



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**Evaluación del efecto antinociceptivo de extractos y
fracciones ricas en flavonoides de *Tagetes lucida* Cav.
en ratas**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA

CLARET GUTIÉRREZ VALENTINO



CD.MX.

AÑO 2018



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: **Profesor: Atonatiu Edmundo Gómez Martínez**

VOCAL: **Profesor: Andrés Navarrete Castro**

SECRETARIO: **Profesor: María Eva González Trujano**

1er. SUPLENTE: **Profesor: José Eduardo Roa Coria**

2° SUPLENTE: **Profesor: Itzel Susana de la Rosa Lara**

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Laboratorio de Neurofarmacología de Productos Naturales de la Dirección de Investigación en Neurociencias del Instituto Nacional de Psiquiatría “Ramón de la Fuente Muñiz”

ASESOR DEL TEMA:

Dra. María Eva González Trujano

SUSTENTANTE:

Claret Gutiérrez Valentino

Agradecimientos

A la Dra. Eva González Trujano por haberme dado la oportunidad de incursionar en el maravilloso mundo de las plantas y la investigación, además de ser una guía y un gran ejemplo en el ámbito académico y personal.

Al Dr. Atonatiu Gómez por su gran paciencia y ganas de que este trabajo quedara en su mejor punto.

Al Dr. Andrés Navarrete por sus comentarios que ayudaron a la culminación de esta tesis.

A la Mtra. Mariana por su revisión, sugerencias y apoyo en la realización de los análisis cromatográficos.

A la Dra. Gimena Pérez Ortega por su huella etnobotánica y sus fotografías del pericón.

Dedicatorias

La culminación de mis estudios de licenciatura ha sido gracias al apoyo de un sinfín de personas que han tomado parte en diferentes momentos de la vida. Sepan que sin ustedes esto no sería posible.

Dedico este logro a mi papá Martin y mi mamá Pilar porque con su manera a veces incomprensible de hacer las cosas, me han traído hasta aquí, se los debo todo. A mis hermanos Roberto y Carolina por su apoyo directo, pero más por el indirecto.

A mi mamá Lupe y mi papá Luis, este logro también lleva su nombre porque son parte importantísima de mi vida, les quiero y respeto ya que son el eslabón con el que todo esto comenzó. Especialmente va para ti Lupe porque me has apoyado incondicionalmente en todo momento y no te imaginas cuánto he querido compartir esto contigo.

Paty, Armando, Mauro Luis, Liz, Lola, Carlos muchas gracias por el apoyo y comprensión. T Paty; fuiste tú quien me lanzó directamente al estrellato cuando me caí.

Dra. Perla, le agradezco con el corazón las oportunidades brindadas para poder llevar a término mis estudios, ¡más personas tan humanas como usted!

Al Dr. Alejandro Camacho y a la Dra. Norma por su interés en el aprendizaje y bienestar de los alumnos.

A las grandes personas que he conocido por mi paso en esta gran Universidad; a Brenda, agradezco infinitamente haberte conocido porque hemos aprendido juntas a interpretar la vida y a valorar lo realmente importante, Lau porque tu amistad es invaluable, Vale ¡la más ridícula del mundo! , Erick y Lizandro mis amigos de aventuras y estudio, Luisito y Enrique, gracias por su amistad y su aliento.

No puedo dejar de mencionar a mis hermanitos del CCH oriente Edgar Salvador, Lore, Felipe, Emmanuel, quienes a lo lejos me animaban y sellaban su amistad.

Y a las maravillosas personas del Laboratorio de Neurofarmacología de Productos Naturales; a la Dra. Lupita, la Mta. Mariana, al Dr. Beto, al Mto. Omar, a la Q.F.B Maricela, al Mto. Leonel, a la Bióloga Citlali, al Dr. Luis Melo, a la Dra. Nieves y al Lic. Eduardo, gracias por los buenos momentos y por compartirme sus conocimientos.

ÍNDICE

ABREVIATURAS

ÍNDICE DE GRÁFICAS

ÍNDICE DE TABLAS

RESUMEN

1. Marco teórico

1.1 Epidemiología del dolor.....	1
1.2 Definición de dolor.....	1
1.3 Clasificación del dolor.....	1
1.4 Neurofisiología del dolor.....	3
1.4.1 Transducción, transmisión, modulación y percepción del dolor.....	4
1.4.2 Proceso inflamatorio.....	6
1.5 Terapéutica del dolor.....	7
1.6 AINEs.....	8
1.6.1 Mecanismo de acción	8
1.7 OPIÁCEOS.....	10
1.7.1 Mecanismo de acción.....	10
1.8 Efectos adversos.....	11
1.9 La Medicina Herbolaria.....	12
1.9.1 <i>Tagetes lucida</i> Cav.....	13
1.9.1.1 Antecedentes históricos.....	14
1.9.1.2 Antecedentes farmacológicos.....	16
1.9.1.3 Aspectos fitoquímicos.....	16
1.9.1.4 Flavonoides.....	17
1.10 Modelos animales de dolor.....	17
1.10.1 Prueba de la formalina al 1%.....	19
2. Planteamiento del problema.....	19

3. Hipótesis.....	19
4. Objetivos generales.....	19
5. Objetivos particulares.....	20
6. Materiales y método.....	20
6.1 Equipo.....	20
6.2 Reactivos.....	20
6.3 Preparación del material vegetal.....	21
6.3.1 Colecta.....	21
6.3.2 Maceración.....	21
6.3.3 Fraccionamiento y purificación.....	21
6.3.4 Identificación preliminar por UPLC.....	22
6.4 Evaluación Farmacológica	
6.4.1 Animales.....	22
6.4.2 Prueba de la formalina al 1%.....	23
6.4.3 Mecanismo de acción antinociceptivo.....	24
6.5 Análisis estadístico.....	24
7. Resultados	24
7.1 Evaluación química.....	24
7.2 Evaluación farmacológica.....	28
7.3 Evaluación de la participación de receptores a opioides endógenos y 5-HT_{1A} de serotonina.....	31
8. Discusión y conclusión.....	32
9. Perspectivas.....	34
10. Bibliografía.....	35

ABREVIATURAS

δ	Delta
κ	Kappa
μ	Mu
μm	Micrómetro
μL	Microlitro
ABC	Área bajo la curva
AcOEt	Acetato de etilo
AINEs	Analgésicos antiinflamatorio no esteroideos
AMP	Adenosín monofosfato
ANADEVA	Análisis de varianza
COX-1	Ciclooxigenasa 1
COX-2	Ciclooxigenasa 2
E.E.M.	Error estándar de la media
EtOH	Etanólico
g	Gramo
IASP	Asociación Internacional para el Estudio del dolor (por sus siglas en inglés)
IL-1β	Interleucina 1-beta, por sus siglas en inglés
i.p.	Vía intraperitoneal
kg	Kilogramo
L	Litro
LIF	Factor inhibidor de leucemia
LPS	Lipopolisacárido
LT	Leucotrieno
mg	Miligramo
min	Minuto
mL	Mililitro
NGF	Factor de crecimiento nervioso
nm	Nanómetro

NMDA	N-metil-D-aspartato
OMS	Organización Mundial de la Salud
ON	Óxido nítrico
PG	Prostaglandina
PGE2	Prostaglandina E2
p.o.	Vía esofágica (del latín “per os”)
SNC	Sistema nervioso central
SNP	Sistema nervioso periférico
SSI	Solución salina isotónica
TLRs	Receptor tipo Toll (por sus siglas en inglés)
T.A.	Temperatura ambiente
TNFα	Factor de necrosis tumoral (por sus siglas en inglés)
ua	Unidades de área

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Rendimiento de las fracciones obtenidas del extracto etanólico de las partes aéreas de <i>T. lucida</i> Cav.....	25
--	-----------

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de la terminal de un nociceptor periférico. Modificado del Woolf, 2004.....	3
Figura 2. Escala analgésica de dolor según la OMS.....	8
Figura 3. Mecanismo de acción de AINEs. (Modificado de Haley, 2018).....	9
Figura 4. <i>Tagetes lucida</i> Cav. Foto tomada durante su colecta en el Municipio de San Cristóbal, Ecatepec, Estado de México. Foto por: Claret Gutiérrez Valentino.....	13
Figura 5. Estado de Morelos. Los habitantes de la región aún conservan la práctica de rituales tradicionales debido a su dependencia de la agricultura donde hay necesidad de lluvias abundantes y oportunas (Sierra, 2008). (Modificada de INEGI, 2008).....	14
Figura 6. Cruz de Pericón. Tomada en Tlayacapan, Morelos. Foto tomada por: Dra. Gimena Pérez Ortega.....	15
Figura 7. Diagrama que ilustra la prueba de la formalina.....	23
Figura 8. Diagrama de la obtención de los extractos crudos y fracciones de las partes aéreas de <i>Tagetes lucida</i> Cav.....	25
Figura 9. Cromatoplasmas con revelador de productos naturales para ubicar las fracciones ricas en flavonoides para ser evaluadas en la prueba de la formalina, como referencia se usaron rutina y una mezcla de cumarinas.....	26
Figura 10. Perfiles cromatográficos correspondientes a: (A) Extracto etanólico de las partes aéreas de <i>T.lucida</i> ; (B) Fracción no soluble (C) Flavonoide derivado de quercetagetina; (D) Estándar quercetagetina; (E) Hidrólisis ácida (8 horas; ácido clorhídrico 12M).....	27
Figura 11. Curso temporal del efecto antinociceptivo de fracciones no polares y medianamente polares de <i>Tagetes lucida</i> Cav. y diclofenaco (50 mg/kg) en comparación con el vehículo donde se muestra una disminución del efecto nociceptivo en la fase inflamatoria. Los resultados son expresados como la media±EEM de una n no menor a seis.....	28

Figura 12. Efecto antinociceptivo expresado como ABC en la fase neurogénica **(A)** e inflamatoria **(B)** en el modelo de formalina en ratas que muestra un decremento de dicha respuesta en ambas fases siendo significativa la fase II o inflamatoria. ANADEVAs de una vía seguida de la prueba de Dunnett. ** P<0.01 y ****P<0.0001. Los resultados son expresados como la media±EEM de una n no menor a seis.....**29**

Figura 13. Curso temporal del efecto antinociceptivo de la mezcla de flavonoides, compuesto puro y las fracciones 8, 9 y 10 en comparación con el efecto de diclofenaco y el vehículo donde se muestra una disminución de la respuesta nociceptiva en ambas fases. Los datos son expresados como la media±EEM, con una n no menor a seis.....**29**

Figura 14. Efecto antinociceptivo expresado como ABC en la fase neurogénica **(A)** e inflamatoria **(B)** en el modelo de formalina en ratas en comparación con el efecto de diclofenaco y el vehículo donde se muestra la disminución significativa de la respuesta nociceptiva en ambas fases. ANADEVAs de una vía seguida de la prueba de Dunnett. * P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001, ****P<0.0001.....**30**

Figura 15. Curva dosis-respuesta del efecto antinociceptivo de la mezcla de flavonoides (1, 3, 10 y 100 mg/kg, i.p.) donde se muestra un efecto dosis dependiente, siendo este decremento de la respuesta nociceptiva donde significativo a partir de la dosis de 3 mg/kg en el modelo de formalina. Los datos son expresados como ABC±EEM de al menos seis animales *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 ANADEVAs de una vía seguido de Dunnett.....**30**

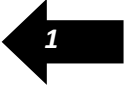
Figura 16. Respuesta nociceptiva del vehículo y los antagonistas de los receptores a opiodes endógenos y 5-HT_{1A} de serotonina solos y en presencia del extracto crudo de *T. lucida* (100 mg/kg i.p.) en comparación con el fármaco de referencia diclofenaco (50 mg/kg i.p.) en la fase neurogénica **(A)** e inflamatoria **(B)** donde puede observarse una inhibición parcial al administrar WAY100635 en combinación con el extracto, siendo significativa esta disminución al administrar naloxona en combinación con el extracto en la prueba de la formalina en ratas. ANADEVAs de una vía seguida de la prueba de Dunnett, **P<0.01 y ***P<0.001. **NX:** Naloxona (3 mg/kg, i.p.); **WAY:** WAY100635 (0.5, mg/kg, s.c.).....**31**

RESUMEN

Tagetes lucida Cav. es una planta ancestral comúnmente conocida como “pericón” o “yahutli”. Las partes aéreas de esta especie son utilizadas para preparar infusiones o tinturas, las cuales consumen tradicionalmente las personas con la finalidad de producir efectos tranquilizantes, que en términos de filiación cultural denominan “para tratar los nervios” y “para el susto”. Además, se usa para aliviar otras afecciones, tales como infecciones gastrointestinales, aliviar el dolor conocido como cólico menstrual, y el muscular y reumático. Farmacológicamente se han reportado sus propiedades como antibacteriana, insecticida, citotóxica, antioxidante, antidepresiva y ansiolítico-sedante. Sin embargo, estudios para validar sus propiedades medicinales como analgésico y/o antiinflamatorio son escasas. Por lo anterior, la importancia de realizar investigación que refuerce la eficacia y seguridad del uso tradicional para el alivio de dolor como lo indica su uso popular es de interés para esta tesis.

