



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTINOCICEPTIVA  
Y ANTIINFLAMATORIA EN ROEDORES DE UNA  
MEZCLA DE VALEPOTRIATOS AISLADOS DE  
*Valeriana edulis ssp. procera***

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

**PRESENTA**

**LUIS ARTURO SÁNCHEZ TRUJILLO**



**MÉXICO, CDMX**

**AÑO: 2016**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

## **JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:** Dr. Andrés Navarrete Castro

**VOCAL:** Dr. José Fausto Rivero Cruz

**SECRETARIO:** Dra. María Eva González Trujano

**1er. SUPLENTE:** Dra. Ruth Ivonne Téllez Ballesteros

**2° SUPLENTE:** M. en C. Alejandro Alfaro Romero

## **SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

El trabajo experimental se realizó en el Laboratorio 126 del Edificio de Bioquímica y Farmacia, Conjunto E, Facultad de Química, UNAM.

## **ASESOR DEL TEMA:**

Dr. Andrés Navarrete Castro \_\_\_\_\_

## **SUPERVISOR TÉCNICO:**

M. en C. Alejandro Alfaro Romero \_\_\_\_\_

## **SUSTENTANTE:**

Luis Arturo Sánchez Trujillo \_\_\_\_\_

## ÍNDICE

<b>1. RESUMEN</b> .....	1
<b>2. INTRODUCCIÓN</b> .....	2
<b>3. ANTECEDENTES (MARCO TEÓRICO)</b> .....	3
3.1. Dolor .....	3
3.1.1. Definición de dolor .....	3
3.1.2. Clasificación del dolor .....	3
3.1.3. Fisiología del dolor .....	4
3.2. Nocicepción .....	5
3.2.1. Diferencia entre dolor y nocicepción .....	5
3.2.2. Nociceptores .....	6
3.2.3. Neurofisiología de la nocicepción .....	7
3.2.4. Transmisión química y moduladores de la vía nociceptiva .....	8
3.3. Inflamación .....	8
3.3.1. Definición de inflamación .....	8
3.3.2. Tipos de inflamación .....	10
3.3.3. Mediadores inflamación aguda .....	10
3.4. Tratamiento del dolor e inflamación .....	11
3.4.1. Fármacos opioides .....	12
3.4.2. AINEs .....	14
3.4.3. Uso de plantas medicinales con actividad analgésica y antiinflamatoria .....	15
3.5. Generalidades de <i>Valeriana</i> sp. ....	15
3.6. <i>Valeriana edulis</i> ssp. <i>procera</i> .....	16
3.6.1. Farmacología de <i>V. edulis</i> ssp. <i>procera</i> .....	17
3.6.2. Composición química de <i>V. edulis</i> ssp. <i>procera</i> .....	17
3.7. Valepotriatos .....	18
3.7.1. Actividad de los valepotriatos .....	20
3.8. Pruebas para el estudio de la nocicepción .....	20
<b>4. JUSTIFICACIÓN</b> .....	22
<b>5. HIPÓTESIS</b> .....	22

<b>6. OBJETIVOS</b> .....	23
6.1. Objetivo general.....	23
6.2. Objetivos particulares.....	23
<b>7. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	24
7.1. Compuestos y fármacos .....	24
7.2. Aparatos utilizados:.....	24
7.3. Animales .....	24
7.4 Preparación de los tratamientos.....	25
7.5. Pruebas de nocicepción .....	25
7.5.1 Prueba de Randall-Selitto .....	25
7.5.2 Prueba de retirada de cola por inmersión en agua caliente y fría .....	26
7.5.3. Prueba de la formalina.....	27
7.5.4. Inflamación inducida por carragenina .....	27
7.6. Análisis estadístico.....	27
<b>8. RESULTADOS</b> .....	29
8.1. Prueba de retirada de cola por inmersión en agua caliente y fría .....	29
8.2. Prueba de la formalina .....	30
8.3. Prueba de Randall-Selitto .....	30
8.4. Prueba de inflamación inducida por carragenina .....	33
<b>9. DISCUSIÓN</b> .....	35
<b>10. CONCLUSIONES</b> .....	38
<b>11. PERSPECTIVAS</b> .....	39
<b>12. REFERENCIAS</b> .....	40
<b>13. ANEXOS</b> .....	48
Anexo I.....	48

## ÍNDICE DE FIGURAS Y CUADROS

### Índice de figuras

<b>Figura 1.</b> Principales estructuras neuronales relacionadas con el dolor.....	5
<b>Figura 2.</b> Principales grupos de fibras nociceptoras .....	6
<b>Figura 3.</b> Distribución anatómica de la nocicepción y el dolor. ....	7
<b>Figura 4.</b> Canales, receptores y mecanismos de transmisión más importantes de las terminaciones aferentes nociceptivas .....	9
<b>Figura 5.</b> Principales mediadores inflamatorios .....	10
<b>Figura 6.</b> Pirámide representando la jerarquía de los tratamientos para el dolor..	11
<b>Figura 7.</b> Resumen de los mecanismos moduladores de la vía nociceptiva .....	12
<b>Figura 8.</b> Estructura bidimensional de la morfina.....	13
<b>Figura 9.</b> Hoja, tallo, flores y raíces de <i>Valeriana edulis ssp. procera</i> .....	16
<b>Figura 10.</b> Clasificación de los valepotriatos.....	19
<b>Figura 11.</b> Sustituyentes más comunes de los valepotriatos.....	19
<b>Figura 12.</b> Productos de degradación de los valepotriatos .....	20
<b>Figura 13.</b> Analgesímetro .....	26
<b>Figura 14.</b> Prueba de retirada de cola, actividad antinociceptiva de la mezcla de valepotriatos .....	29
<b>Figura 15.</b> Curso temporal de la prueba de la formalina.....	31
<b>Figura 16.</b> Actividad antinociceptiva de la Fase 1 (A), y de la Fase 2 (B) de la prueba de la formalina.....	32
<b>Figura 17.</b> Prueba de Randall-Selitto.....	32
<b>Figura 18.</b> Curso temporal de la inflamación inducida por carragenina.....	33
<b>Figura 19.</b> Área bajo la curva del curso temporal de la inflamación inducida por carragenina .....	34

### Índice de cuadros

<b>Cuadro 1.</b> Tipos de receptores opioides con sus principales ligandos .....	13
<b>Cuadro 2.</b> Principales pruebas de nocicepción.....	21

## NOTACIÓN EMPLEADA

<b>5-HT</b>	Serotonina
<b>AINEs</b>	Antiinflamatorio no esteroideos
<b>ASIC</b>	Canales iónicos sensibles al ácido
<b>ATP</b>	Adenosin trifosfato
<b>B2</b>	Receptor de bradicidina
<b>BC</b>	Bradicidina
<b>CGRP</b>	Péptido relacionado con el gen de la calcitonina
<b>COX-1</b>	Ciclooxigenasa 1
<b>COX-2</b>	Ciclooxigenasa 2
<b>GABA</b>	Ácido gamma-aminobutírico
<b>GPCR</b>	Receptor acoplado a proteína G
<b>GRD</b>	Ganglio de la raíz dorsal
<b>H</b>	Hipotálamo
<b>MSNM</b>	Metros sobre el nivel del mar
<b>NA</b>	Noradrenalina
<b>Nap</b>	Naproxeno
<b>NGF</b>	Factor de crecimiento nervioso
<b>NO</b>	Óxido Nítrico
<b>P2X</b>	Receptores sensibles a ATP
<b>PG</b>	Prostaglandina
<b>PIFIR</b>	Modelo de dolor inducido por deterioro funcional en ratas
<b>PKA</b>	Proteína cinasa A
<b>PKC</b>	Proteína cinasa C
<b>SNC</b>	Sistema Nervioso Central
<b>SP</b>	Sustancia P
<b>Tra</b>	Tramadol
<b>TRPV1</b>	Receptor de potencial transitorio V1

## 1. RESUMEN

*Valeriana edulis* ssp. *procera*, también conocida como “Valeriana Mexicana” ha sido utilizada desde tiempos antiguos con fines medicinales principalmente para tratar diversos trastornos nerviosos, como de sueño, ansiedad o estrés, sin embargo se sabe que en segundo plano, esta planta se ha utilizado para tratar dolores musculares y de articulaciones. Si bien está confirmado su efecto sedante e hipnótico sobre el sistema nervioso central, no existe evidencia científica que respalde el uso analgésico. Por otro lado, se sabe que *V. edulis* ssp. *procera* presenta diversos metabolitos característicos de la planta, entre ellos los valepotriatos, siendo la especie con mayor cantidad de éstos de todo el género *Valeriana*. Dado que no existe evidencia científica que respalde el uso de esta planta con fines analgésicos, y tomando en cuenta la gran cantidad de valepotriatos que presenta, además de que en un estudio previo realizado por nuestro grupo de trabajo donde se encontró que los valepotriatos presentan actividad antiinflamatoria se propuso la evaluación de una mezcla de valepotriatos que fueron previamente aislados de *V. edulis* ssp. *procera* en diversos modelos de nocicepción en roedores para confirmar su actividad, y así justificar el uso tradicional de la planta para estos fines.

Los resultados obtenidos en las diversas evaluaciones realizadas en este trabajo, muestran una actividad antinociceptiva de los valepotriatos a dosis de 1, 10 y 31 mg/kg en la prueba de retiro de cola por inmersión en agua caliente, y a dosis de 10 y 31 en agua fría. Así mismo presentan actividad en la fase 1 de la prueba de la formalina a dosis de 10 y 31 mg/kg: La dosis de 10 mg/kg también presentó actividad antinociceptiva en la fase 2 de la misma prueba. En cuanto a la prueba de Randall-Selitto la actividad antinociceptiva se presentó a dosis de 31 y 100 mg/kg. La actividad antiinflamatoria se observó en todas las dosis de valepotriatos probadas, 1, 10, 31 y 100 mg/kg en el modelo de inflamación inducida por carragenina.

Éstos resultados dan respaldo al uso tradicional de *V. edulis* ssp. *procera* para el tratamiento de dolor.



## 2. INTRODUCCIÓN

La *Valeriana edulis* ssp. *procera*, también conocida como “Valeriana Mexicana”, es una especie endémica de México, la cual se utiliza desde tiempos antiguos con fines medicinales. En México, la valeriana se utiliza principalmente para tratar trastornos del sueño, afecciones relacionadas con la ansiedad y el estrés psicológico, así como para tratar dolores musculares y de articulaciones.

Dentro de los componentes representativos de ésta planta se encuentran los valepotriatos, compuestos a los cuales se les atribuye participación en algunas de las actividades reportadas de la valeriana, como la actividad ansiolítica y sedante, las cuales han sido ampliamente estudiadas; otras actividades, como la analgésica, han sido poco exploradas hasta el momento.

El presente trabajo pretende reforzar la actividad antinociceptiva y antiinflamatoria de una mezcla de valepotriatos compuesta por valtrato, acevaltrato e isohomoacevaltrato, en diferentes modelos murinos de nocicepción e inflamación.

### **3. ANTECEDENTES (MARCO TEÓRICO)**

#### **3.1. Dolor**

##### **3.1.1. Definición de dolor**

Según la Asociación Internacional para el Estudio del Dolor (IASP, por sus siglas en inglés), *dolor* se define como una experiencia sensorial y emocional desagradable asociada con daño tisular real o potencial, o se describe en términos de dicho daño<sup>1</sup>.

Esta definición implica el hecho de que si el sujeto no habla o está incapacitado para responder, no significa que no esté experimentando nocicepción. También reconoce la importancia de una experiencia emocional desagradable (por ejemplo, el miedo) en el desencadenamiento de respuestas homeostáticas similares a las inducidas por estímulos nocivos<sup>2</sup>.

##### **3.1.2. Clasificación del dolor**

La clasificación del dolor también resulta difícil debido a la gran cantidad de factores anatómicos, fisiológicos y psicológicos que se integran para originar esta sensación<sup>3</sup>, La clasificación más aceptada es la publicada por Woolf en el 2004 quien se basa en el mecanismo neurofisiológico que lo origina para clasificar al dolor en 4 tipos<sup>4</sup>:

1) Dolor nociceptivo: es un dolor transitorio que responde a estímulos nocivos mediante un sistema especializado de alto umbral. Se considera como un sistema de alerta ante estímulos potencialmente dañinos.

2) Dolor inflamatorio: es un dolor espontáneo que responde a un daño en el tejido y se acompaña de hipersensibilidad. Este dolor tiene como objetivo la reducción del contacto y movimiento de la zona afectada. Se considera como un sistema de protección para evitar un daño mayor al ya originado.

3) Dolor neuropático: es un tipo de dolor espontáneo acompañado de hipersensibilidad que se genera por lesiones en el sistema nervioso, tanto a nivel periférico (polineuropatía diabética o neuralgia post-herpética) como a nivel central (lesión en la médula espinal o esclerosis múltiple)<sup>5</sup>

4) Dolor funcional: es un tipo de dolor no adaptativo, pues carece de un motivo de respuesta específico y se origina como consecuencia de sensibilidad anormal o procesamiento central alterado.

