (Okamura et al., 1994; Zeng et al., 2001). Flavonoids, part of a large

* Corresponding author. Tel.: +52 55 56 55 28 11; fax: +52 55 56 55 99 80.
E-mail address: evag@imp.edu.mx (M.E. González-Trujano).

family of naturally occurring polyphenolic compounds characterized by a common benzo- γ -pyrone structure, are important constituents of the human diet (Miean and Mohamed, 2001). They also have a wide range of biological and pharmacological activities as antioxidant, anti-ageing, antineoplastic, and anti-inflammatory; these compounds also lower of blood cholesterol levels, and improve bone strength (Yang et al., 2006). In a previous study, we observed that the ethanol extract from *R. officinalis* aerial parts produced antinociceptive and anti-inflammatory effects in different experimental models of nociception (González-Trujano et al., 2007). However, the active components and the mechanism of action of the antinociceptive response have not been described so far. The aim of this study was not only to evaluate the antinociceptive effect of hesperidin, as a responsible antinociceptive component of *R. officinalis*, but also to gain some knowledge into its mechanism of action and pharmacological interaction with a non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID) by using the “pain-induced functional impairment in the rat” (PIFIR) model, an assay of inflammatory and chronic nociception similar to that observed in clinical gout (López-Muñoz et al., 1993).

2. Materials and methods

2.1. Animals

Male Swiss albino mice (25–30 g) and Male Wistar rats [CrI(WI)fBR] weighing 180–200 g obtained from Cinvestav-Sur and Instituto Nacional de Psiquiatría “Ramón de la Fuente Muñiz” were used in this study. Animals were housed in a temperature- and light-controlled room under a 12-h light/12-h dark cycle (lights on at 7:00 a.m.) with water and food *ad libitum*. Twelve hours before the experiments, food was suspended, though animals had free access to tap drinking water. All experimental procedures followed the Guidelines on Ethical Standards for Investigations of Experimental Pain in Animals (Zimmermann, 1983), and were carried out according to a protocol approved by the local Animal Ethics Committee. The number of experimental animals was kept to a minimum; they were used only once. For each experimental procedure, animal groups consisted of six mice or rats.

2.2. Drugs

The *Rosmarinus officinalis* L. ethanol extract was prepared as previously described González-Trujano et al. (2007). Extract, flumazenil and bicuculline were suspended in vehicle [0.5% tween 80 in saline solution (s.s.)]. Capsaicin was firstly prepared in a stock solution containing 1 mg of capsaicin dissolved in 1 ml of vehicle (0.2% Tween 80 in s.s. and 10% ethanol). Then, 16 μ l of this stock solution were diluted with 384 μ l of s.s. to yield a concentration of 1.6 μ g/40 μ l. The extract was administered via oral (p.o.), whereas ketorolac-tromethamine ($\geq 99\%$ purity) and hesperidin ($\sim 80\%$ purity) were dissolved in s.s. and administered via intraperitoneal (i.p.). Naloxone, WAY 100635, capsaizepine and caffeine were dissolved in s.s. and administered via subcutaneous (s.c.). Drugs were freshly prepared on the day of the experiments and administered in a volume of 0.1 ml/100 g body weight rats. Control animals received the same volume of either vehicle or s.s. by the respective route of administration. All pure compounds were purchased from Sigma Chemical Company. To induce nociception, a 20% uric acid suspension in mineral oil was used.

2.3. High pressure liquid chromatography (HPLC) analysis

Samples tested (10 mg) were dissolved in 10 ml of HCl (1 N) in MeOH and filtered to inject 20 μ l to the HPLC system.

2.3.1. HPLC-PAD conditions

The HPLC system included a Waters 2795 pump (Waters, Milford MA, USA) equipped with an automatic sample injector module and

photodiode detector model 996 (Waters, Milford MA, USA). The separation was performed on a Kromasil C-18 column (150 mm \times 4.6 mm, MetaChem Technologies, Inc., Torrance CA, USA). The mobile phase consisted of components A (10 mM phosphoric acid aqueous solution) and B (acetonitrile). The system was run with a linear gradient program: at the beginning 90% A, 10% B; 18 min, 30% A, 70% B; 20 min, 30% A, 70% B; and 22 min, 90% A, 10% B. The flow rate was set at 0.6 ml/min. Chromatograms were detected at 280 nm.

2.4. Antinociceptive activity

2.4.1. Pain-induced functional impairment model in the rat (PIFIR model)

Antinociceptive activity was measured using the PIFIR model, previously described in detail elsewhere (López-Muñoz et al., 1993). The animals were anaesthetized with ethylic ether (J.T.Baker) in an anesthesia chamber (glass dryer Pyrex saturated with ether vapors). Nociception was induced by an intra-articular injection of 0.05 ml of 20% uric acid suspended in mineral oil in the knee joint of the right hind limb. The suspension was prepared by grinding 2.0 g of uric acid in a glass mortar (Pyrex) and adding 10 ml of mineral oil. The intra-articular injection was performed through the patellar ligament using a 1 ml glass syringe (Becton, Dickinson LTDA, Brazil) with a 24 gauge needle of 5 mm. Subsequently; an electrode was attached to the plantar surface of each hind paw between the plantar pads. Rats were allowed to recover from anesthesia and placed on a stainless steel cylinder, 30 cm in diameter. The cylinder was rotated at 4 rpm, forcing the rats to walk. The variable to be measured was the time of contact between each hind paw and the cylinder. When the electrode placed on the animal's paw made contact with the cylinder floor, a circuit was closed; the time the circuit remained closed was recorded. The cylinder was rotated for 2-min periods, during which time recordings were made; 28 min rest periods were interspersed between recordings. In all subsequent experiments, analgesic agents were administered 2.5 h after uric acid injection. Thus, this time was considered as time zero for the measurements of the antinociceptive effect. Drugs were given at this time and the time of contact was measured every 30 min for 4 h. All experiments were performed between 7:00 a.m. and 14:00 p.m. After uric acid injection, animals developed a progressive dysfunction of the injured limb. The time of contact of the injured hind limb reached a zero value 2.5 h after uric acid injection. Data are expressed as the percentage of the functionality index (FI%), i.e., the time of contact of injected paw divided by the time of contact of the control left paw multiplied by 100. Recordings were taken every 15 min for the first hour, and every 30 min for the remaining 3 hours. Rats were allowed to rest between recording periods. Recovery of FI% was considered as expression of the antinociceptive effect. Time–response curves were plotted to detect the onset of the antinociceptive effect, as well as dose–response curves to determine the antinociceptive efficacies. For the purpose of this study, inducing nociception in the experimental animals was unavoidable. However, care was taken to avoid unnecessary suffering.