El objetivo de este estudio fue evaluar la respuesta antinociceptiva producida por extractos etanólicos de las partes aéreas de *T. lucida* usando un modelo de dolor nociceptivo denominado como la prueba de la formalina en ratas. El efecto de una mezcla de flavonoides y diversas fracciones obtenidas del extracto, así como participación de algunos receptores en su posible mecanismo de acción también fueron explorados. En los experimentos se trabajó con ratas para inducir el modelo de dolor nociceptivo con la prueba de formalina al 1%. Las fracciones obtenidas por separación en columna abierta se resuspendieron en el vehículo y se administraron en dosis de 1 a 100 mg/kg, vía i.p. y se compararon con la respuesta obtenida por un fármaco de referencia diclofenaco (50 mg/kg, vía i.p.). Las curvas dosis-respuesta (1, 3, 10 y 100 mg/kg) muestran un efecto dosis dependiente y efecto antinociceptivo significativo desde 3 mg/kg. La respuesta antinociceptiva de *T. lucida* fue bloqueada con los antagonistas naloxona y WAY100635 indicando la participación de receptores inhibidores del dolor tales como los opioides endógenos y el 5-HT_{1A} de serotonina. Los resultados permiten dar evidencia de las propiedades analgésicas atribuidas a *T. lucida* en la medicina tradicional para aliviar el dolor muscular e inflamatorio.

1. Marco teórico



1.1 Epidemiología del dolor

El dolor crónico es un problema de salud entre la población debido al impacto que causa en la calidad de vida de las personas. Esto no solo llega a provocar incapacidad para llevar a cabo las actividades diarias, sino que también repercute en el estado mental de las personas que lo padecen ocasionando comorbilidad con afecciones del sistema nervioso central como la depresión y la ansiedad, entre otras (Smith y cols., 2001). Pacientes con este problema, llegan a hacer uso de los servicios de salud hasta cinco veces más que personas sin este problema. Lo anterior suscita que la cifra destinada para gastos médicos aumente (Neville y cols., 2008).

La prevalencia del dolor crónico varía de acuerdo a los diferentes autores estimándose en un rango del 7% hasta un 80% (Smith y cols., 2001; Covarrubias y cols., 2010) dependiendo de su etiología y la población estudiada.

1.2 Definición

El dolor es definido por la Asociación Internacional para el Estudio del dolor (IASP, por sus siglas en inglés) como una experiencia sensorial y emocional desagradable asociado a un daño tisular o potencial descrito en términos de dicho daño (Merskey, 1979). Dicho en otras palabras, el dolor tiene un componente cognitivo y se describe en términos de sufrimiento.

1.3 Clasificaciones de dolor

La nocicepción se refiere al proceso fisiológico que causa dolor y comprende los procesos de transducción, conducción, transmisión y percepción. El dolor es una sensación fisiológica vital y un sistema de alarma que anuncia la presencia de estímulos potencialmente dañinos (Woolf, 2004). Hay diferentes clasificaciones de

dolor que hacen referencia a su duración, patogenia, curso, fisiopatología y según su respuesta a los fármacos.

Según la duración, se divide en:

- Agudo: producido por estímulos somáticos o viscerales, aparece abruptamente y es de corta duración.
- Crónico: dolor persistente, cualquiera que sea su intensidad, dura más de un mes.

Según su patogenia:

- Dolor nociceptivo: se da como respuesta a una lesión tisular que activa receptores específicos de dolor llamados nociceptores. Los nociceptores son sensibles a estímulos nocivos como frío, calor, vibración o estiramiento y/o sustancias químicas liberadas por tejidos en respuesta a falta de oxígeno, destrucción de tejidos o inflamación (OMS, 2012).
- Dolor neuropático: causado por el daño estructural y la disfunción de las neuronas del Sistema Nervioso Central (SNC) o periférico. Ya sea por invasión directa del tumor o por infecciones en un paciente debilitado (Colloca et al., 2017).

Según el curso:

- Continuo: persistente a lo largo del tiempo y no desaparece.
- Irruptivo: dolor moderado o intenso que aparece sobre el dolor crónico. Puede comenzar inesperadamente o de forma previsible.

De acuerdo a su fisiopatología:

- Dolor somático: causado por activación de nociceptores presentes en tejidos superficiales o en tejidos profundos tales como huesos, articulaciones, músculo o tejido conectivo (OMS, 2012).
- Dolor visceral: causado por activación de nociceptores localizados en vísceras, debido a la infiltración, distensión o compresión de órganos en el tórax o cavidad abdominal.

Según a su respuesta a fármacos:

- Responde a opiáceos: dolores viscerales y somáticos.
- Parcialmente sensible a opiáceos: dolor óseo y dolor por compresión de nervios periféricos.

- Escasamente sensible a opiáceos: dolor por espasmos de la musculatura estriada y el dolor por infiltración y destrucción de nervios periféricos (éste es conocido como dolor disfuncional y solo responde a antidepresivos o anticonvulsivantes) (Puebla, 2005).

1.4 Neurofisiología del dolor

La transmisión de estímulos nociceptivos sufre una compleja modulación desde el impulso nervioso a nivel periférico hasta la percepción como sensación dolorosa. Los estímulos dolorosos son transducidos a través de potenciales de acción en neuronas especializadas llamadas nociceptores, los cuales tienen una gran variedad de receptores sensibles a estímulos térmicos, mecánicos y químicos, por esta razón son llamados polimodales (Romera y cols., 2000). Su principal función es diferenciar los estímulos inocuos de los lesivos. Histológicamente son terminaciones periféricas de las neuronas bipolares que tienen su soma en los ganglios raquídeos y cuyo axón penetra en el asta dorsal de la médula espinal. Existen también un grupo de nociceptores denominados silentes o dormidos, normalmente no son activados por estímulos mecánicos y se vuelven activos durante la inflamación, al exponerse al factor de crecimiento nervioso (NGF), un mediador de la inflamación, contribuyendo así a la hiperalgesia (Romera y cols., 2000).

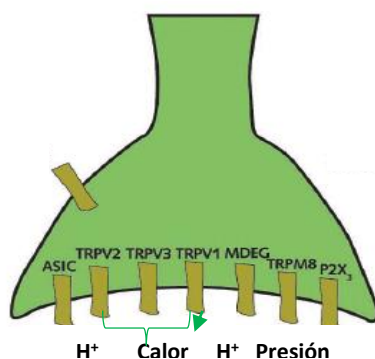


Figura 1. Esquema de la terminal de un nociceptor periférico. Modificado del Woolf, 2004.

El proceso neural de la transmisión del dolor comprende:

Transducción: los nociceptores responden a diferentes estímulos térmicos, mecánicos o químicos y canales iónicos específicos o receptores acoplados a proteínas G que están involucrados en la conversión del estímulo en señales eléctricas. Estos canales generan una corriente eléctrica a través de su apertura, permitiendo la entrada de iones Na^+ o Ca^{2+} o cerrando el canal si este es responsable de la entrada de algún ion hiperpolarizante. Es en las fibras nerviosas donde se inicia la despolarización y la transmisión de los impulsos dolorosos hacia la médula (Romera y cols., 2000).

Las fibras nerviosas son de 2 tipos:

Las fibras A- δ que son mielínicas, su diámetro va de 1-5 μm , su velocidad de conducción es rápida de media entre 4 a 30 ms^{-1} . Conducen señales de dolor de corta latencia que precisan respuestas rápidas.

Las fibras C son amielínicas, su diámetro es de 0.3 a 1.5 μm , su velocidad de conducción es lenta entre 0.4 a 2 ms^{-1} . Transmiten estímulos nociceptivos térmicos, mecánicos y químicos e informan sobre sensaciones de dolor de latencia más larga (Romera y cols., 2000).

Transmisión: se refiere a la propagación de los potenciales de acción, que viajan desde las terminales periféricas a lo largo de los axones a la terminal central de nociceptores en el SNC (Woolf, 2004). La señal periférica es transmitida a la médula espinal, luego al tálamo y finalmente a la corteza cerebral. Las fibras nerviosas aferentes viajan en el tracto de Lissauer, el cual está localizado en la sustancia gris del asta dorsal espinal, la cual está dividida en seis capas o láminas, cada una de las cuales recibe fibras aferentes nerviosas de tipos específicos. La vía más importante para el ascenso de señales aferentes de dolor de la médula espinal a la corteza es el haz espinotalámico y se subdivide en: neoespinotalámico y paleoespinotalámico. La función del haz espinotalámico es discriminar entre diferentes aspectos del dolor: localización, intensidad y duración. Las neuronas de segundo orden en el asta dorsal de la médula espinal tienen la capacidad de cambiar su patrón de respuesta en circunstancias de descarga sostenida de las fibras aferentes (Zegarra, 2007).

Modulación: La liberación de neurotransmisores como sustancia P y glutamato (GLU) transmiten la señal de la periferia a los nociceptores aferentes. El GLU es el neurotransmisor que interacciona de manera importante con receptores aminoácido excitatorios NMDA y no NMDA. La sustancia P, interactúa con receptores acoplados a proteínas G para producir corrientes sinápticas lenta y más sostenidas que el GLU y el factor neurotrófico actúan sobre el receptor tirosinacinas para modificar la excitabilidad de la membrana.

La sensibilización central contribuye al fenómeno de hiperalgesia y alodinia. Los receptores opioides que se encuentran en las terminaciones nerviosas periféricas, al ser activado por opioides endógenos o exógenos inhiben el haz aferente. De este modo la morfina actúa sobre el receptor opioide μ , promueve la apertura de canales de K^+ , que da lugar a la carga negativa intracelular, la cual hiperpolariza al nociceptor, resultando en una disminución de la actividad del nociceptor: analgesia.

Las endorfinas activan el sistema descendente. Dicho sistema se activa alrededor de la sustancia gris periacueductal del mesencéfalo. Neuronas en esta región se proyectan a la formación reticular medular y al *locus coeruleus*, donde se produce serotonina y norepinefrina respectivamente. Las fibras descendentes se proyectan hasta el funiculus dorsolateral del asta dorsal de la médula espinal para la sinapsis con la neurona aferente primaria. Las neuronas moduladoras descendentes del dolor liberan neurotransmisores en la médula espinal, activan interneuronas que liberan opioides en el asta dorsal espinal (Zerraga, 2007).

Percepción: Es el proceso final en que la transducción, la transmisión y la modulación interactúan con una serie de otros fenómenos individuales, creando la experiencia subjetiva y emocional denominada dolor (Bell, 2018)

1.5 Proceso inflamatorio

Enfermedades y lesiones a menudo resultan en dolor que no se explica únicamente por la transducción de estímulos nocivos, sino también como resultado de la

generación de factores endógenos que pueden activar terminaciones nerviosas, esto comprende en el proceso llamado inflamación (Bell, 2018).

Calor, rubor, dolor y edema son los signos característicos de la inflamación y pueden ser de diferente naturaleza dependiendo de la causa, como son la presencia de agentes químicos o físicos, traumatismos, necrosis, microorganismos patógenos o reacciones inmunitarias (Villalba, 2014).

El reclutamiento de macrófagos en la zona dañada se da por un proceso de quimiotaxis. En este proceso las células son atraídas al sitio dañado, por un gradiente de concentración de una molécula atrayente como son la IL-8, C5a, histamina, leucotrieno (LT), lipopolisacáridos, restos de fibrina o colágeno. Las células tisulares (cebadas, queratinocitos, fibroblastos) adyacentes a la zona lesionada son las primeras en llegar, son activadas y promueven la inflamación. (Vega, 2008).

La vasodilatación permite que aumente la permeabilidad y por tanto se produzca un edema. Las células que coadyuvan en el proceso inflamatorio son los mastocitos que se encuentran en tejidos periféricos y liberan histamina, bradicinina, eicosanoides, serotonina. Estas aumentan el flujo de sangre al área inflamada, lo cual aumenta la temperatura y produce enrojecimiento local. También participan algunos mediadores como son las citocinas, estas se encuentran en el citoplasma y su papel es indispensable ya que liberan sustancias que generan la inflamación. La infiltración de células sanguíneas es esencial durante el proceso inflamatorio. Conforme transcurre el tiempo y se va dando la inflamación, el dolor a menudo evoluciona y se presenta la hiperalgesia, esto significa que hay un aumento del dolor al estimularse el área afectada. Del mismo modo el umbral de dolor disminuye, esto último se conoce como alodinia (Vega, 2008).

Sustancias como $TNF\alpha$, $IL-1\beta$, NGF y prostaglandinas E2 (PGE2) producen hiperalgesia y al neutralizarlas se reduce el dolor en modelos de inflamación. En cuanto al ON, éste es un mediador de analgesia a nivel del SNC principalmente y en menor cantidad a nivel periférico. El óxido nítrico se induce en tejidos inflamados, probablemente a través de las sintasas de ON inducible y neuronal (iNOS y nNOS).

Los donadores de ON contribuyen al dolor en el proceso inflamatorio y los inhibidores de estos donadores como lo es la PGE2 pueden llegar a reducir la hiperalgesia.

Muchos de los mediadores de la inflamación actúan directamente en las terminales de los nociceptores que inervan la zona afectada. Estas neuronas expresan receptores para TNF α , IL-1 β , NGF, IL-6, LIF, histamina, bradicinina y prostanoïdes. La bradicinina actúa sobre receptores B2 en los nociceptores y a través de una proteína de diacilglicerol, fosforila una cinasa y esto produce que se abran canales de protones. Los canales TRPV1, también están sensibilizados, que podría explicar el calor inducida por bradicinina. En el caso de las PGs secretadas por la ciclooxigenasa 1 y 2 (COX₁ y COX₂, respectivamente) actúan en una serie de receptores prostanoïdes en nociceptores. Activan la adenilatociclasa en estas neuronas, elevando la concentración de AMP cíclico (AMPc), que sensibiliza las terminales nerviosas, aumentando las concentraciones de sodio (Marchand y cols., 2005).

