



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIHIPERALGÉSICO Y
ANTIALODÍNICO DE COMBINACIONES DE *TILIA AMERICANA* VAR.
MEXICANA Y FÁRMACOS DE LA CLÍNICA EN UN MODELO DE
FIBROMIALGIA EN RATAS**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA

Yara Elena Quinto Ortiz



Ciudad Universitaria, CDMX

2019



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas

Tesis Digitales

Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: Ignacio Camacho Arroyo

VOCAL: Profesora: María Eva González Trujano

SECRETARIA: Profesora: Berenice Ovalle Magallanes

1er. SUPLENTE: Profesora: Itzel Susana de la Rosa Lara

2° SUPLENTE: Profesora: Ariana Elizabeth Vargas Castillo

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

**LABORATORIO DE NEUROFARMACOLOGÍA DE PRODUCTOS NATURALES,
INSTITUTO NACIONAL DE PSIQUIATRÍA RAMÓN DE LA FUENTE MUÑIZ.**

ASESORA DEL TEMA:

Dra. María Eva González Trujano

SUPERVISOR TÉCNICO:

Dr. Alberto Hernández Leon

SUSTENTANTE:

Yara Elena Quinto Ortiz

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por brindarme los recursos para realizar mis estudios profesionales, por formarme un criterio crítico y consciente.

Al proyecto CONACyT 256448 (beca No. 28941) por el apoyo económico provisto.

ÍNDICE

i.	ÍNDICE DE ABREVIATURAS	1
ii.	ÍNDICE DE FIGURAS	4
iii.	ÍNDICE DE TABLAS	6
1.	INTRODUCCIÓN	7
2.	MARCO TEÓRICO	8
2.1	Dolor	8
2.1.1	Definición	10
2.1.2	Nocicepción	10
2.1.3	Nociceptores	11
2.1.4	Mecanismos involucrados en la percepción y modulación del dolor	15
2.1.5	Clasificación	17
2.2	Fibromialgia (FM)	21
2.2.1	Definición	21
2.2.2	Antecedentes históricos	22
2.2.3	Epidemiología y prevalencia	24
2.2.4	Clasificación	26
2.2.5	Etiología y fisiopatología	26
2.2.6	Diagnóstico	32
2.2.7	Terapéutica	36
2.2.7.1	Tratamiento farmacológico	36
2.2.7.2	Tratamiento no farmacológico	42
2.2.8	Importancia de los modelos animales en la investigación del dolor	43
2.2.9	Modelos experimentales de FM	44
2.2.10	Herbolaria mexicana	46
2.2.11	Productos naturales y FM	46
2.2.12	<i>Tilia americana</i> var. <i>mexicana</i>	49
2.2.12.1	Usos de <i>Tilia</i> en la medicina tradicional	50
2.2.12.2	Estudios farmacológicos y análisis fitoquímico	50

2.2.12.3	Interacciones farmacológicas	51
2.2.13	Flavonoides	51
3.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	52
4.	HIPÓTESIS	53
5.	OBJETIVOS	54
5.1	Objetivo general	54
5.2	Objetivos particulares	54
6.	MATERIALES Y MÉTODOS	54
6.1	Fármacos y reactivos químicos	54
6.2	Equipos	55
6.3	Diseño experimental	56
6.3.1	Análisis fitoquímico	56
6.3.1.1	Material vegetal	56
6.3.1.2	Preparación del extracto	56
6.3.1.3	Fraccionamiento por Cromatografía en Columna Abierta (CCA)	57
6.3.1.4	Identificación de compuestos por Cromatografía en Capa Fina (CCF)	58
6.3.1.5	Identificación de compuestos por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR)	59
6.3.2	Análisis farmacológico	60
6.3.2.1	Animales	60
6.3.2.2	Modelo experimental	60
6.3.2.3	Grupos experimentales	62
6.3.2.4	Evaluación de conductas nociceptivas	63
6.3.2.5	Evaluación de conductas tipo depresivas	67
6.3.3	Análisis estadístico	70
7.	RESULTADOS	70
7.1	Fraccionamiento por CCA	70
7.2	Identificación de compuestos por CCF	72
7.3	Identificación de compuestos por CLAR	73

7.4	Evaluación del extracto metanólico de inflorescencias y de la fracción F en las conductas nociceptivas del modelo de FM inducidas por reserpina	81
7.5	Evaluación de pramipexol en las conductas nociceptivas del modelo de FM inducidas por reserpina	87
7.6	Evaluación de tramadol en las conductas nociceptivas del modelo de FM inducidas por reserpina	91
7.7	Evaluación de las combinaciones producto natural/pramipexol o tramadol en las conductas nociceptivas del modelo de FM inducidas por reserpina	93
7.8	Evaluación de la fracción F en la prueba de nado forzado	98
8.	DISCUSIÓN	101
8.1	Análisis del material vegetal por la técnica de CLAR	103
8.2	Determinación de las conductas de hiperalgesia y alodinia inducidas por reserpina	104
8.3	Evaluación del extracto metanólico de inflorescencias y de la fracción F en las conductas nociceptivas del modelo de FM inducidas por reserpina	107
8.4	Evaluación de pramipexol en las conductas nociceptivas del modelo de FM inducidas por reserpina	111
8.5	Evaluación de tramadol en las conductas nociceptivas del modelo de FM inducidas por reserpina	112
8.6	Evaluación de las combinaciones producto natural/pramipexol o tramadol en las conductas nociceptivas del modelo de FM inducidas por reserpina	113
8.7	Evaluación de la fracción F en la prueba de nado forzado	114
9.	CONCLUSIÓN	117
10.	PERSPECTIVAS	117
11.	REFERENCIAS	119

i. ÍNDICE DE ABREVIATURAS

°C	Grados Celsius
5-HT	5-Hidroxitriptamina/Serotonina
5-HT_{1A}	Receptor de serotonina familia 1 subtipo A
5-HT₃	Receptor de serotonina familia 3
5-HTT	Transportador de serotonina (5-HTT, por sus siglas en inglés)
AA	Ácido araquidónico
ABC	Área Bajo la Curva
AcOEt	Acetato de etilo
ACR	Colegio Americano de Reumatología (ACR, por sus siglas en inglés)
AMPA	Receptor del ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico
AMPc	Adenosín Monofosfato cíclico (AMPc, por sus siglas en inglés)
AMPT	Alfametil-p-tirosina
ANOVA	Análisis de Varianza (ANOVA, por sus siglas en inglés)
ASIC3	Canal sensible a ácido tipo 3
ATC	Antidepresivos tricíclicos
ATP	Adenosín trifosfato (ATP, por sus siglas en inglés)
AU	Unidades de Absorbancia (AU, por sus siglas en inglés)
BDNF	Factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF, por sus siglas en inglés)
Ca²⁺	Ion calcio
CB1	Receptor cannabinoide tipo 1 (CB1, por sus siglas en inglés)
CCA	Cromatografía en Columna Abierta
CCF	Cromatografía en Capa Fina
CCVD	Canales de Calcio Voltaje Dependientes
CGRP	Péptido Relacionado al Gen de Calcitonina (CGRP, por sus siglas en inglés)
CLAR	Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución
cm	Centímetros
COMT	Catecol-O-MetilTransferasa (COMT, por sus siglas en inglés)
D₂	Receptor de dopamina subtipo 2
D₃	Receptor de dopamina subtipo 3
D₄	Receptor de dopamina subtipo 4
DA	Dopamina
DAG	Diacylglicerol
DNA	Ácido desoxirribonucleótido (DNA, por sus siglas en inglés)
EEG	Electroencefalograma
EEM	Error Estándar de la Media
EUA	Estados Unidos de América
EVA	Escala Visual Análoga
ExtMeOH	Extracto metanólico
FDA	Agencia de Alimentos y Medicamentos de EUA (FDA, por sus siglas en inglés)

Fig.	Figura
FM	Fibromialgia
g	Gramos
GABA	Ácido gamma-aminobutírico
GABA_A	Receptor de GABA tipo A
GABA_B	Receptor de GABA tipo B
GABA_C	Receptor de GABA tipo C
GRD	Ganglio de Raíz Dorsal
Gαi	Proteína G alfa subunidad i
Gαo	Proteína G alfa subunidad o
H⁺	Ion hidrógeno
HCl	Ácido clorhídrico
Hex	Hexano
i.m.	Intramuscular
i.p.	Intraperitoneal
IASP	Asociación Internacional para el Estudio del Dolor (IASP, por sus siglas en inglés)
IL-1β	Interleucina 1 beta
IL-6	Interleucina 6
IMAO	Inhibidores de la Monoamino Oxidasa
INCMNSZ	Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán
IRSN	Inhibidores duales de la Recaptura de Serotonina y Noradrenalina
ISRS	Inhibidores Selectivos de la Recaptura de Serotonina
K⁺	Ion potasio
kg	Kilogramos
m	Metros
MAO	MonoAmino Oxidasa (MAO, por sus siglas en inglés)
MAO-A	Monoamino oxidasa isoforma A
MAO-B	Monoamino oxidasa isoforma B
MeOH	Metanólico
mg	Miligramos
min	Minutos
mL	Mililitros
mm	Milímetros
mRNA	Ácido ribonucleótido tipo mensajero (mRNA, por sus siglas en inglés)
NA	Noradrenalina
Na⁺	Ion sodio
Na₂SO₄	Sulfato de sodio
NFA	Asociación Nacional de Fibromialgia en EUA (NFA, por sus siglas en inglés)
NGF	Factor de crecimiento nervioso (NGF, por sus siglas en inglés)
nm	Nanómetros
NMDA	Receptor de N-metil-D-aspartato
NO	Óxido Nítrico (NO, por su fórmula química)
NREM	Sueño de movimientos oculares no rápidos (NREM, por sus siglas en inglés)
OMS	Organización Mundial de la Salud

P	Probabilidad
PCPA	Para-clorofenilalanina (PCPA, por sus siglas en inglés)
PEG2	Prostaglandina E2
PGG2	Prostaglandina G2
pH	Potencial de hidrógeno
PKC	Proteína quinasa C
p.o.	Vía oral (p.o., por sus siglas en latín). También se usa v.o.
Rf	Factor de retención (Rf, por sus siglas en inglés)
rpm	Revoluciones Por Minuto
s	Segundos
s.c.	Subcutánea
SNC	Sistema Nervioso Central
SP	Sustancia P
SS	Escala de severidad de síntomas (SS, por sus siglas en inglés)
SW	Swiss-Webster
Sx	Síndrome
TNF-α	Factor de necrosis tumoral alfa
TRP	Receptor de Potencial Transitorio (TRP, por sus siglas en inglés)
TRPA	Receptor de Potencial Transitorio tipo A
TRPM	Receptor de Potencial Transitorio tipo M
TRPV1	Receptor de Potencial Transitorio tipo V1
UV	Ultravioleta
var.	Variedad
VIH	Virus de Inmunodeficiencia Humana
WPI	Índice de dolor generalizado (WPI, por sus siglas en inglés)
μg	Microgramos
μL	Microlitros

ii. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Esquema de la Neuromatriz propuesta por Patrick Wall	9
Figura 2	El suplicio de Cuauhtémoc	11
Figura 3	Estructuras involucradas en el proceso de percepción del dolor	13
Figura 4	Receptores sensoriales cutáneos	14
Figura 5	Clasificación fisiopatológica de los tipos primarios de dolor	20
Figura 6	Mecanismos etiopatogénicos en la fibromialgia	27
Figura 7	Hiperalgesia y alodinia como anormalidades en el umbral de dolor en FM	28
Figura 8	Puntos sensibles a la palpación identificados como criterio de diagnóstico	33
Figura 9	Índice de dolor generalizado	34
Figura 10	Árboles de <i>Tilia americana</i> var. <i>mexicana</i>	49
Figura 11	Estructura química base de los flavonoides	52
Figura 12	Inflorescencias de <i>Tilia americana</i> var. <i>mexicana</i>	56
Figura 13	Diagrama del análisis fitoquímico experimental	58
Figura 14	Ratas Wistar	60
Figura 15	Línea del tiempo en el que se desarrolló el modelo experimental	61
Figura 16	Diseño experimental de la interacción farmacológica en el modelo experimental de FM	63
Figura 17	Rata en el analgesiómetro durante la prueba de hiperalgesia muscular	64
Figura 18	Filamento de Von Frey utilizado para medir la alodinia táctil	65
Figura 19	Rata lamiéndose la extremidad posterior en la prueba de alodinia térmica	67
Figura 20	Prueba de nado forzado	68
Figura 21	Rata en prueba de campo abierto	69
Figura 22	Ratas en el cilindro rotatorio	70
Figura 23	Identificación de compuestos por CCF	72
Figura 24	Perfil cromatográfico del extracto MeOH de inflorescencias de <i>Tilia</i>	74
Figura 25	Cromatogramas del extracto MeOH de <i>Tilia</i> enriquecidos con rutina o isoquercitrina	76
Figura 26	Perfil cromatográfico de la fracción F derivada del extracto MeOH de <i>Tilia</i>	78
Figura 27	Cromatogramas de la fracción F derivada del extracto MeOH de <i>Tilia</i> enriquecidos con rutina o isoquercitrina	80
Figura 28	Cursos temporales de la evaluación del extracto metanólico de inflorescencias en los umbrales nociceptivos del modelo de FM inducidos por reserpina	82
Figura 29	Evaluación del extracto metanólico de <i>Tilia</i> en los umbrales nociceptivos del modelo de FM inducidos por reserpina expresados como ABC	83

Figura 30	Cursos temporales de la evaluación de la fracción F del extracto de <i>Tilia</i> en los umbrales nociceptivos del modelo de FM inducidos por reserpina	85
Figura 31	Evaluación de la fracción F del extracto de <i>Tilia</i> en los umbrales nociceptivos del modelo de FM inducida por reserpina expresados como ABC	87
Figura 32	Cursos temporales de la evaluación de pramipexol en los umbrales nociceptivos del modelo de FM inducidos por reserpina	88
Figura 33	Evaluación de pramipexol en los umbrales nociceptivos del modelo de FM inducida por reserpina expresados como ABC	90
Figura 34	Cursos temporales de la evaluación de tramadol en los umbrales nociceptivos del modelo de FM inducidos por reserpina	92
Figura 35	Evaluación de tramadol en los umbrales nociceptivos del modelo de FM inducida por reserpina expresados como ABC	93
Figura 36	Cursos temporales de la evaluación de las combinaciones de la fracción F con pramipexol o tramadol en los umbrales nociceptivos del modelo de FM inducidos por reserpina	95
Figura 37	Evaluación de las combinaciones de la fracción F con pramipexol o tramadol en los umbrales nociceptivos del modelo de FM inducidos por reserpina expresada como ABC	96
Figura 38	Comparación teórica/experimental del efecto antihiperálgésico y antialodínico de las combinaciones de la fracción F con pramipexol o tramadol en los umbrales nociceptivos del modelo de FM inducidos por reserpina	98
Figura 39	Evaluación preliminar de la fracción F en la prueba de nado forzado	100
Figura 40	Propuesta de mecanismos periféricos y espinales en el modelo de FM inducida por reserpina	105

iii. ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Cronología de algunos eventos destacables en la historia de la FM	23
Tabla 2	Clasificación empírica de la FM	26
Tabla 3	Factores que incluyen en el procesamiento anormal de dolor en FM	30
Tabla 4	Principales comorbilidades del síndrome de FM	31
Tabla 5	Nuevos criterios de diagnóstico	34
Tabla 6	Medicamentos comúnmente utilizados en la FM	37
Tabla 7	Evidencia farmacoterapéutica en estudios clínicos de FM	38
Tabla 8	Evidencia de terapias alternativas en estudios clínicos de FM	43
Tabla 9	Modelos animales para el estudio de la FM	45
Tabla 10	Estudios realizados con productos naturales en el tratamiento de FM	47
Tabla 11	Fraccionamiento por CCA y rendimiento obtenido	71
Tabla 12	Evaluación de la actividad ambulatoria mediante prueba de campo abierto	99
Tabla 13	Evaluación de la coordinación motora con el equipo rota-rod	99

1. INTRODUCCIÓN

La fibromialgia (FM) es un síndrome determinado por dolor crónico generalizado, sensibilidad a la palpación y síntomas concomitantes como alteración del sueño y a la respuesta al estrés, rasgos alterados de personalidad, fatiga, cefalea, ansiedad y depresión (Clauw, 2009) de origen desconocido y que afecta del 2-8% de la población mundial, especialmente al sexo femenino (Vincent et al., 2013; Cabo-Meseguer et al., 2017). (Debido a su alta incidencia entre las mujeres, se utilizará el artículo femenino la(s) cuando se hable de pacientes).

Los fármacos utilizados para tratar la fibromialgia tienen como objetivos principales el alivio del dolor muscular al disminuir la alodinia e hiperalgesia (conductas nociceptivas características de este padecimiento) y atenuar las afecciones comórbidas. No obstante, la farmacoterapia actual no es completamente eficaz y produce diversos efectos adversos que promueven que la paciente discontinúe el tratamiento o tenga poco apego al mismo. Por lo anterior, mientras se realizan esfuerzos por conocer y comprender más acerca de la patogenia y etiología de la FM, es necesaria la continua búsqueda de alternativas, entre ellas las de origen vegetal que puedan ser efectivas para este tipo de dolor y que no conlleven a eventos adversos severos como los ya conocidos para la terapéutica actual.

Para la exploración de evidencias científicas útiles en la terapéutica se requiere del uso de los modelos experimentales que reproduzcan en lo posible las características de la enfermedad. El modelo experimental de FM en el que el presente trabajo se basa fue reportado por Nagakura et al. (2009) y modificado por Hernandez-Leon et al. (2018). Éste ha permitido reproducir conductas nociceptivas tipo FM como la alodinia e hiperalgesia en ratas basada en la depleción de monoaminas como parte de la etiología del síndrome de FM.

Adicionalmente se sabe que en la actualidad las pacientes suelen complementar el tratamiento farmacológico que se les prescribe para sus enfermedades con la ingesta de infusiones o decocciones de plantas medicinales. Sin embargo, en muchos casos no existen reportes científicos que confirmen las posibles interacciones benéficas o erróneas de su uso combinado. *Tilia americana* var. *mexicana*, conocida popularmente como: tila, tilio, cirimo, jonote, tzirimo o sirimu es una planta endémica de la que se ha corroborado y reportado su alto contenido en compuestos de tipo flavonoide mediante técnicas cromatográficas y fitoquímicas (Aguirre-Hernández et al., 2009; Aguirre-Hernández et al., 2010). A esta especie se le atribuyen actividades terapéuticas a nivel del sistema nervioso central (SNC) por lo que su uso es común en diversas comunidades de nuestra población. Estudios etnobotánicos y farmacológicos reportan su uso como analgésica y antiinflamatoria, anticonvulsiva y ansiolítico-sedante (Pérez-Ortega et al., 2008; Aguirre-Hernández et al., 2007; Martínez et al., 2009). Sin embargo, no se sabe si la combinación de esta especie con fármacos utilizados para estas afecciones pueda producir alguna interacción medicamentosa benéfica al haber sinergismo, o bien inadecuada si existe antagonismo o alguna respuesta tóxica. Por lo anterior, el interés en esta tesis será conocer el efecto de esta especie medicinal, así como la combinación de una de sus fracciones con alto contenido en flavonoides y dos fármacos de uso clínico para la FM; pramipexol (antidepresivo) y tramadol (analgésico).

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Dolor

El dolor puede provenir de diversas situaciones; la principal causa es la lesión del tejido, aunque también podría ser propiamente la propia patología. Puede estar acompañado de una condición psicológica o comorbilidad, como la ansiedad y/o depresión, o inclusive ocurrir en la ausencia de un evento desencadenante (Farlex Partner Medical Dictionary, 2012).

La sensación dolorosa es esencial para la supervivencia, bienestar y adaptación de los seres humanos en su ambiente. La habilidad para detectar estímulos nocivos es una función determinante del organismo para la interacción con el medio que nos rodea, con la finalidad de anticipar, reaccionar y adaptarse. No obstante, el dolor puede convertirse en algo patológico cuando ya no es útil como sistema de alarma y se vuelve crónico y debilitante afectando la calidad de vida del individuo que lo sufre (Cheng, 2018).

El dolor que cada persona experimenta es el resultado entonces de una interacción de múltiples variables biológicas, psicológicas, sociales y culturales. Melzack considera que la interacción de todas esas variables determina un sistema funcional cerebral denominado “neuromatriz” (Fig. 1), y que es el reflejo de las características personales de esa percepción dolorosa (Moreno y Prada, 2004).

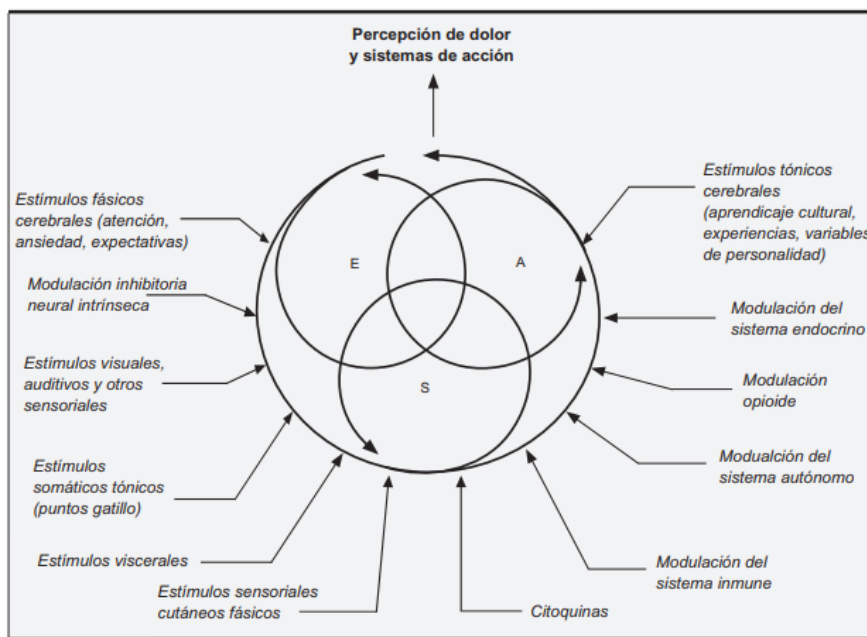


Figura 1. Esquema de la Neuromatriz propuesta por Patrick Wall. Se consideran tres dimensiones de la experiencia dolorosa. E: dimensión evaluativa-cognoscitiva, A: dimensión afectiva-motivacional, y S: dimensión sensorial-discriminativa.

Modificado de Melzack, 1999; citado en Moreno y Prada, 2004.

2.1.1 Definición

En la actualidad, el concepto de dolor ha evolucionado de ser una entidad unidimensional a una multidimensional. Éste involucra cualidades sensoriales, cognitivas, motivacionales y afectivas. El dolor siempre es subjetivo y cada individuo lo describe con base en su experiencia previa relacionada al deterioro ocasionado.

La Asociación Internacional para el Estudio del Dolor (IASP, por sus siglas en inglés) define el término dolor como: “una experiencia sensorial y emocional desagradable, asociada con un daño tisular real o potencial, que puede describirse en términos de la magnitud del daño” (Kumar y Elavarasi, 2016).

El dolor es más que una sensación, ya que la conciencia física del dolor; también incluye la percepción y la interpretación subjetiva del malestar. La percepción proporciona información acerca de la localización, intensidad e inclusive naturaleza del dolor. Las diversas respuestas conscientes e inconscientes tanto a la sensación como a la percepción, incluida la respuesta emocional, agregan una definición adicional al concepto general de dolor (Farlex Partner Medical Dictionary, 2012).

2.1.2 Nocicepción

Una de las funciones vitales del sistema nervioso es informar sobre la existencia o amenaza de una lesión (Fig. 2). La sensación de dolor, por su naturaleza aversiva e inherente, contribuye a esta función (Meyer et al., 2007 en McMahon y Koltzenburg, 2007). La nocicepción y el dolor responden a dos conceptos diferentes. La nocicepción es la activación de vías neuronales sensoriales tras el contacto con estímulos nocivos, mientras que el dolor se refiere a la percepción de esta experiencia luego de que el cerebro procesó la señal transmitida. El proceso de la percepción nociva es complejo; comienza en la periferia, se extiende por el eje cerebroespinal y termina en las regiones supraespinales responsables de la

percepción, interpretación y reacción (Chan et al., 2018 en Cheng y Rosenquist, 2018).



Figura 2. El suplicio de Cuauhtémoc (Leandro Izaguirre, 1892).

2.1.3 Nociceptores

Son los receptores especializados en la detección de estímulos nocivos. Por lo que no son estimulados por estímulos inocuos (calentamiento suave o ligero toque). La intensidad del estímulo determina la respuesta inicial. Los nociceptores tienen umbrales altos y normalmente responden solo a estímulos con suficiente energía como para lesionar el tejido potencialmente. (Chan et al., 2018 en Cheng y Rosenquist, 2018).

Morfológicamente son fibras nerviosas, éstas se dividen en tres grupos con base en diferencias en su estructura y velocidad de conducción del estímulo nervioso. Las fibras de tipo A subdivididas en términos de velocidad de transmisión en $A\alpha$, $A\beta$, $A\gamma$ y $A\delta$; fibras B y C (Perena et al., 2000). Específicamente en las terminaciones nerviosas libres $A\delta$ y C se encuentran los nociceptores; las fibras $A\delta$ (mielínicas, 2-5 mm de diámetro y velocidad de conducción de 12 a 20 m/s) transmiten la sensación aguda inicial de dolor, como por un pinchazo con un alfiler; y las fibras C (amielínicas, 0.4-1.2 mm de diámetro

y velocidad de conducción de 0.5 a 2 m/s) que transmiten el dolor de tipo sordo y persistente. Ambos funcionan como transductores biológicos.

Estas terminaciones nerviosas libres tienen sus cuerpos celulares en los ganglios de raíz dorsal de la médula espinal (neuronas de primer orden), donde se lleva a cabo la liberación de sustancia P (neuropéptido), glutamato y el péptido relacionado al gen de la calcitonina (CGRP, por sus siglas en inglés) como neurotransmisores. Lo anterior resulta en la activación de neuronas de segundo orden a través de los receptores correspondientes. Las neuronas de segundo orden cruzan la médula espinal (lámina I-V) en dirección contralateral y viajan a través del tracto espinotalámico hasta llegar al tálamo. Desde ahí las neuronas de tercer orden son activadas, van del tálamo a la corteza somatosensorial lo que permite la percepción de dolor (Vanderah, 2007; Fox, 2011). Cabe mencionar que a nivel del asta ventral de la médula espinal, las neuronas de segundo orden resultan en la activación directa de motoneuronas, lo que provoca un reflejo de retirada de los estímulos nocivos. De igual forma, las interneuronas por su carácter inhibitorio modulan la entrada de información dolorosa a nivel de médula (Vanderah, 2007) (Fig. 3).

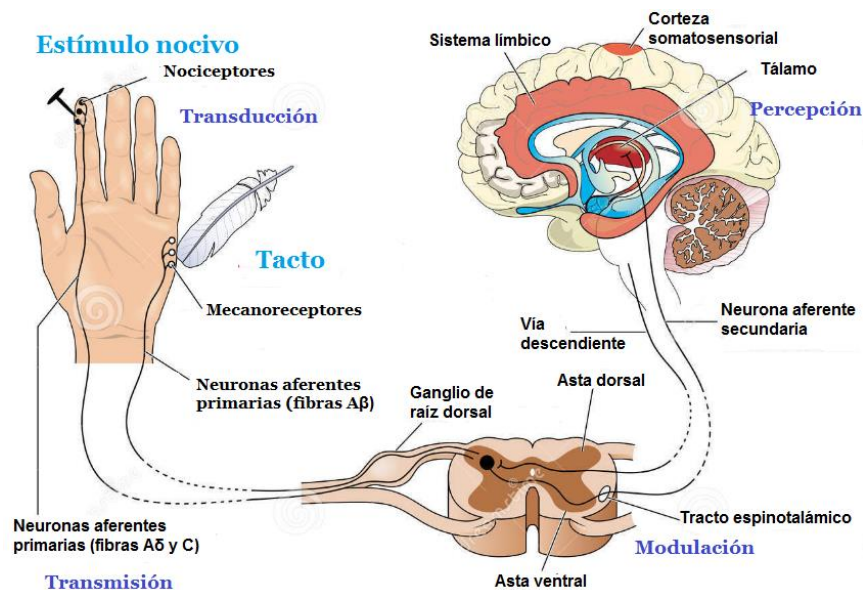


Figura 3. Estructuras involucradas en el proceso de percepción del dolor.