2.4.2. Capsaicin-induced nociception

The procedure used was similar to that described by Déciga-Campos et al. (2010), but by using intraplantar injection of capsaicin in mice. Before testing, the animals were individually placed in a transparent glass cylinder, 20 cm in diameter, which serve as an observation chamber. A mirror was placed behind the chamber to enable unhindered observation. After a 20-min adaptation period, mice were injected 40 μ l of capsaicin (1.6 μ g/paw) intraplantar in the right hind paw by using a 27-gauge needle. Immediately after capsaicin injection, each animal was returned to the chamber for nociceptive behavior observation. Nociceptive behavior was quantified as the amount of time the animal spent licking the injected paw within a 5-min period measured with a chronometer.

2.5. Experimental design

In the PIFIR model, dose–response curves were constructed in order to know the effective dose twenty-five (ED_{25}) of hesperidin; this dose was compared to that produced by *R. officinalis* extract and the reference drug ketorolac. Once the FI% reached the zero value, rats were administered with vehicle (0.5% tween 80 in s.s.), *R. officinalis* (30, 100, 300, 1000 and 3000 mg/kg), hesperidin (100, 300, 562.3, 1000 and 1778.3 mg/kg), or ketorolac (0.18, 0.32, 0.56, 1, and 1.78 mg/kg). Subsequently, the possible mechanism of action of hesperidin-induced antinociception was investigated by exploring the participation of endogenous opioids, 5-HT_{1A}, GABA_A/benzodiazepine, A₁/A₂ and/or TRPV1 (the transient receptor potential vanilloid 1) receptors in different animal groups (at least 6 rats each). In this part of the experiment, one of the following treatments was given when FI% = 0: naloxone (a competitive opioid antagonist, 1 and 10 mg/kg, s.c.); WAY100635 (a selective 5-HT_{1A} receptor antagonist, 0.12 mg/kg, s.c.); flumazenil (a benzodiazepine antagonist, 10 mg/kg, i.p.); bicuculline (a competitive antagonist of GABA_A receptor, 1 mg/kg, s.c.); capsazepine (a TRPV1 competitive antagonist, 10 or 20 mg/kg s.c.), or caffeine (a non selective adenosine antagonist, 1 and 3.2 mg/kg, s.c.). Fifteen minutes later, all groups of animals received hesperidin (1000 mg/kg, i.p.). At the end of the experiment, animals were euthanized. No side effects were observed in any of the studied groups of animals. For synergistic analysis, all doses of hesperidin were combined with lesser doses of ketorolac (0.18, 0.32 and 0.56 mg/kg) giving 15 combinations in total.

2.6. Statistical analysis

Antinociception was estimated as the recovery of the FI% value in the PIFIR model. The cumulative antinociceptive effect during the whole observation period (4 h) was determined as the area under the curve (AUC) of the time course to obtain the dose–response curves and to analyze the whole antinociceptive effect elicited by the *R. officinalis* extract, hesperidin and/or ketorolac, either alone or in combination with an inhibitor or antagonist drug. The AUC was obtained by the trapezoidal rule. The percentage of the antinociceptive effect was calculated with respect to the maximum antinociceptive effect observed in the PIFIR model under the present experimental conditions; its value was 387.5 au (López-Muñoz et al., 1993; González-Trujano et al., 2007; Martínez et al., 2009). The doses producing 25% of the maximum possible effect in the PIFIR model (ED_{25}) of *R. officinalis* extract, hesperidin and ketorolac were calculated by performing a linear regression analysis in the linear portion of the dose–response curves. Statistical differences were determined by ANOVA followed by Dunnett's test. The synergism between hesperidin and ketorolac was calculated using surface of synergistic interaction (SSI) analysis (López-Muñoz, 1994; López-Muñoz and Salazar, 1995). The AUC of the individual effects of each drug were added up to obtain the expected value. If the experimental AUC obtained from the combinations was higher than the theoretical sum of the individual effects, the results were considered to show supra-additive response; if it was similar to the theoretical sum, it was considered to show an additive antinociceptive effect and if it was less than the theoretical sum, it was considered to show sub-additive effect. The AUC values for hesperidin–ketorolac combinations were compared with the expected value by using Student's test. Statistical differences for gastric injury were determined by ANOVA on ranks followed by Dunn's test. Significance was considered for $P < 0.05$.

3. Results

3.1. Chemical composition

Thin layer chromatography analysis of an ethanol extract revealed the presence of terpenoids and flavonoids as principal constituents of

the ethanol extract from *R. officinalis*; a bio-guided fractionation allowed the isolation of fractions revealing mainly flavonoid components (data not shown). Then, HPLC analysis indicated several peaks in the most active ethyl acetate fraction (7.5 g, 8.33%) with flavonoid content in which a compound 9.37 mg/g was identified as hesperidin (10.836 min) (Fig. 1).