1.6 Terapéutica del dolor

Para el tratamiento del dolor se encuentran indicados una amplia gama de medicamentos. En ese sentido, la OMS designó una escala de dolor que es de ayuda en la prescripción de analgésicos y es sugerida como una estrategia para manejar el dolor crónico. Cabe mencionar que medicamentos desarrollados para el tratamiento de enfermedades no relacionadas con el dolor como como antidepresivos, anticonvulsivantes, neurolépticos, ansiolíticos y corticoesteroides son empleados en ocasiones, y con buenos resultados, para síndromes de dolor crónico como en el caso de metástasis de hueso, dolor neuropático y dolor visceral donde se utilizan como analgésicos secundarios en cuadros dolorosos donde fracasan los analgésicos tradicionales o primarios (Torre-Mollinedo y cols., 2007). Es importante recalcar que no son tratamientos de primera línea y que su uso debe estar indicado y supervisado por un experto de la salud.

1.7 AINEs

Los AINEs tienen tres principales funciones; efecto antiinflamatorio, analgésico y antipirético. Ejemplos de ellos son el paracetamol, el ácido acetilsalicílico, la indometacina, la nimesulida, siendo el junto y el ibuprofeno, son los AINEs más ampliamente usados en el mundo, seguidos por el naproxeno, piroxicam y ketoprofeno (Haley y cols., 2018).

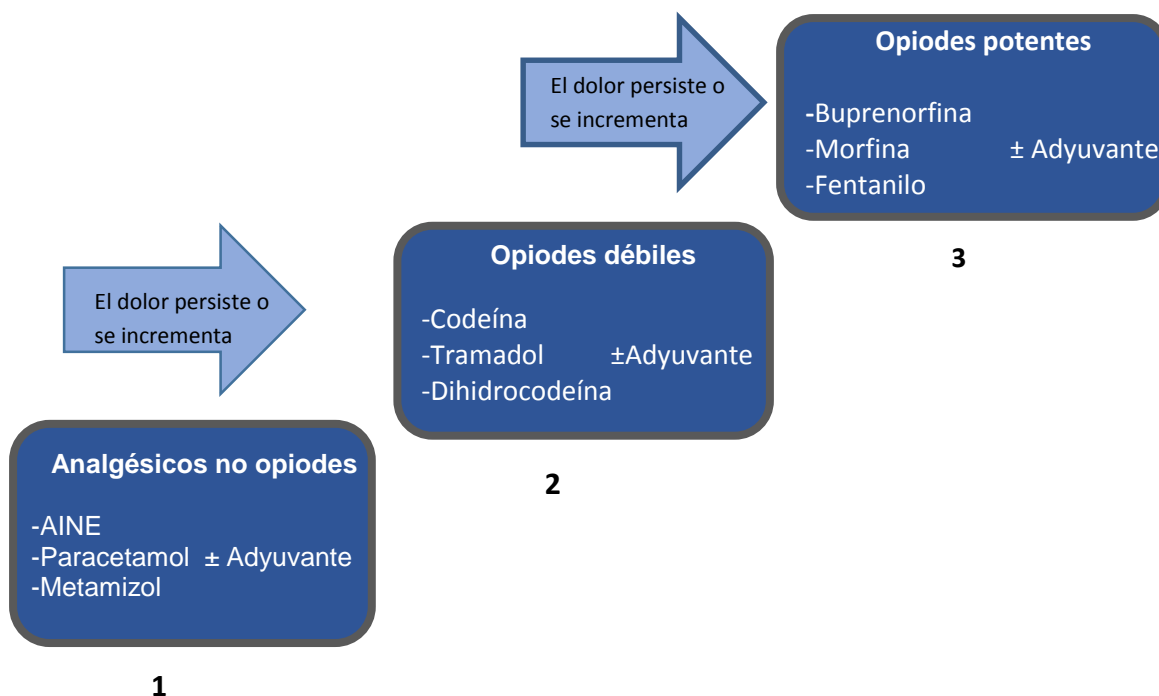


Figura 2. Escala analgésica de dolor según la OMS.

1.7.1 Mecanismo de acción

La acción principal de estos fármacos es la inhibición de la enzima ciclooxigenasa (COX) de ácidos grasos y, por tanto, la inhibición de la síntesis de PGs y tromboxanos. Las PGs promueven la inflamación y la agregación plaquetaria, son liberadas por células nucleadas y se encuentran en casi todos los tejidos (Haley y cols., 2018).

Los AINES actúan como inhibidores reversibles de la COX, uniéndose a una molécula de arginina, que está presente en ambas isoformas de la enzima COX e

inhibiendo la función enzimática debido al impedimento estérico (Haley y cols., 2018). Principalmente se conocen 3 isoenzimas, COX₁, COX₂, COX₃. La COX₁ es constitutiva que se encuentra en casi todos los tejidos. Participa en la homeostasis tisular, se ocupa de la síntesis de PGs implicada en la citoprotección gástrica, agregación plaquetaria, autorregulación dinámica renal y el comienzo del parto. La COX₂ es inducida en células inflamatorias al activarse la IL-1 y el TNF- α . En ese sentido, se puede decir que la isoenzima COX₂ es responsable de la producción de mediadores prostanoideos implicados en el proceso de la inflamación (Haley y cols., 2008). En el caso específico del diclofenaco se ha encontrado que es un potente inhibidor de la síntesis de prostaglandinas, en comparación con otros AINEs como el naproxeno e ibuprofeno (Kantor, 1986).

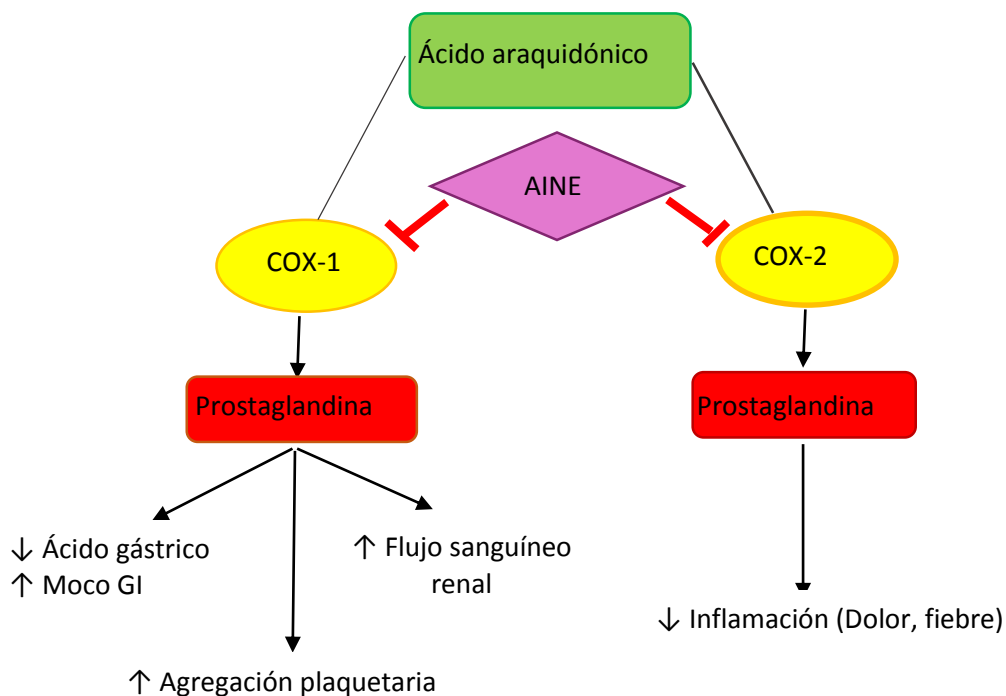


Figura 3. Mecanismo de acción de AINES. (Modificado de Haley, 2018)

1.8 Opiáceos

Por su parte los fármacos que actúan sobre receptores de tipo opioide tienen tres receptores posibles. El receptor μ es activado por morfina y ocasiona analgesia supraespal, depresión respiratoria, bradicardia, miosis, dependencia, euforia y

sedación. El receptor κ , media la analgesia espinal, sedación, miosis, depresión de reflejos flexores y el receptor σ , media la disforia, alucinaciones, midriasis y taquicardia.

Agonistas puros: Son opiáceos que se comportan como agonistas preferentes y en ocasiones selectivos. Muestran la máxima actividad intrínseca. Ejemplo de ello son la morfina, el fentanilo y la metadona.

Agonistas-antagonistas mixtos: Son capaces de actuar sobre más de un receptor, concretamente el μ y el κ ; sin embargo, tienen comportamientos diferentes; sobre el κ se comportan como agonistas y en el receptor μ lo hacen como agonistas parciales o antagonistas. Ejemplo: nalorfina, pentazocina, butorfanol y nalbufina.

Antagonistas puros: estos muestran afinidad por los receptores a opioides pero carecen de actividad intrínseca; son afines a los tres tipos de receptores aunque es mayor por μ que por κ y δ . La naloxona, naltrexona y diprenorfina son ejemplos de esto (Vallejo, 2011).

1.8.1 Mecanismo de acción

Los opioides se unen a receptores en terminaciones nerviosas pre y post-sinápticas que impiden la liberación de un neurotransmisor excitador. Los opioides producen efecto analgésico por la:

- 1) inhibición del transporte de Ca^{2+} en la membrana presináptica, lo cual inhibe la liberación de un neurotransmisor llamado sustancia P.
- 2) hiperpolarización de las células presinápticas, debido a un aumento en el transporte de K^+ evitando que las señales sigan la vía aferente y se extienda a las neuronas adyacentes.
- 3) modulación a nivel central de la respuesta nociceptiva en el sistema límbico (Vallejo, 2011).

La modulación del sistema opioide mediante el uso de antagonistas específicos o inespecíficos de sus receptores puede tener un papel terapéutico en el manejo sintomático de diferentes contextos, incluyendo la intoxicación aguda por

opiáceos, la dependencia a opioides, y la reducción de reacciones adversas de agonistas opioides utilizados en el manejo del dolor crónico. Además, la naloxona es uno de los antagonistas no selectivos de primera elección en la búsqueda de evidencia de la participación de los receptores a opioides como mecanismo de acción de fármacos analgésicos (Nava-Mesa et al., 2015).

Los efectos analgésicos de opiáceos pueden eludirse por la lesión del núcleo magno del rafe, estructura con abundantes terminaciones serotoninérgicas cuya eliminación hace desaparecer los efectos analgésicos de la morfina. Esto se debe a que la estimulación de este núcleo aumenta de la liberación de serotonina extracelular a nivel del asta posterior medular y del líquido cefalorraquídeo para generar dicha analgesia. Los antagonistas selectivos de receptores inhibidores de serotonina como el WAY100635 que se utiliza para el bloqueo de receptores 5-HT_{1A}, producen la misma eliminación del efecto analgésico siendo útiles en la búsqueda de mecanismos involucrados en la modulación del dolor y en el efecto de los fármacos analgésicos (Serrano-Atero et al., 2002).

1.9 Efectos adversos

El uso de los medicamentos analgésicos (AINEs) se ve limitado por la presencia de los efectos adversos (Salido y cols., 2001). El daño en la mucosa gástrica como úlcera gástrica es uno de los más comunes y principales efectos adversos (Wallace y cols., 2000). Por su parte, los fármacos de tipo opioide pueden ocasionar dependencia y tolerancia, entre otros (Koepke y cols., 2018). Es importante hacer un uso adecuado de estos fármacos y valorar el riesgo-beneficio, así como realizar evaluaciones periódicas para distinguir entre una buena adherencia al tratamiento y el abuso por parte del paciente. La dependencia física es una respuesta fisiológica a la abstinencia, en pacientes que han recibido el tratamiento continuamente y la tolerancia es un fenómeno farmacológico en el que se requiere incrementar la dosis del fármaco para lograr el efecto analgésico. Lo anterior no supone progreso en la enfermedad (Vallejo, 2011). Debido a lo anterior existe la necesidad continua de

buscar nuevas alternativas de terapéutica como en la medicina tradicional mexicana.

1.10 La medicina tradicional

El uso de plantas para el tratamiento de diversas enfermedades se remonta a civilizaciones antiguas de todo el mundo. La Medicina Tradicional China, por ejemplo, es famosa por el uso de hierbas como parte importante de la medicina alternativa y complementaria. Dicha práctica data de hace miles de años y se ha extendido por Japón y otros países asiáticos (Wang y cols., 2018). La medicina Ayurvédica es un sistema de medicina tradicional de la India, esta incluye la descripción de más de 500 signos y síntomas de diferentes enfermedades de las que se reporta el uso de 700 especies de plantas y 6000 formulaciones que se pueden elaborar para el tratamiento de estas (Farooqui y cols., 2018)

En México las culturas Maya y Azteca emplearon las plantas como medicinales. Con la llegada de los españoles se introdujeron nuevos conocimientos y productos del Viejo Mundo, de este modo el arsenal de medicina natural de América se incrementó. Las personas optan por este tipo de alternativas de tratamiento porque se dice que son baratas y se cree que no producen riesgos o no hay posibilidad de reacciones alérgicas u otros efectos adversos, ya que se asocian con lo natural, lo cual no siempre se cumple (Cruz y cols., 2017).

Se estima que alrededor de 70, 000 plantas son utilizadas etnomédicamente alrededor del mundo (Uritu y cols., 2018). De acuerdo a la OMS, cerca del 80% de la población mundial elabora remedios que tienen como base estos recursos naturales y esto podría explicarse dada la suposición de alta efectividad, bajo costo y la disminución de efectos adversos.