Modificado de Dreamstime, 2019.

Los nociceptores pueden clasificarse funcionalmente como: mecano-nociceptores, termo-nociceptores y polimodales. Los tres tipos se encuentran en la piel y en la mayoría de las vísceras y algunos de ellos han sido identificados como canales de membrana. Los mecano-nociceptores son fibras Aδ que se activan por estímulos de presión intensa. Los termo-nociceptores corresponden a fibras Aδ y son activados por temperaturas superiores a 45°C o inferiores a 5°C. Los nociceptores polimodales pertenecen a fibras C y son activados por una gran variedad de sustancias químicas, estímulos mecánicos intensos y temperaturas extremas de frío o calor (Moreno y Prada, 2004).

Las sensaciones cutáneas de tacto, presión, calor o frío están mediadas por las terminaciones nerviosas dendríticas de diferentes neuronas sensoriales. Las terminaciones dendríticas desnudas que rodean los folículos pilosos, así como las terminaciones dendríticas expandidas, llamadas terminaciones de Ruffini y discos de Merkel, respectivamente, son las encargadas de mediar las sensaciones de tacto. Por otra parte, las sensaciones de tacto y presión también están mediadas por dendritas encapsuladas dentro de diversas estructuras incluyendo corpúsculos

de Meissner (cambios en textura) y corpúsculos de Pacini (presión profunda) (Fig. 4).

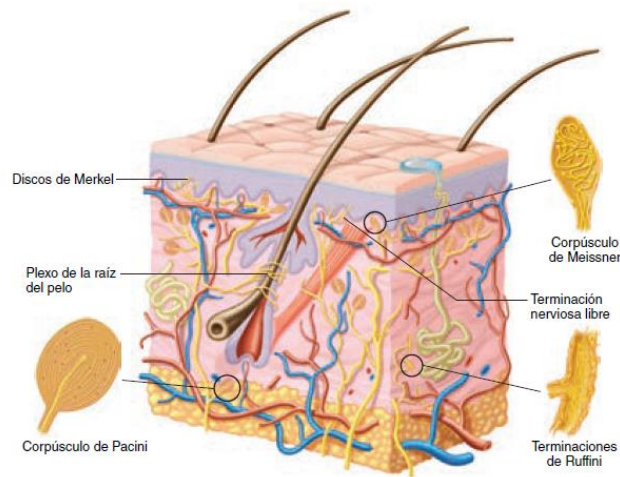


Figura 4. Receptores sensoriales cutáneos.

Modificado de Fox, 2011.

Existe un mayor número de terminaciones dendríticas libres que responden al frío más que al calor. Las temperaturas calientes (43°C o más) producen sensaciones de dolor por medio de la acción de una proteína de membrana particular ubicada en dendritas sensoriales llamada receptor de capsaicina, que además es un canal iónico. En respuesta a una temperatura nocivamente alta o a la presencia de capsaicina (contenida en chile y pimienta picante), estos canales se abren, lo cual permite que los iones Ca^{2+} y el Na^{+} se difundan hacia la neurona. Lo que a su vez ocasiona la despolarización y da como resultado los potenciales de acción que se transmiten hacia el SNC y se perciben como calor y dolor al disminuir el umbral de activación.

De manera análoga a la capsaicina se evoca la sensación de calor; en tanto que el mentol es capaz de producir una sensación de frío. Existe un canal de iones de membrana sobre las neuronas sensoriales que muestra respuesta tanto al mentol como al frío en el rango de 8 a 28°C. Los receptores de frío/mentol y los de calor/capsaicina son miembros de la misma familia de canales de cationes, llamados receptores de potencial transitorio (TRP, por sus siglas en inglés) (Fox,

2011). Esta familia de canales iónicos responde a estímulos térmicos (TRPV1), trauma y químicos (TRPA y TRPM) (Chan et al., 2018 en Cheng y Rosenquist, 2018).

2.1.4 Mecanismos involucrados en la percepción y modulación del dolor

La sensación dolorosa se origina gracias a mecanismos complejos de señalización, los cuales comienzan en la periferia, ascienden por la médula espinal y, finalmente, son interpretados en la corteza cerebral. Las vías ascendentes son susceptibles a daño por anomalías mecánicas, tóxicas o patológicas. Por otra parte las vías descendentes también influyen en la percepción del dolor al mitigar las entradas dolorosas.

La concepción de los mecanismos de modulación y percepción del dolor son vitales para comprender los fundamentos de los procesos patológicos, así como de las intervenciones terapéuticas (Rajneesh y Bolash, 2018). Los cuatro pasos identificados en el procesamiento neural de las señales nocivas que pueden conllevar a la experimentación del dolor, tales como:

1. Transducción. - Es el proceso por el cual los estímulos mecánicos, químicos o térmicos posiblemente nocivos se convierten en potenciales de acción por los nociceptores periféricos (Chan et al., 2018 en Cheng y Rosenquist, 2018). Para ello suceden los procesos siguientes:

Activación de nociceptores.- Sucede cuando un grupo heterogéneo de receptores, canales iónicos de membrana de los nociceptores (canales de la familia TRP) se activa por la presencia de mediadores del daño tisular. El deterioro de tejido y daño celular está asociado con la liberación de mediadores como el ácido araquidónico (AA) proveniente de las membranas lisadas, así como los iones H^+ y K^+ . Los metabolitos del AA como prostaglandinas (PEG2, PGG2) y la bradiquinina juegan un papel importante en la activación de los nociceptores periféricos al unirse a receptores acoplados a proteínas G y desencadenar

cascadas de señalización intracelular que activan canales iónicos por fosforilación. Finalmente, la entrada de Ca^{2+} y Na^{+} genera la despolarización de la membrana.

Conducción.- Es el proceso donde los potenciales de acción generados por los nociceptores periféricos activados y mediados por los canales de Ca^{2+} y Na^{+} dependientes de voltaje son conducidos por medio de las diferentes fibras (A δ , C). Los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje facilitan la liberación de neurotransmisores en las sinapsis sucedidas en el asta dorsal (Chan et al., en Cheng y Rosenquist, 2018).

2. Transmisión. - Se refiere a la transferencia de los impulsos nocivos de los nociceptores primarios hacia las células de la médula espinal, posteriormente al tálamo y finalmente a la corteza. Ambos tipos de neuronas nociceptivas aferentes o fibras hacen sinapsis con una neurona de segundo orden en la capa superficial de la médula espinal. Esta neurona de segundo orden forma el tracto espinotalámico ascendente con su axón para llegar al tálamo, donde se lleva a cabo la sinapsis con la neurona de tercer orden que se proyecta a la corteza sensorial (Vanderah, 2007).

3. Modulación. - Este proceso representa cambios que ocurren en respuesta a los estímulos nocivos en el asta dorsal de la médula espinal, mesencéfalo y tallo cerebral. El sistema de modulación endógeno consiste en interneuronas en la médula espinal y tractos neurales descendientes que inhiben la transmisión de la señal dolorosa. La activación de estos tractos involucra la liberación de neurotransmisores como β -endorfinas y encefalinas (Vanderah, 2007; Chan et al., en Cheng y Rosenquist, 2018).

4. Percepción. - La región talámica, que recibe tanto estímulos nocivos como sensaciones normales (tacto y presión), es donde se discriminan los componentes de la transmisión dolorosa. Las neuronas de tercer orden también proyectan la señal de dolor hacia las estructuras límbicas, corteza cingulada anterior e ínsula, es por eso que aquí sucede el procesamiento de los componentes emocionales y cognitivos del dolor (Chan et al., en Cheng y Rosenquist, 2018).

2.1.5 Clasificación

La prevalencia y cotidianidad del dolor como síntoma típico de la mayoría de las enfermedades es la razón primordial que motiva a una consulta médica (Bassols et al., 1999; Ali et al., 2015; Cheng, 2018). Ello requirió de su clasificación para facilitar el entendimiento de los padecimientos asociados y establecer criterios estandarizados de diagnóstico, además de hacer posible el seguimiento de sus cifras estadísticas alrededor del mundo (Cheng, 2018).

Existen varias clasificaciones del dolor, por ejemplo: en función de la anatomía, etiología, intensidad, duración y fisiopatología (Montgomery et al., 2017). Desde el punto de vista fisiopatológico, en general puede dividirse en:

a) Dolor nociceptivo

El dolor nociceptivo es aquel que surge como consecuencia de la activación de receptores periféricos denominados nociceptores que reconocen estímulos nocivos de tipo químico, térmico y mecánico, la señal se convierte a potencial eléctrico por receptores o canales iónicos sensibles a frío, calor, estímulos mecánicos y concentración de protones (Scholz y Woolf, 2002). Esta actividad eléctrica se conduce a lo largo del sistema nociceptivo, extendido desde la periferia a través de la médula espinal, el tallo cerebral, y el tálamo para llegar a la corteza cerebral donde la sensación se percibe (Woolf, 2004) (Fig. 5).

Por lo tanto, la función de este sistema de alarma es esencial para mantener la integridad del cuerpo, ya que es la protección mediante el reconocimiento y la minimización del contacto con estos estímulos, la pérdida de ésta podría conllevar al daño tisular (Woolf, 2010).

b) Dolor inflamatorio

Si ocurre el daño al tejido a pesar del sistema de defensa que representa el dolor nociceptivo (como en el caso de trauma, cirugía o enfermedades inflamatorias), se optará por reparar el tejido dañado, lo que conlleva a la infiltración de células del

sistema inmune y al aumento de la sensibilidad en la zona afectada para reducir su movimiento y evitar mayor daño, esto se traduce como dolor inflamatorio (Woolf, 2004; Woolf, 2010).

Desde las células lesionadas se inicia la liberación de una gran variedad de sustancias, y otras son sintetizadas durante los eventos que siguen a la lesión. Por ejemplo, las prostaglandinas, los leucotrienos y la sustancia P sensibilizan a los nociceptores, mientras que los iones K^+ , la serotonina, la bradiquinina y la histamina los activan directamente; el conjunto de todos estos mediadores químicos se denomina “sopa inflamatoria” (Moreno y Prada, 2004).

Cabe resaltar en este proceso el papel de las citocinas proinflamatorias y quimiocinas, como el $TNF-\alpha$, la $IL-1\beta$ y factores de crecimiento, específicamente NGF y BDNF, los cuales pueden cambiar las propiedades de la respuesta en las neuronas de señalización del dolor de maneras diversas. Éstas van desde la activación o sensibilización de las terminales nociceptivas hasta la regulación de la expresión génica que afecta las propiedades de los nociceptores (modificado de McMahon et al., 2007) (Fig. 5).

c) Dolor neuropático

El dolor neuropático proviene de lesiones o la disfunción del propio sistema nervioso tanto a nivel central (pacientes con esclerosis múltiple o lesión de la médula espinal) como periférico (neuropatía diabética o polineuropatía asociada al VIH) (modificado de Woolf, 2004). Generalmente se caracteriza por ser espontáneo, quemante o punzante y presentar alodinia e hiperpatía, asociadas a signos de déficit neurológico dependiendo del lugar de la lesión (Moreno y Prada, 2004).

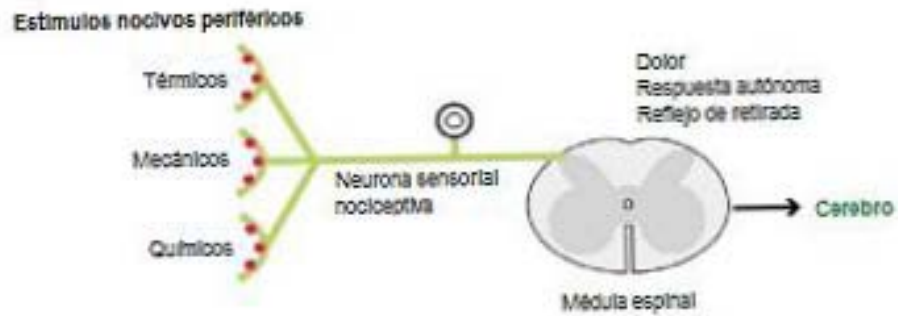
Las alteraciones de las fibras nerviosas, tanto centrales como periféricas, no solo afectan la comunicación interneuronal, además dan lugar a una cascada de respuestas que llevan a la desmielinización, retracción axonal, gemación y muerte celular. Por otra parte, algunos axones de los nervios periféricos pueden

recuperar su función posterior a la lesión, pero las neuronas centrales no se recuperan funcionalmente después del daño (Moreno y Prada, 2004) (Fig. 5).

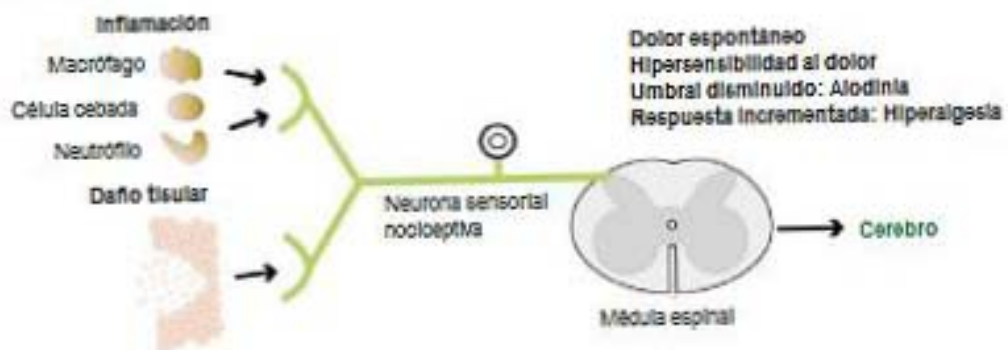
d) Dolor disfuncional

En esta forma de susceptibilidad dolorosa no se detecta ningún déficit neurológico o anomalía periférica. El dolor se debe a una respuesta o función anormal del sistema nervioso, en la que aumenta la sensibilidad y los síntomas se amplifican. Esto se conoce generalmente como sensibilización central y se piensa que es la consecuencia de la plasticidad de sinapsis neuronales en respuesta a experiencias dolorosas pasadas (Bennett, 2002). Varias condiciones patológicas tienen características que pueden ubicarlos en esta categoría, como es el caso de la fibromialgia (FM), síndrome del intestino irritable y algunas formas de dolor torácico no cardíaco y cefalea tensional. No es claro por qué el SNC de las pacientes con dolor disfuncional muestra esta sensibilidad anormal o respuesta exacerbada (modificado de Woolf, 2004) (Fig. 5).

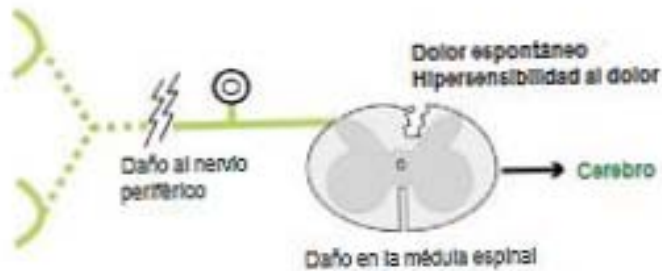
a) Dolor nociceptivo



b) Dolor inflamatorio



c) Dolor neuropático



d) Dolor disfuncional



Figura 5. Clasificación fisiopatológica de los tipos primarios de dolor.

Modificado de Woolf, 2004.

2.2 Fibromialgia (FM)

“La FM es un paradigma de algo cada vez más cierto en medicina: todas las enfermedades crónicas poseen tanto un componente físico como mental, sobre todo aquellas enfermedades, como los reumatismos, en las que el dolor es un factor indisociable” (Martínez-Lavín, 2007).

La característica central del dolor es su subjetividad. Por un lado, existe el problema de evaluar el dolor en forma objetiva y, por otro, la dificultad de comunicar su intensidad por parte de las pacientes. Estos conflictos han sido parte medular del historial y controversia que rodea a la FM, reconocida no hace mucho tiempo como un desorden neural digno de incluirse en los lineamientos para el tratamiento del dolor crónico por la Organización Mundial de la Salud (OMS) (OMS, 2008; Montoya, 2011).

2.2.1 Definición

La FM es un síndrome de origen desconocido caracterizado por dolor músculo-esquelético, crónico generalizado o multifocal, con hiperalgesia y alodinia concomitantes manifestadas como sensibilidad a la palpación digital ligera (Wood, 2015), reportado por las pacientes en la ausencia de daños físicos detectables (Montoya, 2011) y acompañadas de otros síntomas como fatiga, rigidez, trastornos del sueño, alteraciones del estado de ánimo, ansiedad, depresión, cefaleas recurrentes, mareo, síndrome del colon irritable y/o dolor urogenital (Wolfe et al., 2009; Goldenberg, 2009; Chen y McKenzie-Brown en Lawson y Wallace, 2015; Blasco-Serra, 2016). La cantidad de síntomas que se integran en el síndrome de FM lo convierten en un padecimiento severamente incapacitante, lo que conlleva un gran impacto a nivel personal, familiar y socio-económico (Boulanger et al., 2012).

2.2.2 Antecedentes históricos

La descripción de dolores músculo-esqueléticos data en la literatura desde el siglo XVI. Fue el médico francés Guillaume de Baillou quien introdujo por primera vez el término ‘reumatismo’ para describir las manifestaciones clínicas del dolor muscular con la fiebre reumática aguda en 1592. Para el siglo XVIII, los médicos europeos establecieron la distinción entre reumatismo articular con deformación del tejido músculo-esquelético y dolor; por otra parte, a aquél que no lo deformaba le llamaron reumatismo muscular. Desde el siglo XIX varias formas de reumatismo muscular se han descrito bajo diferentes términos, entre los que destacan: neurastenia, fibrositis, fibromiositis nodular, miofascitis, miofibrositis, neurofibrositis, reumatismo psicógeno, entre otros (Block, 1993 citado en Inanici y Yunus, 2004). Hasta 1904, el neurólogo William Gowers introdujo el concepto de ‘fibrositis’ para describir un cuadro clínico muy similar al de la FM, consistía en la presencia de dolor espontáneo y sensibilidad asintomática a la presión mecánica, fatiga, alteración del sueño y agravación de la sintomatología al exponerse a estímulos fríos agudos o crónicos (Gowers, 1904 citado en Inanici y Yunus, 2004). Este término fue empleado por 72 años y finalmente se rechazó por contener el sufijo “itis” que refiere a la inflamación del músculo, característica ausente en la FM.

Posteriormente al año de 1976, Hench utilizó por vez primera el término ‘fibromialgia’ para resaltar la falta de signos inflamatorios (Correa-Roan, 2016). Smythe en 1977 fue el pionero en describir que la FM se trataba de un síndrome de dolor generalizado, que conllevaba fatiga, falta de sueño, irritabilidad y múltiples puntos sensibles, puntos gatillo o *tender points*. Muchos de éstos sirvieron como precedente para que el Colegio Americano de Reumatología (ACR, por sus siglas en inglés) estableciera los criterios de diagnóstico de la FM en 1990 (Inanici y Yunus, 2004). Cabe destacar que el término fue reconocido por la OMS en 1992, tipificado en su Manual de Clasificación Internacional de Enfermedades y por la IASP en 1994 (Blasco-Serra, 2016). En la tabla 1 se destacan los

acontecimientos importantes que tuvieron un impacto en la evidencia literaria de la FM.

Tabla 1. Cronología de algunos eventos destacables en la historia de la FM.

Año	Autor	Desarrollo importante
1904	Gowers, W.R.	Utilizó por primera vez el término fibrositis
1972	Smythe, H.	Primera descripción del síndrome de FM con dolor generalizado y múltiples puntos sensibles en sitios específicos.
1975	Moldofsky, H.	Primer estudio EEG que mostró alteraciones en el sueño NREM
1976	Hench, P.K.	Uso del término fibromialgia por primera vez
1977	Smythe, H.	Recalcó la importancia de las aportaciones de Moldofsky y sugirió una revisión a los criterios de diagnóstico de FM
1981	Yunus, M.B.	Primer estudio clínico controlado validando la sintomatología y los puntos sensibles localizados, añade nuevos síntomas
1986	Carette, S. y Goldenberg, D.L.	Primer reporte de la eficacia de amitriptilina en un ensayo clínico aleatorizado
1988	Vaeroy, H.	Primer reporte del aumento de sustancia P en fluido cerebroespinal de pacientes con FM
1988	Bennett, R.M.	Primer reporte de la eficacia de ciclobenzaprina en un ensayo clínico aleatorizado
1989	Bennett, R.M.	Primera demostración de que la falta de ejercicio aeróbico en pacientes con FM influye en su recuperación
1990	Wolfe, F.	Publicación de los criterios de diagnóstico de FM por el ACR
1991	Buckhardt, C.S.	Desarrollo de un cuestionario validado para evaluar las disfunciones físicas y psicológicas en la FM
1993	Granges, G. y Arroyo, J.F.	Primera demostración de la sensibilización central en FM
2009	Nagakura, Y.	Modelo animal de FM inducido por reserpina
2010	Wolfe, F.	Modificación en los criterios de diagnóstico del ACR

ACR: American College of Rheumatology, EEG: Electroencefalograma, FM: Fibromialgia, NREM: Sueño de movimientos oculares no rápidos. Modificada de Inanici y Yunus, 2004.

2.2.3 Epidemiología y prevalencia

Debido a que aún existen varios desafíos para generar un consenso entre los grupos de expertos en cuanto a definición y diagnóstico de este padecimiento, dependiendo de los criterios de diagnóstico utilizados, la prevalencia es de 2-8% en la población mundial (Clauw, 2014; Cohen, 2017). Se trata de la segunda patología reumática más común en la clínica luego de la osteoartritis (Arnold et al., 2011).

La FM puede desarrollarse en cualquier etapa de la vida; sin embargo, es más común que suceda en el rango de edad de los 44 a 55 años (Clauw, 2014). Las mujeres representan del 80 al 90% de los casos establecidos (la relación mujer:hombre es de aproximadamente 9:1) (Cabo-Meseguer et al., 2017). No obstante, las cifras de esta relación son variables al considerar elementos como raza, estilo de vida, edad, criterios de diagnóstico y población estudiada. La agregación familiar, la existencia concomitante de dolor crónico regional (miofascial, pélvico, lumbar, cefalea) y la presencia de condiciones de estrés emocional son factores de riesgo considerables. Adicionalmente se ha observado que la prevalencia de la FM es mayor en zonas rurales que en urbanas y es más común en personas con niveles educativos y económicos bajos (Cabo-Meseguer et al., 2017). Recientemente, Marques et al. (2017) realizaron una revisión literaria donde agruparon datos de prevalencia y proporciones de la fibromialgia en distintas poblaciones de diversos países. Se estimó que la prevalencia en nuestro país es de 0.7-0.8%, con una relación de 3 mujeres afectadas por cada hombre.

Un estudio retrospectivo realizado en México entre 2005 a 2008, describió los casos de pacientes diagnosticados con FM y encontró una predominancia en mujeres mayores de 50 años. El promedio general de la intensidad del dolor registrada fue de 5.7 empleando la Escala Visual Análoga (EVA), donde 0 = nada de dolor y 10 = el dolor más intenso, con un promedio de 4.56 medicamentos empleados y 7.15 cambios de esquema farmacoterapéutico, lo que indica una

importante variabilidad en la utilización de medicamentos (Cruz-Franco et al., 2010).

Otro punto importante para destacar es que, de acuerdo a un reporte de la Clínica del Dolor del Hospital General de México, quienes padecen FM reciben atención médica después de más de dos años del inicio de los síntomas y que el número de médicos visitados antes del diagnóstico es en promedio de 6.6 (Cobarrubias-Gómez et al., 2016). Lo desgastante de esta enfermedad repercute en varios aspectos de la vida de las pacientes; primeramente, la sintomatología ocasiona que se afecten sus actividades diarias y relaciones sociales, muchas veces existe dependencia de las pacientes hacia sus familiares para mantener una calidad de vida aceptable y el empobrecimiento de sus actividades de ocio puede conllevar al agravamiento de la sintomatología misma (Blasco-Serra, 2016).

Por otra parte, a nivel socio-económico, las repercusiones también son destacables, esto incluye una disminución en el desempeño laboral que pone en riesgo la estabilidad de su empleo. Un estudio realizado en EUA por Kleinman y colaboradores en 2009 estimó que los adultos trabajadores con FM perdieron aproximadamente 16.8 días al año por problemas relacionados a su padecimiento, comparados con trabajadores sin FM que faltaron solo 6.4 días. También reportaron algunos costos totales por concepto de beneficio a la salud que para quienes la padecen fue de 8 452 dólares versus 4 013 dólares de quienes no (Halawa y Edwards en Lawson y Wallace, 2015). En nuestro país la FM no está reconocida en la seguridad social como una enfermedad incapacitante, por lo que ningún paciente puede solicitar una incapacidad laboral por este padecimiento (Correa-Roan, 2016).

Cabe destacar que el diagnóstico tardío, el tratamiento insatisfactorio, la atención médica poco dirigida y las múltiples comorbilidades en este síndrome conlleva a mayores gastos a nivel del sector salud, lo que implica visitas médicas, gastos sanitarios, medicamentos, intervenciones quirúrgicas, estudios de laboratorio para descartar otras patologías, entre otros.

2.2.4 Clasificación

Para un mejor estudio de la FM se han desarrollado diversas clasificaciones a través del tiempo. Belenguer y colaboradores realizaron una revisión sistemática en 2009 donde notaron que las clasificaciones empíricas de la FM hasta ese momento estaban basadas en el perfil psicopatológico del paciente, pero no consideraban la relación de este síndrome con las enfermedades concomitantes. Por lo que propusieron la siguiente clasificación (Ver tabla 2).

Tabla 2. Clasificación empírica de la FM.

FM	Características importantes
Idiopática (Tipo I)	Sensibilidad extrema al dolor no asociada a padecimientos psiquiátricos
Relacionada con enfermedades crónicas (Tipo II)	Incluye patologías crónicas de cualquier etiología
Secundaria a enfermedades psicopatológicas (Tipo III)	Desajustes psicológicos (dominio psicosocial, depresión, ansiedad, dominio cognitivo) evaluados a través de cuestionarios estandarizados
Simulada (Tipo IV)	Pacientes que fingen tener este padecimiento para intentar obtener una incapacidad laboral

Modificada de Belenguer et al., 2009.

2.2.5 Etiología y fisiopatología

Existen algunas teorías etiopatogénicas que en convergencia podrían justificar la presentación del síndrome de FM (Fig. 6).

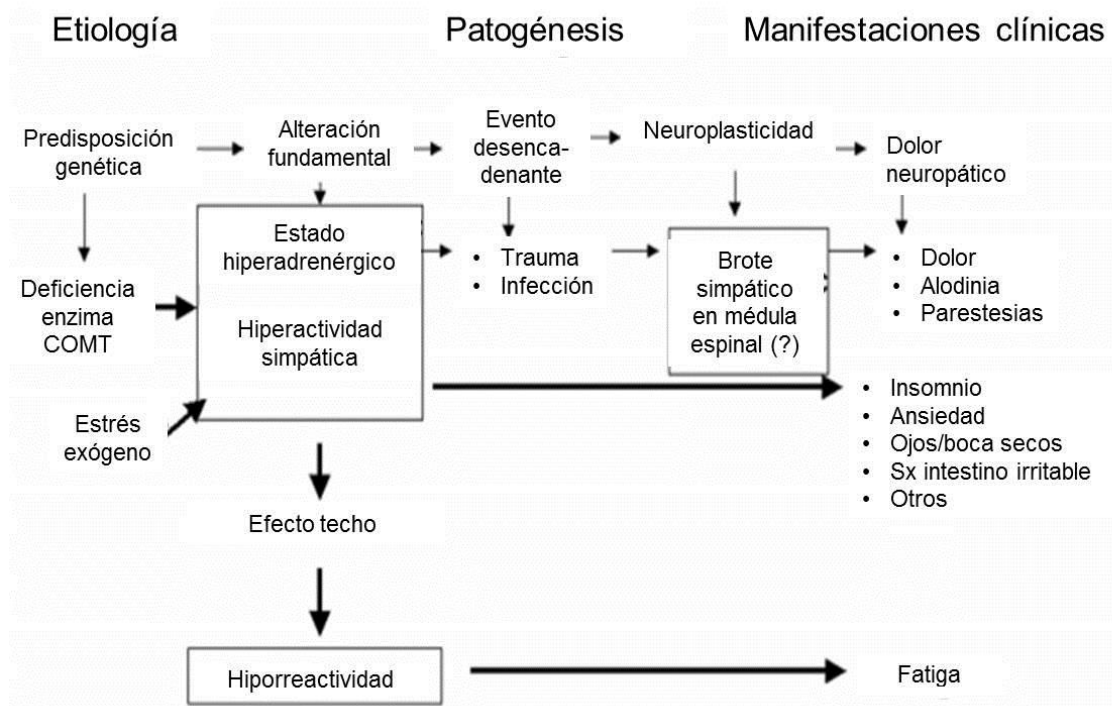


Figura 6. Mecanismos etiopatogénicos en la fibromialgia.