3.2. Antinociceptive effect of hesperidin in the PIFIR model

At the time when the functionality index reached the zero value, administration of *R. officinalis* extract, hesperidin or ketorolac produced a dose-dependent antinociceptive effect curve (Fig. 2) at doses not affecting the walking ability of the rats during the period of evaluation. *R. officinalis* extract (3000 mg/kg) and ketorolac (1.78 mg/kg) appeared to be the most effective of the assayed compounds; hesperidin (1778.3 mg/kg) showed limited efficacy with a maximum of $25 \pm 12\%$. The antinociceptive effect curves allowed the calculation of an $ED_{25} = 0.47$ mg/kg for ketorolac, i.p.; $ED_{25} = 302.9$ mg/kg for the *R. officinalis* extract p.o. and, finally, an $ED_{25} = 1666.72$ mg/kg for hesperidin i.p. (Fig. 2). All ED_{25} were calculated with respect to the maximum antinociceptive effect observed in the PIFIR model. A lower potency ($ED_{25} = 1666.72$) as well as limited antinociceptive efficacy were observed for hesperidin. The *R. officinalis* extract was considerably less potent than ketorolac though both exhibited similar efficacy. *R. officinalis* extract increased FI% in rats, showing a significant antinociceptive effect starting at 300 mg/kg dosage (Fig. 2) with a maximum antinociceptive peak reached within the first 15 min of evaluation (Fig. 3A). Moreover, *R. officinalis* at a 3000 mg/kg dosage allowed the observation that the maximum effect was reached within the first 15 min, this response remained until the end of the evaluation period (3A). With regard to hesperidin, the antinociceptive effect was significant at 1000 mg/kg (Fig. 2), with a maximum antinociceptive effect detected also within the first 15 min (Fig. 3B) of evaluation.

3.3. Effect of hesperidin on the capsaicin-induced nociception

Hesperidin produced a dose-dependent (10, 30 and 100 mg/kg, i.p.) diminution in the time mice spent licking the injected paw after receiving intraplantar capsaicin (Fig. 4). A significant antinociceptive response ($P < 0.05$) was observed in mice treated with 30 mg/kg (19 ± 5 s) and 100 mg/kg (11 ± 6 s) dosages in comparison to the vehicle group (43 ± 10 s) (Fig. 4).

3.4. Analysis of the mechanisms of action of hesperidin

The significant antinociceptive effect of 3000 mg/kg of *R. officinalis* extract was reverted in presence of 10 mg/kg, but not for 1 or 3.16 mg/kg naloxone (Fig. 5A and B). Similarly, pretreatment of WAY100635 reduced the antinociceptive response of the *R. officinalis* extract (Fig. 5A and B). However, when both antagonists were tested in combination with hesperidin (1000 mg/kg), identified as one of the responsible constituents of the antinociceptive activity of *R. officinalis*, no changes were observed (Table 1). Because of this fact, several antagonist or inhibitor drugs were tested in combination with this bioflavonoid in order to investigate its possible antinociceptive mechanism of action. As observed in Table 1, the presence of bicuculline (1 mg/kg), flumazenil (1 mg/kg), or caffeine (1 or 3.2 mg/kg, s.c.) did not modify the antinociceptive effect of hesperidin. On the other hand, pretreatment with capsazepine (10 or 20 mg/kg) reduced 36% the antinociceptive response produced by hesperidin (Table 1). All control groups tested receiving vehicle (s.s. or 0.5% tween 80 in s.s.) or some antagonist or inhibitor drug showed a $FI\% \approx 0$ throughout the 4-h duration of the experiment (Table 1).

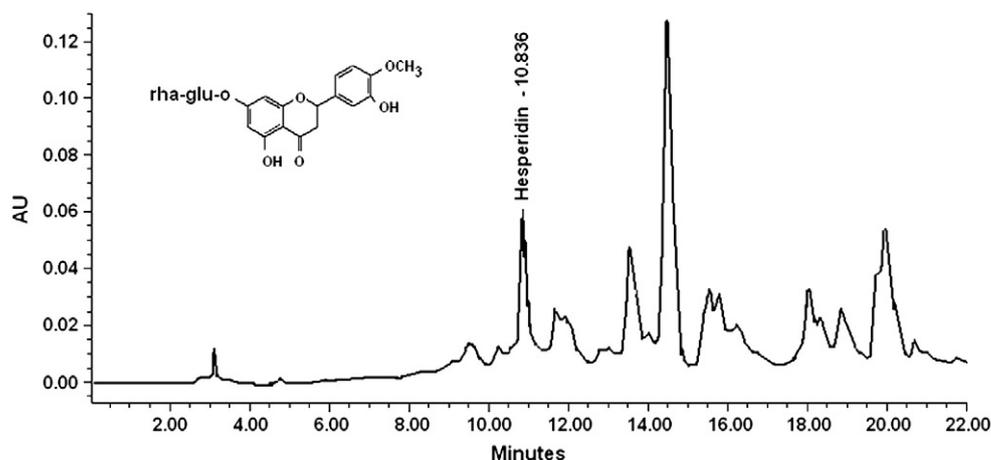


Fig. 1. Representative HPLC profile of the ethanol extract of *R. officinalis* aerial parts. The peak corresponds to hesperidin (TR = 10.836 min) corroborated with a standard.

3.5. Pharmacological synergistic interaction of hesperidin and ketorolac in the PIFIR model

Fig. 6A shows the antinociceptive effect of 3 different combinations of hesperidin plus ketorolac. A maximal antinociceptive effect was obtained with the hesperidin (562.3 mg/kg) plus ketorolac (0.56 mg/kg) combination giving $AUC = 228.31 \pm 30.82$ au which corresponds to a high supra-additive interaction ($P < 0.001$). The other 12 combinations showed additive antinociceptive effects (i.e. the sum of the effects produced by each agent alone). One representative combination of additive response is shown in Fig. 6A. Only one combination (1000 mg/kg hesperidin with 0.18 mg/kg ketorolac) exhibited a sub-additive antinociceptive effect (i.e., less than the sum of the effects produced by the each drug alone) (Fig. 6A).

The combination ketorolac plus hesperidin producing potentiation did not cause any gastric injury as the one observed with indomethacin (as positive control) or ketorolac alone in single administration (Fig. 6B).