### **3.1.3. Fisiología del dolor**

El procesamiento del dolor comprende cuatro etapas principales: la traducción, la transmisión, la modulación y la percepción<sup>6</sup>.

La traducción se refiere a los procesos mediante los cuales los estímulos activan a las terminaciones nerviosas. La transmisión implica las funciones por las cuales el mensaje es llevado desde el sitio de la lesión del tejido a las regiones del cerebro de la percepción. La modulación es el proceso neural recién descubierto que actúa específicamente para reducir la actividad en el proceso de transmisión. Finalmente, la percepción es conciencia subjetiva producida por señales sensoriales, involucra la integración de muchos mensajes en un “todo” coherente y significativo (Fig. 1). La traducción, la transmisión y la modulación son procesos neuronales los cuales pueden ser estudiados objetivamente utilizando métodos que implican la observación directa. En contraste, la conciencia del dolor es una percepción y por lo tanto, subjetiva, por lo que no se puede medir directa y objetivamente. Incluso si pudiéramos medir la actividad de las neuronas de transmisión de dolor en otra persona, concluir que esa persona siente dolor requeriría una inferencia basada en su experiencia<sup>7</sup>.

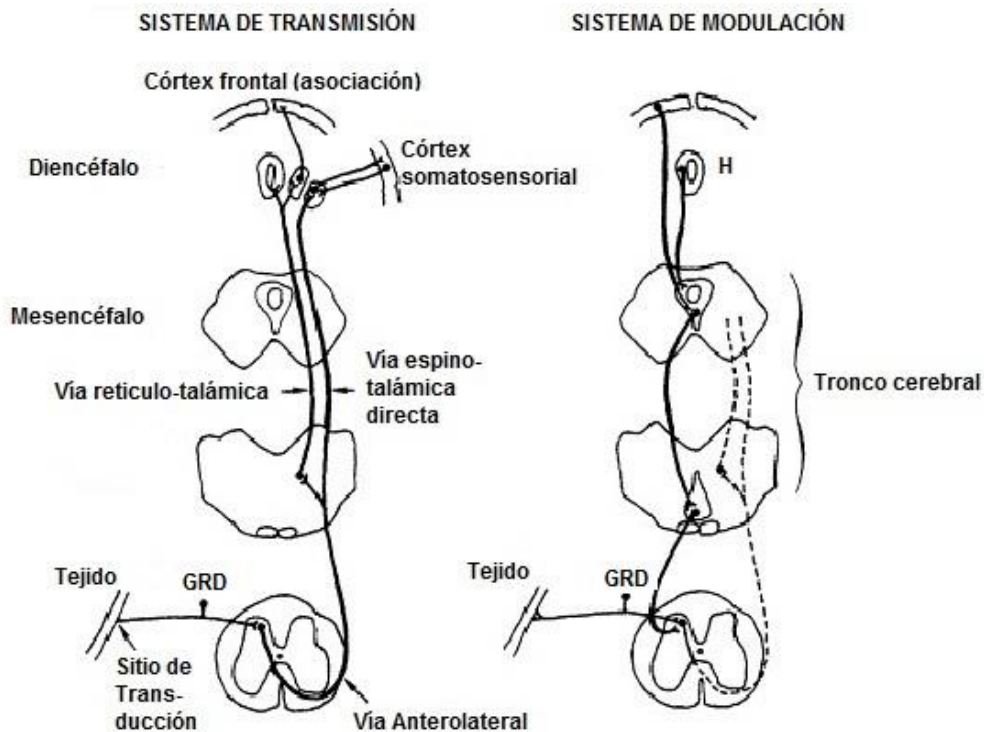


Figura 1. Principales estructuras neuronales relacionadas con el dolor. (GRD: Ganglio de la raíz dorsal, H: Hipotálamo). La secuencia de eventos que conducen a la percepción del dolor inicia en el sistema de transmisión con la traducción, en el que un estímulo nocivo produce impulsos nerviosos que son conducidos a la médula espinal, el mensaje es retransmitido al tálamo ya sea directamente vía espiño-talámica o indirectamente a través de la formación reticular y la vía talámica reticular, desde el tálamo, se transmite a la corteza cerebral<sup>7</sup>.

## 3.2. Nocicepción

### 3.2.1. Diferencia entre dolor y nocicepción

Es importante distinguir la diferencia entre dolor y nocicepción. El dolor es una experiencia subjetiva, producto de una percepción conjunta por el sistema nervioso central, que incorpora un importante componente emocional<sup>2</sup>, mientras que la nocicepción es el proceso neural de codificación de estímulos nocivos; las consecuencias de la codificación de los mismos pueden ser de naturaleza autónoma (por ejemplo presión arterial elevada) o de comportamiento, (reflejo motor de retirada). La sensación de dolor no está necesariamente implicada<sup>1</sup>.

### 3.2.2. Nociceptores

Los nociceptores son neuronas del sistema nervioso periférico somatosensorial que funcionan como receptores de alto umbral capaces de codificar estímulos potencialmente dañinos mediante la detección de variaciones extremas de temperatura, presión y productos químicos<sup>8</sup>, y traducir estos estímulos en señales eléctricas de largo alcance que se retransmiten a centros neuronales superiores<sup>9</sup>.

Se pueden categorizar en tres grupos principales basados en criterios anatómicos y funcionales. Las células de diámetro grande, mielinizadas, y de conducción rápida son conocidas como fibras sensoriales primarias A $\beta$ , las cuales en su mayoría detectan estímulos inocuos en la piel, músculos y articulaciones y por lo tanto, no contribuyen al dolor. En contraste, células de diámetros pequeños, dan lugar a las fibras C no mielinizadas de conducción lenta, éstos nociceptores son polimodales respondiendo tanto a estímulos térmicos como mecánicos. Las células de diámetro mediano dan lugar a las fibras A $\delta$  las cuales están poco mielinizadas y son de conducción un poco más rápida que las fibras C, existen dos clases de fibras A $\delta$ , ambas responden a estímulos mecánicos y térmicos intensos (Fig. 2)<sup>8</sup>.

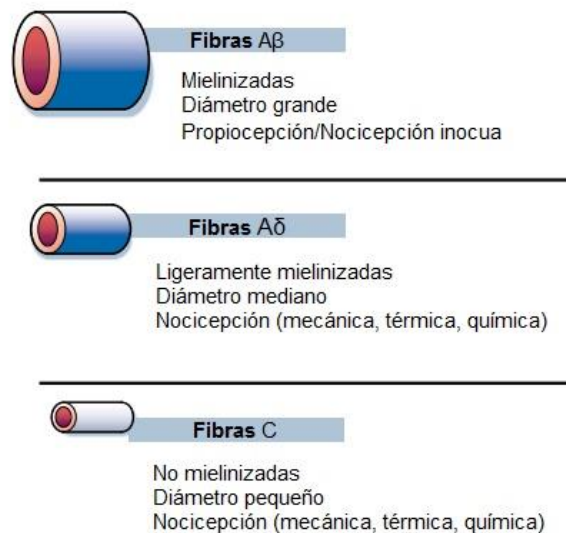


Figura 2. Principales grupos de fibras nociceptoras<sup>8</sup>.

### 3.2.3. Neurofisiología de la nocicepción

La nocicepción se refiere al procesamiento de información sobre el entorno interno y externo del sujeto por el sistema nervioso periférico y central. Típicamente, los estímulos nocivos, incluyendo lesión de los tejidos, activan nociceptores que están presentes en las estructuras periféricas y que transmiten la información al asta dorsal, parte de la *sustancia gris* de la médula espinal<sup>10</sup>. A partir de ahí, la información sigue hacia el tronco cerebral, al tálamo, a las estructuras subcorticales y en última instancia, a la corteza cerebral, donde se genera la percepción del dolor, sin embargo, ésta puede resultar sólo cuando hay actividad de las redes tálamo-corticales, que procesan la información transmitida por las vías de la nocicepción (representación en el cuadro sombreado oscuro en la parte superior, (Fig. 3)<sup>11</sup>.

La *sustancia gris* de la médula espinal es rica tanto en péptidos opioides como en receptores opioides endógenos y pueden ser un importante lugar de acción de los fármacos similares a la morfina<sup>12</sup>.

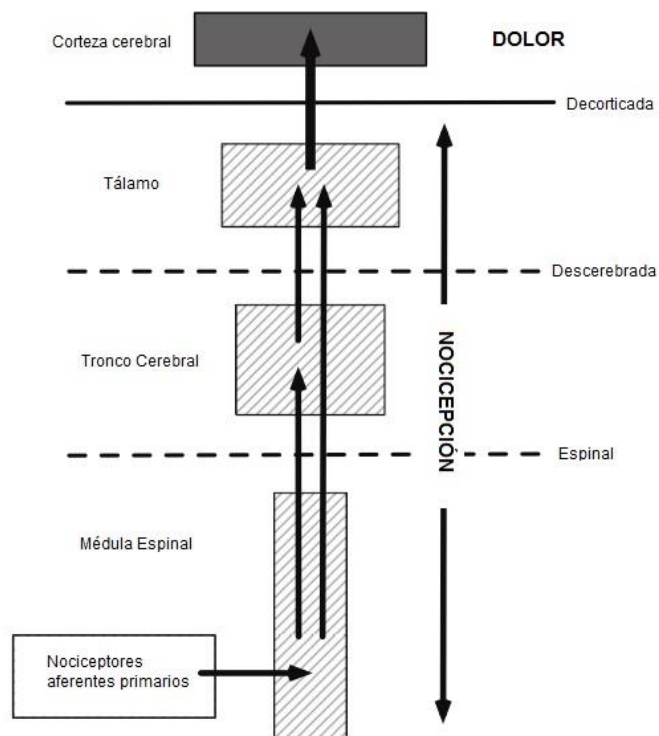


Figura 3. Distribución anatómica de la nocicepción y el dolor. La figura esquematiza las principales estructuras neuroanatómicas que diferencian la nocicepción y el dolor<sup>11</sup>.

### **3.2.4. Transmisión química y moduladores de la vía nociceptiva**

Todos los sistemas sensoriales deben convertir un estímulo a señales electroquímicas, en este aspecto la nocicepción es única, ya que los nociceptores tienen la habilidad de detectar una amplia gama de estímulos, sean éstos de naturaleza física o química, de la misma manera, los nociceptores son únicos en la medida en la que sus propiedades receptivas pueden ser moduladas<sup>13</sup>. Los canales, receptores y mecanismos de transmisión de las terminaciones aferentes nociceptivas más importantes se mencionan en la Fig. 4<sup>12</sup>.

## **3.3. Inflamación**

### **3.3.1. Definición de inflamación**

La inflamación, en su sentido más amplio, es una respuesta del organismo a una lesión<sup>14</sup>, es parte de la respuesta biológica compleja del sistema inmunológico no específico que ocurre en reacción a cualquier tipo de lesión corporal por estímulos nocivos, tales como patógenos, células dañadas, o irritantes<sup>15</sup>. Los cuatro signos cardinales de la inflamación son: enrojecimiento e hinchazón con calor y dolor, los cuales se pueden explicar por el aumento del flujo sanguíneo, metabolismo celular elevado, vasodilatación, liberación de mediadores solubles, extravasación de líquidos y mayor afluencia celular<sup>16</sup>.