Adaptado de Martínez-Lavín, 2007.

Se ha sugerido que una alteración fundamental de la FM es un desajuste en el funcionamiento del sistema nervioso autónomo, con una incesante hiperactividad simpática, caracterizada por una excesiva producción de noradrenalina, sustancia capaz de sensibilizar a los receptores primarios del dolor tanto centrales como periféricos y así inducir dolor e hipersensibilidad generalizados (Martínez-Lavín, 2007). Son distintos los factores que podrían generar esta condición, entre los que destacan un evento disparador (trauma físico o emocional, infección de virus de hepatitis B y C, parvovirus B19 o el Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH)) (Ablin et al., 2008; Halawa y Edwards en Lawson y Wallace, 2015).

La fuerte evidencia de la agregación familiar en individuos con FM ha derivado en la búsqueda de loci genéticos implicados, los polimorfismos genéticos presentes en las pacientes comúnmente están relacionados con la neurotransmisión monoaminérgica, como en el caso del gen del transportador de serotonina (5-HTT), así también el gen de la enzima Catecol-O-MetilTransferasa

(COMT) involucrada en el metabolismo de las catecolaminas como noradrenalina y dopamina (Halawa y Edwards en Lawson y Wallace, 2015). Por otra parte, existe una desregulación entre especies reactivas de oxígeno y sistemas antioxidantes (enzimáticos y no enzimáticos) (Bagis et al., 2005 en Lawson y Wallace, 2015).

Finalmente en los mecanismos de sensibilización central se produce un incremento en la excitabilidad de las neuronas centrales que forman parte de la vía ascendente del dolor y una reducción de los mecanismos inhibitorios de la vía descendente como resultado de cambios plásticos a nivel de SNC. (Blasco-Serra, 2016). Las pacientes con FM presentan una disminución de los umbrales nociceptivos manifestados en forma de hiperalgesia (aumento anómalo de la sensación dolorosa) y alodinia (percepción de dolor ante estímulos mecánicos y/o térmicos que en condiciones normales no son dolorosos) (Fig. 7).

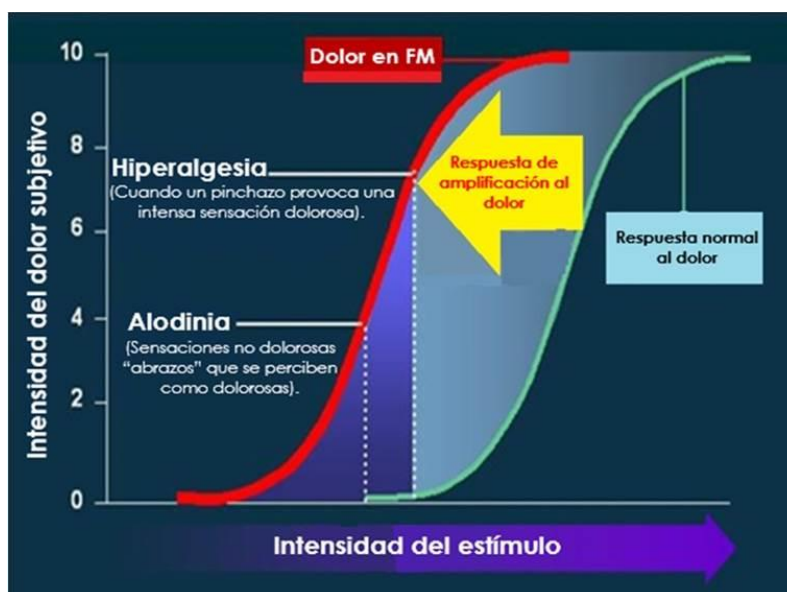


Figura 7. Hiperalgesia y alodinia como anomalías en el umbral de dolor en FM.

Adaptado de Gottschalk et al., 2001.

Diversos grupos de investigación clínica han utilizado varios métodos que buscan elucidar el origen de estas dos características de la FM. Estudios de neuroimagen demuestran que el flujo sanguíneo cerebral en estas pacientes se incrementa en las áreas cerebrales asociadas al procesamiento del dolor ante

menores presiones nociceptivas que en los controles sanos (Blasco-Serra, 2016). Además se han encontrado cambios en los niveles de neurotransmisores excitadores como glutamato y neuropéptidos como sustancia P y el factor de crecimiento nervioso junto con el factor neurotrófico derivado del cerebro que se hallan más altos (hasta en doble o triple proporción), y niveles más bajos de neurotransmisores participantes en la vía inhibitoria descendente como noradrenalina (NA), serotonina (5-HT) y dopamina (DA) en el líquido cefalorraquídeo de las pacientes con FM en comparación con quienes no la padecen (Russell et al., 1992).

Así también destaca la expresión de receptores que generalmente actúan incrementado el impulso ascendente como los de tipo N-metil-D-aspartato (NMDA) (Petersel et al., 2010), probablemente favorecida por los factores antes mencionados y que participan en el fenómeno de potenciación del dolor, luego de repetidas estimulaciones dolorosas, lo que produce mayor hiperalgesia y alodinia (Blasco-Serra, 2016). Paralelamente, la disminución del control inhibitorio nocivo difuso se ha descrito como uno de los principales sistemas inhibitorios endógenos acompañado de la neurotransmisión alterada de serotonina y noradrenalina acentuada en las comorbilidades de tipo psiquiátricas (de Souza et al., 2009).

La presencia de anormalidades en el eje hipotálamo-pituitario-adrenal y el sistema nervioso autónomo, vistas como hiporreactividad simpática que podría explicar la fatiga persistente en las pacientes y otros padecimientos asociados a la baja presión arterial como mareo y debilidad. Por otra parte, la hiperreactividad simpática también presente sería la justificación del insomnio y la alteración en el esquema de sueño (Martínez-Lavín, 2001).

Es así como anormalidades en el procesamiento del dolor es lo que presentan las pacientes con síndrome de FM donde influyen diversos factores, algunos se mencionan en la tabla 3.

Tabla 3. Factores que incluyen en el procesamiento anormal de dolor en FM

Mecanismos de sensibilización central

- Respuesta exacerbada a estímulos dolorosos.
- Cambios en el volumen de materia gris. Disminución en el grosor de la corteza cerebral.
- Alteración de las vías ascendente y descendente de inhibición del dolor.
- Menor disponibilidad de receptores a opioides tipo μ , elevados niveles de glutamato y reducidos de GABA en la zona insular.

Mecanismos periféricos

- Cambios en la activación de las células gliales, desencadenamiento de factores proinflamatorios.

Factores músculo-esqueléticos

- Mala condición física y tono muscular.
- Entesopatías, bursitis y tendinopatías.

Alteraciones del sueño

- La interrupción del sueño profundo (etapa 4 NREM) resulta en dolor y fatiga.
- Alteraciones en el sueño disminuyen la habilidad de las pacientes para recuperarse de los estresores psicosociales.

Otros mecanismos

- Falla en eje hipotálamo-hipofisario.
- Ciclo circadiano anormal.
- Bajos niveles de hormona del crecimiento.
- Predisposición familiar (parientes de primer grado son 8.5 veces más propensos a padecer FM y/u otros estados de dolor crónico (Clauw, 2014)).
- Factores psicosociales

Tomada de Moldofsky et al., 1975 en Lawson y Wallace, 2015; Cohen, 2017.

Aunado a lo anterior, las diferentes comorbilidades con las cuales se asocia el síndrome de la FM hacen aún más difícil y complicado establecer un adecuado diagnóstico. En la tabla 4 se describen las principales comorbilidades de esta afección.

Tabla 4. Principales comorbilidades del síndrome de FM.

Fatiga	Síntoma más común asociado a la FM. Aproximadamente 80% de las pacientes con FM también cumplen con los criterios del síndrome de fatiga crónica, que incluye la permanencia de esta característica por al menos seis meses, dolor de articulaciones, dolor muscular y sueño no reparador.
Falta de sueño	La mayoría de las pacientes se quejan por no conciliar sueño reparador durante la noche. Es importante descartar trastornos primarios del sueño, como ocurre en el síndrome de piernas inquietas o apnea obstructiva del sueño.
Desórdenes psicológicos	La FM está asociada comúnmente con ansiedad (13-71%) y depresión (20-80%). Esta relación puede contribuir a un aumento en la severidad de los síntomas físicos debido a una percepción exacerbada del dolor, un menor nivel de actividad y un deterioro en la habilidad para afrontar la enfermedad.
Rigidez	A varias pacientes con FM las aqueja la rigidez matutina. Se sabe que la contracción muscular focalizada y el estiramiento pasivo mejoran la rigidez muscular; por lo que una actividad física limitada podría resultar favorecedora.
Disfunciones cognitivas	Algunas pacientes con FM presentan pérdida de la memoria a corto plazo, dificultad para realizar varias tareas a la vez, poca concentración y disminución de la fluidez verbal.
Síndrome del colon irritable	Cerca del 30-50% de las pacientes con FM tiene síndrome del colon irritable secundario, se sabe que esta asociación podría estar relacionada a la sensibilización central que se presenta en este padecimiento de dolor crónico.
Desórdenes genitourinarios	Aproximadamente 12% de las pacientes que presentan FM corresponden con los criterios de diagnóstico del síndrome uretral femenino, caracterizado por poliuria, dolor uretral, malestar suprapúbico y disuria. La FM también se encuentra relacionada con la cistitis intersticial.

Tomada de Wallace, 1990; Clauw et al., 1997; Park et al., 2001; Fietta et al., 2007; Bennet et al., 2007; Yunus et al., 2008; Hart-Johnson et al., 2012; Henriquez y Peck, 2015 citados en Lawson y Wallace, 2015.

2.2.6 Diagnóstico

La clasificación diagnóstica de pacientes bajo el término de FM, a pesar de haber estado en constante discusión, ha facilitado la realización de ensayos clínicos y estudios epidemiológicos y fisiopatológicos que han permitido avanzar y conocer mejor este padecimiento (Yunus y Maci, 1985; White, 1999 en Inanici y Yunus, 2004). No obstante, la falta de pruebas específicas, la ausencia de signos o síntomas patognomónicos aunado a que parte de la sintomatología se comparte con otras enfermedades relacionadas al dolor crónico, han ocasionado debate entre algunos profesionales de la salud sobre la aceptación de la FM como una enfermedad con una fisiopatología diferenciada (Ehrlich, 2003; Blasco-Serra, 2016).

No existen pruebas específicas de laboratorio, radiográficas o de imagen que puedan confirmar la presencia de este padecimiento y la única anormalidad física que se ha utilizado para diagnóstico es la sensibilidad a la palpación en 11 o más de los 18 puntos sensibles identificados (Fig. 8), aplicando una fuerza de 4 kg en la zona y que la paciente refiera dolor, esta fuerza puede ser aplicada con las manos del examinador hasta que la punta de sus uñas se torne a color blanco o utilizando un instrumento calibrado denominado dolorímetro.

Esta prueba fue utilizada inicialmente para estandarizar la clasificación de pacientes en ensayos clínicos y posteriormente se determinó como uno de los dos criterios de diagnóstico en 1990 por el ACR. A pesar de no ser utilizada exclusivamente para la FM, fue específica y sensible para diferenciar pacientes con FM de pacientes con otras enfermedades reumáticas en un 85%. El segundo criterio se trataba de dolor generalizado en tres o más meses de duración de forma continua, siendo éste en ambos lados del cuerpo y por debajo y hacia arriba

de la cintura, en todo el esqueleto axial (espina cervical, espina torácica, pecho y espalda baja) (Goldenberg, 2009; Arnold et al., 2011).

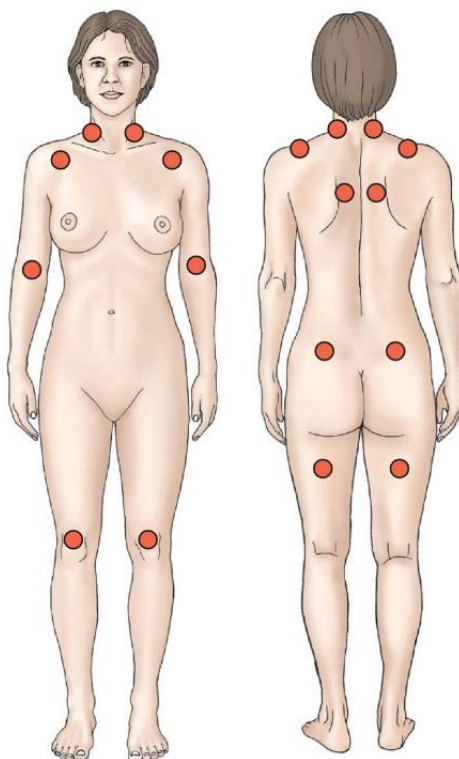


Figura 8. Puntos sensibles a la palpación identificados como criterio de diagnóstico.

Tomada de Farlex Medical Dictionary, 2009.

Debido a que los criterios de 1990 no consideraban las comorbilidades presentes en la FM, Hudson y Pope en 1994 diseñaron criterios que incluían un historial de dolor generalizado de más de tres meses de evolución y cuatro o más de los siguientes síntomas: fatiga generalizada, cefalea, alteraciones en sueño, malestares neuropsiquiátricos, entumecimiento o sensación de estremecimiento e intestino irritable (Goldenberg, 2009).

Como una respuesta a las objeciones hacia aquellos criterios al considerar la subjetividad de los mismos, Wolfe y colaboradores propusieron nuevos criterios de diagnóstico en 2010 con el objetivo de hacerlos más integrales dada la

multiplicidad de esta enfermedad; es decir, que fueran adecuados para aplicarse en la atención primaria y útiles para la evolución longitudinal de las pacientes.

Para ello, en el trabajo publicado por el ACR se diseñaron una escala de severidad de síntomas en FM (Symptom Severity Score-SS por sus siglas en inglés) y un Índice de dolor generalizado (Widespread Pain Index-WPI, por sus siglas en inglés) (Fig. 9). Los nuevos criterios de diagnóstico indican que una paciente padece FM al cumplir con las siguientes condiciones (Ver tabla 5).

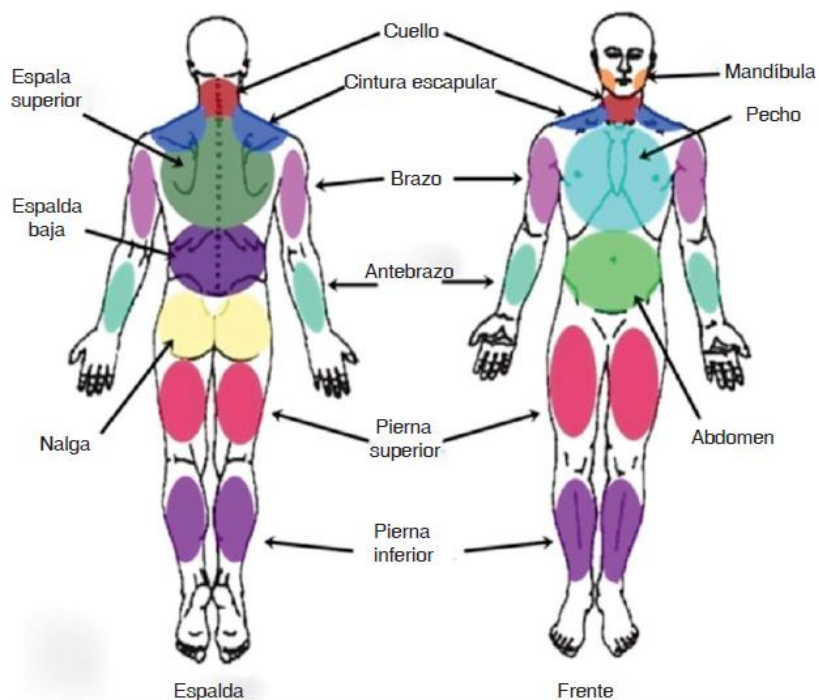


Figura 9. Índice de dolor generalizado.

Tomado de Cobarrubias-Gómez et al., 2016.

Tabla 5. Nuevos criterios de diagnóstico.

Criterios: Una paciente satisface los criterios de diagnóstico de FM al cumplir las tres condiciones siguientes:

Índice de dolor generalizado (WPI) ≥ 7 y puntuación en escala de severidad de síntomas

(SS) ≥ 5 o bien, WPI=3-6 y SS ≥ 9 .

Síntomas presentes al menos durante tres meses.

No presentar alguna otra patología que explique el dolor referido.

Comprobación:

WPI. Registrar el número de zonas en las que las pacientes refieren dolor durante la última semana. La puntuación va desde 0 hasta 19.

Cintura escapular izquierda

Cintura escapular derecha

Brazo superior izquierdo

Brazo superior derecho

Brazo inferior izquierdo

Brazo inferior derecho

Cadera izquierda (nalga, trocánter)

Cadera derecha (nalga, trocánter)

Pierna superior izquierda

Pierna superior derecha

Pierna inferior izquierda

Pierna inferior derecha

Mandíbula izquierda

Mandíbula derecha

Pecho

Abdomen

Espalda superior izquierda

Espalda superior derecha

Cuello

SS Escala de puntuación

Fatiga

Despertar cansado

Síntomas cognitivos

Para cada uno de los tres síntomas anteriores, se indica el nivel de severidad durante la semana pasada, utilizando la siguiente escala:

0. No hay problema

1. Problemas leves o suaves, generalmente leve o intermitente.

2. Problemas considerablemente moderados, a menudo presentes.

3. Problemas graves, generalizados, continuos y que perturban la vida.

Teniendo en consideración que los síntomas son generalmente somáticos*, indicar si la paciente tiene:

Sín síntomas.

Pocos síntomas.

Número moderado de síntomas.

La puntuación de la escala SS es la suma de la severidad de los tres síntomas mencionados más la severidad de los síntomas somáticos en general (0 síntomas= 0

puntos, entre 1-10= 1 punto, entre 11-24= 2 puntos, 25 o más= 3 puntos). La calificación final es entre 0 y 12.

*Síntomas somáticos que se pueden considerar: dolor muscular, síndrome del colon irritable, fatiga/cansancio, debilidad muscular, cefalea, dolor/calambres abdominales, entumecimiento/hormigueo, mareo, insomnio, depresión, estreñimiento, dolor en el abdomen superior, náuseas, nerviosismo, dolor en pecho, visión borrosa, fiebre, diarrea, boca seca, prurito, sibilancias, fenómeno de Reynaud, urticaria, zumbidos en oídos, vómito, acidez estomacal, úlceras orales, convulsiones, resequedad en ojos, dificultad para respirar, pérdida de apetito, erupciones, sensibilidad al sol, dificultad para oír, hematomas, hipersensibilidad al sol, pérdida de cabello, frecuentes ganas de orinar, dolor al orinar y espasmos en la vejiga.

Tomado de Wolfe et al., 2010.

2.2.7 Terapéutica

De la misma forma que es difícil referirse a la FM como una entidad única, tampoco existe una única opción de tratamiento (Montoya, 2011). Las intervenciones multidisciplinarias en el tratamiento de la FM han demostrado ser las más eficaces para la recuperación funcional del individuo, tanto de forma física como psicosocial, así también son las que mantienen los resultados benéficos por mayor tiempo (Rivera et al., 2006). Es decir que el tratamiento debe ser integral, farmacológico y no farmacológico, e incluir al individuo de forma activa; si bien la farmacoterapia puede resultar útil para aliviar algunos síntomas, en general las pacientes no logran una mejoría significativa si no adoptan también las estrategias no farmacológicas.

2.2.7.1 Tratamiento farmacológico

La necesidad clínica insatisfecha, el sufrimiento de las pacientes y los costos socio-económicos son substanciales en la terapéutica. Para unir la brecha entre el entendimiento de la neurobiología del dolor y la falta de éxito en la terapia clínica, es necesario realizar un esfuerzo mayor direccionado al descubrimiento de *targets* para nuevos analgésicos futuros (Scholz y Woolf, 2002). De igual forma, el

abordaje clínico del dolor necesitará ser reevaluado hacia estrategias donde los mecanismos responsables del dolor sean identificados para cada paciente y atacados con tratamientos específicos (modificado de Woolf y Manion, 1999).

El manejo del dolor es complejo y requiere de intervenciones multidisciplinarias y en algunos casos polifarmacia para generar el alivio, mejorar la funcionalidad y la calidad de vida del paciente (Bautista y Chang, 2017). Varios grupos de fármacos distintos de los analgésicos y antiinflamatorios han demostrado ser eficaces contra el dolor crónico, comprobando la variedad de indicaciones terapéuticas que puede tener un mismo medicamento y que puede ser diferente a aquella para la que fue desarrollado.

En la actualidad la Agencia de alimentos y medicamentos de EUA (FDA, por sus siglas en inglés) ha aprobado únicamente tres medicamentos para el tratamiento del dolor en la FM: dos inhibidores selectivos de la recaptura de serotonina y noradrenalina; duloxetina y milnacipram, y un ligando de los canales de calcio $\alpha_2\delta$; pregabalina (Schmidt-Wilcke y Clauw, 2010). Existe una heterogeneidad de medicaciones con efectos centrales cuyo fundamento es la disminución de la actividad de los neurotransmisores excitadores que facilitan la conducción del dolor como el glutamato, y el aumento de la acción inhibitoria de aquellos como NA, 5-HT y el ácido gamma aminobutírico (GABA). La tabla 6 resume los medicamentos mayormente recetados a pacientes diagnosticados con FM en un estudio observacional mexicano realizado en el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán” (INCMNSZ) durante tres años (2005-2008) (Cruz-Franco et al., 2010).

Tabla 6. Medicamentos comúnmente utilizados en la FM.

Medicamento	Dosis (mg)	Casos	Porcentaje
Tramadol	25-450, v.o.	311	27.3
Amitriptilina	25-125, v.o.	176	15.4
Gabapentina	300-2400, v.o.	166	14.6

Paracetamol	750-3000, v.o.	159	13.9
Pregabalina	75-600, v.o.	82	7.2
Morfina	20-90, v.o.	39	3.4
Celecoxib	100-400, v.o.	26	2.3
Carbamazepina	300-800, v.o.	25	2.2
Clonazepam	1-4, v.o.	20	1.8
Dextropropoxifeno	195-390, v.o.	19	1.7
Etoricoxib	60-120, v.o.	19	1.7
Tizanidina	2-4, v.o.	18	1.6
Fluoxetina	20-40, v.o.	9	0.8
Fentanilo (µg)	1400-2800, v.o.	7	0.6
Lorazepam	1, v.o.	6	0.5
Otros		58	5.1
Total		1140	100

Tomado de Cruz-Franco et al., 2010.

Los grupos farmacológicos que han sido estudiados y empleados en la terapéutica de la FM se muestran a continuación. Cabe destacar que en muchos casos la efectividad no es duradera o no ha sido completamente probada (Montoya 2011; Clauw, 2014). (Ver tabla 7).

Tabla 7. Evidencia farmacoterapéutica en estudios clínicos de FM

Fármacos	Mecanismo de acción	Eficacia en:	Efectos adversos	Referencia
A) Antidepresivos y otros moduladores de monoaminas				
Antidepresivos tricíclicos (ATC)				
Amitriptilina Nortriptilina Ciclobenzaprina	Actúan sobre las terminales presinápticas neuronales al bloquear la	Dolor, alteraciones del sueño, fatiga, funcionalidad,	Somnolencia, efectos anticolinérgicos, arritmias.	Schmidt-Wilcke y Clauw, 2010. Kelly y Mauer

	recaptura de 5-HT y NA	cognición.		citados en Lawson y Wallace, 2015.
Inhibidores selectivos de la recaptura de serotonina (ISRS)				
Paroxetina Sertralina Citalopram	Favorecen la presencia de 5-HT en el espacio sináptico	No hay certeza de su efectividad en dolor, trastornos del sueño, fatiga, depresión, tolerabilidad y seguridad	Ganancia de peso, insomnio, disfunciones sexuales, boca seca, náuseas, vómito	Walitt, et al., 2015.
Inhibidores duales de la recaptura de 5-HT y NA (IRSN)				
Duloxetina Milnacipram	Aumentan la concentración de 5-HT y NA en el espacio sináptico	Dolor, rigidez, sensibilidad a la palpación, fatiga	Insomnio, boca seca, cefalea, náusea, diarrea, constipación	Arnold et al., 2007 en Lawson y Wallace, 2015. Schmidt-Wilcke y Clauw, 2010
Inhibidores de la monoaminoxidasa (IMAO)				
Moclobemida Pirlindol	Unión reversible y selectiva a la MAO-A lo que favorece a 5-HT, NA y DA en la neurona presináptica	Dolor, depresión, falta de sueño	Sx serotoninérgico, crisis hipertensivas, náuseas, vómito	Sommer et al., 2008 citado en Schmidt-Wilcke y Clauw, 2010. Tort et al., 2012.

Fármacos serotoninérgicos				
Tropisetron Ondansetron	Antagonistas del receptor 5-HT ₃ . Favorecen la disponibilidad sináptica de 5-HT	Dolor, fatiga, trastornos del sueño, condición general del paciente	Cefalea, dolor abdominal, constipación, diarrea	Hrycaj et al., 1996; Farber et al., 2001; Spath et al., 2004 en Schmidt-Wilcke y Clauw, 2010
Agonistas dopaminérgicos				
Pramipexol Ropinirol Rotigotina Tergurida	Unión a receptores de DA	Dolor, falta de sueño, depresión, sx de piernas inquietas	Ansiedad transitoria, pérdida de peso, compulsividad	Maj et al., 1997. Holman y Myers, 2005 citados en Schmidt-Wilcke y Clauw, 2010
Agonistas α_2 adrenérgicos				
Tizanidina	Unión a receptores α_2 adrenérgicos que incrementa la inhibición presináptica	Espasticidad muscular, dolor crónico, falta de sueño, reducción de SP en LCR	Somnolencia, mareos, bradicardia, hipotensión, boca seca.	Lake y Saper, 2002 citados en Schmidt-Wilcke y Clauw, 2010
B) Anticonvulsivantes, ansiolíticos y sedante-hipnóticos				
Bloqueadores de canales de calcio				
Pregabalina Gabapentina	Unión a la subunidad $\alpha_2\delta$ de los CCVD en terminales nerviosas que impide la	Dolor, alteraciones del sueño	Sedación, mareo, cefalea, ganancia de peso, insomnio, nasofaringitis, irritabilidad	Hauser et al., 2009; Straube et al., 2010 en Schmidt-Wilcke y

	liberación de mediadores inflamatorios, SP y glutamato			Clauw, 2010. Kelly y Mauer en Lawson y Wallace, 2015.
Benzodiacepinas				
Alprazolam Clonazepam	Agonistas del receptor GABA	Sensibilidad a la palpación, sx de piernas inquietas	Depresión, sedación, somnolencia, ataxia, boca seca, mareo	Russell et al., 1991; Wiffen et al., 2000 citados en Schmidt-Wilcke y Clauw, 2010
Sedante-hipnóticos				
Zoplicona Zolpidem	Agonista específico de receptores GABA _A	Trastornos del sueño, fatiga	Confusión, fatiga, cefalea, amnesia, agravamiento del insomnio, mareo	Gronblad et al., 1993; Moldofsky et al., 1996 citados en Russell et al., 1991; Wiffen et al., 2000 citados en Schmidt-Wilcke y Clauw, 2010
C) Agonistas de receptores opioides y fármacos relacionados				
Tramadol	Agonista parcial opioide sobre receptores μ , inhibe la recaptura de 5-HT y NA	Dolor	En algunos pacientes con FM la disponibilidad central de los receptores μ está	Kaneko et al., 2014. Bennett et al., 2003.

			reducida	
D) Cannabinoides				
Nabilona Dronabilona	Unión a receptores CB1 que inhiben la transducción mediada por proteínas G	Dolor, ansiedad,	Somnolencia, vértigo, mareo, boca seca, depresión, ataxia	Skrabek et al., 2008 citado en Schmidt- Wilcke y Clauw, 2010

5-HT: Serotonina, CB1: Receptor cannabinoide tipo 1, CCVD: Canales de calcio voltaje dependientes, DA: Dopamina, LCR: Líquido cefalorraquídeo, NA: Noradrenalina, SP: Sustancia P, Sx: Síndrome.