En ese sentido, la herbolaria provee de plantas que producen sustancias que pueden ser bioactivas en muchos campos de la medicina, y algunas se han aislado con potencial uso para tratar el dolor (Céspedes y cols., 2016). No obstante, muchas de estas plantas no cuentan con evidencias científicas que avalen o refuercen el uso popular.

1.10.1 *Tagetes lucida* Cav.

Tagetes lucida Cav. es una planta endémica de México y América Central comúnmente llamada Santa María, “yahutli”, “pericón”, hierbanis, anicillo. Es una planta perene, muy perfumada y mide entre 40 y 50 cm de alto. Cuenta con hojas opuestas ovado-lanceoladas, borde dentado con glándulas oleosas. Las cabezas de la flor salen en grupos densos de 1 cm de diámetro, su color es amarillo, o amarillo-anaranjadas (Barba, 2015).



Figura 4. *Tagetes lucida* Cav. Foto tomada durante su colecta en el Municipio de San Cristóbal, Ecatepec, Estado de México. Foto por: Claret Gutiérrez Valentino.

Aunque el uso ritual y medicinal del pericón prevalece en diferentes regiones del país, en el Estado de Morelos se ha centrado especial atención en cuanto al estudio de su uso tradicional. En Morelos, el pericón crece principalmente en la parte norte, en lugares altos con climas templados y fríos, y se le encuentra silvestre en el campo, en lugares planos y en las barrancadas. Según el conocimiento popular, la recolección debe hacerse cuando se ha completado su crecimiento; si las lluvias son oportunas y abundantes, en el mes de junio brota la plántula, se desarrolla en julio, a mediados de agosto presenta sus inflorescencias y en septiembre ya está floreciendo, hasta entonces se deberá cortar (Sierra, 2008).



Figura 5. Estado de Morelos. Los habitantes de esta región aún conservan la práctica de rituales tradicionales debido a su dependencia de la agricultura, para lo cual hay necesidad de lluvias abundantes y oportunas (Sierra, 2008). Modificada de INEGI, 2008.

1.10.2 Antecedentes históricos

El pericón o yahutli es relevante tanto histórica, religiosa y medicinalmente, En principio por su relación estrecha con Tláloc y más tarde con San Miguel Arcángel, se cree que ambos tienen poder sobre los fenómenos atmosféricos, que los relacionan con el ciclo agrícola. A Tláloc se le atribuía el poder de enviar la lluvia, hacer crecer la vegetación y por ende, brindar el alimento necesario para la vida; pero también era responsable de las tormentas que podían destruir cultivos y causar hambrunas. Se sabe que se realizaban rituales al quemarla con incienso en los tres momentos del ciclo agrícola; siembra, crecimiento y cosecha del maíz. En dos códices se mencionan los usos del yahutli; el Códice Florentino muestra una de las primeras representaciones, describe su aspecto y propiedades medicinales y por su parte el Códice de la Cruz Badiano, escrito por Martín de la Cruz y traducido al latín por Juan Badiano, aunque hace referencia a los usos de esta planta, son varias las plantas que por su nombre se relacionan con yahutli (Sierra, 2008).

En los registros se encuentra que esta planta fue usada por otras culturas antiguas, como la Azteca que la llamaba Cempoalxochitl y en la Maya, ya que las semillas de esta planta fueron halladas en el Templo Mayor en un contexto

ceremonial (Bye y Linares, 1999). Algunas fuentes refieren que la utilizaban para tratamientos generales que incluyen los de tipo obstétrico, como son cólicos, diarrea, hemorroides, así como calambres y dolor de cabeza, también para sanar el piquete de alacrán y en combinación con el sebo de venado se utilizaba como cataplasma sobre el hueso adolorido, además se le atribuye el curar fiebres intermitentes y enfermedades por causas “divinas” como gota, rigidez en el cuerpo y escupir sangre, además de enfermedades producidas por causas “naturales” por ejemplo, hinchazones (Trujillo, 2017).

T. lucida Cav. fue utilizada de manera importante en rituales y ceremonias porque se tenía la creencia popular de que aleja a las influencias demoniacas. De hecho, actualmente en algunas regiones del Estado de Morelos y el Estado de México, durante las fiestas de “San Miguel” el 29 de septiembre se elaboran pequeñas cruces hechas de flores de pericón y son colgadas en la entrada de casas, negocios, iglesias, milpas (campos de maíz) y carros. Las personas usan la planta en baños (temazcal) y para sahumar las casas y personas (limpias), en rituales para ahuyentar a los malos espíritus (Pérez-Ortega y cols., 2016).

También se sabe que es utilizada como condimento en platillos debido a su aroma a anís.



Figura 6. Cruz de pericón. Tomada en Tlayacapan, Morelos. Foto por: Dra. Gimena Pérez Ortega.

1.10.3 Antecedentes farmacológicos

T. lucida Cav. ha sido estudiada por sus propiedades farmacológicas como antibacteriano (Céspedes y cols., 2006), antifúngico (Céspedes y cols., 2006), insecticida (Céspedes y cols., 2006), antioxidante (Aquino y cols., 2002), antidepresivo, (Bonilla-Jaime H. y cols., 2015), además como antinociceptivo en el modelo *in vivo* de dolor visceral (Soria, 2011) y en órgano aislado como espasmolítico (Camacho, 2016; Ventura-Martínez et al., 2018). También se sabe que tiene propiedades antihipertensivas y vasodilatadoras (Zuñiga, 2013), así como efecto ansiolítico (Pérez Ortega y cols., 2016) y, recientemente, se ha reportado su actividad como antihiperlipidémico y antihiperlipidemia (Abdel-Haleem, 2017). En 2016, Pérez-Ortega y cols., reportan el uso tradicional que se le da a la planta a través de un estudio etnobotánico donde curanderos y vendedores de plantas del Estado de Morelos describieron que los usos que mayormente se le da actualmente a la especie son para tratar problemas digestivos, dismenorrea y dolor muscular, “frialdad”, para los nervios y en rituales. Sin embargo, no había evidencia de su actividad de tipo analgésica y/o antiinflamatoria.

1.10.4 Aspectos fitoquímicos de *Tagetes lucida* Cav.

Aquino y cols, 2002 aislaron diversos compuestos de esta especie, entre los que se pueden mencionar el ácido 3-(2-O-β-D-glucopiranosil-4-metoxifenil) propanoico y el metil 3-(2-O-β-D-glucopiranosil-4-metoxifenil) propanoato, el ácido cafeínico, y 6-O-cafeoil-β-D-glucopiranosido, el ácido 4-(β-D-glucopiranosiloxi) benzoico, el ácido gálico y el 3-(2-O-β-D-glucopiranosil-4-metoxifenil) propanoico, además de la 7-metoxicumarina.

Por su parte Céspedes en 2006, aisló diferentes cumarinas, tales como la 7,8-dihidroxycumarina, la umbeliferona (7-hidroxycumarina), la escoparona (6,7-dimetoxicumarina), la 6-hidroxi-7-metoxicumarina, la esculetina (6,7-dihidroxycumarina) y la escopoletina (6-metoxi-7-hidroxycumarina). La dimetilfraxetina fue aislada en 2016 por Pérez-Ortega, adicionalmente la 7-

metoxicumarina fue identificada por Mejía-Barajas en 2012. También se han encontrado compuestos como el 5-(4-acetoxi-1-butilil)-2,2'-bitienil (BBTOAc), el [5-(3-buten-1-inil)-2,2'-bitienil (BBT) y el 5-(4-hidroxi-1-butilil)-2,2'-bitienil (BBTOH) (Marotti y cols., 2010)

Por otro lado, del aceite esencial de esta planta se han podido extraer compuestos entre los que predominan el metilchavicol, el estragol, el metileugenol, el anetol y el (E)- β -ocimeno (Ciccío, 2004; Regalado y cols, 2011; Bicchi y cols, 1997).

1.10.5 Flavonoides

Tagetes lucida Cav. se ha caracterizado por la presencia de flavonoides, entre los que se pueden mencionar patuletina, isorramnetina, quercetina, quercetagetina 3-O-arabinosilgalactósido (Céspedes y cols., 2006; Abadala, 1999), isorramnetina 7-O-glucósido- β -D-glucopiranosido, quercetagenina-3-metileter-7-O- β -D-glucopiranosido, 6-hidroxicanferol-O- β -D-glucopiranosido y quercetagenin-3,3-dimetiléter (Aquino y cols., 2002). Además, las especies del género *Tagetes* se han caracterizado por la presencia de 6-hidroxi y/o 6-metoxi flavonol agliconas y sus derivados (Abdala, 1999).

1.11 Modelos experimentales

Los modelos animales permiten llevar a cabo investigación básica detallando los efectos de terapéuticas novedosas y de sus mecanismos de acción. Existen modelos de dolor crónico y agudo que son utilizados para el estudio y desarrollo de nuevos fármacos que pueden usarse en la terapéutica de éste. Para ello es necesario que se sigan lineamientos éticos de experimentación y estos recursos sean usados conscientemente (Ortega y cols., 2002).

En ese sentido, la legislación mexicana contempla la NOM-062-ZOO-1999 que establece el correcto cuidado, manejo y uso de animales con fines de investigación científica, pruebas de laboratorio y enseñanza. Esto con el objetivo de

garantizar la salud y buen uso de los animales de laboratorio, además de lograr resultados confiables en la investigación científica. Al utilizar modelos animales de dolor se debe asegurar que los animales son expuestos al mínimo dolor necesario para lograr los objetivos del experimento y que la duración sea lo más corta posible, además de que se debe justificar que la base de sus experimentos sea ética (Ortega y cols., 2002).

1.11.1 Prueba de la formalina

Por la información que se puede obtener en la prueba de la formalina como modelo de dolor nociceptivo es la apreciación de una fase neurogénica (central) e inflamatoria (periférico-central) con temporalidad aguda y crónica (Ortiz y cols., 2008). Tiene como ventaja de que en la prueba se pueden contabilizar diferentes conductas representativas de la manifestación dolorosa que pueden ser aliviadas por la acción de analgésicos, tanto de tipo opiáceo como antiinflamatorios. Se puede valorar desde un parámetro de postura que comprende posiciones que protegen la extremidad, pasando por un trabajo activo para aliviarlo como es el lamido de la zona afectada o un parámetro reflejo como son las sacudidas (Ortega y cols., 2002).

2. Planteamiento del problema

El dolor es un problema que afecta a un gran número de personas en el mundo, no solo porque imposibilita realizar sus actividades, sino porque también interfiere en su bienestar mental. Los tratamientos convencionales son eficientes en la mayoría de los casos, pero causan efectos adversos que muchas veces complican el padecimiento principal. Por esta razón, la necesidad de considerar nuevas alternativas de tratamiento para el dolor es imperante. La medicina herbolaria ofrece una opción, ya que en el país existe una gran biodiversidad de especies de plantas y muchas de ellas son utilizadas en la medicina popular para el tratamiento del dolor sin que haya evidencia científica que valide su uso. *Tagetes lucida* Cav. es utilizada tradicionalmente como infusión y/o extractos hidroalcohólicos (tinturas) para tratar dolor gastrointestinal o músculo-esquelético. En este trabajo se propone realizar investigación básica preclínica para obtener evidencia de los efectos de tipo analgésico que se le atribuyen a *T. lucida* Cav. en la medicina tradicional con el objetivo de reforzar y respaldar su uso popular y tradicional. Asimismo se realizará la búsqueda de un potencial metabolito bioactivo de naturaleza flavonoide y la participación de un posible mecanismo de acción.

3. Hipótesis

Si las partes aéreas de *Tagetes lucida* Cav. son utilizadas en la medicina tradicional para el alivio del dolor, entonces el extracto etanólico de éstas producirá efectos antinociceptivo y/o antiinflamatorio en la prueba de formalina en ratas.

4. Objetivo General

Evaluar el efecto antinociceptivo y/o antiinflamatorio de extractos y fracciones ricas en flavonoides de las partes aéreas de *Tagetes lucida* Cav. en un modelo experimental de dolor.

5. Objetivos Particulares

- Realizar la colecta del material vegetal y preparar extractos crudos de *T. lucida* Cav.
- Realizar el fraccionamiento del extracto crudo etanólico de *T. lucida* Cav. y realizar la separación e identificación de fracciones abundantes en flavonoides.
- Evaluar los efectos antinociceptivos y/o antiinflamatorio de los extractos, fracciones y/o flavonoides puros en la prueba de la formalina en ratas.
- Explorar la participación de los receptores a opioides endógenos y 5-HT_{1A} de serotonina como posible mecanismo de acción en la actividad antinociceptiva de componentes químicos de *T. lucida* Cav.

6. Materiales y método

6.1 Equipo

Balanza analítica Sartorius BL210S

Balanza analítica para pesado de animales Ohaus 700/800 Series

Cajas de acrílico (27 cm x 40 cm x 20 cm)

Cilindro de acrílico de 21 cm de diámetro x 25 cm de altura

Cronómetros

Contadores

Jeringas 1 mL

Evaporador rotatorio Büchi RE111

6.2 Reactivos

Naloxona, WAY100635 y Tween 80 fueron comprados a Sigma (St. Louis MO, USA), diclofenaco (AMSA Laboratorios). El vehículo consistió en Tween 80 al 0.2% en solución salina (s.s. 0.9% NaCl). Formaldehído al 37% (J.T. Baker, México).

Sílica gel 60 (Merck, S. A. de C.V.). Los estándares de los flavonoides fueron usados en las evaluaciones farmacológicas como referencia positiva.