4. Discussion

In the present study, the antinociceptive activity of the bioflavonoid hesperidin was investigated, as well as its possible mechanism of action and pharmacological interaction with a specific NSAID. Our results give evidence that systemic administration of hesperidin produces antinociceptive effect in the PIFIR model at doses causing no

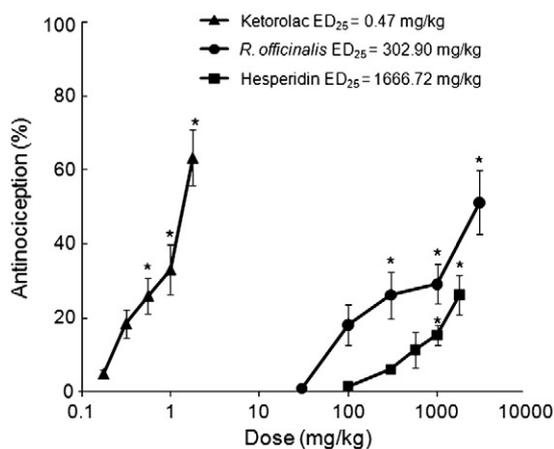


Fig. 2. Dose-response curves of the antinociceptive effect of *R. officinalis* extract (●), hesperidin (■) and ketorolac (▲). Data are expressed as the mean \pm S.E.M. of the percentage of the antinociceptive effect with respect to the maximum antinociceptive response in the PIFIR model. * $P < 0.001$, ANOVA followed by Dunnett's test.

motor dysfunction. We also found that the TRPV1 receptor is partially involved in its mechanism of action, whereas combinations with ketorolac produced synergism mainly as an additive antinociceptive response.

The PIFIR model is a well known test validated to search for new or alternative treatments for arthritic pain. This model uses diluted uric acid injected into the knee joint of the rat right hind limb (i.art.), to render a good representation of clinical gout arthritis (López-Muñoz et al., 1993). In a preliminary study, it was reported that the *R. officinalis* ethanol extract possesses antinociceptive and anti-

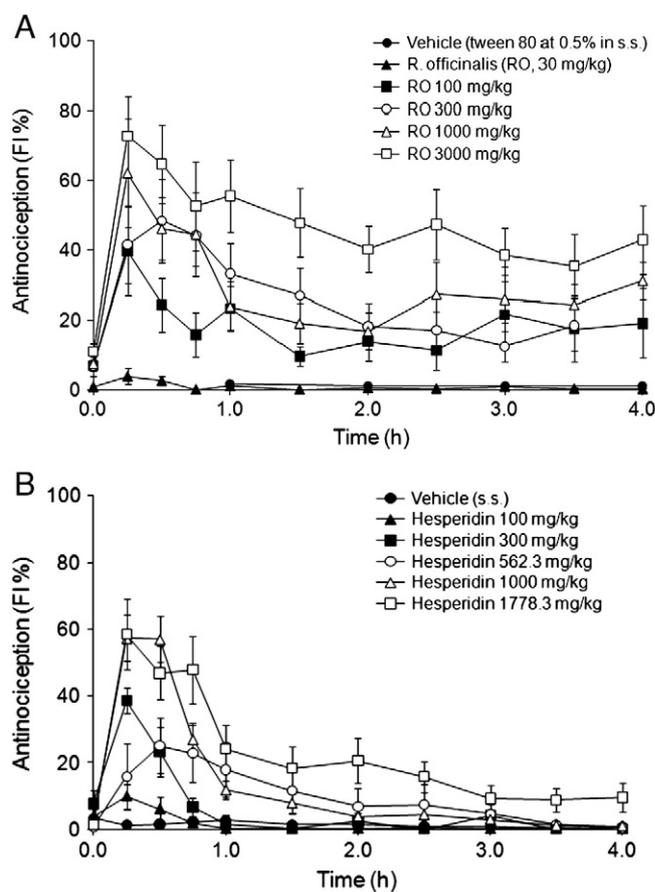


Fig. 3. Time course curves of the antinociceptive effect of (A) *R. officinalis* extract: 30, 100, 300, 1000 and 3000 mg/kg, p.o. and (B) hesperidin: 100, 300, 562.3, 1000 and 1778.3 mg/kg, i.p. in the PIFIR model during a 4 h-period. Each point represents the average of the functionality index in percentage (FI%) \pm S.E.M. of at least six animals.

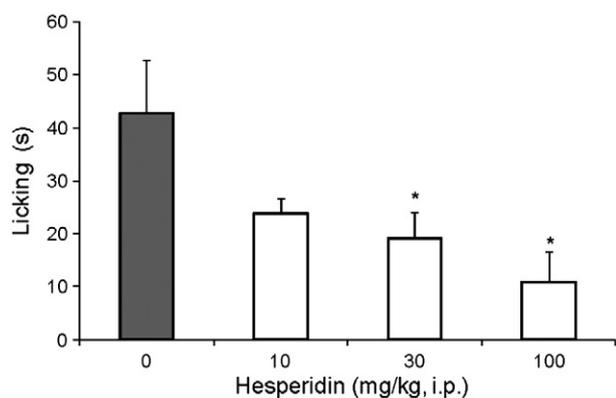


Fig. 4. Antinociceptive effect of hesperidin (10, 30 or 100 mg/kg, i.p.) on the time spent by each mice licking its injected paw with 40 µl of capsaicin (1.6 µg/paw). Each bar represents the average \pm S.E.M. of at least 6 animals. * $P=0.015$, ANOVA followed by Dunnett's test.

inflammatory activity in nociceptive models such as acetic acid-induced writhing and formalin test in mice, and the PIFIR model in rats (González-Trujano et al., 2007). In the PIFIR model, the *R. officinalis* ethanol extract significantly reduced in a dose-dependent fashion the loss of functionality caused by the administration of uric acid into the knee joint. Our results and those reported by Altinier et al. (2007) are in agreement with the use given to *R. officinalis* in traditional medicine and with recent clinical studies reporting that a