2.2.7.2 Tratamiento no farmacológico

La terapia no farmacológica es una parte importante del tratamiento para poder manejar la multiplicidad de esta patología, existiendo evidencia de eficacia para diversas intervenciones tales como terapia física, ejercicio aeróbico, terapia cognitivo-conductual y educación a pacientes. Algunas veces las pacientes no se sienten satisfechas del todo y buscan complementar su terapia con otras alternativas como electromagnetismo, acupuntura, meditación, suplementos alimenticios, remedios herbolarios, masajes, etc. que podrían ser prometedoras para tratar el dolor asociado a múltiples condiciones músculo-esqueléticas (Saad y de Medeiros, 2013) (Ver Tabla 8). Sin embargo, la falta de estudios científicos que recomienden o no su uso en pacientes con FM permanece.

Es importante destacar que la capacitación del personal de salud es necesaria para saber generar el abordaje multidisciplinario en el tratamiento del síndrome de FM, para ello la comunicación entre las áreas del centro médico es esencial. En este caso cabe destacar el programa de evaluación psicológica y psiquiátrica en pacientes con FM que desarrolló el Hospital Universitario de Guadalajara que incluye: diagnóstico psicopatológico, prescripción psicofarmacológica, evaluación psicológica, psicoeducación, aprendizaje de técnicas cognitivas para el manejo del dolor, psicoterapia de grupo e individual. Los resultados mostraron mejoría significativa en las escalas de ansiedad,

depresión, percepción del dolor, alteración del sueño, aislamiento social y relaciones emocionales (García-Bardón et al., 2006).

Tabla 8. Evidencia de terapias alternativas en estudios clínicos de FM

Terapia	Eficacia en:	Referencia
Ejercicio físico: Taichi, yoga, caminata, aerobics, ejercicios acuáticos	Dolor, calidad del sueño, estado de ánimo, bienestar, funcionalidad, capacidad cardiorrespiratoria, la capacidad muscular y la flexibilidad o amplitud de movimiento.	Sañudo, et al., 2010. Consejería de Sanidad de España, 2014.
Terapia cognitivo-conductual	Dolor crónico, percepción de la paciente en cuanto a su padecimiento, depresión, malestar emocional.	Mahmood, 2017.
Educación/ Orientación a pacientes	Aumento de la motivación, mayor interacción social, adhesión al tratamiento a mediano-largo plazo.	Consejería de Sanidad de España, 2014.
Aguas termales	Dolor, hipersensibilidad, disfunción física, fatiga, ansiedad, rigidez y conciliación del sueño.	Saad y de Medeiros, 2013.
Meditación	Relajación física y mental, dolor, depresión, funcionalidad.	Astin et al., 2003; Saad y de Medeiros, 2013.

2.2.8 Importancia de los modelos animales en la investigación del dolor

La necesidad de desarrollar tratamientos enfocados a los mecanismos neurobiológicos responsables del dolor existe y es imperante. Para lograr un acercamiento seguro se requiere de la validación de modelos animales que sean capaces de recrear los mecanismos presentes en pacientes humanos. Aunque es

posible generar un comportamiento tipo doloroso en los animales de experimentación, esto no significa que los mecanismos involucrados en el modelo experimental sean idénticos a aquellos encontrados en las pacientes, donde la complejidad, aparición y persistencia del dolor tienden a ser muy diferentes (Scholz y Woolf, 2002).

2.2.9 Modelos experimentales de FM

Los modelos animales deben mimetizar los síntomas y fisiopatología de la enfermedad en cuestión, además es importante que sean predictivos en cuanto a tratamientos efectivos. La FM es un síndrome doloroso único que se diagnostica por la sintomatología y no por la patología subyacente.

Los síndromes de dolor crónico suelen acompañarse de cambios dramáticos en la calidad de vida de pacientes que los padecen, incluyendo desórdenes de atención, memoria, depresión, ansiedad, falta de apetito, de motivación y trastornos del sueño. Por lo que para la relevancia de los modelos experimentales de FM sería de esperarse que ocurrieran cambios equivalentes en estos parámetros en los animales. Generalmente, la evidencia de que ocurran estas alteraciones en ensayos de dolor crónico en roedores es variado (Mogil, 2009).

Diversos modelos animales de FM se han implementado para intentar reproducir el cuadro sintomatológico de pacientes humanos y permitir la obtención de datos anatómico-funcionales que no es posible en los mismos sujetos humanos por razones metodológicas y éticas (Blasco-Serra, 2016). Los principales modelos de FM se basan en cuantificar las respuestas de los animales de experimentación ante la aplicación repetida de estímulos en el músculo o la inducción de estrés combinado con la aplicación de esos estímulos por parte del experimentador, que muchas veces no representan dolor en sí, sino hipersensibilidad (alodinia e hiperalgesia) que frecuentemente acompaña al dolor (Mogil, 2009; DeSantana et al., 2013).

A continuación, se mencionan una serie de modelos animales desarrollados en los últimos años por diversos autores para el estudio de la FM (Tabla 9).

Tabla 9. Modelos animales para el estudio de la FM.

Modelo	Método	Referencia
Hiperalgesia muscular	Inyección de carragenina (0.5-6 mg/kg; i.m.) en tríceps uni/bilateral de ratas macho Sprague-Dawley.	Kehl et al., 2000.
Dolor músculo-esquelético generalizado duradero	Dos dosis i.m. de pH $\leq$ 4.0 de solución salina (NaCl 0.9%) acidificada en el músculo gastrocnemio de ratas macho.	Sluka et al., 2001.
Dolor músculo-esquelético	Inyección de 50 μ L de TNF α (0.1-10 μ g) en el músculo gastrocnemio o en el bíceps de forma bilateral de ratas Sprague-Dawley.	Schäfers et al., 2003.
Hiperalgesia inducida por estrés	<i>Hot plate test</i> (52.5°C por un máximo de 45 s) seguido de la Prueba de nado forzado en ratas macho Sprague-Dawley.	Suárez-Roca et al., 2006.
Depleción de aminas biogénicas	Inyección de reserpina (1 mg/kg; s.c.) disuelta en ácido acético al 0.5% durante tres días consecutivos en ratas Sprague-Dawley de ambos sexos.	Nagakura et al., 2009.
Dolor crónico generalizado	Sometimiento a estrés mediante sonidos impredecibles (5, 11, 15 y 19 kHz, durante 5 o 10 s) a ratas macho Sprague-Dawley.	Khasar et al., 2009.
Estrés por frío intermitente	Estadía en cuarto frío (-3 a +4°C) por tres noches consecutivas y durante los días se alterna con cuarto a temperatura ambiente (24°C) cada 30 min.	Nishiyori et al., 2011.

Modificado de DeSantana, 2013 y Blasco-Serra, 2016.

2.2.10 Herbolaria mexicana

“La medicina tradicional mexicana es un mosaico de piezas procedentes de culturas diferentes que han determinado históricamente el desarrollo de la cultura nacional”. (Jiménez-Silva, 2017) Parte fundamental de esta es la herbolaria mexicana, reconocida como un recurso fundamental para la salud de millones de seres humanos, sobre todo para aquellos que no cuentan con acceso a sistemas de atención sanitaria digna.

Las plantas medicinales generan subproductos de su metabolismo con funciones de protección contra condiciones climatológicas o contra depredadores, sin embargo, estos compuestos químicos también pueden poseer actividades terapéuticas diversas (Shahido et al., 1992 citado en Correa-Roan, 2016). Alrededor del mundo se han hecho grandes esfuerzos para estudiar sus efectos en la salud y elucidar las moléculas responsables de los mismos, así como los mecanismos de acción por los que actúan. Tras años de investigación es posible asegurar que existe información científica sobre sus propiedades medicinales y, en algunos casos, sus acciones toxicológicas. Aunque lo obtenido ha sido importante para reforzar su uso, aún no es suficiente y por ello es necesario seguir indagando en su farmacología.

2.2.11 Productos naturales y FM

Los efectos de Colladeen®, tabletas concentradas en antocianidinas (flavonoides presentes en frutos rojos) y Zostrix®, una crema de capsaicina, fueron recientemente evaluados en FM y se demostró una mejora en síntomas como alteraciones del sueño e hipersensibilidad respectivamente, pero no en cuestiones como el dolor. Diversos grupos de investigación han estado en búsqueda de productos (de origen vegetal principalmente) con potencial actividad terapéutica en la FM como aceites esenciales, extractos de plantas medicinales, terpenos, sapogeninas, flavonoides y alcaloides (Guedes-Brito et al., 2018).

El uso y la efectividad de los productos naturales se mantienen en parte por sus múltiples blancos terapéuticos disponibles y porque poseen mecanismos de acción similares a los de la farmacoterapia convencional (Woodbury y Leung en Lawson y Wallace, 2015). En la tabla 10 se muestran algunos de los productos naturales que han sido probados como alternativa terapéutica en el modelo de FM de inyección salina acidificada (preclínica) y en ensayos de investigación clínica (Sluka et al., 2001).

Tabla 10. Estudios realizados con productos naturales en el tratamiento de FM.

Producto natural	Dosis/vía	Tipo de estudio	Mecanismo molecular	Referencia
Aceites esenciales				
<i>Hyptis pectinata</i>	0.3 mg/ml (5%); s.c. Ratones SW macho.	Preclínico	Opioide, serotoninérgico, colinérgico, reducción de sustancia P, relacionado a la vía descendente del dolor	Quintans-Junior et al., 2017.
<i>Ocinum basilicum</i>	25, 50, 100 mg/kg; p.o. Ratones SW macho.	Preclínico	Opioide, glutamatérgica, receptor TRPV1, reducción de sustancia P, relacionado a la vía descendente del dolor	Nascimento et al., 2015.
O24® (Mezcla de aceites esenciales)	No se describe	Clínico	Estimulación de fibras A β , inhibición de bradicinina, histamina y prostaglandinas	Ko et al., 2007.
Extractos de plantas medicinales				
<i>Phyllanthus amarus</i> , <i>Phyllanthus fraternus</i>	400 mg/kg; i.p. Ratas Wistar macho.	Preclínico	Opioide	Chopade y Sayyad, 2014.
<i>Ginkgo</i>	200 mg/día;	Clínico	Antioxidante	Lister et al.,

<i>biloba</i>	p.o.			2002.
Terpenos				
Linalol	25 mg/kg; p.o. Ratones SW macho.	Preclínico	Opioide, glutamatérgico y bloqueador de excitabilidad neuronal	Nascimento et al., 2014.
Citronelal	50 mg/kg; p.o. Ratones SW macho.	Preclínico	Opioide, glutamatérgico, receptor TRPV1, reducción de sustancia P, relacionado a vía descendente del dolor, bloqueo de canales de sodio	Santos et al., 2016.
α -Terpineol	25, 50, 100 mg/kg; p.o. Ratones SW macho.	Preclínico	Opioide, serotoninérgico, glutamatérgico, receptor TRPV1, reducción de sustancia P, relacionada a la vía descendente del dolor.	Oliveira et al., 2016.
β -cariofileno	10, 20 mg/kg; p.o. Ratones SW macho.	Preclínico	Opioide y cannabinoide	Quintans-Junior et al., 2016.
Saponinas				
Acetato de Hecogenina	20 mg/kg Ratones SW macho.	Preclínico	Opioide, sustancia P, canales de K ⁺ sensibles a ATP relacionado a la vía descendente del dolor.	Quintans et al., 2016.
Alcaloides				
Capsaicina	0.075% (3 veces al día); tópico	Clínico	Receptor TRPV1 y reducción de sustancia P	Casanueva et al., 2013.

Tomado de Guedes-Brito et al., 2018.

2.2.12 *Tilia americana* var. *mexicana*

Tilia americana variedad *mexicana* conocida popularmente como: tila, flor de tilia, tilio, cirimo, jonote, tzirimo o sirimu es una variedad endémica de México en peligro de extinción (NOM-059-SEMARNAT-2010) perteneciente a la familia *Tiliaceae*, que comprende aproximadamente 50 géneros con 450 especies. Se caracteriza por ser árboles de hasta 35 m de altura y un metro de diámetro (Fig. 10) (Valdés-Ruíz, 2017). Bush (1929) describió 15 especies de *Tilia* en México basadas en la morfología de sus hojas. Las Tilias mexicanas están distribuidas en 14 estados de la república, desde el norte de Chihuahua y Coahuila hasta el sur de Guerrero y Oaxaca específicamente en las regiones de bosque de montaña baja (Aguirre-Hernández et al., 2009). Se ha observado que en el periodo de abril a junio hay un aumento en la comercialización de las inflorescencias de esta especie, vendidas mayoritariamente en los mercados donde en ocasiones se mezclan con otras especies como *Ternstroemia pringlee* (Theaceae), que también es conocida como Tilia (Pérez-Ortega et al., 2008).



Figura 10. Árboles de *Tilia americana* var. *mexicana*.

Tomada de Naturalista, 2019.

2.2.12.1 Usos de *Tilia* en la medicina tradicional

El té de tila es comúnmente utilizado por sus propiedades tranquilizantes para tratar padecimientos relacionados al SNC como ansiedad, insomnio y cefaleas. Las flores y frutos también son utilizadas para tratar espasmos de colon, cólicos menstruales, reumatismos, hipertensión y como emoliente (Argueta et al., 1994 en Noguerón-Merino et al., 2015).

2.2.12.2 Estudios farmacológicos y análisis fitoquímico

Como parte de los estudios farmacológicos preclínicos llevados a cabo con esta planta, se ha determinado el efecto ansiolítico de los extractos acuoso, metanólico, de acetato de etilo y hexánico de las inflorescencias. Así también se declaró que los extractos metanólico y acuoso disminuyeron la intensidad de las convulsiones inducidas por pentilentetrazol en ratones (Cárdenas-Rodríguez et al., 2014). Por otra parte, los extractos metanólico y hexánico de *Tilia* aumentaron el efecto sedante-hipnótico inducido por pentobarbital (Pérez-Ortega, 2008; Aguirre-Hernández, 2010).

Con relación a su efecto antinociceptivo, se reportó el efecto tipo analgésico de los extractos acuoso, metanólico y hexánico, además del de quercetina en un modelo de dolor inflamatorio por artritis, así como en la prueba de la formalina. En este estudio también se probó el mecanismo de acción, obteniendo resultados relacionados a las vías opioide y serotoninérgica (Martínez et al., 2009).

Se sabe que los flavonoides son los metabolitos secundarios que caracterizan al género *Tilia*. Un estudio fitoquímico mostró la composición de los extractos polares de muestras de *Tilia americana* var. *mexicana* obtenidas de Michoacán, Hidalgo y Veracruz donde se destacó la presencia de flavonoides derivados de quercetina y canferol (canferitrina, quercetina, isoquercetina, quercitrina, isoquercitrina, astragalina, rutina, tilirósido, entre otros) quienes pudieran ser los responsables del efecto sedante y tipo ansiolítico observado (Aguirre-Hernández, 2010).

2.2.12.3 Interacciones farmacológicas

Las interacciones farmacológicas se reflejan como el aumento o disminución en la respuesta farmacológica que produce un fármaco en presencia de otro o de un extracto o fracción de una planta medicinal u otro producto natural. Debido a que el uso de terapias combinadas es una práctica común en la población es necesaria la evidencia científica que muestre si las interacciones son de tipo sinérgicas (potenciación o suma) o antagónicas, esto se traduce en los beneficios o perjuicios que pudieran ocasionar a las pacientes.

El trabajo de Valdés-Ruíz (2017) mostró que la interacción del extracto metanólico de inflorescencias de *Tilia americana* var. *mexicana* con diclofenaco no potenció la actividad antinociceptiva en el modelo de estiramiento abdominal, pero sí fue capaz de reducir el daño gástrico inducido por el fármaco cuando se administró de manera crónica. Por otra parte, un estudio describió la interacción de una fracción estandarizada de flavonoides procedente de *Tilia americana* var. *mexicana* con fármacos serotoninérgicos en el modelo de cruz elevada, se determinó que ambos actúan por mecanismos similares, en parte el efecto ansiolítico de la fracción se vio disminuido al combinarlo con esa farmacoterapia. Cabe mencionar la importancia de avanzar en el estudio de los probables mecanismos de acción, utilizando otras técnicas, tales como el análisis *in vitro* que mida la expresión molecular de ciertos mensajeros químicos envueltos en la vía fisiopatológica (Noguerón-Merino et al., 2015).

2.2.13 Flavonoides

Los flavonoides son un grupo de cerca de 4000 diferentes compuestos polifenólicos, cuyo elemento estructural común es un esqueleto de difenilpirano (C6-C3-C6), compuesto por dos anillos de fenilo (A y B) ligados a través de un anillo (C) de pirano (Fig. 11). Sobre este esqueleto pueden darse múltiples sustituciones, lo que origina las diferentes categorías de flavonoides: flavonoles, flavonas, catequinas, flavanonas, antocianinas, chalconas, isoflavonas, entre otros. Están presentes en gran variedad de especies de plantas. Son

componentes importantes en la dieta humana al encontrarse en las frutas y verduras que consumimos; bebidas como el café, vino tinto, té y cerveza los contienen en grandes cantidades. Los flavonoides tienen gran variedad de efectos biológicos sobre numerosos sistemas celulares de los mamíferos tanto *in vivo* como *in vitro*. Se ha demostrado su actividad antimicrobiana, antiviral, antiulcerogénica, citotóxica, antineoplásica, mutagénica, antiinflamatoria, antioxidante, antihepatotóxica, antihipertensiva y antiplaquetaria (Guardia et al., 2001; Filho et al., 2008). Específicamente se han evaluado sus propiedades antinociceptivas en diversos modelos animales de dolor y los resultados obtenidos han sido positivos.

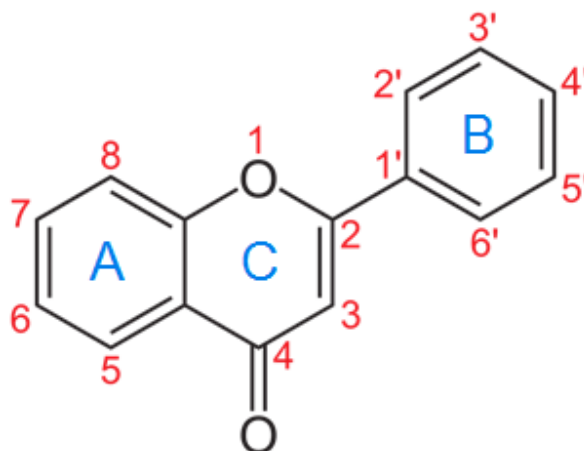


Figura 11. Estructura química base de los flavonoides.

Tomada de Wikipedia, 2019.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El dolor es un problema de salud pública que influye de manera importante en la funcionalidad y calidad de vida de quien lo padece (Correa-Roan, 2016). Al ser crónico generalizado y característica principal del síndrome de FM, éste se vuelve de principal interés para la búsqueda de alternativas de terapéutica. Considerando que los fármacos utilizados como tratamiento para la FM no son

completamente eficaces y generan diversos efectos adversos, ello exige el continuo desarrollo de investigaciones para evaluar posibles alternativas terapéuticas que respondan a las necesidades actuales de este padecimiento.

La herbolaria como parte de la medicina tradicional es utilizada para tratar diversos padecimientos que incluyen dolor. Su práctica es una opción para la población con falta de acceso a sistemas de salud o por la creencia popular de que al ser de origen natural resultará menos dañina al cuerpo humano.

En el caso de la FM se ha reportado que la mayor evidencia de eficacia para su alivio se obtiene con la aplicación de terapia holística, la cual combina la intervención farmacológica (analgésicos, antidepresivos, ansiolíticos, entre otros) con la no farmacológica (ejercicio aeróbico, terapia cognitivo-conductual, educación al paciente) (Rivera et al., 2006). En la población existe una alta posibilidad de que las pacientes combinen el tratamiento farmacológico con la ingesta de infusiones de plantas medicinales. Por lo tanto, resulta de interés el contar con los resultados de investigaciones que den evidencia del tipo de interacción que se puede obtener, ya sea en beneficio o perjuicio para las pacientes al utilizar estas combinaciones (Valdés, 2017). Por lo que en el presente trabajo se elaboró un diseño experimental para evaluar no sólo el extracto que se puede obtener con una infusión o una tintura, sino además una fracción con mayor contenido de sustancias bioactivas atribuidas a las propiedades terapéuticas de *Tilia americana* var. *mexicana*; la cual fue además valorada en combinación con dos fármacos, tramadol (analgésico) y pramipexol (antidepresivo), utilizados en la clínica para el tratamiento de la FM.

4. HIPÓTESIS

El extracto metanólico de las inflorescencias de *Tilia americana* var. *mexicana* y su fracción concentrada en flavonoides, sola o en combinación con tramadol o pramipexol, producirán efectos antialodínicos y antihiperálgésicos en el modelo de fibromialgia inducida por reserpina en ratas

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Evaluar el efecto del extracto polar de las inflorescencias de *Tilia americana* var. *mexicana* y su fracción concentrada en flavonoides sola y en combinación con los fármacos de la clínica, tramadol y pramipexol, en las conductas de hiperalgesia y alodinia en el modelo de fibromialgia inducida con reserpina en ratas.

5.2. Objetivos particulares

- Fraccionar el extracto metanólico de inflorescencias de *Tilia americana* var. *mexicana* mediante cromatografía en columna abierta para separar las fracciones ricas en flavonoides.
- Analizar por cromatografía de capa fina y cromatografía de líquidos de alta resolución la presencia de flavonoides en el extracto y la fracción de *Tilia*.
- Evaluar el efecto de las fracciones de alta polaridad en el modelo de FM inducida con reserpina en ratas.
- Construir una ventana de actividad biológica de la fracción de flavonoides activa en el modelo de FM inducida con reserpina en ratas.
- Determinar el tipo de interacción farmacológica (sinergismo o antagonismo) de la combinación de dosis subefectivas de la fracción de flavonoides y los fármacos pramipexol y tramadol en el modelo de FM inducida con reserpina en ratas.
- Evaluar el efecto tipo antidepresivo de la fracción de flavonoides en el modelo de FM inducida con reserpina en ratas.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Fármacos y reactivos químicos

- Reserpina grado reactivo (SIGMA-ALDRICH)
- Quercetina 95% grado reactivo (SIGMA-ALDRICH)
- Hidrato hidrocólico de pramipexol grado reactivo (SIGMA-ALDRICH)
- Tramadol (AMSA)
- Acetato de etilo grado técnico (JT BAKER)

- Acetona grado técnico (JT BAKER)
- Ácido acético glacial grado técnico (MERCK)
- Hexano grado técnico (JT BAKER)
- Metanol grado técnico (JT BAKER)
- Metanol grado HPLC (SIGMA-ALDRICH)
- Sílica gel 60 (0.063- 0.200 mm) (MERCK)
- Tween 80 (SIGMA-ALDRICH)

6.2 Equipos

- Cromatógrafo de líquidos Acquity UPLC H-Class (Waters). Software Empower 3.
- Balanza analítica (Sartorius BL 210S).
- Analgesímetro (Randall-Selitto test Modelo 37215, Hugo Basile, Italia).
- Rotaevaporador BUCHI R-210.
- Báscula Tefal OPTISS Modelo 5280.
- Filamentos de VonFrey (North Coast medical, EUA)
- Cilindro rotatorio ROTA-ROD (Panlab, EUA).
- Micropipetas Labpette de diferentes capacidades (Labnet)
- Cilindro de acrílico (30 cm largo x 6.2 cm diámetro).
- Cronómetro (Daigger).
- Vortex Genie 2 (Daigger).
- Aplicador de acetona (jeringa BD-Plastipack con adaptación).
- Jeringas y agujas de diferentes capacidades (BD-Plastipack).
- Rejilla metálica y malla de acero inoxidable.

6.3 Diseño experimental

6.3.1 Análisis fitoquímico.

6.3.1.1 Material vegetal

La colecta del material vegetal *Tilia americana* var. *mexicana* (Schltdl.) Hardin (Tiliaceae) se realizó en agosto del 2017 en Morelia, Michoacán (Voucher No. FCME131611), la identificación de la especie fue realizada por el botánico José Luis Contreras; un espécimen fue colocado en el herbario de la Facultad de Ciencias de la UNAM. Las inflorescencias de la planta (Fig. 12) se separaron de las brácteas y hojas y se dejaron secar a la sombra a temperatura ambiente para posteriormente ser trituradas en un molino manual.



Figura 12. Inflorescencias de *Tilia americana* var. *mexicana*.

Tomada de CONABIO, 2019.

6.3.1.2 Preparación del extracto

Las inflorescencias se maceraron en hexano por tres días para desgrasarlas, posteriormente se filtró el material y se concentró en un evaporador rotatorio, el procedimiento se repitió tres veces. El residuo vegetal se dejó secar y entonces se colocó en acetato de etilo y posteriormente en metanol siguiendo el mismo procedimiento de tres maceraciones sucesivas con el volumen de disolvente necesario para cubrir el material vegetal. De lo anterior, tres extractos crudos se

obtuvieron siendo de mayor rendimiento los de mediana y alta polaridad (Gilbón y Soria, 2018).

6.3.1.3 Fraccionamiento por Cromatografía en Columna Abierta (CCA)

A partir de 15.3 g del extracto metanólico de inflorescencias de *T. americana* var. *mexicana* se realizó el fraccionamiento en columna abierta. Para impregnar la muestra en sílica gel se utilizaron 30 mL de la mezcla acetona:metanol 7:3. Previo a empacar la columna, la sílica gel fue desactivada al 10% con agua destilada, esto con el fin de reducir la afinidad de los grupos silanoles con aquellos compuestos muy polares. Se utilizaron 500 g de sílica gel (MERCK) para preparar el punto de aplicación. El volumen muerto necesario para la hidratación de la sílica gel fue de 1100 mL de hexano. Cabe destacar que 4.6 g de precipitados no pudieron ser fraccionados por este procedimiento debido a su nula solubilidad en acetona:metanol 7:3, por lo que no fueron considerados en el rendimiento final.

De la cromatografía en columna por gradiente de disolventes de menor a mayor polaridad se obtuvieron 21 subfracciones de 550 mL. La evaporación de los disolventes con el rotaevaporador (BÜCHI) permitió concentrarlas para realizar la cromatografía en capa fina que a su vez permitió reunir las que mostraron un perfil cromatográfico equivalente (Fig. 13).