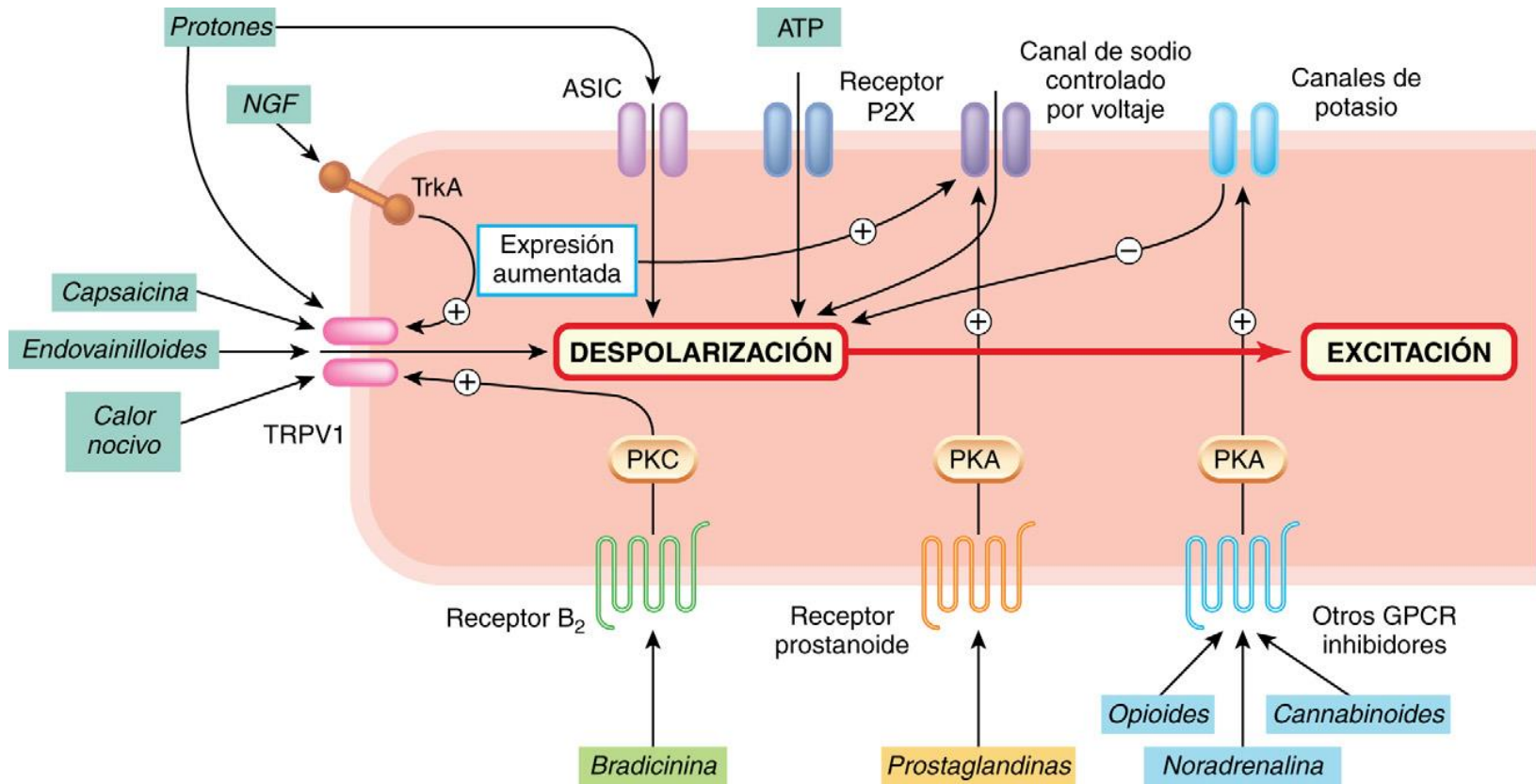


Figura 4. Canales, receptores y mecanismos de transmisión más importantes de las terminaciones aferentes nociceptivas. Los canales controlados por ligandos, que comprenden a los canales iónicos sensibles al ácido (ASIC), los sensibles al ATP (receptores P2X) y los sensibles a la capsaicina (TRPV1), que también son sensibles a los protones y la temperatura. Se muestran varios receptores acoplados a proteínas G (GPCR), facilitadores e inhibidores, que regulan la función de los canales mediante varios sistemas de segundos mensajeros. Los factores de crecimiento tales como el factor de crecimiento nervioso (NGF) actúan por medio de receptores unidos a cinasas, controlando la función de canales iónicos y la expresión génica. PKA: proteína cinasa A; PKC: proteína cinasa C; receptor B<sub>2</sub>: receptor de bradicinina tipo 2 <sup>12-13</sup>.



### 3.3.2. Tipos de inflamación

La inflamación es categorizada en dos tipos, aguda y crónica, siendo la principal diferencia entre ambas la temporalidad. De manera general, si una inflamación aguda ha durado más de unas semanas es considerada como crónica<sup>17</sup>, y a nivel celular hay una diferencia en el tipo de células que prevalecen en el sitio de la lesión. En la inflamación aguda, hay un gran número de células fagocíticas, citocinas, entre otras<sup>18</sup>.

### 3.3.3. Mediadores inflamación aguda

Los mediadores inflamatorios liberados por las células no neuronales durante la lesión de los tejidos, referidos colectivamente como “sopa inflamatoria”<sup>8</sup>, aumentan la sensibilidad de los nociceptores y potencian la percepción del dolor. Algunos de los principales componentes de esta “sopa inflamatoria” son: bradicidina, H<sup>+</sup>, neurotransmisores como la serotonina y el ATP, neurotrofinas (factor de crecimiento nervioso), leucotrienos (LT) y prostaglandinas (PG)<sup>19</sup>(Fig. 5).

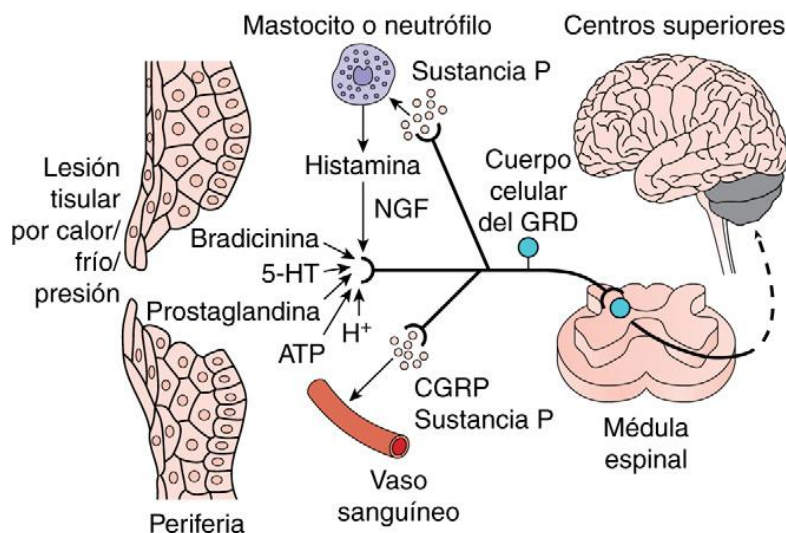


Figura 5. Principales mediadores inflamatorios. 5-HT: serotonina; ATP: tri-fosfato de adenosina; NGF: factor de crecimiento nervioso; CGRP: Péptido relacionado con el gen de la calcitonina; GRD: Ganglio de la raíz dorsal<sup>8, 12</sup>.

### 3.4. Tratamiento del dolor e inflamación.

A pesar de que el dolor sea una experiencia subjetiva, sigue siendo un fenómeno incapacitante que acompaña a numerosos trastornos médicos, por lo que su control es una de las principales prioridades terapéuticas en la actualidad, y debe ser examinado en términos de severidad, temporalidad y etiología<sup>20</sup>.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha establecido una jerarquía aceptada mundialmente de tratamientos para el dolor, estos tratamientos han sido documentados por investigaciones médicas como eficaces para algunas condiciones dolorosas, entre más alto su lugar en la escala, más potente y riesgoso es. Como regla, se debe iniciar con el tratamiento apropiado de menor lugar en esta jerarquía, y avanzar hacia los tratamientos superiores para mejorar el alivio del dolor<sup>21</sup> (Fig. 6). Además de las terapias invasivas, los tratamientos incluyen fármacos, los llamados AINEs como primera opción y los narcóticos u opioides (analgésicos clásicos) (Fig. 7).

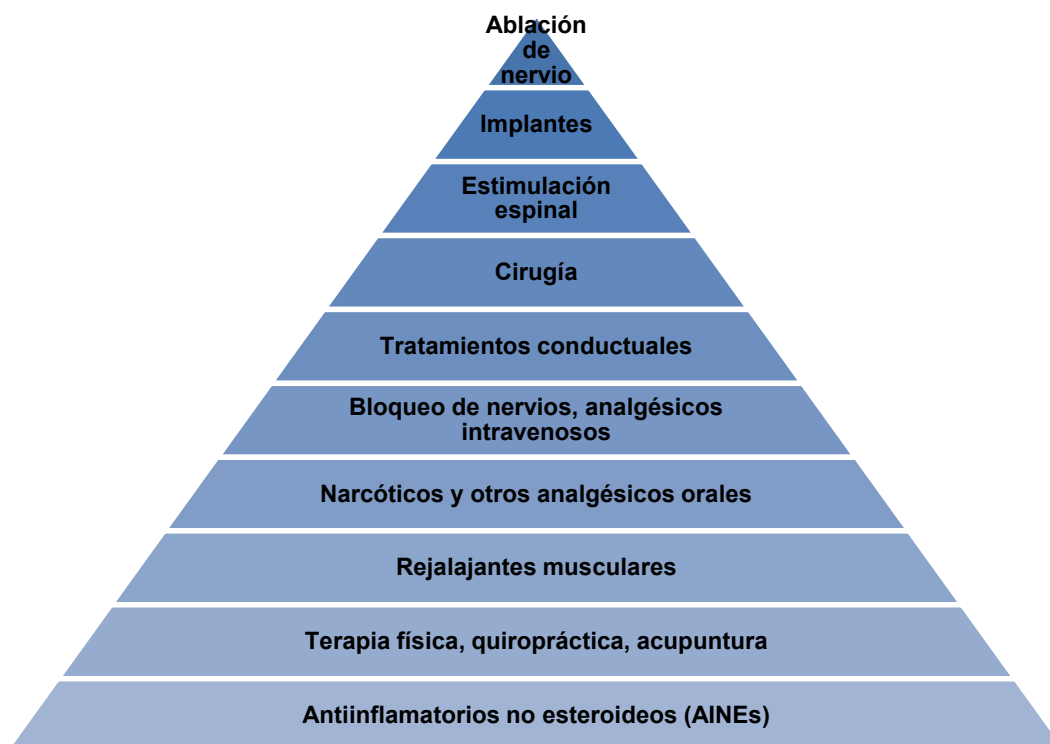


Figura 6. Pirámide representando la jerarquía de los tratamientos para el dolor. Adaptación de autor<sup>21</sup>.

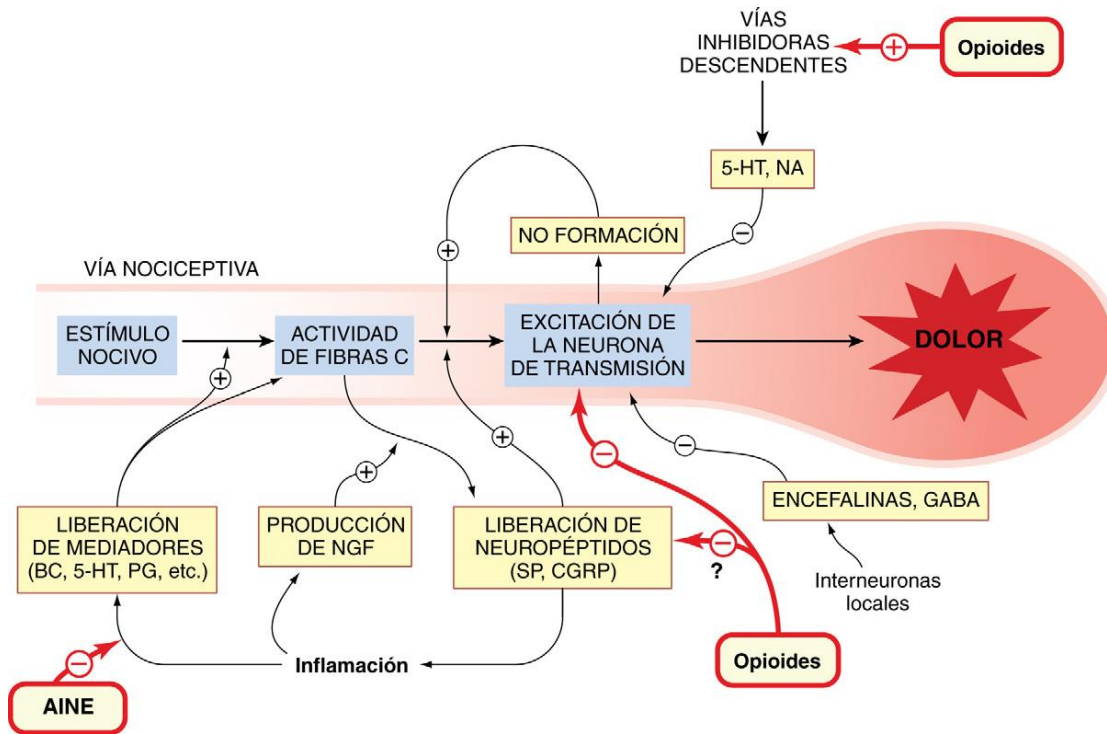


Figura 7. Resumen de los mecanismos moduladores de la vía nociceptiva. Localización de donde actúan los fármacos más utilizados. AINE: antiinflamatorios no esteroideos; BC: bradicinina; CGRP: péptido relacionado con el gen de la calcitonina; GABA: ácido gammaaminobutírico; 5-HT: 5-hidroxitriptamina; NA: noradrenalina; NGF: factor de crecimiento nervioso; NO: óxido nítrico; PG: prostaglandinas; SP: sustancia P.

### 3.4.1. Fármacos opioides

El opio es un extracto obtenido de la adormidera, planta de la especie *Papaver somniferum*, que contiene morfina y otros alcaloides afines. La estructura de la morfina fue establecida en 1902, es un alcaloide derivado del fenantreno, con dos anillos planares y dos estructuras anulares alifáticas, que ocupan un plano situado casi en ángulo recto con respecto al resto de la molécula<sup>22</sup> (Fig. 8). Desde entonces se han estudiado numerosos compuestos semisintéticos y sintéticos derivados de la modificación química de la morfina<sup>20</sup>. Se les llama *opioides* a todos los compuestos (naturales, semi-sintéticos y sintéticos) que producen sus efectos al unirse a receptores opioides y los cuales son antagonizados competitivamente por la Naloxona<sup>23</sup>. *Narcótico* es un término general que se utiliza para describir a fármacos similares a la morfina<sup>24</sup>.