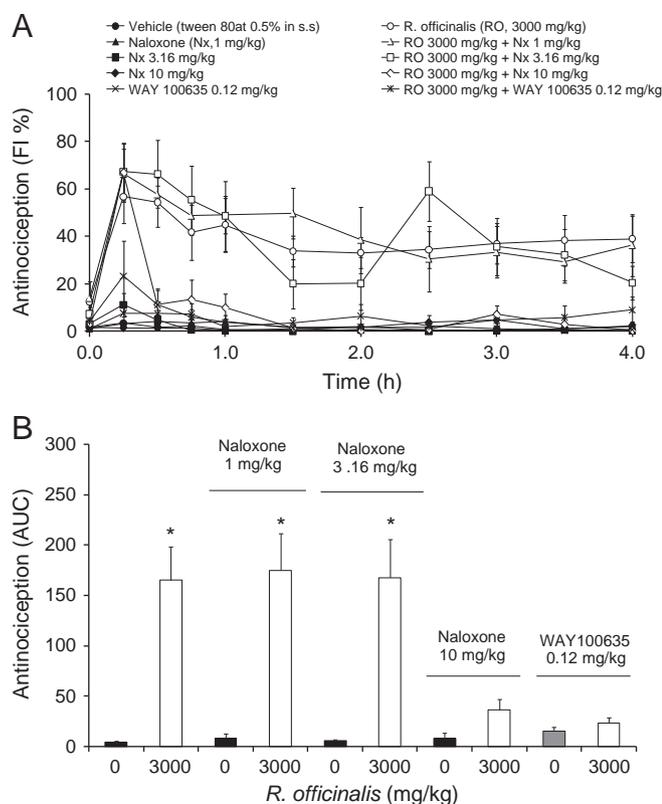


Fig. 5. (A) Time course curves of the antinociceptive effect of *R. officinalis* at 3000 (o) mg/kg alone and in the presence of naloxone (Nx) at 1.0 (Δ), 3.16 (\square), and 10 (\diamond) mg/kg or WAY 100635 at 0.12 (\times) mg/kg expressed as the percentage of the functionality index (FI%) in the PIFIR assay during a 4-h-period. These effects were compared with the effect observed by administering vehicle (\bullet) and Nx 1.0 (\blacktriangle), 3.16 (\blacksquare), and 10 (\blacklozenge) mg/kg or WAY 100635 at 0.12 (\times) mg/kg. (B) Area under the curve (AUC) obtained from the FI% graph showing the administration of *R. officinalis* (3000 mg/kg) alone and in presence of Nx 1, 3.16, and 10 mg/kg or WAY 100635 0.12 mg/kg. Each point represents the average of the AUC \pm S.E.M. of at least 6 animals. * $P<0.001$, ANOVA followed by Dunnett's test.

Table 1

Analysis of the possible antinociceptive mechanism of action of hesperidin in the PIFIR assay.

Treatment	Dose (mg/kg)	AUC	Antinociception (%)
Vehicle	–	8.43 \pm 2.36	2.18 \pm 0.61
Naloxone	1	8.15 \pm 4.26	2.10 \pm 1.10
	10	4.41 \pm 2.57	1.14 \pm 0.66
WAY100635	0.12	15.16 \pm 3.65	3.91 \pm 0.94
Bicuculline	1	0.84 \pm 0.57	0.22 \pm 0.15
Flumazenil	10	5.69 \pm 2.86	1.47 \pm 0.74
Caffeine	1	2.55 \pm 0.85	0.66 \pm 0.22
	3.2	1.76 \pm 0.45	0.45 \pm 0.12
Capsazepine	10	0.16 \pm 0.16	0.04 \pm 0.04
	20	0.32 \pm 0.16	0.08 \pm 0.04
Hesperidin plus	1000	59.41 \pm 11.32	15.33 \pm 2.92 ^a
Naloxone	1	43.98 \pm 15.27	11.35 \pm 3.94 ^a
	10	106.56 \pm 7.05	27.50 \pm 1.82 ^a
WAY100635	0.12	57.18 \pm 4.83	14.76 \pm 1.25 ^a
Bicuculline	1	75.40 \pm 11.28	19.46 \pm 2.91 ^a
Flumazenil	10	98.21 \pm 11.99	25.34 \pm 3.09 ^a
Caffeine	1	87.26 \pm 28.78	22.52 \pm 7.43 ^a
	3.2	61.50 \pm 26.73	15.87 \pm 6.90 ^a
Capsazepine	10	30.90 \pm 10.27	7.97 \pm 2.65
	20	28.32 \pm 13.73	7.31 \pm 3.54

Data are represented as the mean of the percentage of antinociception \pm S.E.M of six repetitions based in the maximum antinociceptive effect calculated as the area under the curve (AUC) obtained in the PIFIR model. ^a $P<0.001$ ANOVA followed by Dunnett's test.

combination of *R. officinalis* extract with reduced iso-alpha acids and oleanolic acid decrease pain in patients with osteoarthritis and rheumatoid arthritis (Lukaczer et al., 2005). After bio-guided fractionation of the active ethanol extract, it was possible to isolate and identify the flavanone glycoside called hesperidin as partially responsible for the antinociceptive activity of *R. officinalis*. In our present study, hesperidin showed a significant and dose-dependent antinociceptive response in the PIFIR model. Hesperidin was 5.5 times less potent (ED_{25}) than its original extract suggesting that others compounds must be involved in the effect of *R. officinalis*, though the analgesic property of hesperidin was confirmed.