6.3 Preparación del material vegetal

6.3.1 Colecta

La colecta del material vegetal se llevó a cabo en San Cristóbal Ecatepec. Un ejemplar se depositó en el Herbario Metropolitano UAMIZ, Departamento de Biología de la UAM identificado por la M en C Ana Rosa López Ferrari. y se obtuvo su No. de registro 82038 para espécimen de *Tagetes lucida* Cav.

6.3.2 Maceración

Las partes aéreas del material vegetal (tallo, hojas y flores) se secaron a temperatura ambiente y se cortaron en pequeños trozos para su proceso por maceración a temperatura ambiente: Éste consistió en colocar 496.9 g de las partes aéreas de *T. lucida* en 5 L del disolvente hexano para desgrasar el material vegetal a temperatura de $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 72 horas por 3 veces. El residuo vegetal fue separado después de la filtración y se maceró en 3 L de etanol absoluto durante 72 horas por 3 veces para obtener un filtrado final. Los disolventes fueron removidos con ayuda de un evaporador rotatorio.

6.3.3 Fraccionamiento y purificación

El extracto crudo etanólico (15 g) se fraccionó inicialmente en columna abierta utilizando 250 g de sílica gel 60 GF254 con disolventes tales como: hexano, acetato de etilo y etanol en incremento de polaridad. Del fraccionamiento se obtuvieron 14 fracciones descritas en la tabla 1. Cabe mencionar que en el inicio del proceso de separación por columna abierta se precipitó un sólido de color café-verdoso, el cual fue separado para permitir la continuidad del fraccionamiento. Dicho precipitado se

denominó fracción 1, se lavó con hexano y se disolvió en metanol para ser filtrado. El filtrado se pesó y se dejó secar para obtener cristales de color amarillo.

6.3.4 Identificación preliminar por cromatografía de líquidos de ultraresolución (UPLC, por sus siglas en inglés)

El análisis se realizó usando cromatografía de líquidos de ultra resolución (UPLC) en un equipo Acquity Waters (Singapore) con detector de diodos, equipado con una columna C18 (100Å, 150 mm x 4.6 mm, 5 mm, Waters, Irlanda) con termostato a 43°C. La fase móvil consistió en agua acidificada al 0.1% de ácido fosfórico en agua mili Q (A) y metanol (B) (grado HPLC). El gradiente inicial de elución fue 80% A: 20% B para alcanzar el 100%. La condición inicial se regeneró durante 3 min (80% A: 20% B). El flujo constante fue 1 mL/min con una curva de elución de 6. El extracto (4 mg/mL) y la mezcla de compuestos y el estándar puro (2 mg/mL) se diluyeron en metanol y se inyectaron después de pasar por un filtro de 0.2 mm (acrodisco GHP, 13, Waters) en un volumen de 10 µL. Los datos adquiridos y su manejo fueron realizados por el software Empower® 3 (Waters, Milford, MA, E.U)

6.4 Evaluación farmacológica

6.4.1 Animales

Para la evaluación farmacológica se utilizó un modelo de dolor experimental utilizando la prueba de formalina en ratas. Hembras Wistar (180-200 g) se utilizaron en condiciones estándar de laboratorio siguiendo la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 de especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. Los animales fueron provistos por el Instituto Nacional de Psiquiatría “Ramón de la Fuente Muñiz”. Estos se mantuvieron en un ambiente de temperatura controlada de (22±1°C) con ciclos de luz/oscuridad de 12 h, agua y alimento *ad libitum*. Los experimentos fueron realizados en el Laboratorio de Neurofarmacología de Productos Naturales siguiendo las especificaciones del

Comité de Ética e investigación de esta institución con la aprobación del proyecto número NC-123280 y NC-17073.0, de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana para el cuidado y manejo de animales (NOM-062-ZOO-1999), y las reglas internacionales de cuidado y uso de animales de laboratorio.

6.4.2 La prueba de la formalina

Los animales se habituaron de manera individual durante 20 minutos dentro de un cilindro de acrílico abierto (Fig. 7). Entonces el vehículo (tween al 0.2% en SSI), los extractos y/o fracciones se administraron vía i.p. en una dosis de 100 mg/kg en grupos de n no menores a seis. El fármaco de referencia fue Diclofenaco a la dosis de 50 mg/kg, i.p. Treinta minutos después de los tratamientos, un volumen de 50 μ L de formalina al 1% se inyectaron en el cojinete de la planta de la extremidad inferior derecha. El animal se colocó nuevamente dentro del cilindro y se contabilizó la conducta de lamidas de la extremidad estimulada, por un minuto cada cinco minutos durante 30 min. Para ser evaluadas se eligieron las fracciones con mayor rendimiento.

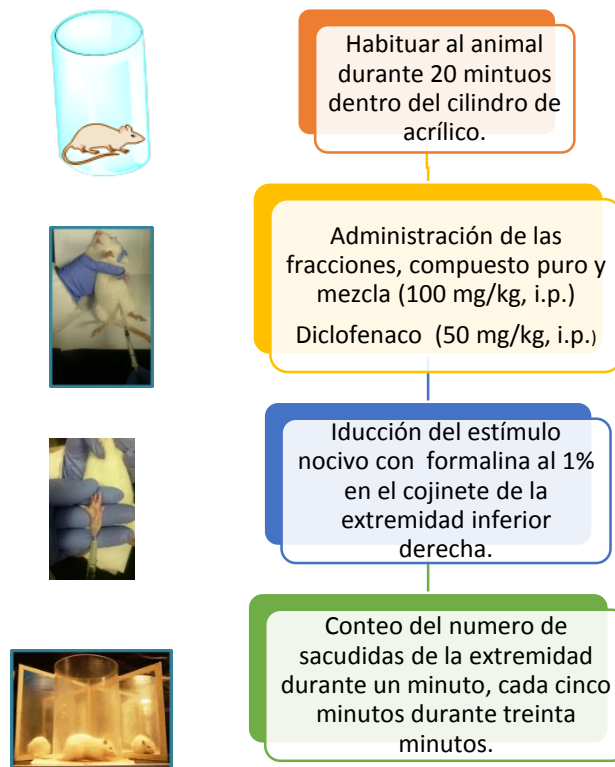


Figura 7. Diagrama que ilustra la prueba de la formalina.

6.4.3 Mecanismo de acción

Para determinar la participación de los receptores a opioides endógenos y al 5-HT_{1A} de serotonina se probó el efecto antinociceptivo de los extractos y las fracciones. Grupos de ratas fueron administradas con los antagonistas naloxona (3 mg/kg, i.p.) o WAY100635 (0.5 mg/kg, s.c.) 15 min antes de administrar el vehículo o el extracto (100 mg/kg, i.p.). Transcurridos 30 minutos, las ratas recibieron el estímulo nociceptivo para comparar las respuestas con aquellos animales que sólo recibieron la naloxona o WAY100635.

6.5. Análisis estadístico

Los datos se representan como el cálculo de área bajo la curva (ABC), los valores fueron calculados usando el método de los trapezoides a partir de los cursos temporales obtenido en las fases neurogénica e inflamatoria en la prueba de la formalina. Los datos se presentan como el promedio \pm error estándar de la media (EEM) de al menos 6 repeticiones y se analizaron mediante análisis de varianza (ANADEVA) de una vía seguido de la comparación de las medias contra el grupo control (prueba de Dunnett) o entre grupos (prueba de Tukey). La diferencia fue significativa cuando $P < 0.05$. Para el análisis se utilizó el programa de cómputo GraphPad Prism 6.

7. Resultados

7.1 Evaluación química

El rendimiento del extracto hexánico crudo de *Tagetes lucida* Cav. fue de 1.03% (5.13 g), mientras que el del extracto etanólico crudo fue de 8.1% (40.49 g), lo anterior habiendo partido de 496.9 g de material vegetal seco. Es importante mencionar que al iniciar el fraccionamiento del extracto etanólico (15 g) con elución

de hexano se produjo un precipitado insoluble de la muestra de aplicación en la cromatografía en columna, dicho precipitado tuvo aspecto chicloso y color café a verde oscuro con rendimiento de 0.47% (Fig. 8). La fracción insoluble (mezcla) se purificó disolviéndola en metanol y retirando el disolvente para la obtención de cristales amarillos (210-230°C). El fraccionamiento del extracto crudo se continuó con disolventes de baja, media y alta polaridad, de donde se obtuvieron fracciones con diferentes rendimientos, los cuales se indican en la Tabla 1.

Figura 8. Diagrama de la obtención de los extractos crudos y fracciones de las partes aéreas de *Tagetes lucida* Cav.

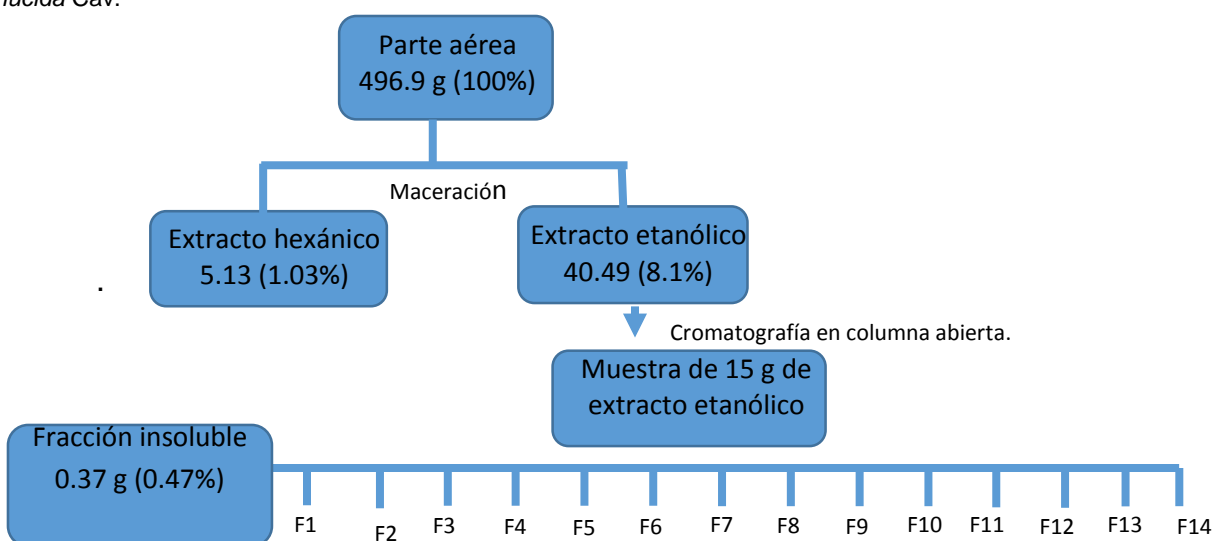


Tabla 1. Condiciones de elución para la obtención de las fracciones del extracto etanólico de las partes aéreas de *T. lucida* Cav. y su rendimiento absoluto y relativo.

Fracción	Sistema de elución	Cantidad (g)	% rendimiento
1	Hexano	0.7014	4.67
2	Hexano/AcOEt (50:50)	1.5567	10.37
3	Hexano/AcOEt (50:50)	1.0398	6.93
4	AcOEt	0.2560	1.71
5	AcOEt/Etanol (50:50)	0.2864	1.91
6	AcOEt/Etanol (50:50)	0.1658	1.11
7	AcOEt/Etanol(50:50)	0.3739	2.49
8	Etanol	2.9747	19.83
9	Etanol	0.4249	2.83
10	Etanol	0.7063	4.71
11	Etanol	0.1283	0.85
12	Etanol	0.0224	0.15
13	Etanol	0.0124	0.083
14	H ₂ O	0.2175	1.45

Las fracciones fueron evaluadas en la prueba farmacológica de nocicepción y para seleccionarlas se elaboró cromatografía de capa fina. Las elegidas fueron las F1, F2, F3, F5, F7 utilizando una fase móvil acetona/acetato de etilo/H₂O/ácido fórmico/ácido acético (2:7.5:0.5:1.5:0.5), las F8, F9, F10, la fracción insoluble y los cristales se obtuvieron con una fase móvil hexano/diclorometano/metanol (4:5.8:0.2) usando como referencia al flavonoide rutina y a una mezcla de cumarinas, previamente aisladas del extracto etanólico de *T. lucida* Cav. En los cromatofolios fue posible observar que las fracciones contienen compuestos de naturaleza cumarínica (tonos blancos) y flavonoide (tonos amarillos y anaranjados) de acuerdo con las bandas reveladas con los cromógenos de productos naturales en comparación con estándares de referencia (Fig. 9)

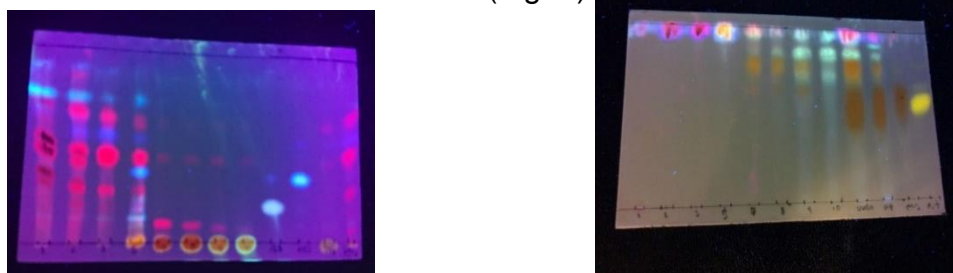


Figura 9. Cromatoplasas con revelador de productos naturales para ubicar las fracciones ricas en flavonoides para ser evaluadas en la prueba de la formalina. Como referencia se usaron rutina y una mezcla de cumarinas.