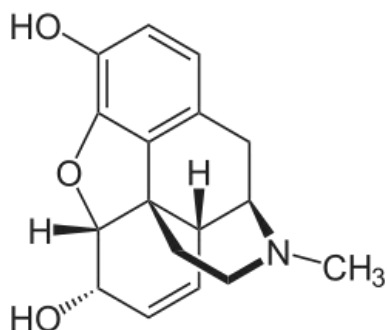


Figura 8. Estructura bidimensional de la morfina.

### 3.4.1.1. Receptores opioides

La noción de receptores opioides fue aceptada tras el desarrollo de moléculas con actividad antagonista. Para justificar su existencia se planteó la hipótesis de que deberían existir sustancias endógenas que activaran a éstos, hecho que se comprobó con las encefalinas<sup>25</sup>, y que en la actualidad se sabe que éstas pertenecen a una familia de opioides endógenos conocidos como endorfinas<sup>26</sup>. Después de diversos estudios, los receptores opioides fueron categorizados en tres tipos diferenciados, denominados  $\mu$ ,  $\kappa$ , y  $\delta$ <sup>27</sup> (Tabla 1).

Cuadro 1. Tipos de receptores opioides con sus principales ligandos.

Receptor Opiode	Ligandos
$\mu$	Morfina, Fentanilo, Alfentanilo
$\kappa$	Cetociclazocina, Nalbufina, Pentazocina
$\delta$	<i>N</i> -alilnormetazocina

### 3.4.1.2. Mecanismo de acción de los opioides

Gracias a estudios efectuados en cepas de animales transgénicos que carecían de cada uno de los receptores, permitió demostrar que el receptor  $\mu$  es necesario para mediar la acción de la morfina en las vías de la nocicepción<sup>28</sup>. Los tres tipos de receptores opioides pertenecen a la familia de los receptores acoplados a proteínas  $G_i/G_o$ . Facilitan la apertura de un canal de potasio específico e inhiben la apertura

de canales de calcio controlados por voltaje. Estos efectos en la membrana reducen la excitabilidad neuronal debido a que el aumento de  $K^+$  induce una hiperpolarización de la membrana haciendo que la probabilidad de activar mecanismos de acción sea menor, y disminuyen la liberación de neurotransmisores debido a la entrada de  $Ca^{2+}$  en la célula<sup>29</sup>.

Existen datos que la analgesia supraespinal por opioides implica la liberación de péptidos opioides endógenos, y que en la médula espinal existe un componente de la analgesia derivado de la liberación de serotonina (5-HT)<sup>29</sup>.

### **3.4.2. AINEs**

Los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs), clasificación que data desde los años sesenta<sup>30</sup>, son un grupo de fármacos que tienen propiedades analgésicas, antipiréticas y antiinflamatorias que se utilizan como alternativas no adictivas para los analgésicos clásicos (opioides)<sup>19</sup>. Generalmente son el tratamiento de instancia para dolor leve a moderado ya sea agudo o crónico. Todos los AINEs ejercen su efecto inhibiendo la actividad de las ciclooxygenasas 1 y 2, (COX-1, COX-2), enzimas encargadas de la síntesis de prostaglandinas, las cuales son compuestos mediadores del dolor y a su vez favorecen la inflamación<sup>31</sup>. A pesar de su uso extendido en todo el mundo, éstos fármacos presentan diversas reacciones adversas, sobre todo aquellos AINEs que inhiben a ambas COX (inespecíficos), ya que la inhibición de la COX-1 puede llegar a generar úlceras gástricas, es por ello que se sintetizó una nueva generación de AINEs selectivos para la COX-2<sup>32</sup>, sin embargo, diversos estudios concluyeron que estos fármacos pueden inducir a un aumento de eventos cardiovasculares trombóticos por la vasodilatación y la disminución de la producción de prostaglandinas antiagregantes<sup>33</sup>.

El fuerte aumento en la morbilidad del dolor a nivel global<sup>34</sup>, y los efectos adversos de los tratamientos actuales hacen necesaria la inclusión de terapias alternativas, y en este contexto, se debe considerar el uso de productos naturales, los cuales han sido utilizados desde la antigüedad para el tratamiento del dolor.

### **3.4.3. Uso de plantas medicinales con actividad analgésica y antiinflamatoria**

El papel de las plantas medicinales como remedio para el dolor ha sido reconocido desde la antigüedad. Algunas de las plantas que se han utilizado tradicionalmente como analgésicos, o han sido base para fármacos que se utilizan en el alivio del dolor incluyen a *Cannabis sativa* (Cannabaceae), *Mandragora officinarum* (Solanaceae), *Papaver somniferum* (Papaveraceae) y *Conium maculatum* (Umbelliferae), *Capsicum annum*, entre otras<sup>35</sup>.

En México existe una gran diversidad de plantas medicinales utilizadas para el tratamiento del dolor y la inflamación. Entre las más utilizadas están el árnica mexicana *Heteroteca inuloides*<sup>36</sup>, la sábila *Aloe vera*<sup>37</sup>, la ruda *Ruta graveolens*, y la valeriana *Valeriana edulis* ssp. *procera*<sup>38</sup>, a pesar de que no exista evidencia científica que respalde la actividad antinociceptiva o analgésica de la valeriana.

### **3.5. Generalidades de *Valeriana* sp.**

La valeriana se ha utilizado con fines medicinales por al menos 2000 años, siendo estudiada por médicos como Dioscórides y Galeno. Utilizada para el tratamiento de la epilepsia en el siglo XVI, actualmente se utiliza como tratamiento para numerosos trastornos nerviosos<sup>39</sup>, en Europa, Asia y Norteamérica ha sido utilizada principalmente como sedante suave e hipnótico<sup>40</sup>.

El género *Valeriana* comprende poco más de 200 especies distribuidas alrededor de todo el globo terráqueo, *V. officinalis*, utilizada en todo el mundo<sup>41</sup>, *V. wallichii* (sinónimo de *V. jatamansi*) en India y Pakistán y *V. edulis* ssp. *procera* en México<sup>42</sup> son las especies utilizadas con fines medicinales de mayor importancia.

Cabe mencionar que todas estas especies se utilizan para casi los mismos propósitos<sup>40</sup>. Las tres son utilizadas para la producción de fitomedicamentos sólidos orales<sup>43</sup> a pesar de que la composición química entre especies difiera en gran manera<sup>44</sup>.

### 3.6. *Valeriana edulis* ssp. *procera*

Conocida también como “Valeriana Mexicana”, “Hierba de gato”, o “plateada” dependiendo la región donde se encuentre, esta subespecie endémica de México, es una planta herbácea perenne, dioica, hasta de 1.5 m de alto, con raíz cilíndrica, de 1 a 3 cm de diámetro, dando origen a uno o a veces dos tallos, éstos hasta de 15 mm de diámetro en la base; hojas basales varias a numerosas con peciolo hasta de 10 cm de largo; fruto ovado, de 2 a 3.5 mm de largo, café-verdoso. Se caracteriza por ser la especie con la raíz más grande de todo el género <sup>45</sup> (Fig. 9).

Originaria de América boreal y occidental, esta planta se puede encontrar en zonas de clima templado desde los 2240 y los 2750 msnm; asociada a bosque de juníperos y bosque mixto de pino y encino. Está distribuida desde el sur de Chihuahua hasta Puebla y Oaxaca, principalmente en la zona central del país<sup>38, 46</sup>.



Figura 9. Hoja, tallo, flores y raíces de *Valeriana edulis* ssp. *procera*

Ha sido ampliamente utilizada en la medicina tradicional mexicana, principalmente como sedante e hipnótico, así como en la industria farmacéutica para la producción de fitomedicamentos; tal es la importancia en ventas, que la sobreexplotación de la planta ha impulsado su producción por micropropagación<sup>47</sup>. Además de su uso tradicional como sedante, en segundo plano la *V.edulis ssp. procera* se utiliza para tratar dolor de pecho, espalda y cabeza mediante la aplicación tópica en el sitio del malestar de un extracto de la planta, elaborado por maceración de la raíz, las hojas o ambas en alcohol con un periodo de reposo de 7 días<sup>38, 46</sup>.

### **3.6.1. Farmacología de *V. edulis ssp. procera***

Considerando la gran variedad de la composición química del género Valeriana, se puede observar que la Valeriana es un ejemplo de planta medicinal donde el efecto general es debido a diversos componentes y a los diferentes mecanismos de acción de los mismos.

El efecto depresor que posee esta planta sobre el sistema nervioso central ha sido demostrado en ratones<sup>48</sup> y en estudios clínicos<sup>49, 50, 51</sup>. A pesar de que el mecanismo de acción molecular no ha sido elucidado, se asume que el ácido valerénico y los valepotriatos son responsables de dicho efecto.

El perfil de actividad del ácido valerénico indica que tiene un efecto central en vez de periférico, y esta hipótesis se ha ido fortaleciendo por el descubrimiento de que el ácido valerénico inhibe el sistema enzimático que ocasiona la degradación de GABA en el cerebro<sup>52</sup>. De la actividad de los valepotriatos se hablará más adelante.

### **3.6.2. Composición química de *V. edulis ssp. procera***

Se han identificado más de 150 componentes en el género *Valeriana*, muchos de los cuales presentan actividad farmacológica, entre los cuales podemos encontrar alcaloides, terpenos, ácidos orgánicos y sus derivados, valepotriatos y flavonas<sup>53</sup>. Los principales alcaloides son actinidina, chatinina, valerianina, entre otros; el ácido orgánico más representativo es el ácido valerénico.



En *V. edulis* ssp. *procera* se han identificado por cromatografía de líquidos de alta resolución el ácido clorogénico, los lignanos 4-O-D-glucósido de masorresinol, 4,4-O-D-diglucósido de pinorresinol, 4-O-D-glucósido de berchemol y los flavonoides hesperidina y linarina<sup>54</sup>. Es importante mencionar que otra cosa que diferencia a *V. edulis* ssp. *procera* es la especie que contiene mayor cantidad de valepotriatos (8-12%) en comparación con *V. officinalis* (0.8-0.17%) y *V. wallichii* (2.8-3.5%)<sup>43</sup>.

### 3.7. Valepotriatos

Los valepotriatos (valeriana-epoxi-triesteres), son iridoides con esqueleto ciclopentano-C-piranoide que contiene un anillo epóxido, tres grupos ester, uno o dos dobles enlaces y no presentan enlaces glucosídicos y son exclusivos de la familia *Valerianaceae*<sup>42</sup>. Basados en el número de dobles enlaces que presentan, los valepotriatos pueden ser clasificados en dos grupos principales: monoenos y dienos (Fig. 10). Los valepotriatos más comunes son valtrato, isovaltrato, acevaltrato, y dihidrovaltrato, cada uno con un diferente sustituyente dentro del esqueleto general de los valepotriatos (Fig. 11).

Los valepotriatos son compuestos inestables. Son termolábiles y se descomponen fácilmente bajo condiciones ácidas o básicas tanto en solución acuosa, como en soluciones alcohólicas. Sin embargo, los valepotriatos tipo dieno pueden ser conservados en metanol anhidro a 20°C<sup>42</sup>.

Sus productos de degradación son los baldriales, los cuales se forman a partir de la pérdida de los sustituyentes y de la formación de un grupo aldehído a partir del epóxido<sup>55</sup>, (Fig. 12).