The precise mechanism of action in the antinociceptive response of either *R. officinalis* crude extract or hesperidin is not yet understood. It has been reported that inhibition of the acetic acid-induced abdominal contractions in mice elicited by *R. officinalis* was totally reverted in the presence of naloxone (Hosseinzadeh and Nourbaksh, 2003). In our present study, both naloxone (an opioid antagonist) and WAY 100635 (a high potent and selective 5-HT_{1A} antagonist) (Foster et al., 1995) prevented the effect of *R. officinalis* in the PIFIR model. These results reinforce the hypothesis that not only the opioid system, but also the serotonergic system through 5-HT_{1A} receptors are involved in the antinociceptive mechanisms of action of this plant. Although for generations it has been suggested that opioid drugs act solely on the central nervous system, producing analgesia by interaction with cerebral and spinal opioid receptors, several studies in animals (Stein et al., 1989; Kolesnikov et al., 1996) and humans (Tegeeder et al., 2003) have demonstrated the contribution of a peripheral opioid mechanism in antinociception, particularly prominent under painful inflammatory conditions (Stein et al., 1989; Kolesnikov et al., 1996). As a result there is the possibility that the antinociceptive effect of *R. officinalis* could be mediated centrally and/or peripherally by the opioid system. In addition, it has been reported the involvement of the 5-HT_{1A} receptor as a novel analgesic and high-efficacy receptor (Bardin et al., 2003; Colpaert et al., 2002) participating in a mechanism of central analgesia. It is known that activation of post-synaptic 5-HT_{1A} receptors in the periaqueductal grey substance produces a facilitatory influence of opioids upon K⁺-currents in isolated neurons (Jeong et al., 2001). In agreement with Kishimoto et al. (2001), the possibility that this action is related to the engagement of descending inhibition is favored by the finding that the

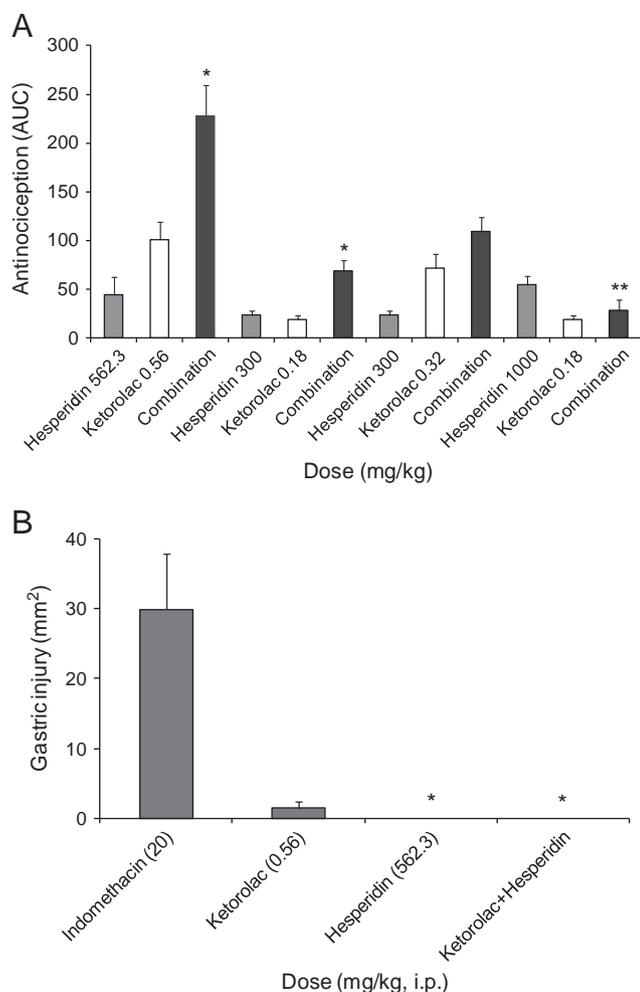


Fig. 6. (A) The antinociceptive effect produced by different combinations of ketorolac and hesperidin that showing synergism of potentiation (high supra-additive interaction) or additive response, as well as antagonism in the last case. Each interaction is represented by the mean of six animals for each combination. * $P < 0.05$; ** $P = 0.006$. (B) Gastric injury produced by indomethacin at 20 mg/kg, i.p. (as positive control) compared to the gastric injury of hesperidin (562.3 mg/kg, i.p.) or ketorolac (0.56 mg/kg, i.p.) alone and in the combination corresponding to a high supra-additive interaction. * $P < 0.05$ ANOVA on ranks followed by Dunn's test.

synergistic action of μ -opioids and 5-HT_{1A} agonists may produce analgesic effectiveness.

The participation of opioid receptors in the antinociceptive effect of hesperidin (0.7 and 1 mg/kg, i.p.) was early reported by Loscalzo et al. (2008) when naltrexone (5 mg/kg, i.p.) was shown to inhibit abdominal constrictions in mice. However, in our present study no changes were observed in presence of 1 or 10 mg/kg of naloxone in the antinociceptive response using the PIFIR model. Other receptor antagonists like WAY100635, bicuculline, flumazenil or caffeine did not modify the antinociceptive activity of hesperidin. Nevertheless, capsazepine, a TRPV1 selective antagonist, partially prevented the hesperidin response in the PIFIR model. The vanilloid receptor TRPV1 is a homotetrameric, non-selective cation channel which is highly selective for calcium. It is found in the central and peripheral nervous systems abundantly expressed in nociceptors (c-fibers). This receptor is involved in the transmission and modulation of pain, as well as in the integration of various painful stimuli (Cui et al., 2006). The precise mechanisms of receptor activation by various agents have not been fully established although such stimuli appear to alter protein conformation and stability through specific amino acid residues on the receptor, which results in ion influx and disruptions of structural gating (Veronesi and Oortgiesen, 2006). Hence, both TRPV1 agonist

and antagonist drugs are being evaluated as potential antinociceptive and analgesic drugs as observed in preclinical and clinical trials (Wong and Gawa, 2009). It has been described that capsaicin, the main capsaicinoid in chili peppers, produces pain by selectively activating polymodal nociceptive neurons (Caterina et al., 2000). The capsaicin-induced activation is mediated by TRPV1 receptors which can be selectively and competitively antagonized by capsazepine (Dray, 1992). In agreement with Loscalzo et al. (2008), it is possible that hesperidin participates in various brain receptors implicated in the control of numerous behavioral and physiological functions, such as sedation (Guzmán-Gutiérrez and Navarrete, 2009) and antinociception (present study). Since hesperidin was capable to reduce capsaicin-induced nociception and partial prevention of the antinociceptive effect of hesperidin was observed with capsazepine in the PIFIR model, our results provide the first evidence that the antinociceptive response of the bioflavonoid hesperidin involves the participation of TRPV1 receptors, which act as modulators of this response in a model of arthritis gout-type nociception in rats. Nevertheless, further investigation is necessary to explain the specific involvement of TRPV1 and other possible mediators in the antinociceptive mechanisms of action of hesperidin.