La fracción no soluble y los cristales provenientes del precipitado en el extracto crudo etanólico, fueron analizados mediante cromatografía de líquidos. El cromatograma de la fracción no soluble (Fig. 10B) muestra una señal predominante con el tiempo de retención de 5.6 min.

Al analizar el cromatograma de los cristales (Fig. 10C), se observa que se observa que el compuesto mayoritario también presenta la señal con el tiempo de retención de 5.6 min, mientras que las longitudes de onda máxima a las cuales absorbe fueron de 259.7 nm y 359.4 nm. Este tiempo de retención y longitudes de onda característicos se compararon con algunos estándares previamente inyectados en el cromatógrafo, como quercetina, rutina y quercetagetina (tiempo de retención 7.4 min), siendo el estándar quercetagetina el más similar en las longitudes de onda, sin corresponder con el tiempo de retención. Para saber si se podría tratar de un derivado de quercetagetina, se realizó una hidrólisis ácida de los

cristales. En la figura 10E se logró observar que mientras la señal de 5.6 min disminuye, la señal de 7.5 min con longitudes de onda máxima de 257.3 nm y 359.4 nm aumenta, que coinciden con la aglicona quercetina. Lo anterior sugiere que el compuesto mayoritario presente en los cristales se trata de un derivado de quercetina.

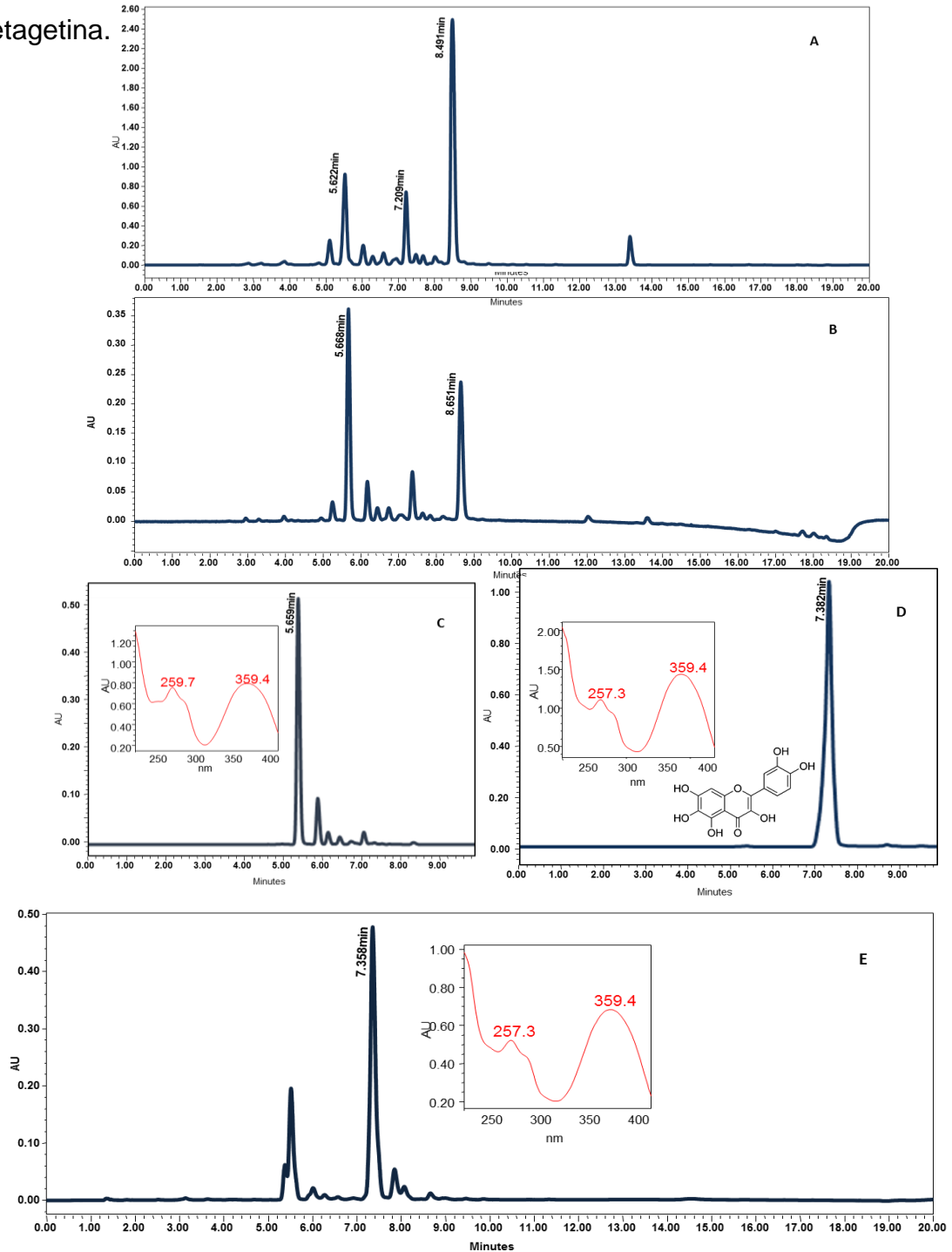


Figura 10. Perfiles cromatográficos correspondientes a: **(A)** Extracto etanólico de las partes aéreas de *T. lucida*; **(B)** Fracción no soluble **(C)** Flavonoide derivado de quercetina; **(D)** Estándar quercetina; **(E)** Hidrólisis ácida (8 horas; ácido clorhídrico 12M)

7.2 Evaluación farmacológica

El curso temporal de la nocicepción muestra que la respuesta observada en ratas que recibieron el vehículo (SSI) disminuye con el tratamiento con las fracciones 1, 2, 3, 5, y 7 en una dosis de 100 mg/kg, así como con el fármaco de referencia diclofenaco (Fig. 11A). De manera enfática, esta respuesta fue disminuida en la fase inflamatoria. (Figura 11.A)

Las gráficas expresadas como área bajo la curva (ABC) permiten ver que en la fase neurogénica hay un decremento de la respuesta al estímulo nocivo para las fracciones F1 (40 ± 8.06 ua), F3 (41.25 ± 5.11 ua), F5 (45.83 ± 5.86 ua) y F7 (35.33 ± 6.50 ua) en forma similar al diclofenaco (Figura 12. A) en comparación con el vehículo (63.43 ± 5.70 ua). Una mayor significancia fue obtenida en la respuesta producida por todas las fracciones en la segunda fase en forma similar al fármaco de referencia: F1 (107.91 ± 6.17 ua), F2 (131.66 ± 30.47 ua), F3 (115.83 ± 22.32 ua), F5 (182.91 ± 18.21 ua), F7 (134.16 ± 22.66 ua) en comparación con el vehículo (110.83 ± 19.02 ua).

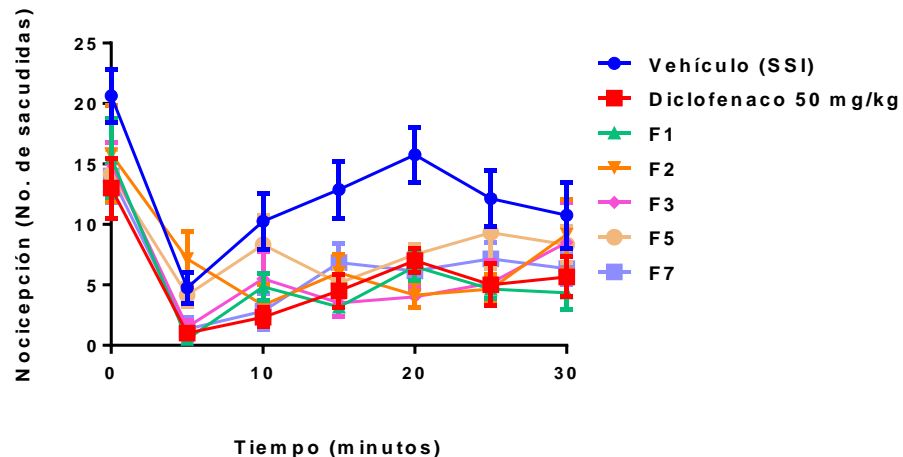


Figura 11. Curso temporal del efecto antinociceptivo de fracciones no polares y medianamente polares de *Tagetes lucida* Cav. y diclofenaco (50 mg/kg) en comparación con el vehículo, donde se muestra una disminución del efecto nociceptivo en la fase inflamatoria. Los resultados son expresados como la media \pm EEM de una n no menor a seis.

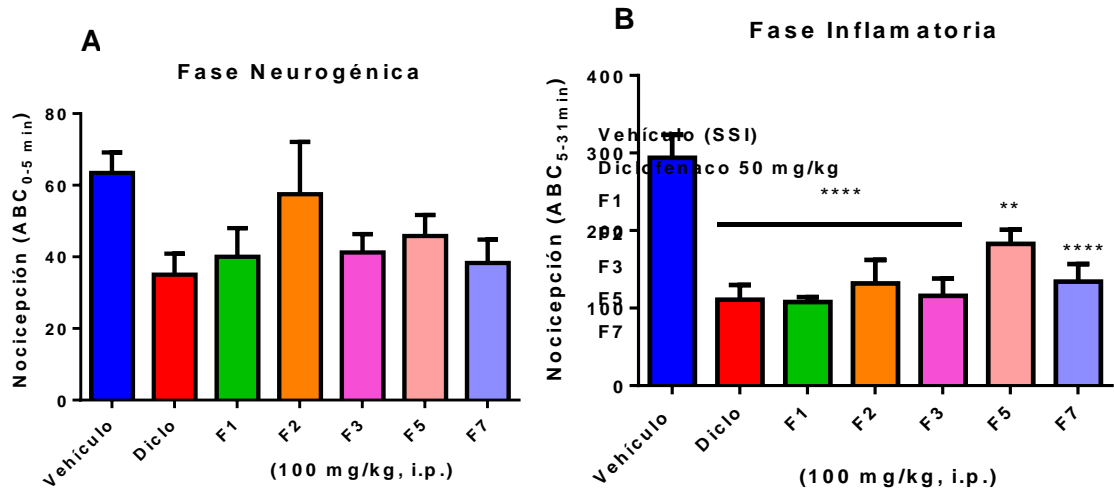


Figura 12. Efecto antinociceptivo expresado como ABC en la fase neurogénica (A) e inflamatoria (B) en el modelo de formalina en ratas que muestra un decremento de dicha respuesta en ambas fases siendo significativo en la fase II o inflamatoria. ANADEVIA de una vía seguida de la prueba de Dunnett. ** $P < 0.01$ y **** $P < 0.0001$. Los resultados son expresados como la media \pm EEM de una n no menor a seis.

En el curso temporal de la figura 13A se observa el efecto antinociceptivo del flavonoide purificado como derivado de quercetagina, la mezcla de flavonoides y las fracciones de mayor polaridad F8, F9 y F10 en comparación con el vehículo y el fármaco de referencia. La representación como ABC permite observar en la fase neurogénica se produce una disminución significativa en la respuesta nociceptiva con la administración de la mezcla (30.0 ± 3.84 ua), el compuesto puro (32.08 ± 3.84 ua) y la fracción 8 (30.83 ± 6.66 ua) (Figura 14A). En tanto que todos los tratamientos, incluyendo a las fracciones F8 (138 ± 22.34 ua), F9 (157.5 ± 20.69 ua), F10 (169.16 ± 10.94 ua), a la mezcla de flavonoides (138.33 ± 22.34) y al flavonoide puro (110.41 ± 13.12 ua) disminuyeron significativamente la respuesta nociceptiva en la fase inflamatoria como comparado con el fármaco de referencia (110.83 ± 19.02 ua) (Fig. 14B).

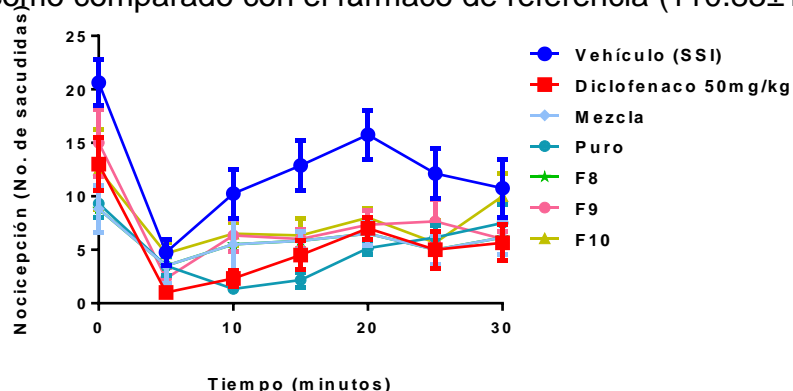


Figura 13. Curso temporal del efecto antinociceptivo de la mezcla de flavonoides, compuesto puro y las fracciones 8, 9 y 10 en comparación con el efecto de diclofenaco y el vehículo donde se muestra una disminución de la respuesta nociceptiva en ambas fases. Los datos son expresados como la media \pm EEM, con una n no menor a seis.