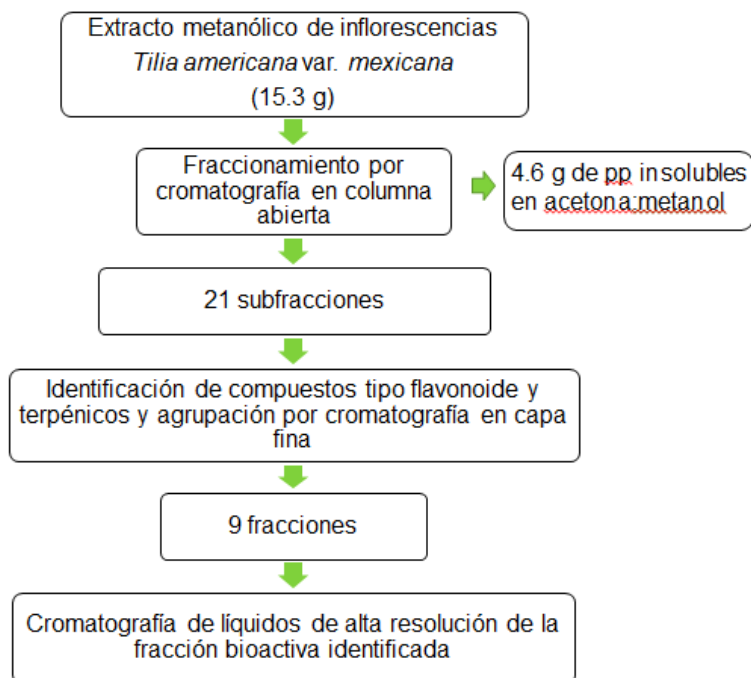


Figura 13. Diagrama del análisis fitoquímico experimental.

6.3.1.4 Identificación de compuestos por Cromatografía en Capa Fina (CCF)

En esta técnica de identificación de compuestos se utilizaron distintos sistemas de elución que permitieran una nítida separación de los componentes de las subfracciones observados como manchas de colores en varios cromatofolios que, tras ser revelados con el revelador de productos naturales (compuesto por una solución de 2-aminoetildifenil borinato en metanol al 1% m/v y una solución de polietilenglicol en etanol al 5% m/v), y observados con una lámpara de luz UV a una longitud de onda de 365 nm, fueron agrupadas por semejanza como las fracciones AB, C, 11, D, E, F, 18 y G.

La coloración rojiza-anaranjada observada tras el revelador de productos naturales es característica de la presencia de flavonoides, por lo que se sugirió que la fracción **F** contenía compuestos de este tipo, se decidió realizar una hidrólisis ácida, que corroborara que las agliconas de las cuales derivaban los flavonoides presentes eran quercetina y canferol (Martínez et al., 2009). Para ello se tomó una muestra de 20 mg en un matraz bola, se adicionaron 5 mL de metanol y se colocó

en agitación vigorosa y calentamiento, esto para promover la solubilidad, posteriormente se agregaron 300 µL de HCl concentrado y 2 mL más de metanol. Al matraz se le adaptó un refrigerante y la mezcla de reacción se puso en calentamiento a reflujo. Esto se mantuvo durante tres horas. Luego del seguimiento de la reacción, se procedió a extraer los metabolitos a través de extracción líquido-líquido. La solución del crudo de reacción se concentró a través del rotaevaporador y a ésta se le adicionaron 25 mL de agua Milli-Q, después se colocó en un embudo de separación y se realizaron tres extracciones con 30 mL de acetato de etilo cada una. Se reunieron las fases orgánicas que se secaron con Na₂SO₄ anhidro. Por último se concentraron en el rotaevaporador. El sólido resultante se redisolvió con metanol y se observó la precipitación de un sólido blanquecino (12.2 mg). De la solución obtenida se decidió realizar una CCF para comparar, la materia prima (MP), el producto y el estándar de quercetina (única aglicona con la que se llevó a cabo la comparación).

6.3.1.5 Identificación por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR)

Tanto el extracto metanólico de inflorescencias (10 mg/mL) como su fracción **F** (5 mg/mL) se inyectaron al cromatógrafo de líquidos para conocer su perfil cromatográfico y analizar el número y tipo de flavonoides en comparación con los estándares disponibles (rutina, quercitrina, isoquercitrina y quercetina) (1 mg/mL) para comparar sus correspondientes tiempos de retención y máximos de absorción. Se utilizó el método de fase reversa; se empleó la columna Symmetry® C-18 (150 mm) con un modo de elución de tipo gradiente (fase móvil agua Milli-Q acidificada con ácido fosfórico 0.1% y MeOH 80:20 a 100 MeOH y finalmente agua Milli-Q acidificada:MeOH 80:20 en 12 min.), con una velocidad de flujo de 1 mL/min. La longitud de onda utilizada para la detección de compuestos fue de 254 nm. Todas las muestras se disolvieron en metanol grado HPLC y se filtraron a través de una membrana Acrodisc® de 0.22µm de espesor antes de ser inyectadas al cromatógrafo.

6.3.2 Análisis farmacológico

6.3.2.1 Animales

143 Ratas Wistar machos (21) y hembras (122) (cuya fase del ciclo estral no fue determinada) (200-300 g de peso corporal) fueron obtenidas del bioterio del Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz y mantenidas en condiciones controladas de temperatura ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$) e iluminación, con ciclos de luz/oscuridad de 12 horas, libre acceso al alimento estándar y agua purificada (Fig. 14). El mantenimiento y cuidado de los animales se efectuó de acuerdo con la NOM-062-ZOO-1999 y la aprobación del comité de bioética institucional (Registro No. CONBIOETICA-09-CEI-010-20170316). Así como siguiendo las especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, 2001).



Figura 14. Ratas Wistar.

(Quinto Ortiz, 2019).

6.3.2.2 Modelo experimental

Previo al inicio de la inducción de la mialgia por reserpina, se realizó la habituación de los animales, ello con el propósito de evitar falsos positivos en la evaluación de las conductas nociceptivas y obtener datos confiables y reproducibles. Estas condiciones experimentales incluyeron colocar a las ratas dentro de un cilindro de acrílico (30 cm altura x 6.2 cm diámetro) para su libre exploración por 30 minutos

cada día. También se consideró el familiarizarlas al ruido del analgesiómetro “Randall-Sellito” (Ugo-Basile) y que manifestaran la habilidad de mantener la extremidad posterior derecha inmóvil, sin retirarla de la posición en la que se les colocaba.

El modelo experimental de FM que se utilizó fue el descrito por Nagakura et al. (2009) y modificado por Hernández-Leon et al. (2018). Éste consiste en la administración de reserpina disuelta en ácido acético al 0.5% diluido con agua destilada (Milli-Q), la cual fue administrada (1 mg/kg, vía s.c.) cada 24 horas durante tres días consecutivos. En el trabajo de Hernández-Leon et al. (2018) se reportó que la administración de reserpina afectó de igual forma a ratas macho y hembra, las cuales, previo al tratamiento con este fármaco, se seleccionaron arbitrariamente en todas las fases del ciclo estral. La reserpina interrumpió el ciclo estral normal y provocó que todas las ratas hembra entraran en las fases de metaestro/diestro, caracterizadas por bajos niveles de estradiol, hormona reguladora de la percepción del dolor.

En la figura 15 se indica la línea del tiempo que describe de qué forma en los días de trabajo se establecían las actividades de adaptación y manipulación de los animales, la inducción del dolor tipo FM y, cinco a siete días posteriores a la última administración de reserpina, la sesión de evaluación de las conductas de hiperalgesia y alodinia en presencia de los tratamientos (Hernández-Leon et al., 2018).

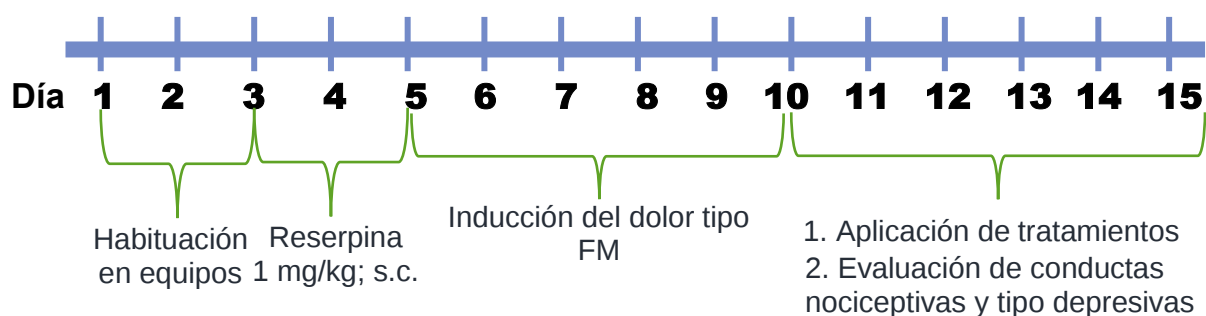


Figura 15. Línea del tiempo en el que se desarrolló el modelo experimental

6.3.2.3 Grupos experimentales

Los animales fueron inducidos de manera individual e independiente separados en cajas de acrílico desde su primera administración de reserpina, los grupos por tratamiento constaron de una $n \geq 6$ cada uno.

Para construir la ventana de actividad biológica del extracto metanólico de *Tilia* y de la fracción identificada con la letra **F** se evaluaron las dosis de 10, 30, 100 y 300 mg/kg, i.p. en el caso de la fracción. El flavonoide quercetina se utilizó como flavonoide de referencia en una dosis de 562 mg/kg, i.p. resuspendida con 50 μ L de Tween 80 (Sigma) y agua destilada (Milli-Q). Los fármacos de la clínica que se evaluaron fueron tramadol (3 y 10 mg/kg, vía i.p.) y pramipexol (0.01, 0.1, 0.5 y 1 mg/kg, vía s.c.). Para conocer el tipo de interacción farmacológica entre producto natural y fármaco se realizaron combinaciones de la fracción con flavonoides y los fármacos de la clínica seleccionando las dosis mínimas efectivas de cada uno. Las combinaciones probadas fueron: Fracción F (10 mg/kg, i.p.) + tramadol (3 mg/kg, i.p.), Fracción F (10 mg/kg, i.p.) + pramipexol (0.1 mg/kg, s.c.). El esquema de la figura 16 describe el diseño experimental.

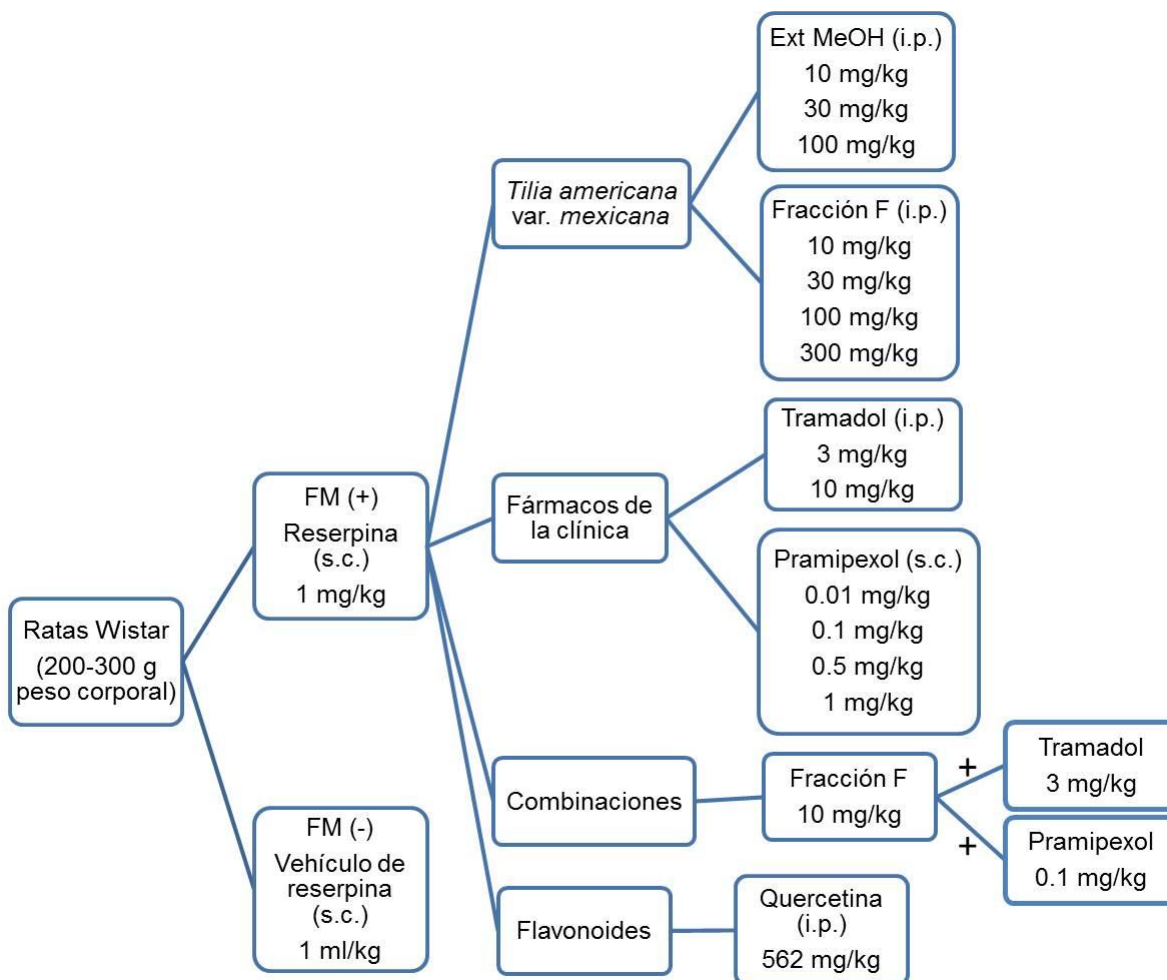


Figura 16. Diseño experimental de la interacción farmacológica en el modelo experimental de FM

6.3.2.4 Evaluación de conductas nociceptivas

La evaluación de las conductas nociceptivas que establecieron el estado de las ratas con dolor tipo FM se realizó previamente a la aplicación de los tratamientos, lo anterior con la finalidad de confirmar la enfermedad de acuerdo con lo descrito para el modelo (Nagakura et al., 2009; Hernández-Leon et al., 2018). Ello se caracterizó por hiperalgesia (umbral de presión muscular, <150 g fuerza soportados) y alodinia (umbral de respuesta táctil, <7 g soportados; y al estímulo frío, >3 s como tiempo invertido en lamidas y sacudidas). Los tres umbrales fueron medidos al inicio y se tomaron como el t=0 de los valores basales, enseguida se

midieron cada 30 min durante cuatro horas para construir las curvas de curso temporal.

- **Umbral de presión muscular**

Las ratas se enrollaron con una franela para inmovilizarlas, posteriormente la extremidad posterior derecha se expuso y se colocó en medio del transductor del analgesímetro Randall-Sellito (Ugo-Basile) para ejercer presión en el músculo gastrocnemio de la rata que fue registrada en gramos (Fig. 17). La retirada de la pata de la rata o la vocalización se tomó como la respuesta para registrar el máximo de gramos de fuerza que soportó el animal. El máximo de fuerza mecánica aplicada tuvo un corte de 250 g, para evitar dañarla en caso de que la rata no retirara su pata ni vocalizara (Schäfers et al., 2003). El valor para este umbral se calculó como el promedio de tres mediciones con un intervalo de al menos un minuto entre cada una.



Figura 17. Rata en el analgesiómetro durante la prueba de hiperalgesia muscular.
(Quinto Ortiz, 2019)

- **Umbral de respuesta táctil**

Para la conducta de alodinia se siguió el método de “up-down” (Chaplan et al., 1994), el cual está diseñado para determinar la fuerza mecánica requerida para ocasionar que al menos el 50% de los animales responda con el retiro de la

extremidad (Deuis et al., 2017). Los roedores se colocaron dentro de los cilindros de acrílico para su exploración espontánea. Estos estaban colocados en una malla metálica que permitió exponer el centro de la superficie plantar de la extremidad posterior derecha de cada rata. Lo anterior para aplicar de forma perpendicular los filamentos de Von Frey (North Coast Medical) de gramaje conocido (2, 4, 6, 8, 10 y 15 g, equivalentes a 4.31, 4.56, 4.74, 4.93, 5.07 y 5.18 N, respectivamente) en un tiempo máximo de seis segundos de aplicación del estímulo (Fig. 18).



Figura 18. Filamento de Von Frey utilizado para medir la alodinia táctil.
(Quinto Ortiz, 2019).

La prueba inició con el primer filamento, si el individuo no presentó respuesta se denotaba como (O), entonces se aplicaba el siguiente filamento en incremento de gramaje. Si en el primero se presentaba respuesta, entonces se registraba como (X) y se aplicaba el filamento anterior en gramaje menor. Esto continuó hasta obtener seis lecturas en cada caso, siempre y cuando la respuesta fuera positiva. La respuesta se consideró positiva si el animal mostraba algún comportamiento incluyendo lamidas, sacudidas o la retirada de la extremidad, ya sea durante la aplicación del estímulo o inmediatamente después que el filamento se apartaba. La conducta se consideró negativa si no se observaba ninguna de las conductas anteriores. El patrón de respuesta se integró con la fórmula de Dixon (1980), lo que permitió calcular los gramos que soporta la rata en la prueba de

alodinia mecánica. Las seis respuestas del umbral de respuesta táctil registradas se utilizaron para el cálculo óptimo del 50% del umbral de retirada con la fórmula:

$$50\% \text{ umbral (g)} = 10^{(x+kd)}/10^4$$

Donde x= el valor del último filamento de Von Frey utilizado (unidades logarítmicas), k= valor de tablas de acuerdo con el patrón de respuestas, d= aumento promedio (unidades logarítmicas) entre los filamentos de Von Frey (Deuis et al., 2017).

- **Umbral de respuesta a estímulo frío**

La alodinia al estímulo frío se llevó a cabo de acuerdo con lo descrito por Choi et al. (1994). En esta prueba, los animales se encuentran dentro del cilindro de acrílico para realizar exploración espontánea. Estos se encontraban colocados sobre una malla metálica que permitió la exposición del centro de la superficie dorsal de la extremidad posterior derecha de la rata, donde se aplicaron 60 µL de acetona (JT BAKER) con una jeringa de 1 ml con adaptador para goteo. Inmediatamente se registraron las conductas de lamida y sacudida que realizaba el animal durante un minuto (Fig. 19). El valor de alodinia térmica para este umbral se calculó como la media de tres mediciones, con al menos un intervalo de tres minutos entre cada una.



Figura 19. Rata lamiéndose la extremidad posterior en la prueba de alodinia térmica.
(Quinto Ortiz, 2019)

6.3.2.5 Evaluación de conductas tipo depresivas

Debido a que la depresión es una de las comorbilidades más comunes en el síndrome de FM (Wolfe, 2009), en esta investigación fue de interés evaluar si la fracción concentrada en flavonoides poseía actividad tipo antidepresiva. Para ello, se realizó la prueba de nado forzado (Porsolt et al., 1978), la cual es uno de los ensayos más comúnmente utilizados para el estudio de comportamiento tipo depresivo en roedores. La prueba se basa en generar aversión en el animal, al introducirlo en un contenedor con un nivel de agua que no le permite apoyarse en el fondo, de tal manera que el animal flota. Primeramente, el roedor hace esfuerzos para escapar, pero eventualmente muestra conducta de inmovilidad que es considerada como una medida de comportamiento de desesperanza (Yankelevitch-Yahav et al., 2015).

- **Prueba de nado forzado**

Para este ensayo los animales se colocaron en un estanque cilíndrico (42 cm largo x 20 cm diámetro), el cual contenía un volumen suficiente de agua (25 ± 2 °C) para que la cola del animal no tocara la base del estanque (Cryan et al., 2005; Yankelevitch-Yahav et al., 2015), la duración del nado fue de 5 min y fue videograbada. Entonces, los tiempos de nado, escalamiento o inmovilidad (Fig. 20) se registraron para cada rata mediante la técnica simple de muestreo. En este

ensayo se realizó una pre-prueba 24 horas previas a la sesión de prueba, en la cual la rata se colocó en el cilindro de nado durante 15 min. Esto con el objetivo de asegurar que el roedor adquiriera rápidamente la postura inmóvil el día de la prueba y facilite la observación del efecto del tratamiento (Slattery y Cryan, 2012).

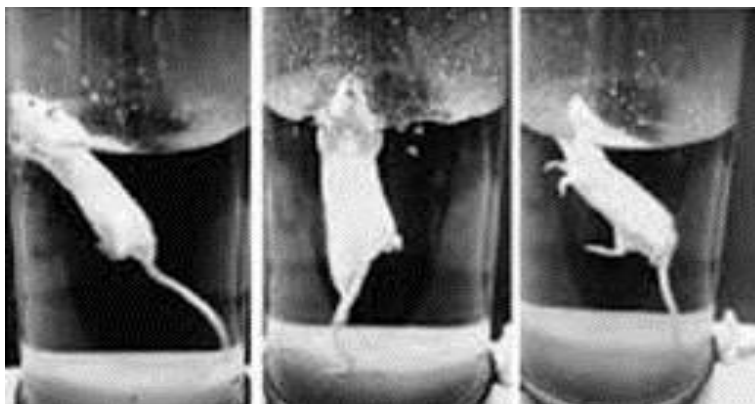


Figura 20. Prueba de nado forzado.

Tomada de Docplayer, 2019.

Los animales que se utilizan para esta prueba fueron inducidos con FM evaluando los umbrales de hiperalgesia y alodinia para poder clasificar a un animal como enfermo. La prueba de nado forzado fue antecedida por la evaluación de la actividad ambulatoria y la coordinación motora. Dada la importancia de la sensibilidad a la palpación o presión muscular en el dolor generalizado de pacientes con FM (Ablin et al., 2008) se decidió realizar la evaluación de conductas tipo depresivas al tiempo en el cual se apreciaba un máximo efecto para los tratamientos de interés de acuerdo con el curso temporal del umbral de hiperalgesia (prueba de presión muscular).

- **Actividad ambulatoria**

La actividad locomotriz de los animales en experimentación es importante para la prueba de nado forzado. Ésta confirma la presencia o ausencia de actividad sedante para evitar falsos positivos en la prueba de nado y permite asegurar que la disminución del tiempo invertido en la conducta de inmovilidad se debe al efecto tipo antidepressivo que genera el tratamiento evaluado y no a un efecto sedante

(Tatem et al., 2014). Se ha sabe que la inducción de las ratas a estímulos que influyan en su ambiente emocional, como ocurre con la reserpina al depletar las aminos biogénicas a nivel SNC, tiene una correlación negativa con su actividad ambulatoria, la cual se estima con la cantidad de cuadros explorados en un modelo de campo abierto durante un tiempo determinado (Hall, 1936) (Fig. 21). Por lo anterior, una caja de 45 × 45 × 20 cm se utilizó para registrar la actividad locomotora espontánea de la rata durante 2 min.



Figura 21. Rata en prueba de campo abierto

Tomada de Dreamstime, 2019.

- **Coordinación motora**

La prueba del rota-rod es un ensayo que permite evaluar efectos neurotóxicos y la habilidad muscular que presenta un individuo. Cuando la coordinación motora no está afectada, los individuos caminan sin problema sobre el rodillo rotador y no caen frecuentemente. En contraste, si están afectados o muy deprimidos del SNC entonces caerán continuamente, por lo que en este equipo se cuenta el número de caídas que se presentan en un periodo de observación de 5 min. Las ratas fueron colocadas en un cilindro rotatorio (ROTA-ROD, Panlab) elevado a 10 cm de la superficie que giraba con velocidad de 11 rpm (Fig. 22). Cabe hacer mención que los animales se habituaron previamente durante tres días para generar habilidad de caminar sobre el cilindro rotatorio el tiempo necesario (Dunham y Miya, 1956).



Figura 22. Ratas en el cilindro rotatorio

Tomada de Docplayer, 2019.

6.3.3 Análisis estadístico

Los datos fueron expresados como la media $\pm$ el error estándar de la media (EEM). Los datos de los cursos temporales fueron analizados por análisis de varianza (ANOVA) de dos vías (factores: tiempo y tratamiento) de medidas repetidas. Los valores de área bajo la curva (ABC) se calcularon a partir de los respectivos cursos temporales de los umbrales nociceptivos por el método de los trapezoides y se analizaron por ANOVA de una vía (factor: tratamiento), en ambos casos seguidos de la prueba post-hoc de Tukey y en casos específicos la t de Student. $P < 0.05$ se consideró como estadísticamente significativa. El software estadístico empleado fue GraphPad Prism versión 8.0.

7. RESULTADOS

7.1 Fraccionamiento por CCA

Como se mencionó anteriormente para la obtención de la fracción rica en flavonoides se realizó una CCA utilizando 10.7 g de extracto metanólico de inflorescencias de *Tilia americana* var. *mexicana*. Del fraccionamiento se obtuvieron 21 subfracciones por elución con un gradiente de disolventes de

distinta polaridad (Tabla 11), las cuales fueron agrupadas tomando en cuenta su perfil cromatográfico similar en capa fina (Fig. 23a). De lo anterior se obtuvieron 9 *pools* o fracciones en orden creciente de polaridad (Tabla 11). Se destaca que al tratarse de un extracto metanólico las fracciones más abundantes fueron las más polares, siendo la fracción identificada como **F** la de mayor rendimiento (36.39%), motivo por el cual se decidió utilizar esta fracción para la evaluación farmacológica.

Tabla 11. Fraccionamiento por CCA y rendimiento obtenido

Fracción	Subfracciones	Gradiente de disolventes	Cantidad (g)	Rendimiento (%)
A	1,2,3	Hexano	0.2358	2.21
B	4,5,6	Hexano Hex:AcOEt 50:50	0.2164	2.02
C	7,8,9,10	AcOEt:Hex 70:30 AcOEt	0.1433	1.34
11	11	AcOEt	0.0429	0.4
D	12	AcOEt:MeOH 80:20	0.4889	4.57
E	13,14	AcOEt:MeOH 80:20 AcOEt:MeOH 60:40	1.400	13.1
F	15,16,17	AcOEt:MeOH 60:40 AcOEt:MeOH 40:60	3.8903	36.39
18	18	AcOEt:MeOH 20:80	0.2196	2.05
G	19,20,21	AcOEt:MeOH 20:80 Metanol	0.9252	8.65
Total			7.5624	70.74

Hex: Hexano; AcOEt: Acetato de etilo

7.2 Identificación de compuestos por CCF

El revelador de productos naturales utilizado en la CCF permitió identificar compuestos de tipo flavonoide en color amarillo, anaranjado o rojizo y compuestos de tipo cumarínico en color verde/amarillo al observarse en una lámpara de luz UV con una longitud de onda de 365 nm (Pascual et al., 2002) (Fig. 23a).

La comparación de los factores de retención (R_f , por sus siglas en inglés) del producto de la hidrólisis con el estándar de quercetina permitió identificar la pérdida de los azúcares y la formación de la aglicona (Fig. 23b). Los R_f identificados fueron idénticos (0.78) para ambas manchas indicando que los compuestos de tipo flavonoide presentes en la fracción **F** probablemente son derivados de quercetina (Fig. 23c).