In this study, interaction of ketorolac, a NSAID possessing significant analgesic efficacy in the treatment of moderate to severe pain (Forrest et al., 2002), and hesperidin produced a positive synergism in the antinociceptive response in the PIFIR model. Potentiation was even obtained when 0.56 mg/kg ketorolac + 562.3 mg/kg hesperidin were combined. It has been reported that 1 mg/kg of ketorolac produces 26% of gastric injury as adverse effect in rats (López-Muñoz et al., 2004). In this study, it was also observed a major gastric lesion of 2 mm² in one of six rats when 0.56 mg/kg of ketorolac alone were administered. However, in the combination causing potentiation no gastric injury was observed. It has been suggested that the combination of analgesic drugs may have synergistic effects, and a specific combination may produce better antinociceptive response with reduced adverse effects (López-Muñoz et al., 2004). The positive synergism in the antinociceptive response observed with the combination of this bioflavonoid and a NSAID without adverse effects of this clinical drug suggests their potential usefulness in the therapeutic of pain.

In conclusion, the results in the present study demonstrate the antinociceptive properties of hesperidin and in turn the additive and supra-additive response when combined with the NSAID ketorolac. The pharmacological response of hesperidin was partially modulated by the participation of the TRPV1 receptor, but not by endogenous opioids, 5-HT_{1A}, GABA_A/benzodiazepine or adenosine receptors, at least with regard to the kind of nociception explored in the PIFIR model.

Acknowledgements

We thank Mr. Froylán Sánchez, Mr. Luis Oliva, Mr. Rubén Luviano and Erika Flores for their technical assistance. This work was partially supported by CONACYT-80811, INP3260 and CONACYT-203600 fellowship for A.L. Martínez.

The authors declare no conflicts of interest.

References

- Al-Sereiti MR, Abu-Amer KM, Sen P. Pharmacology of rosemary (*Rosmarinus officinalis* Linn.) and its therapeutic potentials. *Indian J Exp Biol* 1999;3:124–30.
- Altinier G, Sosa S, Aquino RP, Mencherini T, Della Loggia R, Tubaro A. Characterization of topical antiinflammatory compounds in *Rosmarinus officinalis* L. *J Agric Food Chem* 2007;55:1718–23.
- Bardin L, Tarayre JP, Malfetes N, Koek W, Colpaert FC. Profound, non-opioid analgesia produced by the high-efficacy 5-HT(1A) agonist F 13640 in the formalin model of tonic nociceptive pain. *Pharmacology* 2003;67:182–94.
- Beiler JM, Martin GJ. Inhibition of hyaluronidase action by derivatives of hesperidin. *J Biol Chem* 1948;174:31–4.