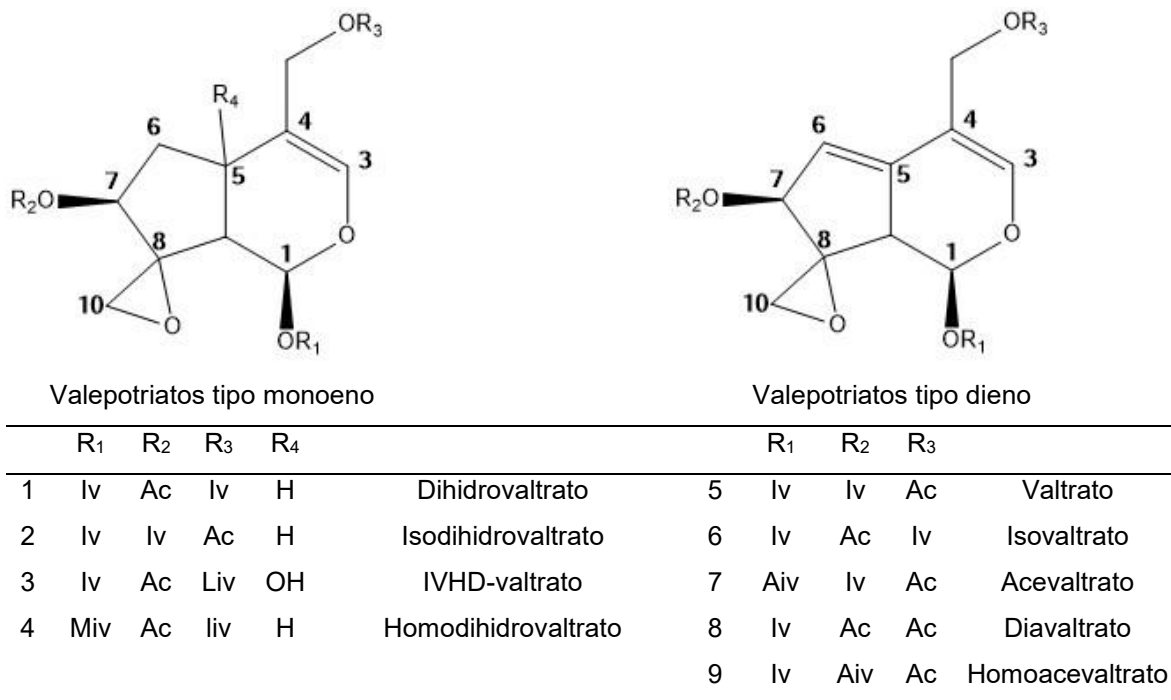


Figura 10. Clasificación de los valepotriatos

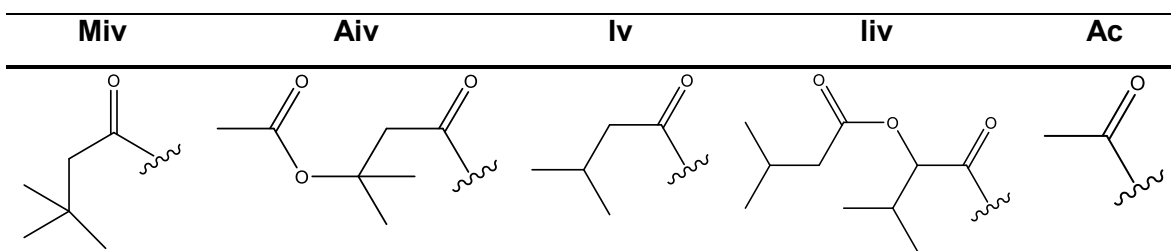
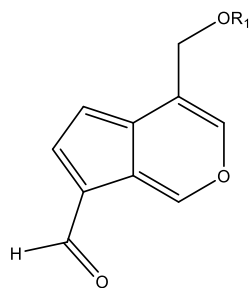


Figura 11. Sustituyentes más comunes de los valepotriatos. Miv:  $\beta$ -metilisovalerilo; Aiv: acetoxiisovalerilo; lv: isovalerilo; liv:  $\alpha$ -isovaleroxiisovalerilo; Ac: acetilo<sup>42</sup>.



<b>R<sub>1</sub></b>		
10	Ac	Baldrinal
11	Iv	Homobaldrinal
12	H	Deacilbaldrinal

Figura 12. Productos de degradación de los valepotriatos<sup>55</sup>

### 3.7.1. Actividad de los valepotriatos

Se ha demostrado que los valepotriatos poseen diversas actividades farmacológicas. Wagner y colaboradores demostraron que ejercían un efecto espasmolítico a dosis menores de las que se observaba un efecto directo sobre el SNC<sup>56</sup>, efecto que también fue encontrado por Hazelhoff y colaboradores en el modelo de íleon de cobayo<sup>57</sup>. Mientras que Estrada-Soto y colaboradores sugieren que la actividad relajante de extractos de la planta sobre anillos de aorta de rata se debe a los valepotriatos<sup>58</sup>

### 3.8. Pruebas para el estudio de la nocicepción

Las pruebas de nocicepción utilizan estímulos térmicos, mecánicos o químicos. Algunos de ellos se basan en la latencia de la aparición de un comportamiento o la ausencia del mismo, usualmente un efecto de retirada de pata o cola; otras se basan en el umbral del estímulo necesario para provocar una conducta de evitación, en este tipo de pruebas el estímulo puede ser variable, con un aumento de la intensidad del estímulo a un valor fijo<sup>59</sup>. A continuación se mencionan las pruebas más utilizadas actualmente, la naturaleza de su estímulo y el parámetro de medición. Las pruebas elaboradas en el presente trabajo se describen a detalle más adelante.

Cuadro 2. Principales pruebas de nocicepción

<b>Prueba</b>	<b>Naturaleza del estímulo</b>	<b>Estímulo</b>	<b>Parámetro</b>	<b>Especies utilizadas</b>
<b>Retiro de cola</b>	Térmico	Temperatura fija (fría o caliente)	Latencia de retiro de cola	Rata, Ratón
<b>Placa caliente</b>	Térmico	Temperatura fija	Latencia de retiro de cola/ brinco	Rata, Ratón
<b>Prueba de la acetona</b>	Térmico	Aplicación por gota	Latencia o cuantificación del estímulo	Rata, Ratón
<b>Von Frey</b>	Mecánico	Incremento fijo del estímulo	Umbral de retiro	Rata, Ratón
<b>Randall-Selitto</b>	Mecánico	Aumento de presión	Umbral de retirada o vocalización	Rata, Ratón
<b>Prueba de la formalina</b>	Químico	Inyección en la pata	Cuantificación de respuesta	Rata, Ratón
<b>PIFIR</b>	Químico	Inyección articular de ácido Úrico	Índice de funcionalidad	Rata

#### **4. JUSTIFICACIÓN**

El uso de *Valeriana edulis* ssp. *procera* se encuentra ampliamente difundido en la medicina tradicional mexicana, así como en la industria fitofarmacéutica<sup>47</sup>, por lo que es la especie de valeriana de mayor importancia en nuestro país. Es utilizada principalmente como sedante y en el tratamiento de trastornos del sueño, sobre todo insomnio; además, se sabe que se utiliza también como analgésico, para dolor de pecho, espalda o cabeza<sup>38</sup>, a pesar de que las evidencias científicas que respalden dicha actividad sean insuficientes.

Estudios recientes han encontrado la actividad antinociceptiva del extracto acuoso, etanólico y una mezcla de valepotriatos obtenidos de *Valeriana edulis* ssp. *procera* por el modelo de contracciones inducidas por ácido acético<sup>60</sup>, aunado a esto, efectos antinociceptivos en la misma prueba han sido reportados utilizando extractos de otras especies de valeriana, que presentan una alta concentración de valepotriatos<sup>61</sup>.

Con base a los resultados previamente reportados de actividad antinociceptiva, así como el creciente uso de la valeriana para el tratamiento del dolor en nuestro país, resulta necesario reforzar la actividad antinociceptiva de la valeriana. Es por ello que en el presente trabajo se evalúa la actividad antinociceptiva de una mezcla de valepotriatos, compuestos representativos de la planta, los cuales fueron previamente aislados de *Valeriana edulis* ssp. *procera*, en diferentes modelos de nocicepción.

#### **5. HIPÓTESIS**

La mezcla de valepotriatos de *Valeriana edulis* ssp. *procera*, presentará actividad antinociceptiva en los modelos de nocicepción y/o inflamación en roedores

## **6. OBJETIVOS**

### **6.1. Objetivo general**

Evaluar una mezcla de valepotriatos de *Valeriana edulis* ssp. *procera* utilizando diferentes modelos murinos de nocicepción e inflamación para sustentar su uso terapéutico para el tratamiento del dolor.

### **6.2. Objetivos particulares**

- Evaluar la actividad antinociceptiva de una mezcla de valepotriatos en la prueba de Randall-Selitto, prueba de retiro de cola y prueba de la formalina.
- Reforzar la actividad antiinflamatoria de una mezcla de valepotriatos en el modelo de inflamación inducida por inyecciones intradérmicas de carragenina.

## **7. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **7.1. Compuestos y fármacos**

Para los experimentos realizados se utilizó un testigo antiinflamatorio: Naproxeno sódico (grado farmacéutico) el cual fue una donación de Helm de México S.A., un testigo antinociceptivo: tramadol, que fue adquirido en solución inyectable de AMSA Laboratorios, La formalina fue adquirida como solución de formaldehído al 37% de J.T. Baker S.A. de C.V. y los valepotriatos fueron previamente aislados de *Valeriana edulis* ssp. *procera* utilizando técnicas fitoquímicas e identificados por técnicas de CL/EM y CG/EM. Los valepotriatos presentes en la mezcla y su proporción son: valtrato (45.53%), acevaltrato (4.43%) e isohomoacevaltrato (10.13%).

### **7.2. Aparatos utilizados:**

Se utilizó un analgesímetro No. 37215 - Analgesy-Meter, UGO BASILE S.R.L (Ugo Basile) (Fig. 13) para la prueba de Randall-Selitto; un Pletismómetro Digital UGO BASILE S.R.L. No. 37140 (Ugo Basile) para la inflamación por carragenina y un baño de agua Buchi 461 waterbath, 1355 JS1L BUCHI para la prueba de retiro de cola.

### **7.3. Animales**

Se utilizaron ratas macho Wistar de 150 a 200 g de peso las cuales se mantuvieron a temperatura constante de  $22 \pm 1^\circ\text{C}$  con libre acceso a agua y alimento, bajo un ciclo de luz/oscuridad de 12h. El manejo y el cuidado de todos los animales utilizados en este estudio fueron conforme a la NOM-062-ZOO-1999. Además, se obtuvo la aprobación del protocolo por parte del Comité Institucional para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Facultad de Química. Oficio 150/16, (ANEXO I).

## **7.4 Preparación de los tratamientos**

El naproxeno sódico se preparó como una suspensión de 10 mg/mL en solución salina isotónica y tres gotas de Tween 80, para alcanzar la dosis de 10 mg/kg administrando un volumen de 0.1 mL por cada 100 g de peso corporal de la rata.

El tramadol (solución inyectable 100 mg/2 mL) se diluyó en solución salina isotónica a concentraciones de 10 mg/mL y 20 mg/mL para alcanzar dosis de 10mg/kg y 20 mg/kg respectivamente administrando 0.1mL por cada 100g de peso corporal de la rata.

Se utilizó la cantidad necesaria de la mezcla de valepotriatos para preparar suspensiones de 1, 10, 31 y 100 mg/mL en solución salina isotónica con tres gotas de Tween 80 para alcanzar dosis de 1, 10, 31, 100 mg/kg, respectivamente. Y se administró 0.1 mL por cada 100 g de peso corporal de la rata. La formalina se preparó mediante una serie de diluciones de la solución de formaldehído al 37% hasta alcanzar la concentración de 0.5% v/v.

## **7.5. Pruebas de nocicepción**

Las pruebas de nocicepción se realizaron de manera secuencial iniciando con la ambientación del animal durante 5 minutos. A continuación se registraron los valores basales de cada una de las pruebas a realizar, posteriormente se administró vía intraperitoneal el respectivo tratamiento, (valepotriatos, fármaco de referencia o SSI). Las pruebas de nocicepción se realizaron 30 minutos después de la administración del tratamiento. Las pruebas se describen con más detalle más adelante.

### **7.5.1 Prueba de Randall-Selitto**

Se realizó utilizando un Analgesímetro No. 37215 - Analgesy-Meter, UGO BASILE S.R.L (Ugo Basile) (Fig. 13), el cual ejerce una fuerza que incrementa a ritmo constante (cierto número de gramos por segundo) y la cual es monitoreada por un puntero en una escala lineal. La parte media de la cola del animal se colocó en una pequeña base bajo el empujador en forma de cono con una punta redonda, se



presionó el pedal para activar el mecanismo que ejerce la fuerza, la cual se mantuvo hasta una respuesta de retirada de cola o chillido por parte del animal, el punto final de la fuerza aplicada fue registrado. La máxima fuerza aplicada fue de 500 g para evitar daño tisular. La prueba se realizó antes y 30 minutos después de la administración del tratamiento vía intraperitoneal. En este modelo, el aumento en el punto final de la fuerza aplicada antes y después del tratamiento se interpretó como efecto antinociceptivo.

### **7.5.2 Prueba de retirada de cola por inmersión en agua caliente y fría**

La parte final de la cola (5 cm) del animal se sumergió en un baño de agua a una temperatura de  $55 \pm 2^{\circ}\text{C}$  o a  $5 \pm 2^{\circ}\text{C}$  respectivamente. Se tomó el tiempo que el animal retiró la cola. El tiempo máximo de retirada fue de 15 segundos para evitar daño tisular. La prueba se realizó antes y 30 minutos después de la administración del tratamiento vía intraperitoneal. El aumento de tiempo de la retirada de la cola se interpretó como la actividad antinociceptiva.



Figura 13. Analgesímetro

### **7.5.3. Prueba de la formalina**

El tratamiento (vehículo, fármaco o valepotriatos) se administró vía intraperitoneal, en seguida, los animales se colocaron individualmente en cámaras de observación abiertas equipadas con espejos de 40 x 40 cm durante 30 minutos y luego se retiraron. Posteriormente, se les administró vía subcutánea 50  $\mu$ L de solución de formalina 0.5% v/v en la región plantar de la pata trasera derecha. El comportamiento nociceptivo se observó inmediatamente después de la administración y se cuantificó como el número de sacudidas de la pata administrada, las cuales se registraron por periodos de 1 minuto cada 5 minutos durante 60 minutos. La sacudida de pata se identificó como una retirada rápida y breve o como la flexión de la pata administrada. La disminución del número de sacudidas se interpretó como efecto antinociceptivo en este modelo.