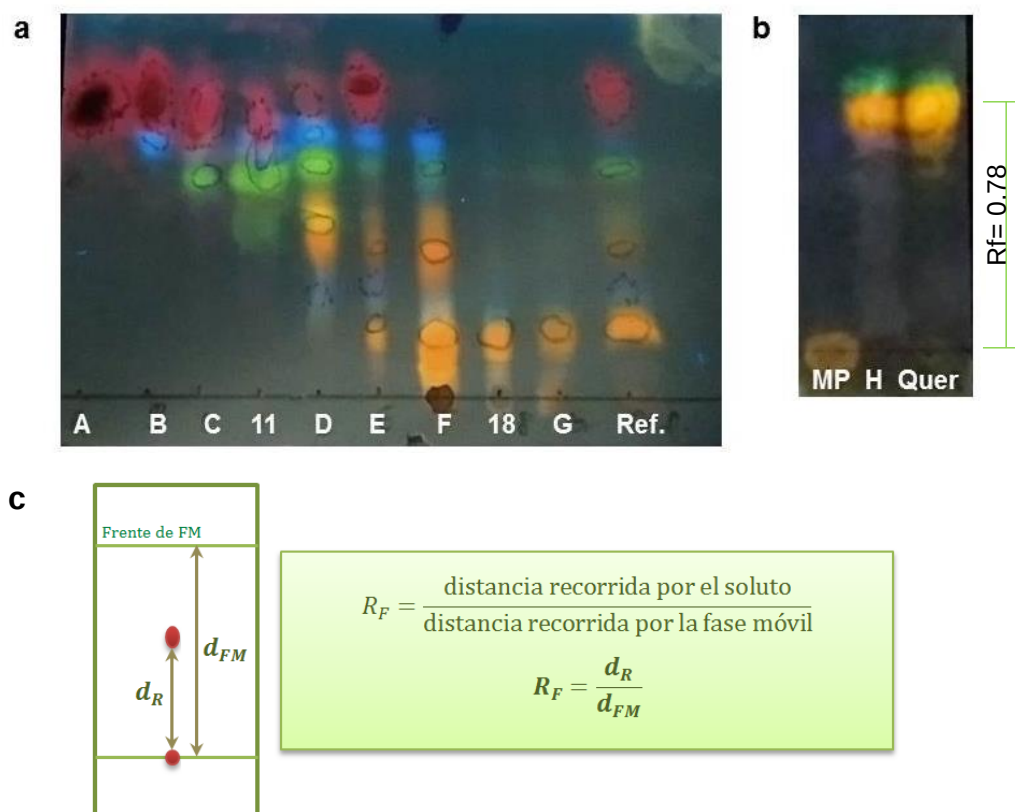


Figura 23. Identificación de compuestos por CCF. (a) Cromatofolio observado a luz UV; 365 nm después del revelador de productos naturales. Se indican en secuencia: las fracciones A, B, C, 11, D, E, F, 18, G y la referencia (Ref.), respectivamente. Sistema de elución: acetato de etilo/acetona/ácido acético/agua (7:3:0.5:0.5). (b) Cromatofolio

observado a luz UV; 365 nm después del revelador de productos naturales. Se observa la materia prima (MP), su hidrolizado (H) y la referencia de quercetina (Quer), respectivamente. Sistema de elución: acetato de etilo/hexano/ácido acético (7:3:0.02). (c) Cálculo del factor de retención.

7.3 Identificación de compuestos por CLAR

En este apartado cabe mencionar que aquellos picos de los cromatogramas del extracto metanólico y la fracción F de *Tilia* que no fueron identificados se numeraron como 0, 00 y 000. En el caso del perfil cromatográfico por CLAR del extracto de *Tilia* (10 mg/mL) se encontraron dos picos mayoritarios (pico 00; $t_r = 6.11$ min y pico 1; $t_r = 7.07$ min) que describen la posible presencia de dos flavonoides abundantes, así como cuatro picos minoritarios (pico 0; $t_r = 1.63$ min, pico 000; $t_r = 7.51$ min, pico 2; $t_r = 8.04$ min y pico 3; $t_r = 9.67$ min) (Fig. 24a). Para poder identificar la naturaleza química de los compuestos la muestra se enriqueció (1 mg/mL) con cuatro estándares de flavonoides –rutina (I), quercitrina (II), quercetina (III) e isoquercitrina (IV)-. Se presentaron únicamente tres picos (1; $t_r = 7.06$ min, 2; $t_r = 7.97$ min y 3; $t_r = 9.42$ min), por lo que, conociendo el perfil cromatográfico de quercitrina (II) y quercetina (III), primeramente se sugirió la presencia de éstas en el extracto metanólico al comparar con los tiempos de retención y máximos de absorbancia. Aunque también cabía la posibilidad de que rutina (I) e isoquercitrina (IV) estuvieran presentes (Fig. 24b-d).

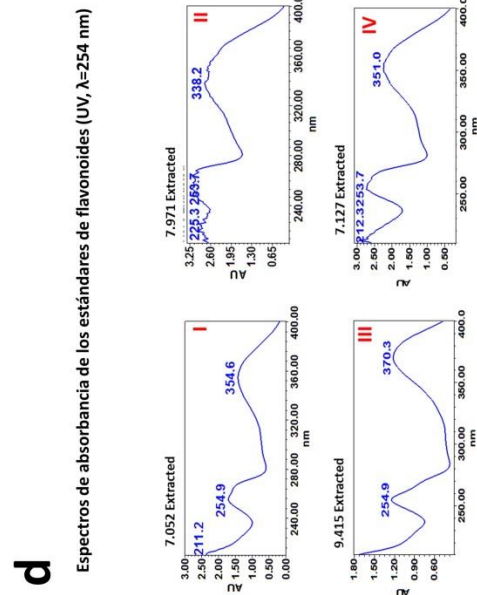
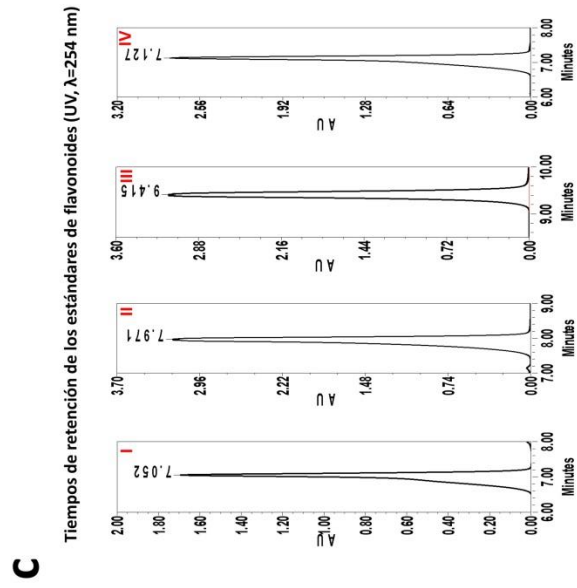
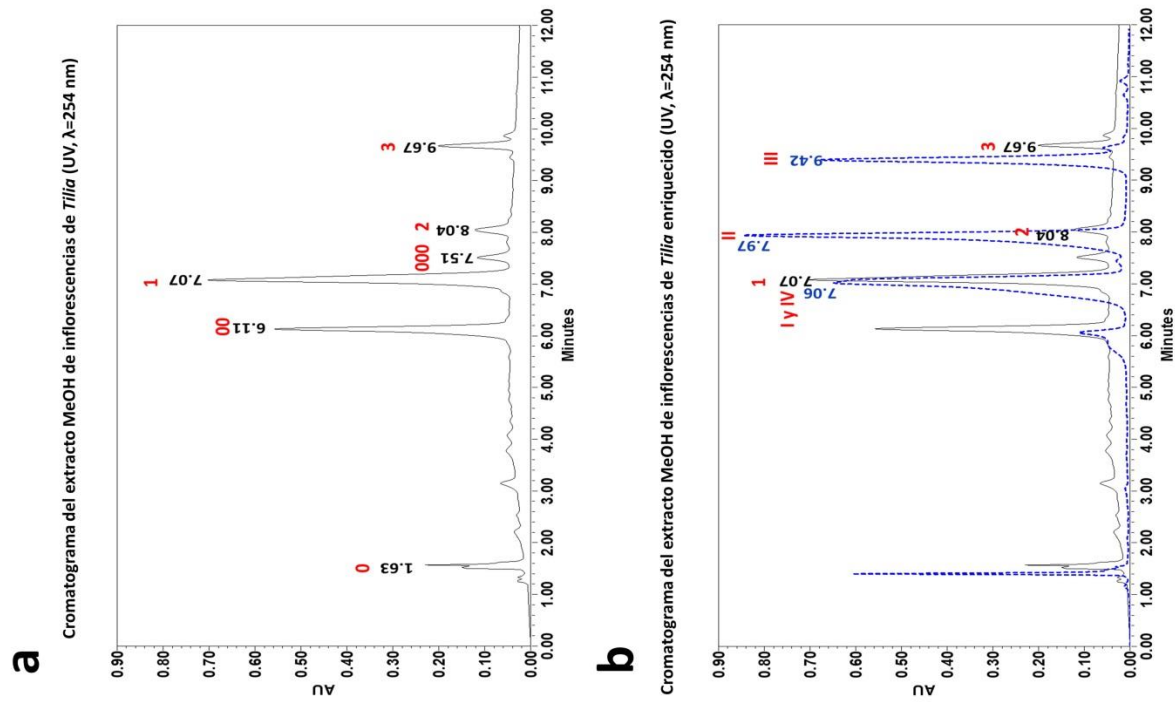


Figura 24. Perfil cromatográfico del extracto MeOH de inflorescencias de *Tilia*. Se muestra (a) Cromatograma del extracto, (b) Cromatograma del extracto enriquecido con los cuatro estándares de flavonoides, (c) tiempos de retención de los estándares y (d) sus máximos de absorbancia.

Por la cercanía de los tiempos de retención de rutina (I; $t_r = 7.05$ min) e isoquercitrina (IV; $t_r = 7.18$ min) y la semejanza de sus máximos de absorbancia, se decidió introducir el extracto metanólico de inflorescencias de *Tilia* enriquecido con cada una de ellas, con el objetivo de definir la posible presencia de alguna o de ambas. Se observa a los dos flavonoides dentro del pico 1 (Fig. 25a-b). Los espectros de absorbancia de los picos de interés (Fig. 25c) concluyeron la comparación entre los perfiles cromatográficos, lo que sugiere la presencia de los cuatro flavonoides en el extracto.

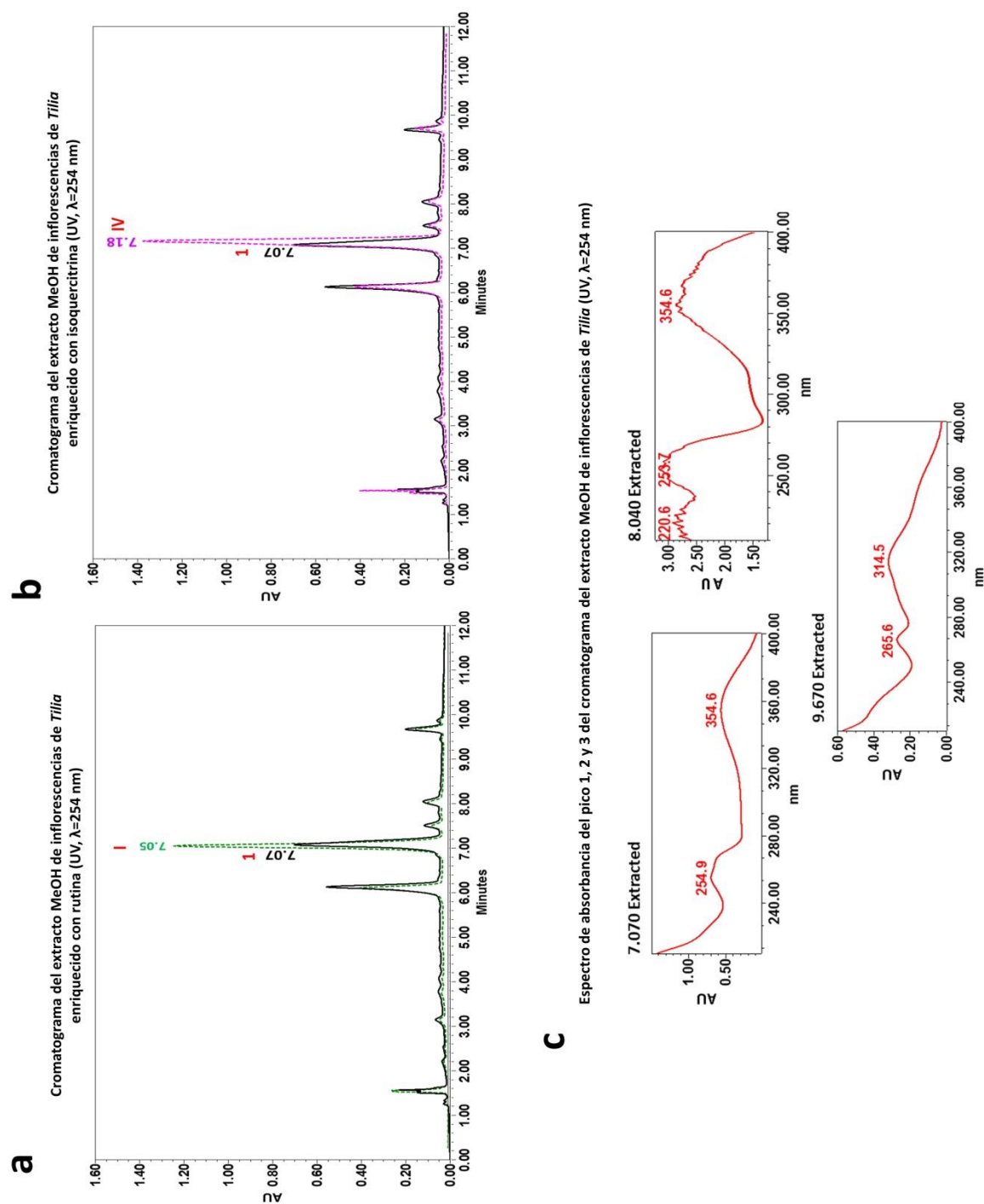


Figura 25. Cromatogramas del extracto MeOH de *Tilia* enriquecidos con rutina o isoquercitrina. Se muestra (a) enriquecida con rutina (I), (b) enriquecida con isoquercitrina (IV), (c) máximos de absorbancia de los picos 1, 2 y 3.

El perfil cromatográfico por CLAR de la fracción **F** (5 mg/mL) mostró nuevamente dos picos mayoritarios, de los cuales solo se analizó el pico 1 ($t_r = 7.154$ min) (Fig. 26a) que describe la posible presencia de los flavonoides principales. Para poder identificar la naturaleza química de esos compuestos la muestra se enriqueció con los mismos cuatro estándares de flavonoides mencionados anteriormente (1 mg/mL), y una vez más aparecieron tres picos, solo que en esta ocasión únicamente el pico 1 coincidía con los estándares introducidos (1; $t_r = 7.111$ min). Se observó que los flavonoides quercitrina (II; $t_r = 8.022$ min) y quercetina (III; $t_r = 9.476$ min) no estaban contenidos en la fracción **F** (Fig. 26b).

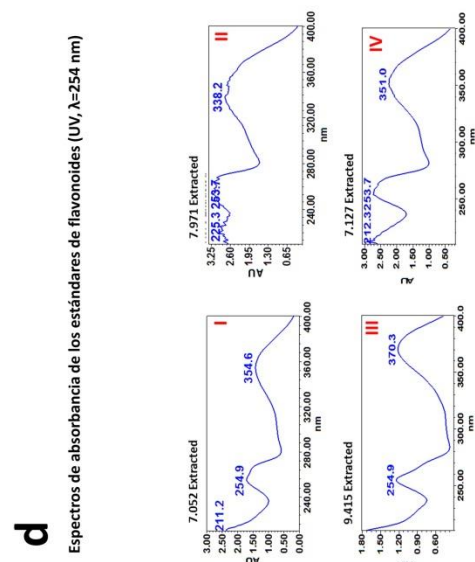
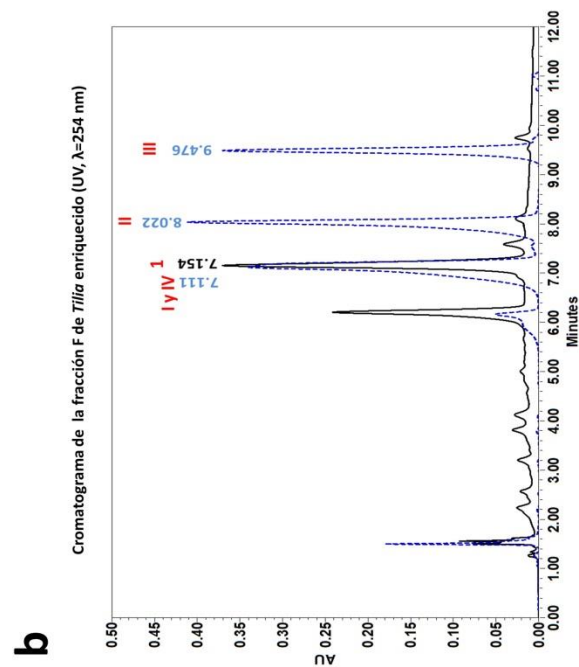
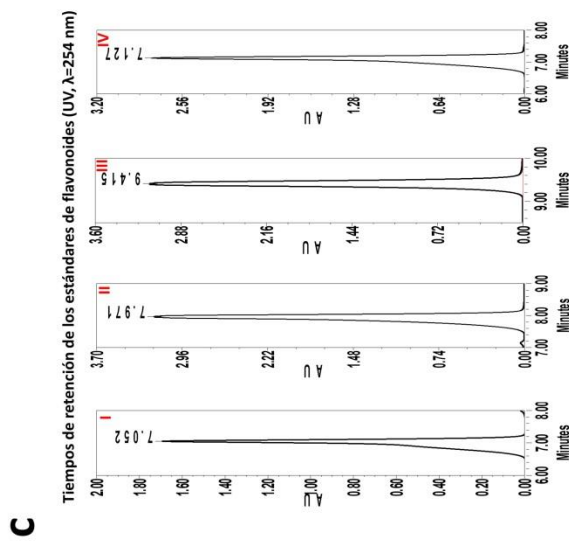
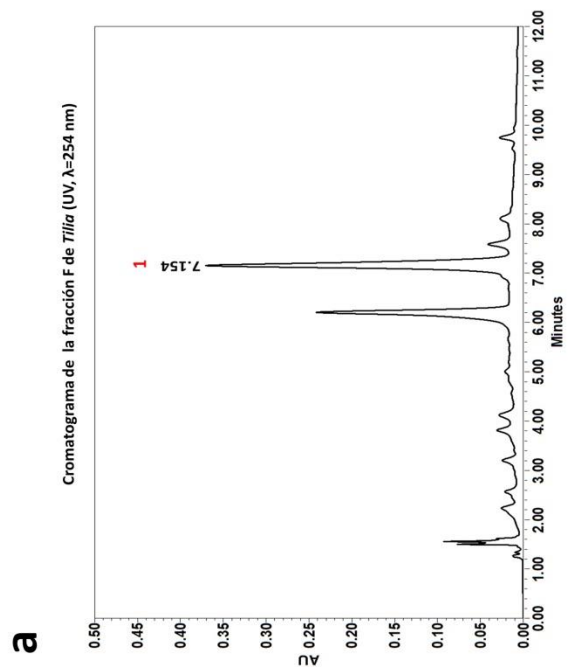


Figura 26. Perfil cromatográfico de la fracción F derivada del extracto MeOH de *Tilia*. Se muestra (a) Cromatograma de la fracción F, (b) Cromatograma de la fracción F enriquecido con los cuatro estándares de flavonoides, (c) tiempos de retención de los estándares y (d) sus máximos de absorbancia.

Al verse aumentado únicamente el pico 1 ($t_r = 7.154$ min), se decidió introducir la fracción **F** enriquecida con rutina (I; $t_r = 7.037$ min) o con isoquercitrina (IV; $t_r = 7.171$ min). La comparación con los tiempos de retención y máximos de absorbancia sugirió la presencia de estos dos flavonoides en la fracción **F** (Fig. 27a-c).

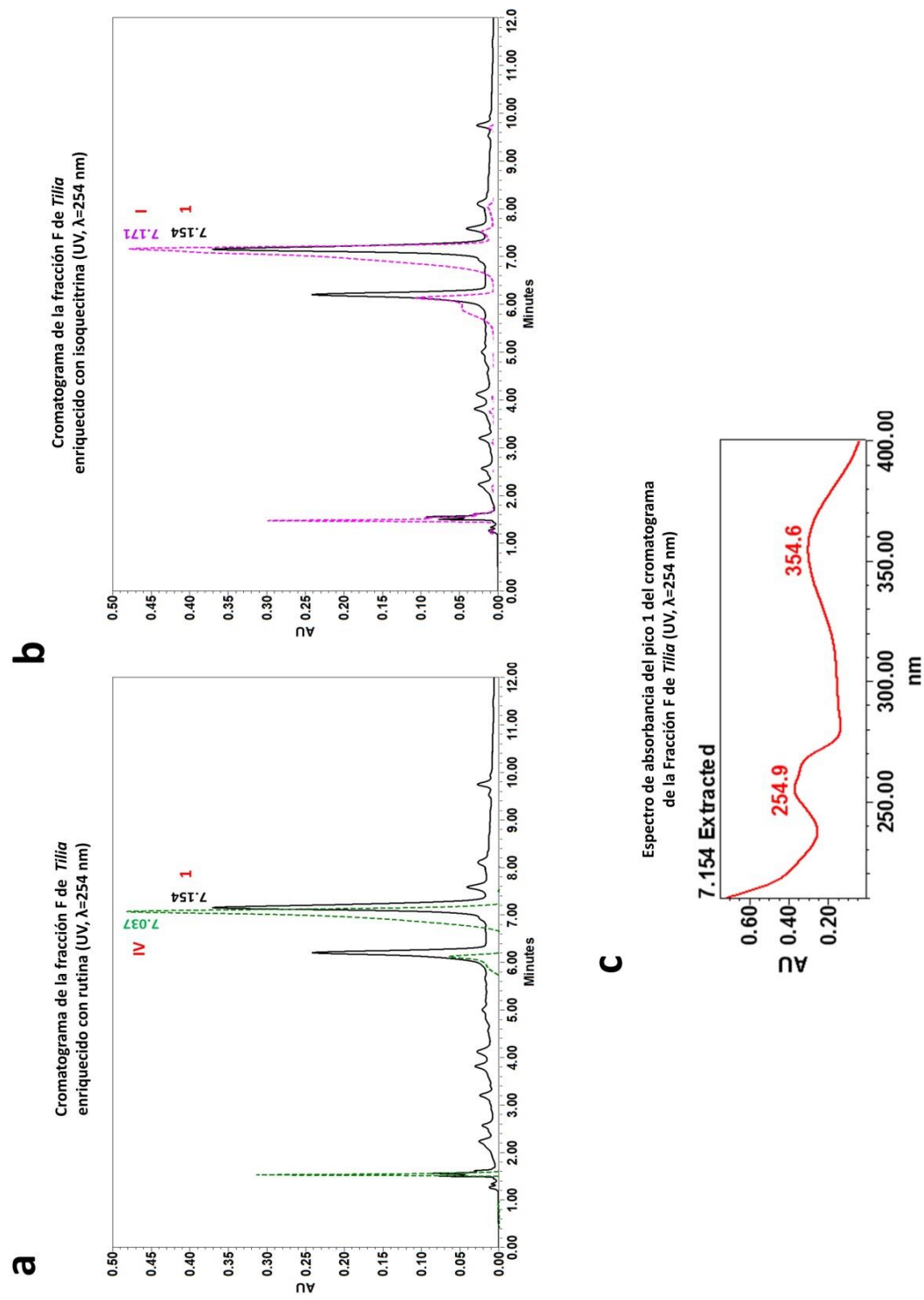


Figura 27. Cromatogramas de la fracción F derivada del extracto MeOH de *Tilia* enriquecidos con rutina o isoquercitrina. Se muestra (a) enriquecida con rutina (I), (b) enriquecida con isoquercitrina (IV), (c) máximos de absorbancia del pico 1.

7.4. Evaluación del extracto metanólico de inflorescencias y de la fracción F en las conductas nociceptivas del modelo de FM inducida por reserpina.

Debido a que no se conocía la ventana de actividad analgésica en el dolor de tipo FM para el extracto metanólico de *Tilia* y de su fracción F, dosis crecientes (10, 30 y 100 mg/kg, i.p.) se analizaron en el modelo de hiperalgesia y alodinia inducidas con reserpina en ratas, y en caso de observar que aún se podía producir un efecto mayor sin presencia de efectos no deseados, se incluyó una dosis más alta (300 mg/kg, i.p.). En el caso de la fracción F, el efecto generado fue de utilidad para elegir la dosis subefectiva que se requeriría para las combinaciones con los fármacos analgésicos de la clínica en la evaluación de la interacción farmacológica.

El tratamiento con el extracto metanólico produjo efectos antihiperalgésicos significativos. La dosis de 10 mg/kg produjo efectos tipo analgésicos a los 30, 120, 180 y 240 min de su administración. En tanto que las dosis de 30 y 100 mg/kg produjeron efectos tipo analgésicos en todos los tiempos analizados (Tiempo: $F_{4,112,139.8} = 15.48$, $P < 0.0001$; Tratamiento: $F_{4,34} = 75.42$, $P < 0.0001$; Interacción: $F_{20,170} = 5.004$, $P < 0.0001$). El tiempo en el que se presentó el efecto antihiperalgésico máximo, tanto para la dosis de 10 como la de 100 mg/kg, fue de 30 min y para la dosis de 30 mg/kg fue de 60 min (Fig. 28a).

En el umbral de respuesta táctil (Fig. 28b), sólo las dosis de 30 y 100 mg/kg del extracto de *Tilia* dieron respuestas significativas durante la evaluación. Cabe señalar que en el tiempo de 120 min el efecto de la dosis de 30 mg/kg decayó parcialmente (Tiempo: $F_{3,922,133.3} = 9.897$, $P < 0.0001$; Tratamiento: $F_{4,34} = 62.30$, $P < 0.0001$; Interacción: $F_{20,170} = 2.592$, $P < 0.0005$). Sin embargo, en este mismo punto se alcanzó el efecto máximo con la dosis de 100 mg/kg.

De la misma forma, en el umbral de respuesta a estímulo frío, las dosis de 30 y 100 mg/kg del extracto produjeron respuestas significativas, con una

reducción parcial de la respuesta en los 180 min para la dosis de 30 mg/kg (Tiempo: $F_{3,745,127.3} = 11.39$, $P < 0.0001$; Tratamiento: $F_{4,34} = 30.51$, $P < 0.0001$; interacción: $F_{20,170} = 3.112$, $P < 0.0001$). En este mismo punto se alcanzó el efecto antialodínico máximo con la dosis de 100 mg/kg (Figura 28c).

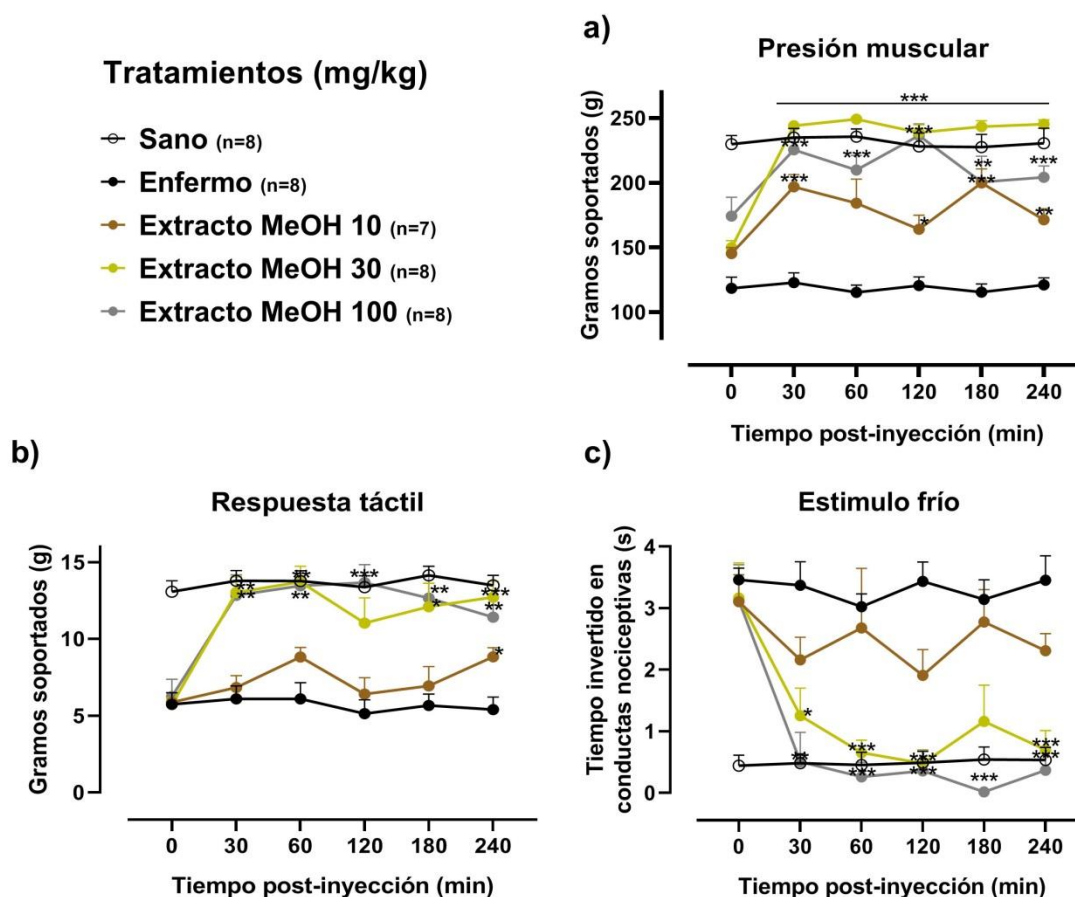


Figura 28. Cursos temporales de la evaluación del extracto metanólico de inflorescencias en los umbrales nociceptivos del modelo de FM inducidos por reserpina. a) Umbral de presión muscular. b) Umbral de respuesta táctil (g) y c) Umbral de respuesta a estímulo térmico (s). Cada punto representa el promedio $\pm$ EEM de la fuerza soportada en el músculo gastrocnemio o en la superficie plantar (g), así como del tiempo invertido en lamidas o sacudidas (s), respectivamente. ANADEVA de dos vías de medidas repetidas seguida de la prueba *post-hoc* Tukey * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ y *** $P < 0.001$ comparado contra el grupo enfermo.