- Benavente-García O, Castillo J. Update and uses and properties of citrus flavonoids: new findings in anticancer, cardiovascular, and anti-inflammatory activity. *J Agric Food Chem* 2008;56:6185–205.
- Caterina MJ, Leffler A, Malmberg AB, Martin WJ, Trifonov J, Petersen-Zeitl KR, et al. Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. *Science* 2000;288:306–13.
- Colpaert FC, Tarayre JP, Koek W, Pauwels PJ, Bardin L, Xu XJ, et al. Large-amplitude 5-HT_{1A} receptor activation: a new mechanism of profound, central analgesia. *Neuropharmacology* 2002;43:945–58.
- Cui M, Honore P, Zhong C, Gauvin D, Mikusa J, Hernández G, et al. TRPV1 receptors in the CNS play a key role in broad-spectrum analgesia of TRPV1 antagonists. *J Neurosci* 2006;26:9385–93.
- Déciga-Campos M, Ríos MY, Aguilar-Guadarrama AB. Antinociceptive effect of *Heliopsis longipes* extract and affinin in mice. *Planta Med* 2010;76:665–70.
- Dray A. Mechanism of action of capsaicin-like molecules on sensory neurons. *Life Sci* 1992;51:1759–65.
- Fernández SP, Wasowski C, Paladini AC, Marder M. Synergistic interaction between hesperidin, a natural flavonoid, and diazepam. *Eur J Pharmacol* 2005;512:189–98.
- Forrest JB, Camu F, Geer IA, Kehlet H, Abdalla M, Bonnet F, et al. Ketorolac, diclofenac, and ketoprofen are equally safe for pain relief after surgery. *Br J Anaesth* 2002;88:227–33.
- Foster EA, Cliffe IA, Bill DJ, Dover GM, Jones D, Reilly Y, et al. A pharmacology profile of the selective silent 5-HT_{1A} receptor antagonist, WAY-100635. *Eur J Pharmacol* 1995;281:81–8.
- Galati EM, Monforte MT, Kirjavainen S, Forstner AM, Tripodo MM. Biological effects of hesperidin, a citrus flavonoid. (note I): anti-inflammatory and analgesic activity. *Farmacologia* 1994;49:709–12.
- Garg A, Garg S, Zaneveld LJD, Singla AK. Chemistry and pharmacology of the citrus bioflavonoid hesperidin. *Phytother Res* 2001;15:655–69.
- Guardia T, Rotelli AE, Juárez AO, Pelzer LE. Anti-inflammatory properties of plant flavonoids. Effects of rutin, quercetin and hesperidin on adjuvant arthritis in rat. *Farmacologia* 2001;56:683–7.
- González-Trujano ME, Peña EI, Martínez AL, Moreno J, Guevara-Fefer P, Déciga-Campos M, et al. Evaluation of the antinociceptive effect of *Rosmarinus officinalis* L. using three different experimental models in rodents. *J Ethnopharmacol* 2007;111:476–82.
- Guzmán-Gutiérrez SL, Navarrete A. Pharmacological exploration of the sedative mechanism of hesperidin identified as the active principle of *Citrus sinensis* flowers. *Planta Med* 2009;75:295–301.
- Hirata A, Murakami Y, Shoji M, Kadoma Y, Fujisawa S. Kinetics of radical-scavenging activity of hesperetin and hesperidin and their inhibitory activity on COX-2 expression. *Anticancer Res* 2005;25:3367–74.
- Hosseinzadeh H, Nourbakhsh M. Effect of *Rosmarinus officinalis* L. aerial parts extract on morphine withdrawal syndrome in mice. *Phytother Res* 2003;17:938–41.
- Jeong HJ, Han SH, Min BI, Cho YW. 5-HT_{1A} receptor-mediated activation of G-protein-gated inwardly rectifying K⁺ current in rat periaqueductal gray neurons. *Neuropharmacology* 2001;41:175–85.
- Kishimoto K, Koyama S, Akaike N. Synergistic mu-opioid and 5-HT_{1A} presynaptic inhibition of GABA release in rat periaqueductal gray neurons. *Neuropharmacology* 2001;41:529–38.
- Kolesnikov YA, Jain S, Wilson R, Pasternak GW. Peripheral morphine analgesia: synergy with central sites and a target of morphine tolerance. *J Pharmacol Exp Ther* 1996;279:502–6.
- Kokkalou E, Kapetanidis I. Flavonoids of the aerial parts of *Acinos suaveolens*. *Pharm Acta Helv* 1988;636:170–3.
- Li R, Li J, Cai L, Hu C, Zhang L. Suppression of adjuvant arthritis by hesperidin in rats and its mechanisms. *J Pharm Pharmacol* 2008;60:221–8.
- López-Muñoz FJ, Díaz-Reval MI, Terrón JA, Déciga-Campos M. Analysis of the analgesic interactions between ketorolac and tramadol during arthritic nociception in rat. *Eur J Pharmacol* 2004;484:157–65.
- López-Muñoz FJ, Salazar LA, Castañeda-Hernández G, Villarreal JE. A new model to assess analgesic activity: pain-induced functional impairment in the rat (PIFIR). *Drug Dev Res* 1993;28:169–75.
- López-Muñoz FJ. Surface of synergistic interaction between dipyrone and morphine in the PIFIR model. *Drug Dev Res* 1994;33:26–32.
- López-Muñoz FJ, Salazar LA. Determination of analgesic interaction between acetaminophen and d-propoxyphene obtained by means of the surface of synergistic interaction. *Meth Find Exp Clin Pharmacol* 1995;17:311–20.
- Loscalzo LM, Wasowski C, Paladini AC, Marder M. Opioid receptors are involved in the sedative and antinociceptive effects of hesperidin as well as in its potentiation with benzodiazepines. *Eur J Pharmacol* 2008;580:306–13.
- Lukaczer D, Darland G, Tripp M, Liska D, Lerman RH, Schiltz B, et al. A pilot trial evaluating Meta050, a proprietary combination of reduced iso-alpha acids, rosemary extract and oleanolic acid in patients with arthritis and fibromyalgia. *Phytother Res* 2005;19:864–9.
- Martínez AL, González-Trujano ME, Aguirre-Hernández E, Moreno J, Soto-Hernández M, López-Muñoz FJ. 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.
- Martínez M. In: Botas, editor. *Las plantas medicinales de México* 4th edition. ; 1989. p. 343–7.
- Miean KH, Mohamed S. Flavonoid (myricetin, quercetin, kaempferol, luteolin, and apigenin) content of edible tropical plants. *J Agric Food Chem* 2001;49:3106–12.
- Morii S. Research for vitamin-P. *J Biochem (Tokyo)* 1939;29:487–501.
- Okamura N, Haraguchi H, Hashimoto K, Yagi A. Flavonoids in *Rosmarinus officinalis* leaves. *Phytochemistry* 1994;37:1463–6.
- Peng CH, Su JD, Chyau CC, Sung TY, Ho SS, Peng CC, et al. Supercritical fluid extracts of rosemary leaves exhibit potent anti-inflammation and anti-tumor effects. *Biosci Biotechnol Biochem* 2007;71:2223–32.
- Stein C, Millan MJ, Shippenberg TS, Peter K, Herz A. Peripheral opioid receptors mediating antinociception in inflammation. Evidence for involvement of mu, delta and kappa receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 1989;248:1269–75.
- Tanaka T, Makita H, Ohnishi M. Chemoprevention of 4-nitroquinoline-1-oxide-induced oral carcinogenesis in rats by flavonoids diosmin and hesperidin, each alone and in combination. *Cancer Res* 1997;57:246–52.
- Tegeger I, Meier S, Burian M, Schmidt H, Geisslinger G, Lötsch J. Peripheral opioid analgesia in experimental human pain models. *Brain* 2003;126(Pt 5):1092–102.
- Veronesi B, Oortgiesen M. The TRPV1 receptor: target of toxicants and therapeutics. *Toxicol Sci* 2006;89:1–3.
- Wong GY, Gawa NR. Therapeutic potential of vanilloid receptor TRPV1 agonists and antagonists as analgesics: recent advances and setbacks. *Brain Res Rev* 2009;60:267–77.
- Yang CS, Lambert JD, Hou Z, Ju J, Lu G, Hao X. Molecular targets for the cancer preventive activity of tea polyphenols. *Mol Carcinog* 2006;45:431–5.
- Zeng HH, Tu PF, Zhou K, Wang H, Wang BH, Lu JF. Antioxidant properties of phenolic diterpenes from *Rosmarinus officinalis*. *Acta Pharmacol Sin* 2001;12:1094–198.
- Zhang YQ, Gao X, Ji GC, Huang YL, Wu GC, Zhao ZQ. Expression of 5-HT_{1A} receptors mRNA in rat lumbar spinal dorsal horn neurons after peripheral inflammation. *Pain* 2002;98:287–95.
- Zimmermann M. The guidelines on ethical standards for investigation of experimental pain in animals. *Pain* 1983;16:109–10.