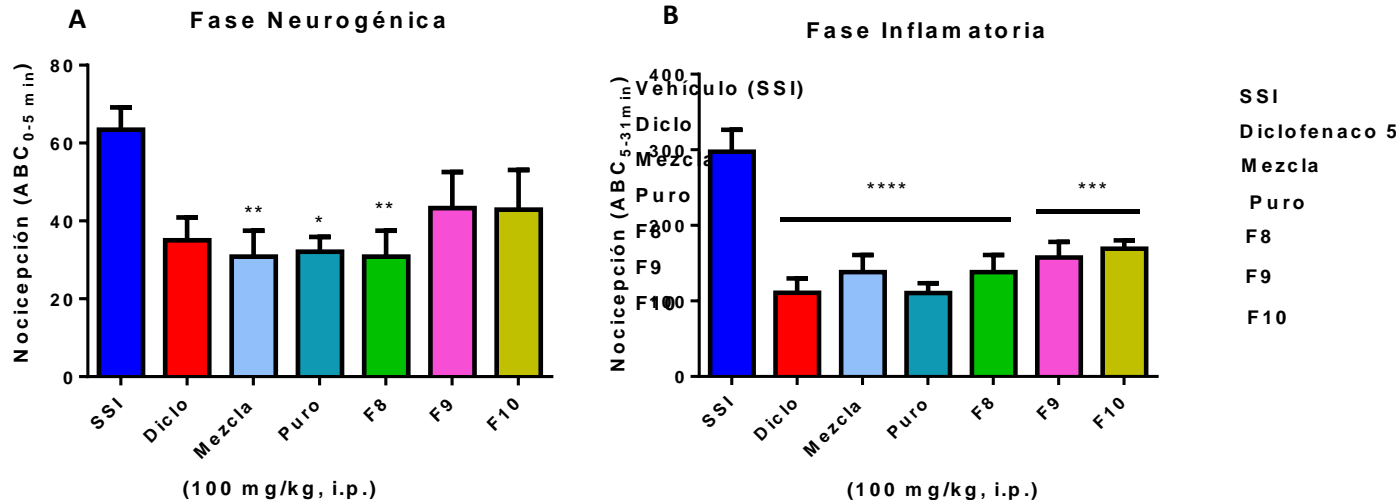


Figura 14. Efecto antinociceptivo expresado como ABC en la fase neurogénica (A) e inflamatoria (B) en el modelo de formalina en ratas en comparación con el efecto de diclofenaco y el vehículo donde se muestra la disminución significativa en la respuesta nociceptiva en ambas fases. ANADEVa de una vía seguida de la prueba de Dunnett. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$.

La curva dosis-respuesta de la mezcla de flavonoides (Fig. 15) muestra un efecto dosis dependiente en un rango de dosis de 3, 10 y 100 mg/kg.

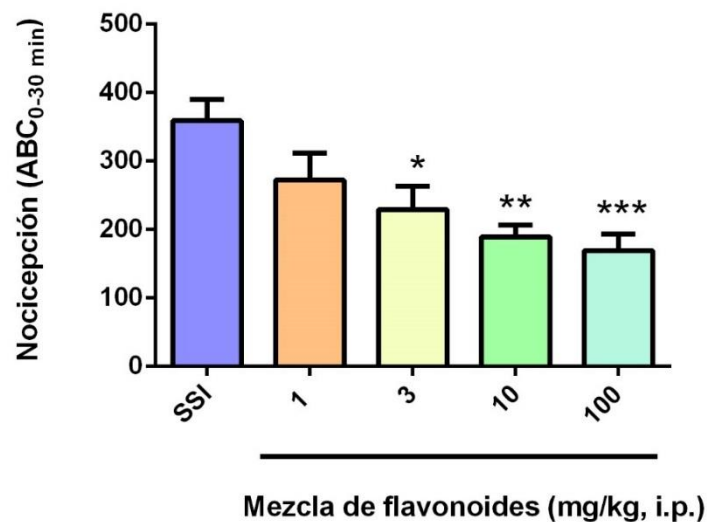


Figura 15. Curva dosis-respuesta del efecto antinociceptivo de la mezcla de flavonoides (1, 3, 10 y 100 mg/kg, i.p.) donde se muestra un efecto dosis dependiente, siendo este decremento de la respuesta nociceptiva significativo a partir de la dosis de 3 mg/kg en el modelo de formalina. Los datos son expresados como $ABC \pm EEM$ de al menos seis animales * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ ANADEVa de una vía seguida de Dunnett.

7.3 Evaluación de la participación de los receptores a opioides endógenos y 5-HT_{1A} de serotonina

En la exploración de un posible mecanismo de acción en el efecto del extracto de *T. lucida* Cav. se utilizaron los antagonistas de los receptores a opioides endógenos (Naloxona, 3 mg/kg) y del receptor 5-HT_{1A} de serotonina (WAY100635, 0.5 mg/kg). En la fase neurogénica se observó que naloxona administrada sola presentó una tendencia al aumento en la respuesta nociceptiva inducida por formalina en comparación con el vehículo y que ésta evitó el efecto antinociceptivo producido por el extracto en su combinación (Figura 14A). En forma similar se observó que en la fase inflamatoria la naloxona inhibe parcialmente el efecto antinociceptivo del extracto (Figura 14B).

Con respecto a los receptores serotoninérgicos 5-HT_{1A}, la administración de WAY-100635 *per se* redujo parcialmente, aunque no de manera significativa, la respuesta nociceptiva inhibiendo totalmente la actividad antinociceptiva observada con el extracto (14A y 14B).

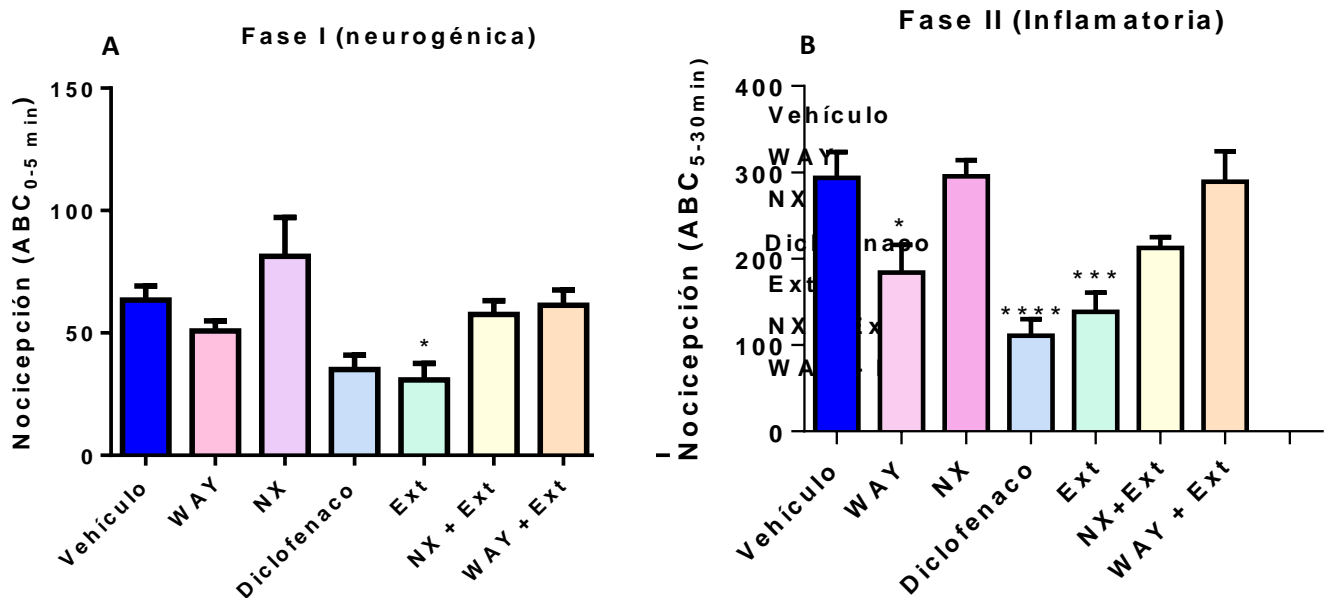


Figura 16. Respuesta nociceptiva del vehículo y los antagonistas de los receptores a opioides endógenos y 5-HT_{1A} de serotonina solos y en presencia del extracto crudo de *T. lucida* (100 mg/kg i.p.) en comparación con el fármaco de referencia diclofenaco (50 mg/kg i.p.) en la fase neurogénica (A) e inflamatoria (B) donde puede observarse una inhibición parcial al administrar WAY100635 en combinación con el extracto, siendo significativa esta disminución al administrar naloxona en combinación con el extracto, en la prueba de la formalina en ratas. ANADEVA de una vía seguida de la prueba de Dunnett, **P<0.01 y ***P<0.001. NX: Naloxona (3 mg/kg, i.p.); WAY: WAY100635 (0.5, mg/kg, s.c)

7. Discusión y conclusión

Tagetes lucida Cav. pertenece a la familia Asteraceae y es una antigua especie medicinal que se utiliza para tratar varias afecciones gastrointestinales que involucran cólicos y úlceras, así como el alivio del dolor musculoesquelético. En este estudio proporcionamos evidencia farmacológica científica del uso de esta especie, específicamente sobre sus propiedades para aliviar el dolor, al usar un modelo animal de nocicepción, donde se observó un efecto analgésico que llegó a ser similar al observado con el Diclofenaco, usado como fármaco de referencia. Además, obtuvimos información preliminar sobre algunos posibles compuestos bioactivos que participan en su actividad de tipo analgésica, ya que observamos que más de una fracción con componentes de diferente naturaleza polar podrían ser responsable de la actividad medicinal de la planta. Identificar la naturaleza de los compuestos bioactivos implicados en la actividad de las plantas, además de evidenciar su actividad farmacológica es importante como origen de nuevos productos farmacéuticos.

Como se mencionó, el dolor abdominal es una afección que frecuentemente es aliviada al usar la infusión de esta planta medicinal. Su uso incluye beneficios para trastornos digestivos, dolor de estómago y cólicos menstruales (dismenorrea) o dolor abdominal asociado a la inflamación (Sierra, 2000; Guadarrama et al., 2008). Nuestros datos avalan la eficacia de tipo analgésica de *T. lucida* para aliviar el dolor abdominal, cuyas dosis podrían estar lejos de posibles efectos tóxicos o letales, ya que el índice terapéutico calculado en ratones fue de 19. Según la OCDE, esta diferencia podría situar a *T. lucida* en una categoría 5 sugiriendo riesgo mínimo o ninguno como sustancia tóxica (OCDE, 2001).

Los resultados de este estudio muestran que *T. lucida* produce eficacia analgésica al reducir la conducta nociceptiva en las fases neurogénica (central) e inflamatoria (periférico-central) de la prueba de formalina en ratas. Se sabe que analgésicos de acción central como los opiáceos inhiben ambas fases de la prueba de formalina (Lucarini et al., 2013); mientras que analgésicos periféricos como los AINEs y los corticosteroides inhiben solo la segunda fase

(Yamamoto et al., 2009). Lo anterior refuerza el uso que se la a esta especie para tratar varios tipos de dolor modulados a diferente nivel (central y/o periférico).

Las partes aéreas de *T. lucida* han sido exploradas en estudios fitoquímicos que han permitido identificar compuestos variados, entre ellos: polifenoles, flavonoides, cumarinas y aceites esenciales (Abdel-Haleem y cols., 2017). Dentro de los primeros estudios fitoquímicos se llevó a cabo la identificación de isorramnetina, quercetagetina 3-O-arabinosyl galactósido e isorramnetina 7-O-glucósido (Abdala, 1999). Con el objetivo de probar el efecto antifúngico y antibacterial de esta planta, se aislaron diferentes cumarinas (umbeliferona, escoparona, esculetina, herniarina, escopoletina, 6-hidroxi-7-metoxicumarina y 7,8-dihydroxicumarina) y flavonoides (patuletina, quercetina y quercetagetina) provenientes de extractos polares y no polares (Céspedes y cols., 2006). Otro componente de la planta que coadyuvó al efecto ansiolítico y sedante que producen extractos acuosos de la planta fue la dimetilfraxetina (Pérez-Ortega y cols., 2016)

El fraccionamiento de los extractos crudos reveló que varias fracciones mostraron actividad antinociceptiva significativa en la prueba de formalina, estos resultados indican la participación de varios constituyentes de diferente polaridad principalmente en la fase inflamatoria. Las propiedades farmacológicas de una planta podrían verse limitadas cuando dependen de un solo principio activo; sin embargo, si la especie posee varios componentes activos siempre habrá alguno que mantenga la propiedad medicinal de la especie incluso si las condiciones de recolección del material vegetal son variadas. En el estudio se obtuvo una mezcla de flavonoides como parte de las fracciones antinociceptivas de *T. lucida* produciendo efecto también en la fase neurogénica. Este resultado reforzó la actividad del sistema nervioso central (SNC) para este tipo de compuestos como se informó anteriormente para la rutina (glucósido de quercetina) (Hernández-León et al., 2016) y otros flavonoides combinados (Carballo-Villalobos et al., 2016). En este estudio, se purificó un derivado de quercetagetina como compuesto bioactivo principal en una mezcla antinociceptiva de flavonoides de *T. lucida*. Estos compuestos son parte de los constituyentes principales en el género Tagetes y en esta especie (Abdala, 1999) incluyendo glucósidos y derivados metílicos, di y

trisustituidos de quercetagina (Xu et al., 2012). Otros componentes identificados como analgésicos bioactivos en esta especie fueron las cumarinas, una de ellas identificada como 6-7-dimetoxicumarina (Pérez-Ortega y cols., 2016). Las cumarinas se han asociado a los efectos antiinflamatorios que incluyen receptores periféricos como TRPV1 o citoquinas proinflamatorias (Li et al., 2017), pero también con mecanismos centrales como los receptores 5-HT_{1A} (Pérez-Ortega et al., 2016) o receptores opioides implicados en la vía inhibitoria descendente del dolor (Hernández-Leon et al., 2016; Sagalajev et al., 2017). Nuestros resultados están de acuerdo con estos estudios, ya que se evitaron los efectos antinociceptivos del extracto crudo de *T. lucida* en presencia de antagonistas de los receptores 5-HT_{1A} y opioides en ambas fases de la prueba de formalina, pero principalmente en la fase inflamatoria.