Los datos fueron expresados como el área bajo la curva (ABC), lo cual permitió calcular y comparar el efecto farmacológico de los tratamientos evaluados

durante el periodo de cuatro horas. El efecto antihiperalgésico del extracto de *Tilia* fue dependiente de la dosis (Tratamiento: $F_{4,33}= 81.19$, $P<0.0001$) con reducción de la conducta tipo dolorosa del 37.54%, 82.81% y 60.24% en las dosis de 10, 30 y 100 mg/kg, respectivamente (Fig. 29a). En la figura 26b se puede apreciar que las dosis que fueron efectivas en el umbral de respuesta táctil fueron 30 y 100 mg/kg con 61.40% y 68.01% de reducción en la conducta tipo dolorosa, respectivamente. (Tratamiento: $F_{4,33}= 59.27$, $P<0.0001$). Estas recuperaciones se mantuvieron en la alodinia térmica (Fig. 29c) con reducción del 86.56% y 103.51% para la dosis de 30 mg/kg y 100 mg/kg, respectivamente (Tratamiento: $F_{4,33}= 40.25$, $P<0.0001$).

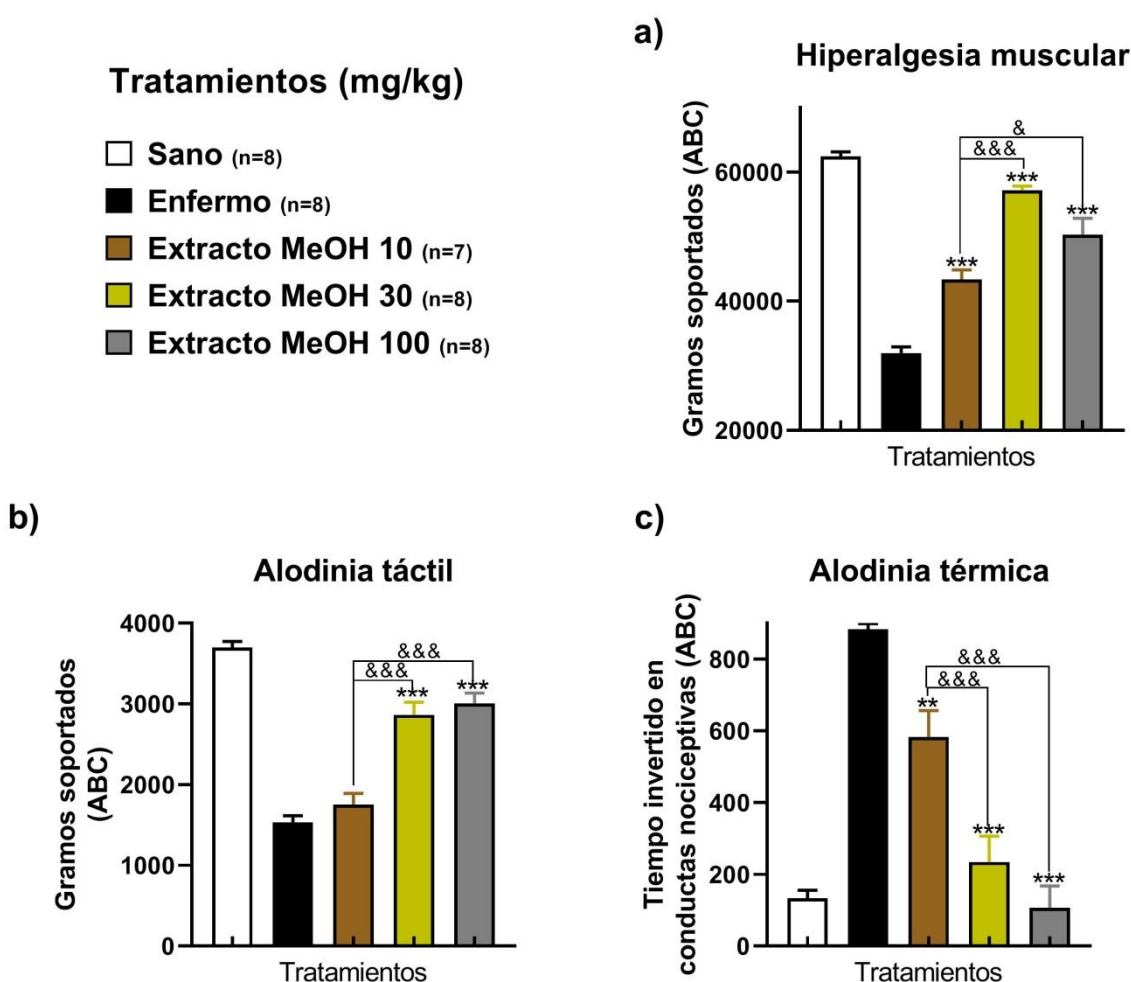


Figura 29. Evaluación del extracto metanólico de *Tilia* en los umbrales nociceptivos del modelo de FM inducidos por reserpina expresados como ABC. a) Hiperalgnesia

muscular. b) Alodinia táctil. c) Alodinia térmica. Cada barra representa el promedio $\pm$ EEM del ABC de la fuerza del estímulo soportada (g) y del tiempo empleado en lamidas y sacudidas (s). ANADEVA de una vía seguida de la prueba *post-hoc* Tukey * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ y *** $P < 0.001$ comparado contra el grupo enfermo, & $P < 0.05$, && $P < 0.001$ comparación entre dosis.

Partiendo de la evidencia de los efectos antihiperalgésico y antialodínicos del extracto polar, se decidió evaluar la fracción rica en flavonoides (**F**) en el modelo de FM y así evidenciar la contribución de estos componentes en el efecto generado por el extracto. En la figura 30a se observa que el efecto antihiperalgésico máximo del flavonoide de referencia quercetina se alcanzó a los 30 min y se mantuvo en las 4 h de evaluación. Las dosis de 30, 100 y 300 mg/kg de la fracción **F** también produjeron efecto antihiperalgésico. En todos los casos el efecto antihiperalgésico se apreció desde los 30 min y permaneció hasta los 90 min, después este efecto disminuyó progresivamente hasta regresar a valores del grupo enfermo (Tiempo: $F_{6,392,236.5} = 10.81$, $P < 0.0001$; Tratamiento: $F_{6,37} = 15.38$, $P < 0.0001$; Interacción: $F_{48,296} = 1.784$, $P < 0.0021$).

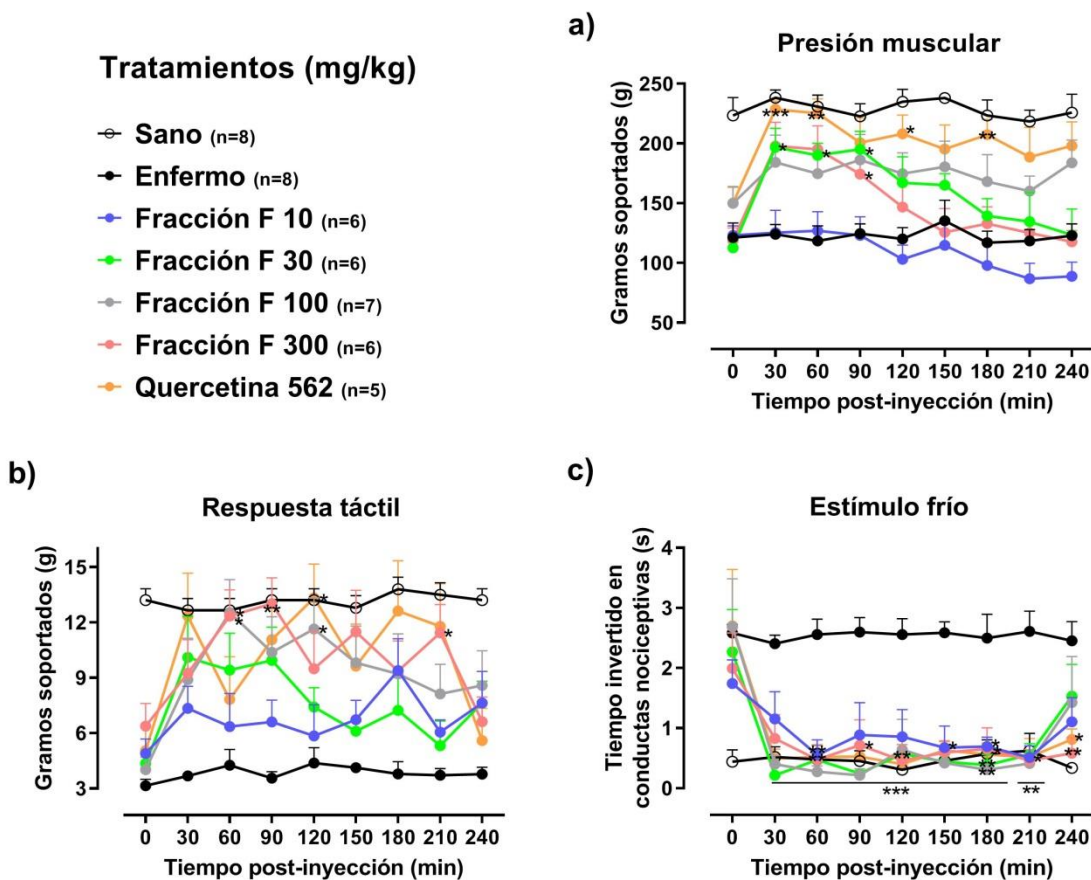


Figura 30. Cursos temporales de la evaluación de la fracción F del extracto de *Tilia* en los umbrales nociceptivos del modelo de FM inducidos por reserpina. a) Umbral de presión muscular. b) Umbral de respuesta táctil. c) Umbral de respuesta a estímulo frío. Cada punto representa el promedio $\pm$ EEM de la fuerza soportada en el músculo gastrocnemio o en la superficie plantar (g), así como del tiempo empleado en lamidas y sacudidas (s). ANADEVA de dos vías de medidas repetidas seguido de la prueba *post-hoc* Tukey * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ y *** $P < 0.001$ en comparación con el grupo enfermo.

En cuanto al umbral de respuesta táctil (Fig. 30b), el efecto máximo y significativo de la administración de la fracción F a la dosis de 300 mg/kg y el de quercetina se alcanzaron entre los 60 min y 120 min (Tiempo: $F_{5,970,232.8} = 6.880$, $P < 0.0001$; Tratamiento: $F_{6,39} = 17.82$, $P < 0.0001$; Interacción: $F_{48,312} = 1.808$, $P < 0.0005$).

Al evaluar la fracción **F** en el umbral de respuesta a estímulo frío, todas las dosis fueron significativas para reducir la alodinia a estímulo frío durante las 4 h de evaluación (Tiempo: $F_{4,243,161.2} = 14.00$, $P < 0.0001$; Tratamiento: $F_{6,38} = 18.20$, $P < 0.0001$; Interacción: $F_{48,304} = 1.689$, $P < 0.0048$). Este efecto antialodínico fue similar al producido por el flavonoide de referencia quercetina (Fig. 30c).

El cálculo del ABC del umbral de presión muscular demostró que las dosis de la fracción **F** generaron efecto antihiperalgésico significativo en la forma siguiente: a 30 mg/kg de 39.93%, a 100 mg/kg de 50.28% y a 300 mg/kg de 29.50% (Tratamiento: $F_{6,39} = 19.77$, $P < 0.0001$). Quercetina evaluada a la dosis de 562 mg/kg revirtió la hiperalgnesia en un 77.16% (Fig. 31a).

En el caso de la figura 31b, se aprecia que en el umbral de respuesta táctil los cinco tratamientos evaluados fueron significativos en la respuesta tipo dolorosa. En cuanto a la fracción **F**, la dosis de 30 mg/kg produjo un efecto antialodínico táctil del 41.25%, seguido de un 62.04% en la dosis de 100 mg/kg y un 70.12% con la dosis de 300 mg/kg. Quercetina produjo efecto antihiperalgésico del 71.50% (Tratamiento: $F_{6,39} = 17.16$, $P < 0.0001$). En la figura 31c, en el umbral de respuesta a estímulo frío se evidenció la mejora en la conducta de los sujetos experimentales para todos los tratamientos evaluados. Cuantitativamente, la fracción **F** a dosis de 10 mg/kg generó un efecto antialodínico térmico de 74.28%, a 30 mg/kg del 86.0%, a 100 mg/kg de 86.33% y a 300 mg/kg alcanzó un 81.91%. Los valores obtenidos fueron muy similares al producido por la administración de quercetina (82.35%) (Tratamiento: $F_{6,39} = 22.54$, $P < 0.0001$).

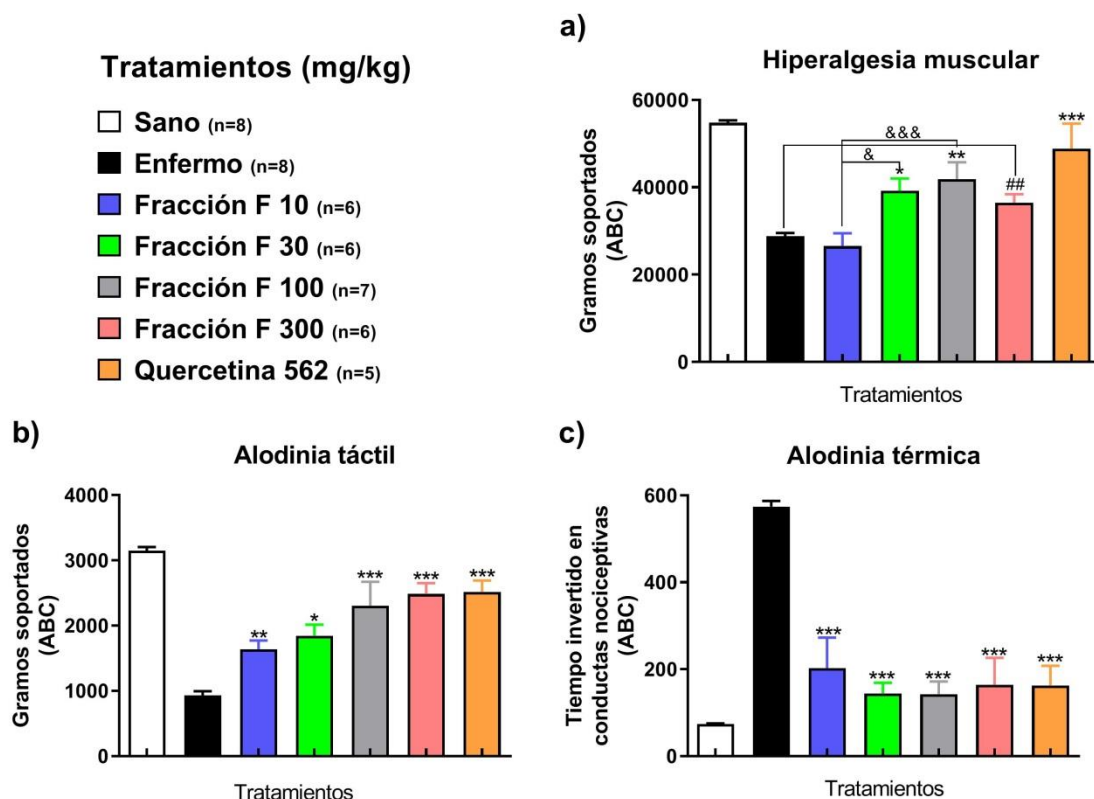


Figura 31. Evaluación de la fracción F del extracto de *Tilia* en los umbrales nociceptivos del modelo de FM inducida por reserpina expresados como ABC. a) Hiperalgesia muscular. b) Alodinia táctil. c) Alodinia térmica. Cada barra representa el promedio $\pm$ EEM del ABC de la fuerza soportada (g) o del tiempo empleado en lamidas y sacudidas (s). ANADEVA de una vía seguido de la prueba *post-hoc* Tukey * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ y *** $P < 0.001$, ## $P < 0.01$, t de student en comparación con el grupo enfermo, & $P < 0.05$, && $P < 0.001$ comparación entre dosis.

7.5 Evaluación de pramipexol en las conductas nociceptivas del modelo de FM inducida por reserpina.

De acuerdo con la evidencia de la moderada eficacia terapéutica del uso de los agonistas dopaminérgicos como pramipexol en la FM (Holman y Myers, 2005); éste se evaluó como fármaco de uso clínico en el modelo de FM inducida con reserpina usando 4 dosis (0.01, 0.1, 0.5 y 1 mg/kg), las primeras 3 fueron para ubicar una dosis subefectiva que pudiera combinarse con la fracción F rica en

flavonoides del extracto de *Tilia*. La dosis de 1 mg/kg se utilizó como referencia antihiperálgica y antialodínica.

En el caso del umbral de presión muscular, únicamente la dosis de referencia fue significativa al alcanzar el máximo efecto antihiperálgico a los 30 min de su administración, posteriormente el efecto decayó (Fig. 32a) (Tiempo: $F_{5,454,207.2} = 9.534$, $P < 0.0001$; Tratamiento: $F_{5,38} = 20.90$, $P < 0.0001$; Interacción: $F_{40,304} = 1.430$, $P < 0.0516$).

En el umbral de respuesta a estímulo táctil, sólo la dosis de 1 mg/kg generó efecto antialodínico, que fue significativo desde los 60 min y se mantuvo hasta los 240 min. El efecto máximo se alcanzó a los 180 min (Fig. 32b) (Tiempo: $F_{5,304,212.2} = 1.4646$, $P < 0.1995$; Tratamiento: $F_{5,40} = 39.13$, $P < 0.0001$; Interacción: $F_{40,320} = 1.639$, $P < 0.0114$).

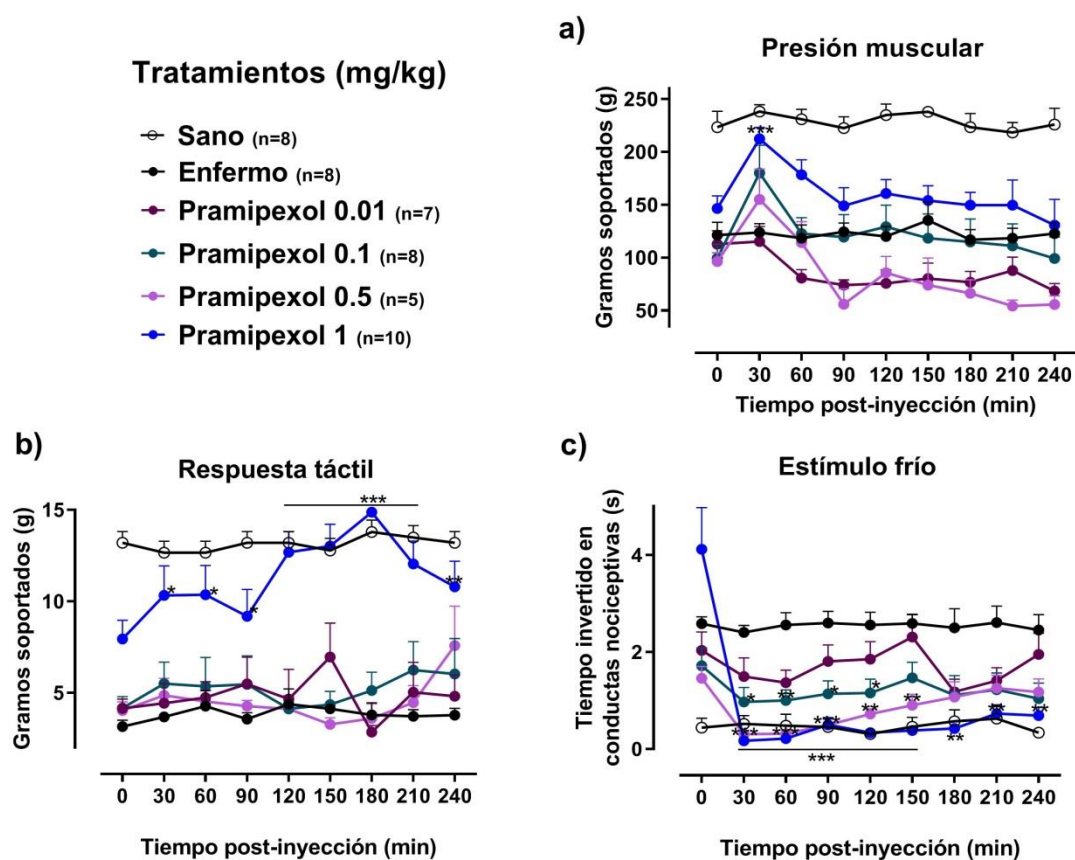


Figura 32. Cursos temporales de la evaluación de pramipexol en los umbrales nociceptivos del modelo de FM inducidos por reserpina. a) Umbral de presión

muscular. b) Umbral de respuesta táctil. c) Umbral de respuesta a estímulo frío. Cada punto representa el promedio $\pm$ EEM de la fuerza soportada en el músculo gastrocnemio o en la superficie plantar (g), así como del tiempo empleado en lamidas y sacudidas (s). ANADEVA de dos vías de medidas repetidas seguido de la prueba *post-hoc* Tukey * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ y *** $P < 0.001$ en comparación con el grupo enfermo.

En tanto que en el umbral de respuesta a estímulo frío (Fig. 32c), se produjo efecto antialodínico con las dosis de 0.1 mg/kg y 0.5 mg/kg de pramipexol, dicho efecto fue desde el comienzo de la evaluación hasta los 120 min y 150 min, respectivamente. La dosis de 1 mg/kg produjo efecto antialodínico durante las 4 h de evaluación (Tiempo: $F_{3,397,132.5} = 9.632$, $P < 0.0001$; Tratamiento: $F_{5,39} = 17.43$, $P < 0.0001$; Interacción: $F_{40,312} = 4.969$, $P < 0.0001$).

Tras calcular las áreas bajo la curva se confirmó que para la dosis 1 mg/kg de pramipexol hay una respuesta significativa antihiperálgica (Fig. 33a-b) (Tratamiento: $F_{5,40} = 26.36$, $P < 0.0001$) y antialodínica táctil (Tratamiento: $F_{5,40} = 37.63$, $P < 0.0001$). Estos efectos fueron en un 36.96% y 80.44%, respectivamente.

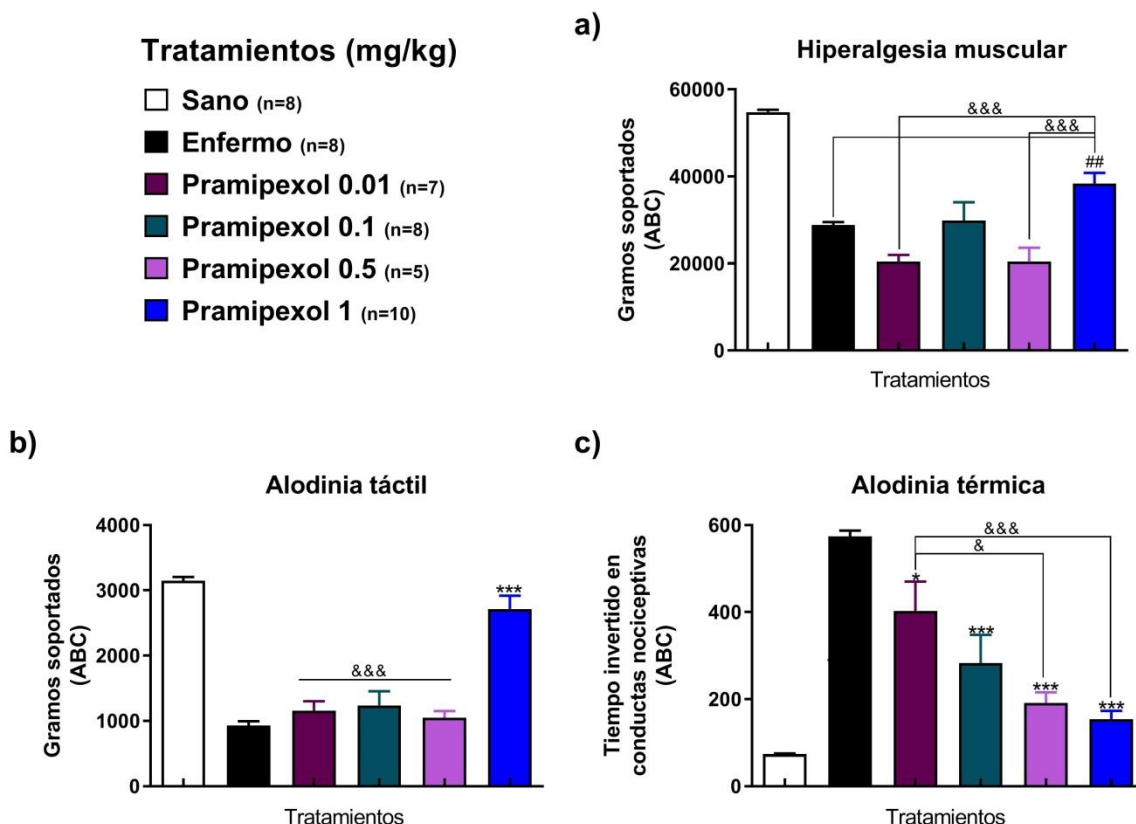


Figura 33. Evaluación de pramipexol en los umbrales nociceptivos del modelo de FM inducida por reserpina expresados como ABC. a) Hiperalgesia muscular. b) Alodinia táctil. c) Alodinia térmica. Cada barra representa el promedio $\pm$ EEM del ABC de la fuerza soportada (g) o del tiempo empleado en lamidas y sacudidas (s). ANADEVA de una vía seguido de la prueba *post-hoc* Tukey * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ y *** $P < 0.001$ en comparación con el grupo enfermo. ## $P < 0.01$, t de student comparado con el grupo enfermo, & $P < 0.05$, &&& $P < 0.001$ comparación entre dosis.

En la figura 33c se muestra la respuesta significativa de todas las dosis de pramipexol evaluadas para revertir la alodinia a estímulo frío inducida por reserpina. El efecto antialodínico de pramipexol fue dependiente de la dosis al promover reducción de la respuesta tipo dolorosa del 34.36% para la dosis de 0.01 mg/kg, 58.21% en la dosis de 0.1 mg/kg, 73.51% en la dosis de 0.5 mg/kg y 83.98% para 1 mg/kg (Tratamiento: $F_{5,40} = 22.05$, $P < 0.0001$).

7.6 Evaluación de tramadol en las conductas nociceptivas del modelo de FM inducida por reserpina.

De igual forma que con pramipexol, tramadol se evaluó en el modelo de FM experimental a una dosis previamente reportada por su eficacia analgésica (10 mg/kg) (Kaneko *et al.*, 2014) así como a una dosis subefectiva (3 mg/kg).

Para el umbral de presión muscular, la dosis de referencia analgésica produjo efecto antihiperalgésico de los 30 a los 90 min (Fig. 34a), siendo el tiempo de 30 min donde se observó el máximo efecto antihiperalgésico (Tiempo: $F_{6,119,159.1} = 26.74$, $P < 0.0001$; Tratamiento: $F_{3,26} = 61.15$, $P < 0.0001$; Interacción: $F_{24,208} = 10.32$, $P < 0.0001$).