### **7.5.4. Inflamación inducida por carragenina**

El edema fue inducido por una inyección subcutánea de 50  $\mu$ L de una solución de carragenina al 1% en solución salina isotónica en la sección plantar derecha de la pata posterior izquierda de la rata. El tratamiento se administró 30 minutos antes de la inducción del edema. El volumen de la pata de la rata se midió con un pletismómetro Digital UGO BASILE S.R.L. No. 37140. Las mediciones se realizaron a los tiempos de 1, 2,3 y 4 horas después de la inducción del edema.

### **7.6. Análisis estadístico**

Los resultados se presentan como el promedio  $\pm$  EEM de al menos 6 animales por grupo. Para las pruebas de Randall-Selitto y retirada de cola por inmersión en agua caliente y fría se realizó una prueba t de Student pareada de los datos antes y después del tratamiento.

Para las pruebas de formalina e inflamación inducida por carragenina se construyeron los cursos temporales del número de sacudidas de pata y volumen del edema respectivamente y se calculó su área bajo la curva (ABC) para cada tratamiento. En el caso de la prueba de la formalina también se determinó el % de Antinocicepción. Para determinar la diferencia entre tratamientos y el control se utilizó un análisis de varianza de una vía (ANOVA) seguido por una prueba de Dunnet. Las diferencias fueron consideradas estadísticamente significativas con una  $p < 0.05$ .

## 8. RESULTADOS

### 8.1. Prueba de retirada de cola por inmersión en agua caliente y fría

En la prueba de retirada de cola a 55°C (Fig. 14, A) los valepotriatos presentaron actividad antinociceptiva en las dosis de 1, 10 y 31 mg/kg, mientras que a 4°C (Fig. 14, B) presentaron actividad únicamente en las dosis de 10 y 31 mg/kg.

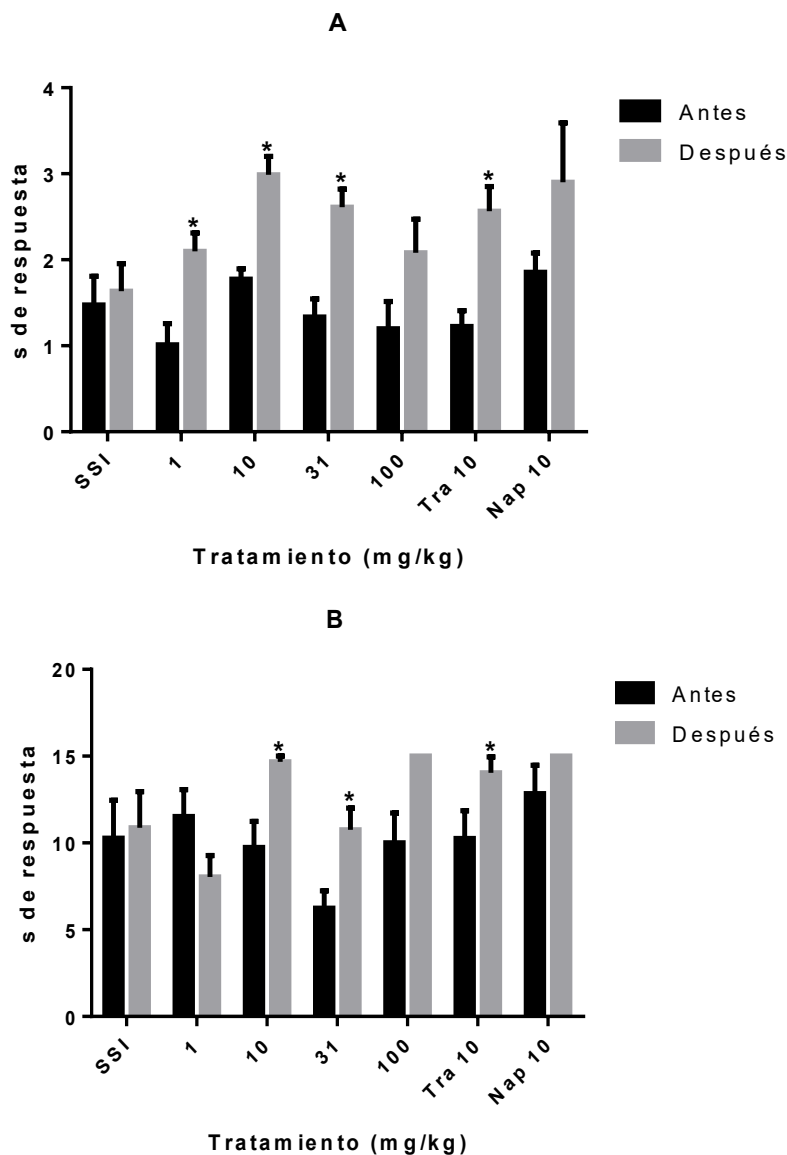


Figura 14. Prueba de retirada de cola, actividad antinociceptiva de la mezcla de valepotriatos a 55°C (A) y a 4°C (B). Resultados expresados en segundos de respuesta antes y 30 minutos después de la administración del tratamiento. Se representa el promedio de un mínimo 6 experimentos  $\pm$  E.E.M. \* Diferencia significativa estadística  $p < 0.05$  por una *t* de Student pareada entre Antes y Después de administrado el tratamiento. SSI= Solución Salina Isotónica, Tra= Tramadol, Nap= Naproxeno

## **8.2. Prueba de la formalina**

El curso temporal de la prueba muestra un comportamiento bifásico. Una fase inicial aguda hasta los 5 minutos, seguida por un periodo corto de reposo que precede a una respuesta tónica prolongada que va desde los 10 minutos hasta concluir la prueba (Fig. 16), por lo anterior, el % de Actividad antinociceptiva es calculado para cada una de estas fases, (Fig. 15).

Se puede observar que en la Fase 1 de la prueba, las dosis de 1 y 100 mg/kg no presentaron efecto, mientras que las dosis 10 y 31 mg/kg presentó un % de antinocicepción mayor que el del fármaco de referencia, (Fig. 15, A). En cuanto a la Fase 2 (Fig. 15, B) la dosis de 10 mg/kg fue la única que presentó un efecto estadísticamente significativo, con un % Antinocicepción mayor que el del fármaco de referencia.

## **8.3. Prueba de Randall-Selitto**

Los valepotriatos únicamente presentaron actividad a las dosis de 31 y 100 mg/kg, mientras que a dosis de 1 y 10 mg no se observó una diferencia significativa en los g de fuerza antes y después del tratamiento.

En cuanto a los fármacos de referencia puede observarse que el tramadol efectivamente presentó un efecto significativo mientras que el naproxeno no presenta actividad alguna.

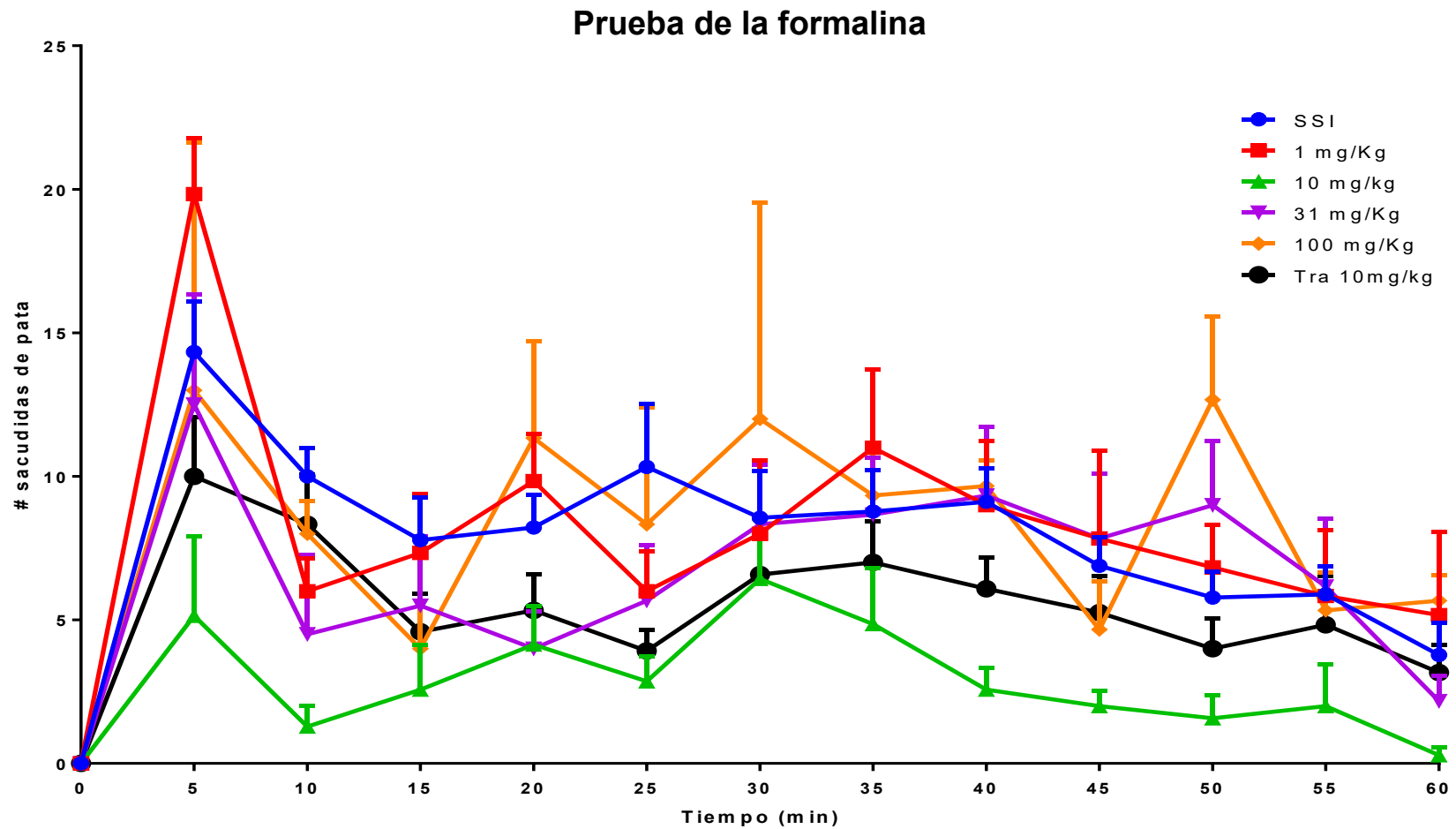


Figura 15. Curso temporal de la prueba de la formalina. Se presenta el número de sacudidas de pata de ratas inyectadas vía s.c. con formalina al 0.5% previa administración del tratamiento. Los valores se presentan como la media  $\pm$  EEM de al menos seis animales por grupo. SSI= Solución Salina Isotónica, Tra=Tramadol.

**B**

22 -

Figura 16. Actividad antinociceptiva de la Fase 1 (A), y de la Fase 2 (B) de la prueba de la formalina. Los valores se reportan como la media  $\pm$  EEM de al menos seis animales por grupo. Los datos fueron analizados por una ANOVA seguida de una prueba de Dunnett. \* Diferencia significativa estadística  $p < 0.05$  respecto a SSI. SSI: solución salina isotónica; Tra: Tramadol

Figura 17. Prueba de Randall-Selitto. Resultados expresados en gramos de fuerza aplicados en la cola antes y 30 minutos después de la administración del tratamiento. Se representa el promedio de un total de 6 experimentos  $\pm$  EEM. \* Diferencia significativa estadística  $p < 0.05$  por una t pareada entre respuesta antes y después de administrado el tratamiento. SSI=solución salina isotónica, Tra= Tramadol, Nap= Naproxeno.

#### 8.4. Prueba de inflamación inducida por carragenina

En el curso temporal (Fig. 18) se puede observar que existe una disminución en el volumen del edema causado por la administración de la carragenina en todos los tratamientos en comparación con la solución salina, así mismo se observa que los valepotriatos a dosis de 10 mg/kg, 31 mg/kg y 100 mg/kg presentan un comportamiento similar al naproxeno 10 mg/kg.

Al comparar el ABC de los cursos temporales podemos observar que todos los tratamientos presentan diferencia estadísticamente significativa respecto a la solución salina, y que efectivamente los valepotriatos a dosis de 10 mg/kg, 31 mg/kg y 100 mg/kg presentan un efecto similar al del naproxeno (Fig. 19).