En conclusión, los datos de este estudio dan evidencia de la actividad tipo analgésica de esta especie de planta para la terapia farmacológica del dolor muscular. Lo anterior refuerza su uso en la medicina tradicional y sugiere la participación de múltiples constituyentes con diferente naturaleza polar, entre los que se encuentran como bioactivo un derivado de quercetagina.

9. Perspectivas

- Determinar la estructura de los flavonoides involucrados mediante técnicas espectroscópicas y espectrométricas.
- Evaluar el efecto antinociceptivo y antiinflamatorio de otros extractos, tales como el hexánico y el acuoso de *T. lucida* Cav.
- Explorar constituyentes de otra naturaleza química presentes en las partes aéreas de *T. lucida* Cav.
- Búsqueda de otros mecanismos de acción.

10. Bibliografía

- Abdala LR. (1999). Flavonoids of the aerial parts from *Tagetes lucida* (Asteraceae). *Biochemical Systematics and Ecology* 27, 753-754.
- Abdel-Haleem SA, Ibrahim AY, Ismail RF, Shaffie NM, Hendawy SF, Omer E. (2017) In-vivo hypoglycemic and hipolipidemic properties of *Tagetes lucida* alcoholic extract in streptozotocin-induced hyperglycemic Wistar albino rats. *Annals of Agricultural Sciences* 62, 169-181.
- Aquino R, Cáceres A, Morrelli S, Rastrelli L. (2002) An extract of *Tagetes lucida* and its phenolic constituents as antioxidants. *Journal of Natural Products* 65, 1773-1776.
- Barba A. (2015) Las plantas sagradas mexicanas. *Revista Ciencia. Academia Mexicana de Ciencias*.
- Bicchi C, Fresia M, Rubiolo P, Monti D, Chlodwing F, Goehler I. Constituents of *Tagetes lucida* Cav. Ssp. *lucida* Essential Oil. *Flavour and Fragrance Journal* 12, 47-52.
- Bell A. (2018) The neurobiology of acute pain. *The Veterinary Journal* 237, 55-62.
- Bye R, Linares E. (1999) Plantas medicinales del México prehispánico. *Arqueología Mexicana* 39, 4-11.
- Bonilla-Jaime H, Guadarrama-Cruz G, Alarcón-Aguilar FJ, Limón-Morales O, Vázquez-Palacios G. (2015) Antidepressant-like activity of *Tagetes lucida* Cav. is mediated by 5-HT_{1A} Y 5-HT_{2A}. *Journal of natural medicines* 69, 463-470.
- Camacho-Escobar K. (2016) Efecto espasmolítico del extracto acuoso de *Tagetes lucida* (pericón) y su posible mecanismo de acción. Tesis. Facultad de Química. UNAM.
- Carballo-Villalobos AI, González-Trujano ME, Pellicer F, López-Muñoz FJ. (2016) Antihyperalgesic effects of hesperidin improves with diosmin in experimental neuropathic pain. *BioMed Research International* 2016, 1-12.
- Céspedes CL, Ávila G, Martínez A, Serrato B. (2006). Antifungal and antibacterial activities of Mexican Tarragon (*Tagetes lucida*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54, 3521-3527.

- Ciccío JF. (2004) A source of almost pure methyl chavicol: volatile oil from the aerial parts of *Tagetes lucida* (Asteraceae) cultivated in Costa Rica. *Revista de Biología Tropical* 52, 853-857.
- Colloca L, Ludman T, Bouhassira D, Baron R, Dickenson AH, Yarnitsky D, Raja SN. (2017) Neuropathic pain. *Nature Reviews. Disease Primers* 3, 17002.
- Covarrubias GA, Guevara LU, Gutiérrez SC, Betancourt SJA, Córdova DJA, (2010) Epidemiología del dolor crónico en México. *Revista Mexicana de Anestesiología* 33, 207-213.
- Cruz MC, Díaz GM, Oh MS. (2017) Use of traditional herbal medicine as an alternative in dental treatment in Mexican dentistry: a review. *Pharmaceutical biology* 55, 1992-1998.
- Regalado EL, Fernández MD, Pino JA, Mendiola J, Echemedia OA. (2011) Chemical composition and biological properties of the leaf essential oil of *Tagetes lucida* Cav. from Cuba. *Journal of Essential oil Research* 25, 63-67.
- Farooqui AA, Farooqui T, Madan A, Ong JH, Ong WY. (2018) Ayurvedic Medicine for the Treatment of Dementia: Mechanistic Aspects. *Evidence-based complementary and alternative medicine* 2018, 1-11.
- Guadarrama-Cruz G, Alarcón-Aguilar FJ, Lezama-Velasco R, Vázquez-Palacios G, Bonilla-Jaime H. (2008) Antidepressant-like effects of *Tagetes lucida* Cav. In the forced swimming test. *Journal of Ethnopharmacology* 120, 277-281.
- Haley RM, von Recum HA. (2018) Localized and targeted delivery of NSAIDs for treatment of inflammation: A review. *Experimental biology and medicine* (Maywood, N.J.) 0, 1-12
- Hernandez-Leon A, Fernando-Guasti A, González-Trujano ME. (2016). Rutin antinociception involves opioidergic mechanism and descending modulation of ventrolateral periaqueductal grey matter in rats. *European Journal of Pain* 20, 274-283.
- Kantor TG. (1986) Use of diclofenac in analgesia. *The American Journal of Medicine* 80, 64-69.

- Kopke EJ, Manning EL, Ganesh A, Williams DGA, Manning, MW. (2018) The rising tide of opioid use and abuse: the role of the anesthesiologist. *Perioperative Medicine* 7, 2-10.
- Li R, Zhao C, Yao M, Song Y, Wu Y, Wen A. (2017). Analgesic effect of coumarins from *Radix angelicae pubescentis* is mediated by inflammatory factors and TRPV1 in a spared nerve injury model of neuropathic pain. *Journal of Ethnopharmacology* 195, 81-88.
- Lucarini R, Bernardes WA, Ferreira DS, Tozatti MG, Furtado R, Bastos JK, Pauletti AH, Junuário AH, Andrade e Silva ML, Cunha WR (2013). *In vivo* analgesic and anti-inflammatory activities of *Rosmarinus officinalis* aqueous extracts, rosmarinic acid and its acetyl ester derivative. *Pharmaceutical Biology* 51, 1087-1090.
- Marchand F, Perrretti M, McMahon S. (2005) Role of the immune system in chronic pain. *Nature Reviews* 6, 521-532.
- Marotti I, Marotti M, Piccaglia R, Nastri A, Grandi S, Dinelli G. Thiphenes occurrence in different *Tagetes* species: agricultural biomasses as sources of biocidal substance. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 90, 1210-1217.
- Mejia-Barajas JA, Del Rio Rosa EN, Martínez-Muñoz Rosa E, Flores-García A, Martínez-Pacheco MM (2012) Cytotoxic activity in *Tagetes lucida* Cav. *Emirates Journal of Food and Agriculture* 24, 142-147
- Merskey H. (1979) Pain terms: a list with definitions and notes on usage. Recommended by the IASP Subcommittee on Taxonomy. *Pain* 6, 249-252.
- Nava-Mesa MO, Téllez-Arévalo A, Rojas-Kozhakin D, Calderon-Ospina CA. (2015) Usos terapéuticos potenciales de los antagonistas opioides: Fisiopatología y evidencia preclínica. *Revista Colombiana de Ciencias Químico Farmacéuticas* 44, 322-358.
- Neville A, Peleg R, Singer Y, Sherf M, Shvartzman P. (2008) Chronic Pain: A population-based study. *Israel Medical Association Journal* 10, 676-680.
- Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.

- Organización Mundial de la Salud. 2012. (Web) Directrices de la OMS sobre el tratamiento farmacológico del dolor persistente en niños con enfermedades médicas. Disponible en: http://www.who.int/medicines/areas/quality_safety/3PedPainGLs_coverspanish.pdf (Enlace revisado el 9 de Junio de 2018).
- Organization for Economic Cooperation and Development (OECD) (2001) Guidance document on acute oral toxicity testing. 24 ENV/JM/MONO. 4, 8-24.
- Ortega A, Roca A, Micó JA (2002) Modelos animales de dolor. Una visión crítica. Revista de la Sociedad Española del dolor 9, 447-453.
- Ortiz MI, Castañeda-Hernández G. (2008) Examination of the interaction between peripheral lumiracoxib and opioids on the 1% formalin test in rats. European Journal of Pain.12, 233-241.
- Pérez-Ortega G, González-Trujano M.E, Ángeles-López GE, Brindis F, Vibrans H, Reyes-Chilpa R. (2016). *Tagetes lucida* Cav.: Ethnobotany, phytochemistry and pharmacology of its tranquilizing properties. Journal of Ethnopharmacology 181, 221-228.
- Puebla DF. (2005) Tipos de dolor y escala terapéutica de la OMS. Dolor latrogénico 28, 25-40.
- Romera E, Perena MJ, Perena MF, Rodrigo MD (2000) Neurofisiología del dolor. Revista de la Sociedad Española de dolor 7, 11-17.
- Salido M, Abasolo L, Bañares A. (2001) Revisión de los antiinflamatorios inhibidores selectivos de la ciclooxigenasa-2. Información Terapéutica de Sistema Nacional de Salud 25, 46-52.
- Sagalajev B, Viisanen H, Wei H, Pertovaara A. (2017) Descending antinociception induced by secondary somatosensory cortex stimulation in experimental neuropathy: role of the medulla spinal serotonergic pathway. Journal of Neurophysiology 117, 1200-1214.
- Serrano-Atero MS, Peramo F, Cañas A, García-Saura P, Serrano-Álvarez C, Caballero J. (2002) Modulación descendente de la información nociceptiva. Revista de la Sociedad Española de Dolor, 9, 382-390.

- Sierra D. (2000) "Yauhtli" o pericón, una planta curative y protectora. Su importancia mágica y religiosa en el presente y el pasado. Tesis. Facultad de Química. UNAM.
- Sierra CD (2008) El demonio anda suelto: el poder de la Cruz de Pericón. México Instituto Nacional de Antropología e Historia. 168p.
- Smith BH, Elliott AM, Chambers WA, Cairns SW, Hananaford PC, Penny K. (2001). The impact of chronic pain in the community. *Family Practice* 18, 292-299.
- Soria TH. (2011) Evaluación farmacológica de *Tagetes lucida* Cav. en la nocicepción inducida en un modelo experimental en ratones. Tesis. Facultad de Química. UNAM.
- Torre-Mollinedo F, Azkue JJ, Callejo-Orcasitas A, Gomez-Vega C, La-Torre S, Arizaga-Maguregui A, Ortiz-Pereda V, Mozas-Calabaza M, Isla-Baranda A. (2007) Coadjuvant analgesic drugs in the treatment of pain. *Gaceta Médica Bilbao* 104, 156-164.
- Trujillo J. (2017) An experience with La Abuelita's favorite remedy: The uses of *Tagetes lucida* (pericón). *Journal of the American Herbalists Guild* 15, 13-23.
- Uritu CM, Mihai CT, Stanciu GD, Dodi G, Alexa-Stratulat T, Luca., Leon-Constant MM, Stefanescu R, Bild V, Melnic S, Tmba BI. (2018) Medicinal plants of the family *Lamiaceae* in pain therapy: a review. *Pain research & management*, 2018, 1-44.
- Vallejo R, Barkin RL, Wang VC. (2011) Pharmacology of opioids in the Treatment of Chronic Pain Syndromes. *Pain Physician*. 14: E343-60.
- Vega RBG. (2008) Inflamación. *Revista de la Facultad de Medicina UNAM*. 51, 220-222.
- Villalba Herrera EW. (2014) Inflamación I. *Revista de Actualización Clínica de Investigación* 43, 2261-2265.
- Wallace LJ, McKnight W, Reuter KB, Vergnolle N. (2000) NSAID-Induce gastric damage in rats: requirement for inhibition of both cyclooxygenase 1 and 2. *Gastroenterology* 119, 706-714.

- Wang Z, Qi F, Cuis Y, Zhao L, Sun X, Tang W. Cai P. (2018) An update on Chinese herbal medicines as adjuvant treatment of anticancer therapeutics. *Bioscience trends*, 12, 220-239.
- Woolf (2004) Pain: Moving from symptom control toward mechanism-specific pharmacologic management. *140*, 441-451.
- Xu LW, Chen J, Qi HY, Shi YP. (2012). Phytochemicals and their biological activities of plants in *Tagetes* L. *Chinese Herbal Medicine* 4, 103-117.
- Yamamoto T, Miyazaki R, Yamada T. (2009) Intracerebroventricular administration of 26RFa produces an analgesic effect in the rat formalin test. *Peptides* 30, 1683-1688.
- Zegarra-Piérola JW. (2007) Bases fisiopatológicas del dolor. *Acta Médica Peruana* 24, 105-108.
- Zuñiga-Girón V. (2013) Determinación del efecto de un compuesto aislado de *Tagetes lucida* Cav. con actividad vasodilatadora y antihipertensiva en rata SHR. Tesis. Facultad de Química. UNAM.