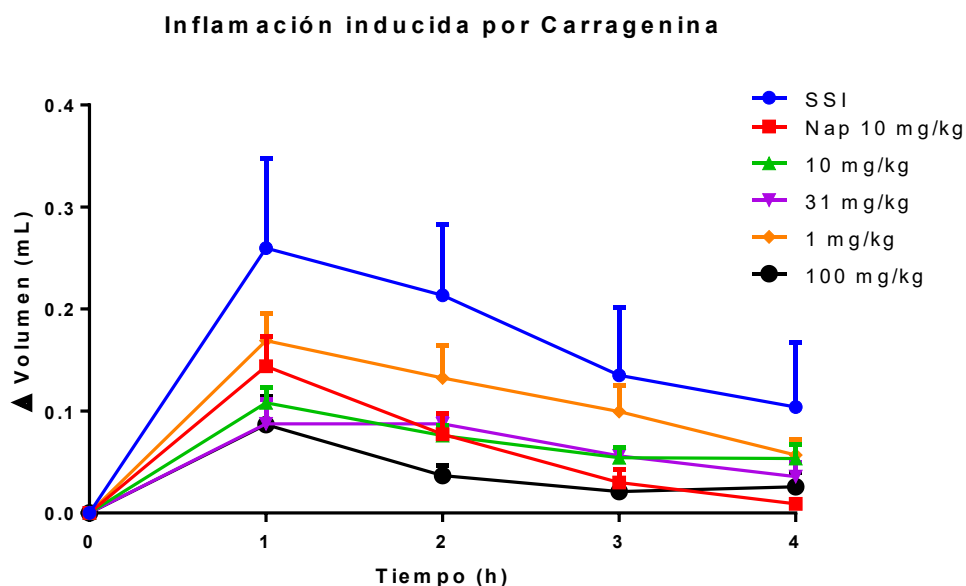


Figura 18. Curso temporal de la inflamación inducida por carragenina. Se presenta la diferencia de volumen de edema inducido por carragenina 1% vía subcutánea. Los valores se presentan como la media  $\pm$  EEM de al menos seis animales por grupo. SSI: Solución Salina Isotónica, Nap: Naproxeno.



Figura 19. Área bajo la curva del curso temporal de la inflamación inducida por carragenina. Los valores se reportan como la media  $\pm$  EEM de al menos seis animales por grupo. Los datos fueron analizados por una ANOVA seguida de una prueba de Dunnett.\* Diferencia significativa estadística  $p < 0.05$  respecto a SSI.

SSI: solución salina isotónica; Nap: Naproxeno.

## 9. DISCUSIÓN

La prueba de retiro de cola ha sido utilizada durante años como una prueba selectiva y validada para fármacos de acción central, especialmente los de tipo opioide, la actividad antinociceptiva presentada por los valepotriatos en esta prueba (Fig. 14, A) revelan que los valepotriatos a las dosis de 1 - 31 mg/kg ejercen un efecto antinociceptivo que sugiere acción central<sup>62</sup>, y los resultados en la prueba en agua fría (Fig. 14, B) muestran actividad a dosis de 10 y 31 mg/kg, reforzando que los valepotriatos actúan de posiblemente a nivel central, ya que ésta prueba es reconocida para fármacos opioides y selectiva para distinguir fármacos agonistas y agonistas-antagonistas de tipo opioide<sup>63,64</sup>.

Dentro de los pocos estudios acerca de la nocicepción de *Valeriana*, está reportado que ha presentado actividad antinociceptiva en la prueba de retiro de cola con estímulo térmico radiante, este efecto no presentó cambio al administrar naloxona ni escopolamina, antagonistas opioide y colinérgico respectivamente, pero disminuyó con ondansetrón, (antagonista serotoninérgico) y metoclopramida, (antagonista dopaminérgico), indicando que si bien *Valeriana* presenta actividad central, este efecto podría ser mediado por los sistemas serotoninérgico y dopaminérgico más que por receptores opioides o el sistema colinérgico<sup>65</sup>,. A pesar de que lo reportado muestre diferencias con los resultados encontrados en el presente trabajo, no se puede descartar que parte de la actividad antinociceptiva de *Valeriana* se deba a la interacción de los valepotriatos con receptores opioides, ya que el extracto utilizado por Shahidi y colaboradores<sup>65</sup> fue elaborado a partir de *Valeriana officinalis*, la cual presenta una cantidad significativamente menor de valepotriatos en su composición respecto a *Valeriana edulis* ssp. *procera*<sup>43</sup>, por lo tanto, es posible que otro tipo de compuestos además de los valepotriatos sean responsables de la actividad antinociceptiva de *Valeriana*.

En otro estudio llevado a cabo por Sangeeta y colaboradores no se encontró actividad en modelo de retirada de cola, sin embargo, los resultados pueden diferir de los encontrados en este estudio debido a que la naturaleza del estímulo fue diferente, pues ellos utilizaron estímulo térmico por radiación<sup>61</sup>. Al utilizar la

inmersión de la cola, la principal diferencia con el estímulo inducido por radiación es que la superficie de tejido estimulado es mayor, por consiguiente la respuesta se presentará en un tiempo menor debido a la activación de distintos tipos de receptores. Utilizando un estímulo de radiación, la temperatura de la piel aumenta en proporción a la raíz cuadrada de tiempo, lo que provocará la activación de diferentes receptores de la piel comenzando por los termorreceptores, posteriormente nociceptores polimodales tipo C, nociceptores polimodales tipo A $\delta$ , para finalmente activar los receptores polimodales de amplio espectro; al sumergir alguna parte del cuerpo en agua caliente, dicha parte alcanza la temperatura del baño de agua casi inmediatamente, provocando así la activación únicamente de los nociceptores polimodales tipo A $\delta$  y los receptores polimodales de amplio espectro<sup>62</sup>. La discrepancia entre resultados encontrados puede deberse a la diferencia en la intensidad del estímulo, y a los diferentes receptores activados en cada uno de los estudios.

Por otro lado, la prueba de la formalina induce dos tipos de estímulos nociceptivos, siendo el de la primera fase una estimulación química de los nociceptores activando las fibras C<sup>66</sup>. Los valepotriatos presentaron actividad antinociceptiva a dosis de 10 y 31 mg/kg en la Fase 1 de esta prueba (Fig. 15A), esto indica que los valepotriatos ejercen una acción a nivel del sistema nervioso central, sin embargo, no se puede saber si es de tipo opioide, ya que los mecanismos de nocicepción no son los mismos, a pesar de que los opioides presenten efecto antinociceptivo en ésta fase de la prueba de la formalina<sup>67</sup>, ésta prueba no es tan específica como la de inmersión de cola ya que muchos otros fármacos analgésicos no opioides pueden presentar actividad<sup>68</sup>.

Cabe señalar que los valepotriatos también presentaron actividad en la fase 2 de la misma prueba en la dosis de 10 mg/kg (Fig. 15B), indicando un efecto antinociceptivo de tipo periférico. Se sabe que el estímulo nociceptivo de la segunda fase de la prueba de la formalina es debido a mediadores de la inflamación, por lo que ésta dosis de valepotriatos presenta además actividad periférica con posible efecto sobre la condición inflamatoria. Los resultados concuerdan con los obtenidos

en estudios previos realizados por nuestro grupo de trabajo, donde se observó que los valepotriatos presentaron actividad antinociceptiva en el modelo de contracciones inducidas con ácido acético<sup>60</sup>.

Aunado a esto, los resultados de la prueba de Randall-Selitto, en la cual se mide nocicepción aguda de tipo periférico, los valepotriatos muestran efecto antinociceptivo a dosis de 31 y 100 mg/kg (Fig. 17). Si se realizara únicamente esta prueba, no se podría determinar si el efecto de los valepotriatos está modificando la liberación de mediadores inflamatorios o si se debe a una acción directa sobre los nociceptores, puesto que es más inespecífica; sin embargo, si comparamos los resultados de ésta prueba con los encontrados en el estudio previamente mencionado y con los de Sangeeta y colaboradores, donde un extracto de *V. walichii* con alta concentración de valtrato presentó una disminución significativa en contracciones por ácido acético<sup>61</sup>, podemos inferir que el efecto presentado por los valepotriatos en esta prueba es por la modificación de la liberación de mediadores inflamatorios, ya que el modelo de contracciones inducidas por ácido acético es un modelo típico para dolor inflamatorio y ha sido una herramienta de selección para la evaluación de las propiedades antiinflamatorias o analgésicas de nuevos agentes terapéuticos<sup>69</sup>.

Esta inferencia también está respaldada por el efecto antiinflamatorio encontrado en la prueba de edema inducido por carragenina, donde se observa que todas las dosis de valepotriatos presentaron actividad, siendo las dosis más altas las que producen mayor efecto, similar al del fármaco de referencia (Fig. 19), otro posible mecanismo por el cual los valepotriatos podrían ejercer su efecto es por la modulación de la activación de canales de potasio<sup>70</sup>. Como se ha mencionado existen evidencias que respaldan la actividad antiinflamatoria de *Valeriana*; sin embargo, los estudios han utilizado extractos de la planta. Éste es el primer trabajo donde se muestra evidencia que confirma la participación de los valepotriatos.

Los resultados de este trabajo indican que los valepotriatos están involucrados en la actividad analgésica y antiinflamatoria de *Valeriana edulis* ssp. *procera*.

## 10. CONCLUSIONES

La mezcla de valepotriatos presentó actividad antinociceptiva central en los modelos de retiro de cola por inmersión en agua caliente y fría, y en la prueba de la formalina, fase 1 y en la prueba de Randall-Selitto. Así mismo presentó actividad antiinflamatoria en la prueba de la formalina, fase 2 y en el modelo de inflamación de edema inducido por carragenina.

La actividad antinociceptiva y antiinflamatoria de los valepotriatos encontrada en el presente estudio refuerzan el uso terapéutico de *V. edulis* ssp. *procera* para el tratamiento de dolor.

## **11. PERSPECTIVAS**

- Evaluar la actividad antinociceptiva y antiinflamatoria de la mezcla de valepotriatos y diferentes dosis de tramadol con el fin de determinar sinergismo.
- Explorar el mecanismo de acción de la mezcla de valepotriatos utilizando diferentes antagonistas de receptores opioides, de serotonina y dopamina.

## 12. REFERENCIAS

1. Andrew Baranowski, *et. al.*, Pain Terms: A Current List with Definitions and Notes on Usage. In *Classification of Chronic Pain*, 2nd ed.; Harold Merskey, N. B., Ed. IASP Press: Seattle, USA, 2011; pp 20-214.
2. Woolf, *et. al.*, Mechanisms of Pain and their Therapeutic Implications. *Journal of American Veterinary Medical Association* **2001**, 219 (10), 1346-1356.
3. Turk, D. C., Okifuji, A., Assessment of patients' reporting of pain: an integrated perspective. *The Lancet* **1999**, 353 (9166), 1784-8.
4. Woolf, C. J., Pain: moving from symptom control toward mechanism-specific pharmacologic management. *Annals of Internal Medicine* **2004**, 140 (6), 441-51.
5. Koltzenburg, M., Scadding, J., Neuropathic pain. *Current Opinion in Neurology* **2001**, 14 (5), 641-7.
6. Dubin, A. E., Patapoutian, A., Nociceptors: the sensors of the pain pathway. *The Journal of Clinical Investigation* **2010**, 120 (11), 3760-72.
7. Committee on Pain, D., and Chronic Illness Behavior, *Pain and Disability: Clinical, Behavioral, and Public Policy Perspectives*. 1st ed.; NATIONAL ACADEMY PRESS Washington D.C., USA, 1987; p 319.
8. Basbaum, A., Julius D., Molecular mechanisms of nociception. *Nature* **2001**, 413, 203-210.
9. Marchand, S., The physiology of pain mechanisms: from the periphery to the brain. *Rheumatic Diseases Clinics of North America* **2008**, 34 (2), 285-309.
10. Adel K. A., Bergman, R.A., *Functional Neuroanatomy: Text and Atlas*. 2nd ed.; McGraw-Hill: 2005; p. 203.

11. Committee on Recognition and Alleviation of Pain in Laboratory Animals, N. R. C., *Recognition and Alleviation of Pain in Laboratory Animals*. The National Academic Press: 2009; p 196.
12. Rang, H., Dale, M., Ritter, J., Flower M., Henderson, G., *Rang y Dale Farmacología*. 7a ed.; Elsevier: España, 2012; p 507-521.
13. Pezet, S., McMahon, S.B., Neurotrophins: mediators and modulators of pain. *Annual Review of Neuroscience* **2006**, 29 (6), 507–538.
14. Winyard, P. G., *Inflammation Protocols*. 1st ed.; Humana Press Inc.: New Jersey, United States of America, 2003; Vol. 225, p 3-6.
15. Ferrero-Miliani, L., Nielsen, O. H., Andersen, P. S., Girardin, S. E., Chronic inflammation: importance of NOD2 and NALP3 in interleukin-1 $\beta$  generation. *Clinical and Experimental Immunology* **2007**, 147 (2), 227-235.
16. Ward, P. A., Part 1. The Inflammatory response - an overview. In *Fundamentals of Inflammation*, 1st ed.; Charles N. Serhan, P. A. W., Derek W. Gilroy, Cambridge University Press: England, 2010; p 1-10.
17. Kumar, V.; Abbas, A. K.; Fausto, N.; Aster, J. C., *Robbins and Cotran pathologic basis of disease*. 1st ed.; Elsevier Health Sciences: 2014.
18. Rankin, J. A., Biological mediators of acute inflammation. *AACN Advanced Critical Care* **2004**, 15 (1), 3-17.
19. Tilo Grosser, E. S. a. G. F., Antiinflamatorios, antipiréticos y analgésicos; farmacoterapia de la gota. In *Goodman & Gilman Las bases farmacológicas de la terapéutica*, Brunton, L. L., Ed. McGraw-Hill: México, D.F., 2012; p 959-965.
20. Freye, E., *Opioids in Medicine. A comprehensive review on the mode of action and use of analgesics in different clinical pain states*. 1st ed.; Springer Science+Business Media: The Netherlands, 2008; p 206-209.



21. Sams, T., *ABC's of Pain Relief and Treatment: Advances, Breakthroughs, and Choices*. 1st ed.; iUniverse: United States of America, 2006; p 156.
22. Gates, M.; Tschudi, G., The Synthesis of Morphine. *Journal of the American Chemical Society* **1956**, *78* (7), 1380-1393.
23. LONGNECKER, D. E.; GRAZIS, P. A.; Eggers Jr, G., Naloxone for antagonism of morphine-induced respiratory depression. *Anesthesia & Analgesia* **1973**, *52* (3), 447-453.
24. Freye, E., Part II Mechanisms of Action of Opioids and Clinical Effects. In *Opioids in Medicine: A Comprehensive Review on the Mode of Action and Use of Analgesics in Different Pain States*, 1st ed.; Freye, E., Ed. Springer Science+Business Media B.V.: The Netherlands, 2008; p 85-95.
25. Hughes, J., Smith, T. W., Kosterlitz, H. W., Fothergill, L. A., Morgan, B. A., Morris, H. R., Identification of two related pentapeptides from the brain with potent opiate agonist activity. *Nature* **1975**, *258* (5536), 577-579.
26. Simantov, R., Snyder, S. H., Morphine-like peptides in mammalian brain: isolation, structure elucidation, and interactions with the opiate receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1976**, *73* (7), 2515-2519.
27. Iwamoto, E. T., Martin, W. R., Multiple opioid receptors. *Medicinal Research Reviews* **1981**, *1* (4), 411-440.
28. Kieffer, B. L., Opioids: first lessons from knockout mice. *Trends in Pharmacological Sciences* **1999**, *20* (1), 19-26.
29. Dickenson, A., Mechanisms of the analgesic actions of opiates and opioids. *British Medical Bulletin* **1991**, *47* (3), 690-702.

30. Buer, J. K., Origins and impact of the term 'NSAID'. *Inflammopharmacology* **2014**, 22 (5), 263-267.
31. Luong, C., Miller, A., Barnett, J., Chow, J., Ramesha, C., Browner, M. F., Flexibility of the NSAID binding site in the structure of human cyclooxygenase-2. *Nature Structural Biology* **1996**, 3 (11), 927-33.
32. Hawkey, C. J., COX-2 inhibitors. *The Lancet* **1999**, 353 (9149), 307-314.
33. Mukherjee, D.; Nissen, S. E.; Topol, E. J., Risk of cardiovascular events associated with selective cox-2 inhibitors. *JAMA* **2001**, 286 (8), 954-959.
34. Croft, P., Blyth, F. M., van der Windt, D., The global occurrence of chronic pain: an introduction. *Chronic Pain Epidemiology: From Aetiology to Public Health. Oxford: Oxford Univ Pr* **2010**, 9-18.
35. Sampson, J. H., Phillipson, J. D., Bowery, N. G., O'Neill, M. J., Houston, J. G., Lewis, J. A., Ethnomedicinally selected plants as sources of potential analgesic compounds: indication of in vitro biological activity in receptor binding assays. *Phytotherapy Research : PTR* **2000**, 14 (1), 24-9.
36. Gené, R. M., Segura, L., Adzet, T., Marin, E., Iglesias, J., Heterotheca inuloides: Anti-inflammatory and analgesic effect. *Journal of Ethnopharmacology* **1998**, 60 (2), 157-162.
37. Aruna, D., Karpagam, T., Evaluation of anti-inflammatory activity and analgesic effect of *Aloe vera* leaf extract in rats. *International Research Journal of Pharmacy* **2011**, 2 (3), 103-110.
38. Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana, *Valeriana edulis* Nutt subsp. *procera*. <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=valeriana&id=7506> (accesado el 21/04/2016).

39. Upton, R., Valerian Root, *Valeriana officinalis*. In *American Herbal Pharmacopoeia and Therapeutic Compendium*, 1st ed.; Upton, R., Ed. American Herbal Pharmacopoeia: USA, 1999; p 1-28.
40. Houghton, P. J., The scientific basis for the reputed activity of Valerian. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology* **1999**, 51 (5), 505-12.
41. The Plant List. Version 1.1. <http://www.theplantlist.org/tp1.1/search?q=valeriana> (accesado el 18/05/2016).
42. Bos, R., Woerdenbag, H. J., Pras, N., Determination of valepotriates. *Journal of Chromatography A* **2002**, 967 (1), 131-146.
43. Bos, R., Woerdenbag, H. J., Hendriks, H., Zwaving, J. H., De Smet, P. M., Tittel, G., Wikström, H. V., Scheffer, J. J. C., Analytical Aspects of Phytotherapeutic Valerian Preparations. *Phytochemical Analysis* **1996**, 7 (3), 143-151.
44. Steinegger E., Hanse R., In *Pharmakognosie*, 5th ed.; Steinegger, E., Ed. Springer-Verlag: Germany, 1992; p 162-163.
45. Rzedowski, J., Calderón, G., VALERIANACEAE. En *La Flora del Bajío y de Regiones Adyacentes*, 1st ed.; Rotter, J., Rzedowski, J., Ed. Instituto de Ecología A.C.: México, 2003; p 1-65.
46. Castillo-España, P., Monroy-Ortiz, C., *Plantas Medicinales Utilizadas en el estado de Morelos*. 2a ed.; Universidad Autónoma del Estado de Morelos: México, 2007; p 255-256.
47. Enciso-Rodríguez, R., Micropropagation of *Valeriana edulis* ssp. *procera*. *Planta Medica* **1997**, 63, 274-275.

48. Oliva, I., Gonzalez-Trujano, M. E., Arrieta, J., Enciso-Rodriguez, R., Navarrete, A., Neuropharmacological profile of hydroalcohol extract of *Valeriana edulis* ssp. *procera* roots in mice. *Phytotherapy Research : PTR* **2004**, 18 (4), 290-6.
49. Herrera-Arellano, A., Luna-Villegas, G., Cuevas-Uriostegui, M. L., Alvarez, L., Vargas-Pineda, G., Zamilpa-Alvarez, A., Tortoriello, J., Polysomnographic evaluation of the hypnotic effect of *Valeriana edulis* standardized extract in patients suffering from insomnia. *Planta Medica* **2001**, 67 (8), 695-9.
50. Stevinson, C., Ernst, E., Valerian for insomnia: a systematic review of randomized clinical trials. *Sleep Medicine* **2000**, 1 (2), 91-99.
51. Francis, A. J. P., Dempster, R. J. W., Effect of valerian, *Valeriana edulis*, on sleep difficulties in children with intellectual deficits: randomised trial. *Phytomedicine* **2002**, 9 (4), 273-279.
52. Trauner, G., Khom, S., Baburin, I., Benedek, B., Hering, S., Kopp, B., Modulation of GABAA receptors by valerian extracts is related to the content of valerenic acid. *Planta Medica* **2008**, 74 (1), 19-24.
53. Patočka, J., Jakl, J., Biomedically relevant chemical constituents of *Valeriana officinalis*. *Journal of Applied Biomedicine* **2010**, 8 (1), 11-18.
54. Navarrete, A., Avula, B., Choi, Y. W., Khan, I. A., Chemical fingerprinting of valeriana species: simultaneous determination of valerenic acids, flavonoids, and phenylpropanoids using liquid chromatography with ultraviolet detection. *Journal of AOAC International* **2006**, 89 (1), 8-15.
55. Muller, L. G., de Andrade Salles, L., Sakamoto, S., Stein, A. C., Cargnin, S. T., Cassel, E., Vargas, R. F., Rates, S. M., von Poser, G. L., Effect of storage time and conditions on the diene valepotriates content of the extract of *Valeriana glechomifolia* obtained by supercritical carbon dioxide. *Phytochemical Analysis : PCA* **2012**, 23 (3), 222-7.

56. Wagner, H., Jurcic, K., Schaette, R., Comparative studies on the sedative action of *Valeriana* extracts, valepotriates and their degradation products. *Planta Medica* **1980**, 39 (4), 358-65.
57. Hazelhoff, B., Malingre, T. M., Meijer, D. K., Antispasmodic effects of *Valeriana* compounds: an in-vivo and in-vitro study on the guinea-pig ileum. *Archives Internationales de Pharmacodynamie et de Therapie* **1982**, 257 (2), 274-87.
58. Estrada-Soto, S., Rivera-Leyva, J., Ramirez-Espinosa, J. J., Castillo-Espana, P., Aguirre-Crespo, F., Hernandez-Abreu, O., Vasorelaxant effect of *Valeriana edulis* ssp. *procera* (*Valerianaceae*) and its mode of action as calcium channel blocker. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology* **2010**, 62 (9), 1167-74.
59. Barrot, M., Tests and models of nociception and pain in rodents. *Neuroscience* **2012**, 211, 39-50.
60. Ramirez, A. H., Evaluación de la actividad antinociceptiva de los extractos acuoso, etanólico y mezcla de valepotriatos de *Valeriana edulis* ssp. *procera* en el modelo de contracciones inducidas con ácido acético en ratones. Tesis de grado de licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, 2014.
61. Sangeeta, P. S., Chandra, S. M., Kanwaljit, C., Elucidation of possible mechanism of analgesic action of *Valeriana wallichii* DC chemotype (patchouli alcohol) in experimental animal models. *Indian Journal of Experimental Biology* **2010**, 48, 289-293.
62. Le Bars, D., Gozariu, M., Cadden, S. W., Animal models of nociception. *Pharmacol Rev* **2001**, 53 (4), 597-652.
63. Wang, J.-j., Ho, S.-t., Hu, O. Y.-p., Chu, K.-m., An innovative cold tail-flick test: the cold ethanol tail-flick test. *Anesthesia & Analgesia* **1995**, 80 (1), 102-107.

64. Pizziketti, R. J., Pressman, N. S., Geller, E. B., Cowan, A., Adler, M. W., Rat cold water tail-flick: a novel analgesic test that distinguishes opioid agonists from mixed agonist-antagonists. *European Journal of Pharmacology* **1985**, 119 (1-2), 23-9.
65. Shahidi, S., Bathaei, A., Pahlevani, P., Antinociceptive Effects of *Valeriana* Extract in Mice: Involvement of the Dopaminergic and Serotonergic Systems. *Neurophysiology* **2013**, 45 (5), 448-452.
66. Hunskar, S., Hole, K., The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. *Pain* **1987**, 30, 103-114.
67. Abbott, F. V., Melzack, R., Samuel, C., Morphine analgesia in the tail-flick and Formalin pain tests is mediated by different neural systems. *Experimental Neurology* **1982**, 75 (3), 644-651.
68. Tjølsen, A., Berge, O.-G., Hunskar, S., Rosland, J. H., Hole, K., The formalin test: an evaluation of the method. *Pain* **1992**, 51, 5-17.
69. Collier, H. O., Dinneen, L. C., Johnson, C. A., Schneider, C., The abdominal constriction response and its suppression by analgesic drugs in the mouse. *British Journal of Pharmacology and Chemotherapy* **1968**, 32 (2), 295-310.
70. Gilani, A. H., Khan, A.-U., Jabeen, Q., Subhan, F., Ghafar, R., Antispasmodic and blood pressure lowering effects of *Valeriana wallichii* are mediated through K<sup>+</sup> channel activation. *Journal of Ethnopharmacology* **2005**, 100 (3), 347-352.

## 13. ANEXOS

### Anexo I.



FACULTAD DE QUÍMICA  
COMITÉ INSTITUCIONAL PARA EL CUIDADO  
Y USO DE LOS ANIMALES DE LABORATORIO  
OFICIO/FQ/CICUAL/150/16  
ASUNTO: Aprobación de Protocolo

**DR. ANDRÉS NAVARRETE CASTRO**  
**DEPARTAMENTO DE FARMACIA**  
*Presente*

Por medio de la presente le informamos que el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Facultad de Química, UNAM, ha revisado el Protocolo con el título:

**“Evaluación de la actividad antinociceptiva y antiinflamatoria en roedores de una mezcla de valepotriatos aislados de *Valeriana edulis* Nutt Subsp. *procera*”**

**No. de animales empleados en el estudio:** 42 ratas Wistar machos

Emitiendo el dictamen de: **APROBADO**

**Con una vigencia de:** 1 año posterior a la fecha de aprobación.

Sin más por el momento le enviamos un cordial saludo.

Atentamente  
“POR MÍ RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”  
Ciudad Universitaria, Ciudad de México a 5 de mayo del 2016

M. en C. Ma. Isabel Gracia Mora  
Presidente

Dra. Ma. Elena Bravo Gómez  
Secretaria

C.c.p. Dr. Jorge Vázquez, Director de la FQ.  
C.c.p. Dr. Felipe Cruz, Secretario Académico de Investigación y Posgrado, FQ.  
C.c.p. H. Consejo Técnico FQ.  
C.c.p. Comisión de Seguridad e Higiene, FQ.  
C.c.p. Mtra. Patricia Santillán, Secretaria Administrativa, FQ.  
C.c.p. Expediente CICUAL.