En el caso del umbral de respuesta táctil como efecto antialodínico generado por la administración de 10 mg/kg, tuvo una mayor duración ya que comenzó a los 30 min y permaneció hasta los 120 min post-inyección (Fig. 34b) (Tiempo: $F_{5,670,158.8} = 4.207$, $P < 0.0008$; Tratamiento: $F_{3,28} = 39.30$, $P < 0.0001$; Interacción: $F_{24,224} = 2.407$, $P < 0.0004$).

Los efectos antialodínicos a estímulo frío fueron de mayor intensidad y duración en el umbral de respuesta, puesto que ambas dosis de tramadol produjeron respuesta significativa a la dosis de 3 mg/kg generando una actividad antialodínica de los 90 min a los 240 min de evaluación, con excepción de los 150 min donde el efecto decayó. Mientras que la dosis de 10 mg/kg comenzó siendo activa a los 30 min, donde se obtuvo el máximo efecto, dicho efecto antialodínico se mantuvo hasta los 90 min de la prueba (Fig. 34c) (Tiempo: $F_{3,758,101.5} = 3.839$, $P < 0.0071$; Tratamiento: $F_{3,27} = 15.14$, $P < 0.0001$; Interacción: $F_{24,216} = 4.069$, $P < 0.0001$).

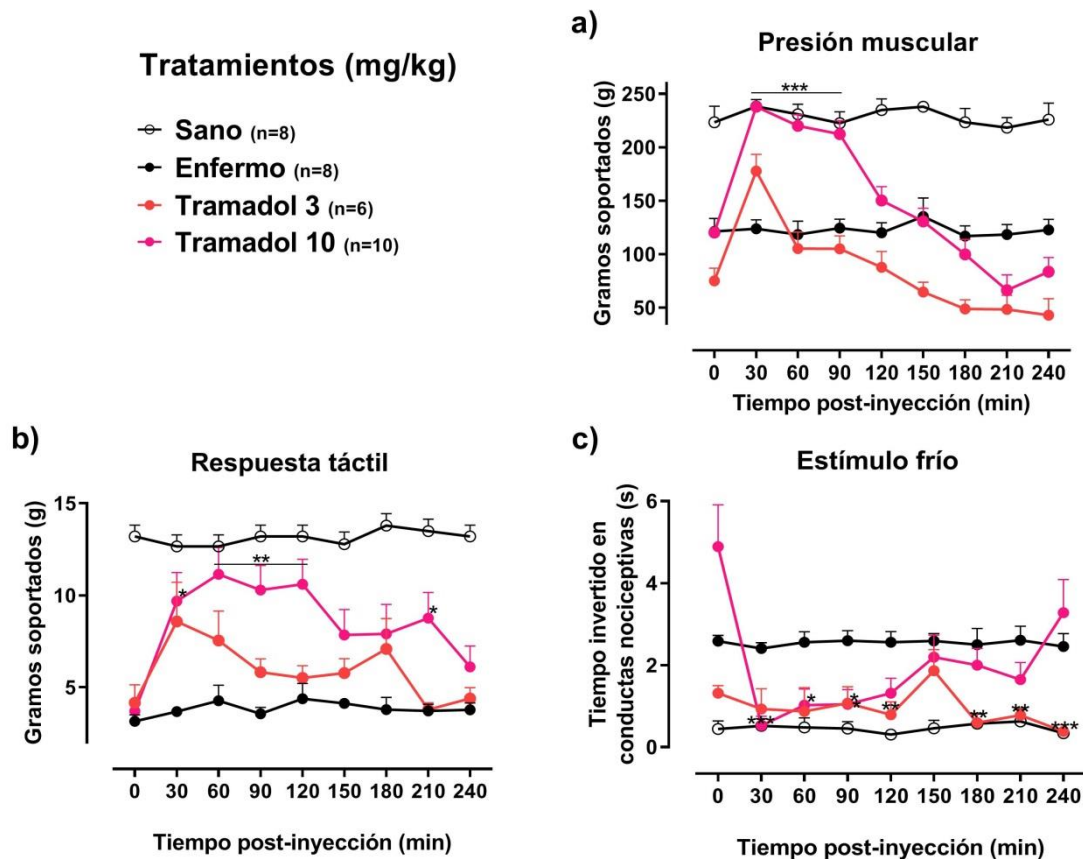


Figura 34. Cursos temporales de la evaluación de tramadol en los umbrales nociceptivos del modelo de FM inducidos por reserpina. a) Umbral de presión muscular. b) Umbral de respuesta táctil. c) Umbral de respuesta a estímulo frío. Cada punto representa el promedio $\pm$ EEM de la fuerza soportada en el músculo gastrocnemio o en la superficie plantar (g), así como del tiempo empleado en lamidas y sacudidas (s). ANADEVA de dos vías de medidas repetidas seguido de la prueba *post-hoc* Tukey * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ y *** $P < 0.001$ en comparación con el grupo enfermo.

Con el cálculo del ABC fue posible establecer que tramadol a la dosis de 10 mg/kg produce una mejora del 29.98 % en la hiperalgesia muscular (Fig. 35a) (Tratamiento: $F_{3,28} = 103.3$, $P < 0.0001$) y un alivio del 54.92% en la alodinia a estímulo táctil (Fig. 35b) (Tratamiento: $F_{3,28} = 34.64$, $P < 0.0001$). En el caso de la alodinia a estímulo frío sólo la dosis de 3 mg/kg de tramadol fue capaz de revertir la alodinia térmica en un 68.28% (Fig. 35c) (Tratamiento: $F_{3,28} = 16.93$, $P < 0.0001$).

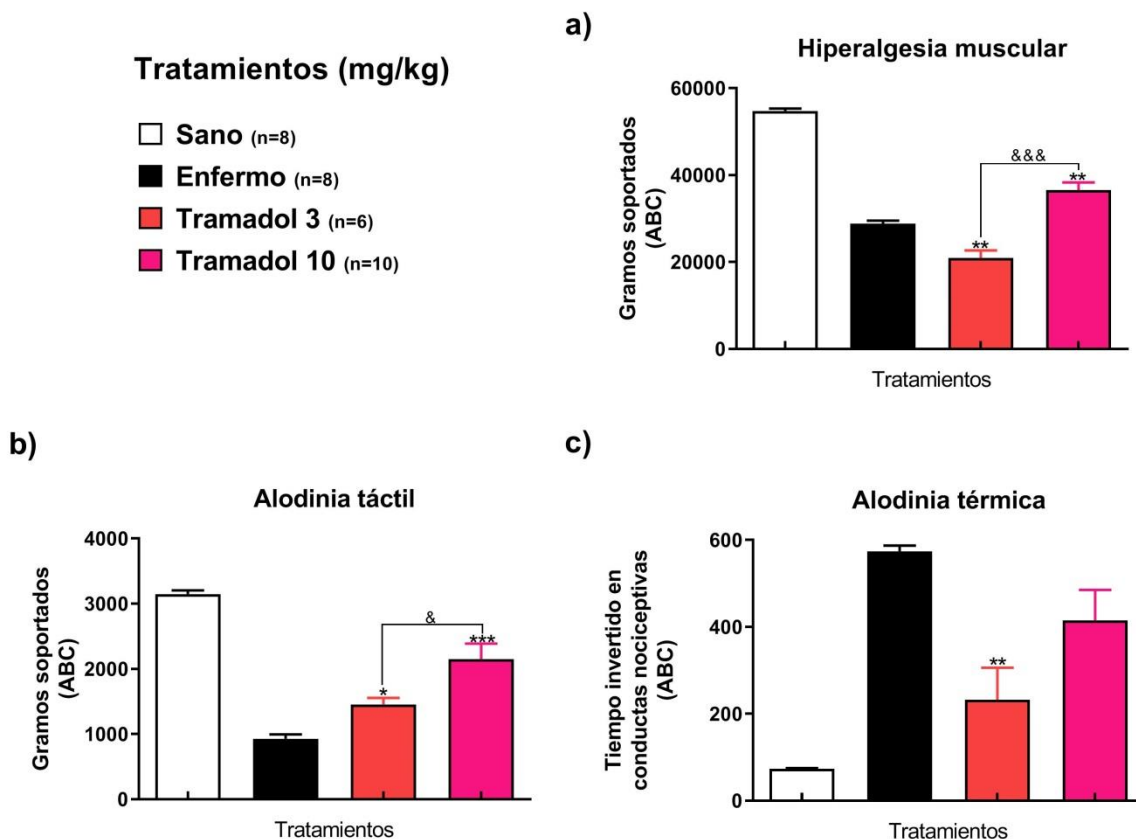


Figura 35. Evaluación de tramadol en los umbrales nociceptivos del modelo de FM inducida por reserpina expresados como ABC. a) Hiperalgesia muscular. b) Alodinia táctil. c) Alodinia térmica. Cada barra representa el promedio $\pm$ EEM del ABC la fuerza soportada (g) o del tiempo empleado en lamidas y sacudidas (s). ANADEVa de una vía seguido de la prueba *post-hoc* Tukey * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ y *** $P < 0.001$ en comparación con el grupo enfermo, & $P < 0.05$, && $P < 0.001$ comparación entre dosis.

7.7 Evaluación de las combinaciones producto natural/pramipexol o tramadol en las conductas nociceptivas del modelo de FM inducidas por reserpina.

Una vez que se obtuvieron las dosis subefectivas, la evaluación de la combinación de la fracción **F** rica en flavonoides con pramipexol o tramadol se realizó para conocer la posible interacción farmacológica y analizar si existe utilidad como alternativa terapéutica en el síndrome de FM.

En el curso temporal del umbral de presión muscular se observó que la combinación de la fracción **F** con tramadol produjo efecto antihiperálgésico a los 30 min (Fig. 36a) (Tiempo: $F_{5,961,232.5} = 24.12$, $P < 0.0001$; Tratamiento: $F_{6,39} = 12.04$, $P < 0.0001$; Interacción: $F_{48,312} = 2.789$, $P < 0.0001$). El curso temporal del umbral de respuesta táctil (Fig. 36b) muestra que ninguna de las dos combinaciones propuestas con la fracción **F** del extracto de *Tilia* fue capaz de reducir significativamente la alodinia táctil inducida por reserpina (Tiempo: $F_{6,277,257.4} = 2.487$, $P < 0.0215$; Tratamiento: $F_{6,41} = 39.11$, $P < 0.0001$; Interacción: $F_{48,328} = 1.186$, $P < 0.1981$).

En el caso del umbral de respuesta a estímulo frío se observó que la combinación de la fracción **F** con pramipexol fue capaz de revertir la alodinia térmica desde los 30 min y hasta los 150 min. En el grupo administrado con la fracción **F** más tramadol se obtuvo que el mejor efecto antialodínico fue a los 150 min y al finalizar la evaluación (Fig. 36c) (Tiempo: $F_{5,410,216.4} = 4.615$, $P < 0.0003$; Tratamiento: $F_{6,40} = 8.721$, $P < 0.0001$; Interacción: $F_{48,320} = 1.110$, $P < 0.2961$).

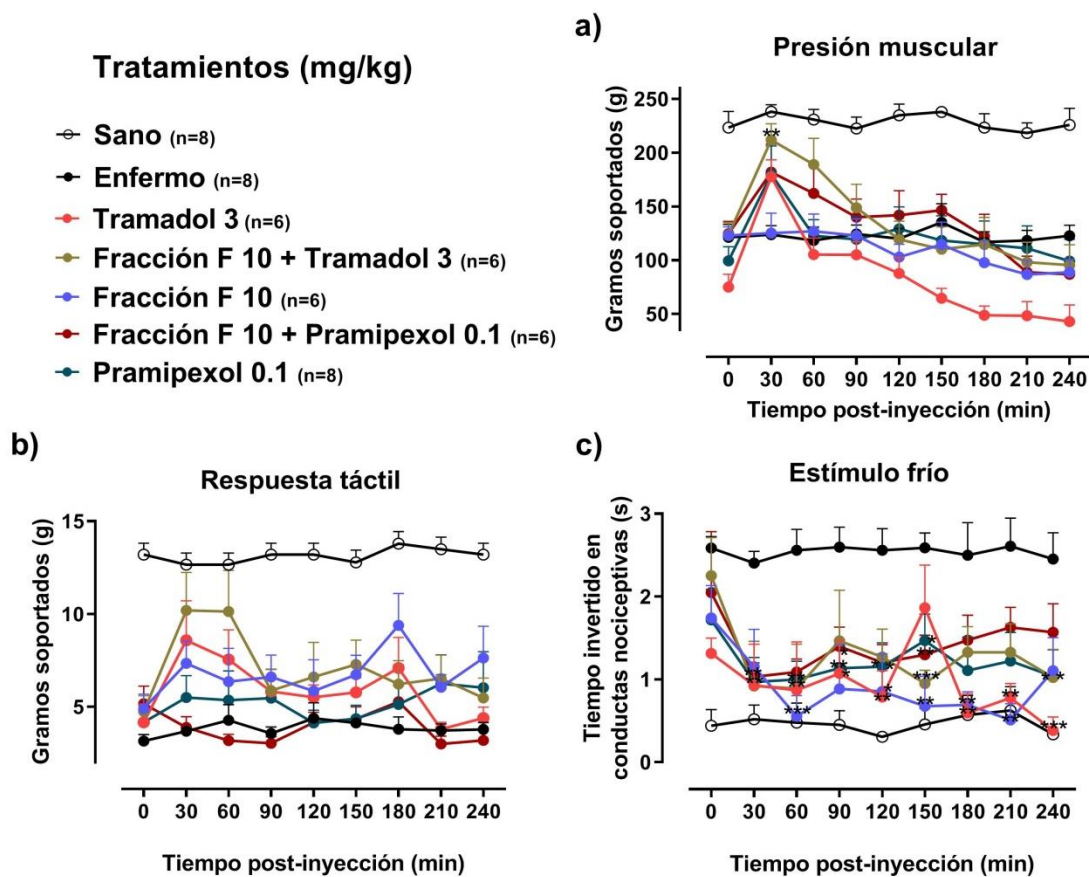


Figura 36. Cursos temporales de la evaluación de las combinaciones de la fracción F con pramipexol o tramadol en los umbrales nociceptivos del modelo de FM inducidos por reserpina. a) Umbral de presión muscular. b) Umbral de respuesta táctil. c) Umbral de respuesta a estímulo frío. Cada punto representa el promedio $\pm$ EEM de la fuerza soportada en el músculo gastrocnemio o en la superficie plantar (g) o del tiempo empleado en lamidas y sacudidas (s). ANADEVA de dos vías de medidas repetidas seguido de la prueba *post-hoc* Tukey * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ y *** $P < 0.001$ en comparación con el grupo enfermo.

En la figura 37a, el ABC del umbral de presión muscular indica que las combinaciones de las dosis subefectivas de la fracción F con pramipexol (Tratamiento: $F_{6,41} = 15.07$, $P = 0.8609$) o tramadol (Tratamiento: $F_{6,41} = 15.07$, $P = 0.8072$) no produjeron efecto antihiperálgico o antialodínico táctil en el caso de la combinación con pramipexol (Tratamiento: $F_{6,41} = 38.42$, $P > 0.9999$), pues la combinación con tramadol produjo 36.43% de efecto en este umbral (Tratamiento: $F_{6,41} = 38.42$, $P = 0.0005$) (Fig. 37b). Finalmente, las combinaciones de la fracción F

con pramipexol o tramadol sí produjeron efecto antialodínico significativo a estímulo frío (Fig. 37c) en un 48.97% y 56.07%, respectivamente. Ninguna de las dos combinaciones fue superior que sus componentes individuales (Fracción F 10 mg/kg; 74.28%, tramadol 3 mg/kg; 68.28% y pramipexol 0.1 mg/kg; 58.21%) (Tratamiento: $F_{6,41}=9.389$, $P<0.0001$).

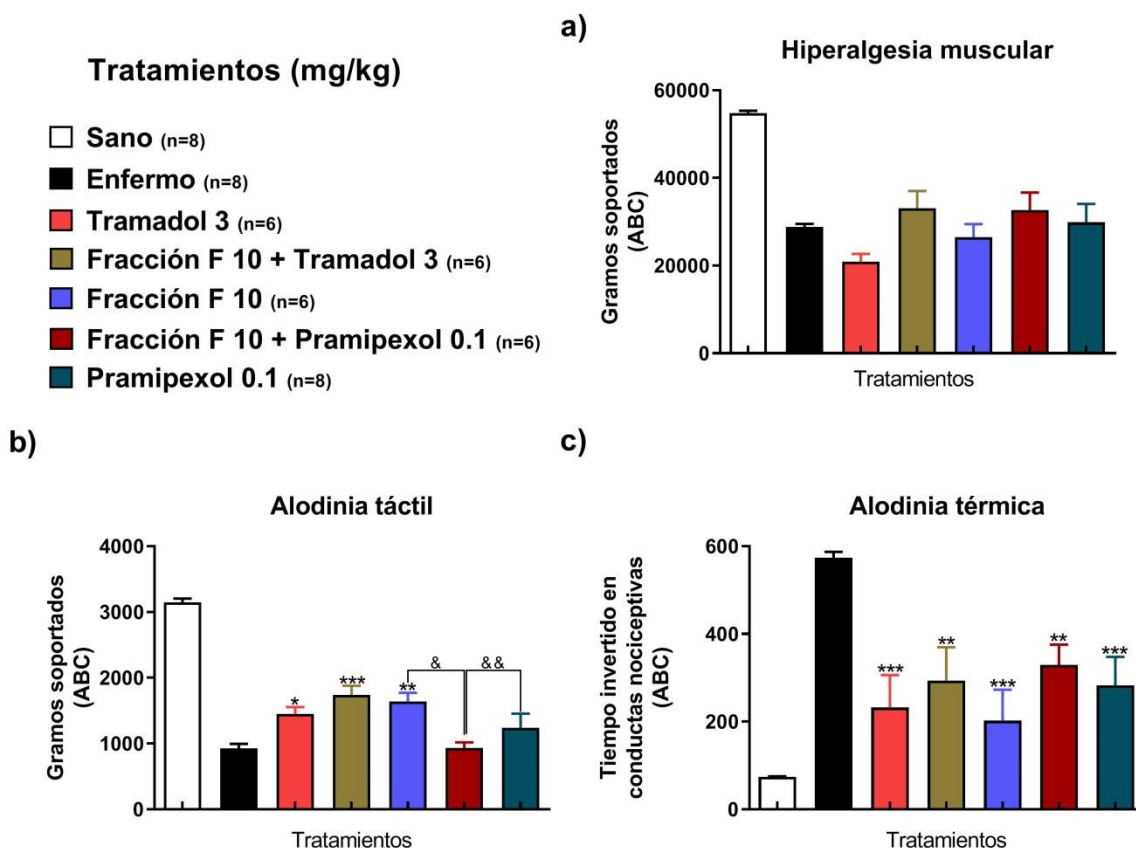


Figura 37. Evaluación de las combinaciones de la fracción F con pramipexol o tramadol en los umbrales nociceptivos del modelo de FM inducidos por reserpina expresada como ABC. a) Hiperalgesia muscular. b) Alodinia táctil. c) Alodinia térmica. Cada punto representa el promedio $\pm$ EEM del ABC de la fuerza soportada (g) o del tiempo empleado en lamidas y sacudidas (s). ANADEVIA de una vía seguido de la prueba *post-hoc* Tukey * $P<0.05$, ** $P<0.01$ y *** $P<0.001$ comparados contra el grupo enfermo. & $P<0.05$, && $P<0.01$ comparación entre tratamientos.

Se compararon los efectos antialodínicos y antihiperalgésicos teóricamente esperados en el caso de tratarse de una interacción aditiva entre las dosis subefectivas de la fracción F (10 mg/kg) y pramipexol (0.1 mg/kg) o tramadol (3

mg/kg) contra aquellos efectos antialodínicos y antihiperalgésicos generados experimentalmente con estas combinaciones (Fig. 38). Es decir que para calcular el porcentaje de efecto teórico, se sumaron los efectos generados por los componentes de las combinaciones de manera individual en cada uno de los umbrales nociceptivos.

Sabiendo que cuando la suma de los efectos obtenidos individualmente con los componentes de la combinación es similar al efecto experimentalmente generado, se trata de una interacción aditiva. En el caso de que el efecto producido por la combinación fuera mayor al teóricamente esperado, estaríamos en presencia de una interacción de potenciación, y si el efecto de la combinación fuera menor, se trataría de una interacción antagónica.

Al analizar las interacciones farmacológicas se encontró que las dosis subefectivas de la fracción **F** combinadas con tramadol ($t_{10}=1.082$, $P<0.3045$) o con pramipexol ($t_{10}=0.3524$, $P<0.7319$) no produjeron efecto tipo analgésico (Fig. 38a).

Para el umbral de alodinia táctil se esperaba que la combinación de la fracción **F** con tramadol generara un efecto antialodínico teórico de 55.42%, no obstante, experimentalmente se obtuvo 36.43% ($t_{10}=2.044$, $P<0.0682$), la diferencia entre las medias no fue suficiente para obtener significancia estadística.

Por otra parte, la administración de la combinación de la fracción **F** con pramipexol no mostró efecto antialodínico (Fig. 38b), aunque teóricamente se esperaba un 55.86% de efectividad para revertir la alodinia táctil inducida en este modelo ($t_{10}=5.778$, $P<0.0002$), este resultado muestra un antagonismo.

De igual forma en el umbral de alodinia térmica, ambas combinaciones resultaron en una interacción antagónica al ser significativamente menores los porcentajes de efecto antialodínico experimentales de los efectos teóricos. En ambas combinaciones se esperaban que mínimo produjeran el 100% de efecto antialodínico a estímulo frío. Sin embargo, experimentalmente se produjeron un

56.07% y 48.97% de respuesta tipo analgésica, respectivamente ($t_{10}=3.840$, $P<0.0033$; $t_{10}=4.807$, $P<0.0007$) (Fig. 38c).

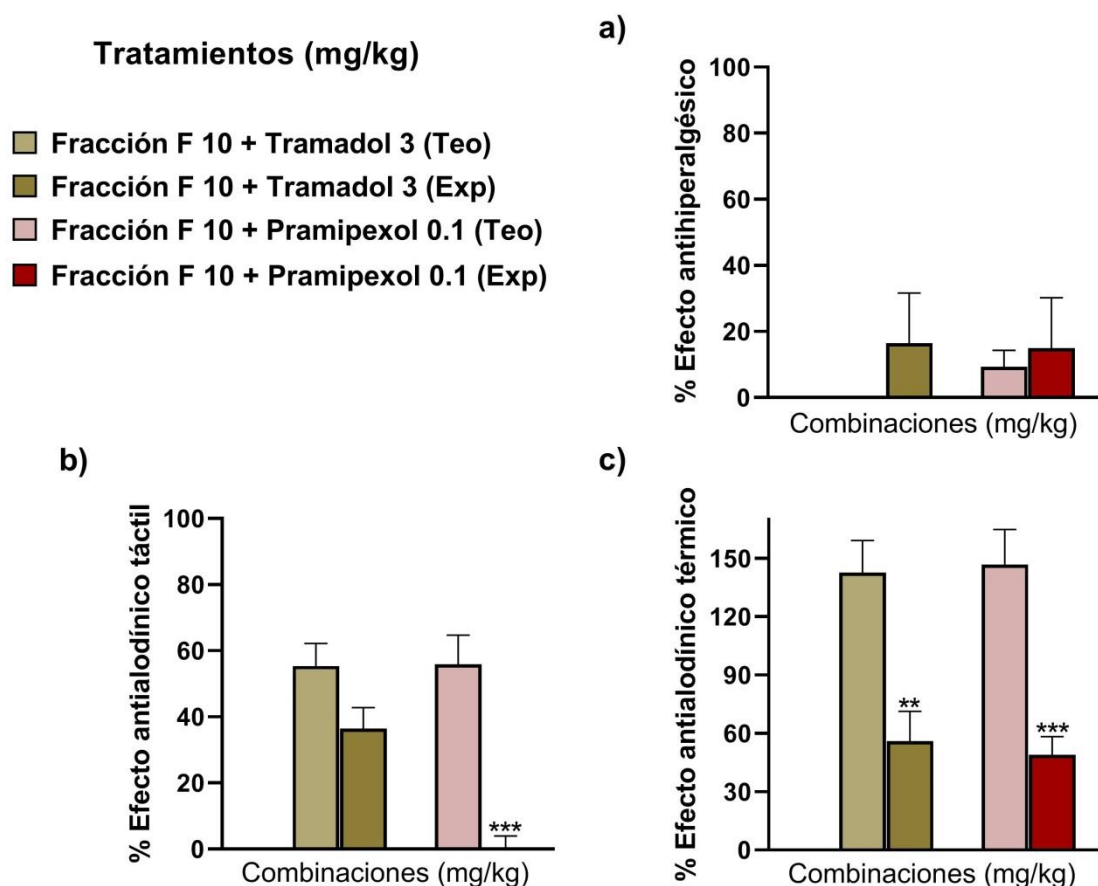


Figura 38. Comparación teórica/experimental del efecto antihiperalgésico y antialodínico de las combinaciones de la fracción F con pramipexol o tramadol en los umbrales nociceptivos del modelo de FM inducidos por reserpina. a) Efecto antihiperalgésico muscular. b) Efecto antialodínico táctil. c) Efecto antialodínico térmico. Cada barra representa el promedio $\pm$ EEM de la fuerza soportada (g) o del tiempo empleado en lamidas y sacudidas (s). Prueba t de student * $P<0.05$, ** $P<0.01$ y *** $P<0.001$ comparación entre dos grupos.

7.8 Evaluación de la fracción F en la prueba de nado forzado

Con base en los reportes previos de las propiedades terapéuticas de *Tilia americana* var. *mexicana* y debido a que la depresión es una comorbilidad importante en el síndrome de FM, una evaluación preliminar de la fracción F (100 mg/kg) se decidió realizar en la prueba de nado forzado, prueba de primera

elección y validada en el modelo de reserpina para el *screening* de conductas tipo-depresivas en modelos animales.

En esta fase experimental primero se constató que los animales presentaban dolor tipo FM con la evaluación de los umbrales nociceptivos. El día de la evaluación de los tratamientos, primero se evaluó la actividad ambulatoria (prueba de campo abierto), después la coordinación motora (prueba de Rota-rod), y finalmente se realizó la sesión de prueba de nado forzado (modelo de depresión). Los valores obtenidos se compararon con el grupo enfermo y el fármaco pramipexol a la dosis de referencia (1 mg/kg).

Los resultados de la prueba de campo abierto no indicaron alguna diferencia entre los grupos evaluados, es decir ninguno de los tratamientos produjo efecto sedante significativo (Tabla 12). Aunque hubo una tendencia a presentar el efecto sedante-hipnótico por parte de la fracción **F** rica en flavonoides. En la prueba de rota-rod sólo la fracción **F** en la dosis de 10 mg/kg produjo efecto sobre la coordinación motora significativo (Tabla 13).

Tabla 12. Evaluación de la actividad ambulatoria mediante prueba de campo abierto

Tratamiento	Número de cuadros explorados (mediana)	Rango máximo
Reserpina (Enfermo)	15	38
Fracción F (100 mg/kg)	5	16
Pramipexol (1 mg/kg)	10	33

Tabla 13. Evaluación de la coordinación motora con el equipo rota-rod

Tratamiento	Número de caídas (mediana)	Rango máximo
Reserpina (Enfermo)	0	1
Fracción F (100 mg/kg)	16	26
Pramipexol (1 mg/kg)	0	4

En la prueba de nado forzado, sólo pramipexol 1 mg/kg redujo en un 95.09% el tiempo de inmovilidad inducido por reserpina (Fig. 39a) (Tratamiento:

$F_{2,11} = 20.45$, $P < 0.0002$) y a consecuencia de esta disminución se presentó aumento en un 55.24% en el tiempo de nado (Fig. 39b) (Tratamiento: $F_{2,11} = 23.14$, $P < 0.0001$). En la conducta de escalamiento no se presentaron cambios respecto al control enfermo con ninguno de los dos tratamientos (Fig. 39c) (Tratamiento: $F_{2,11} = 0.1598$, $P < 0.8542$).

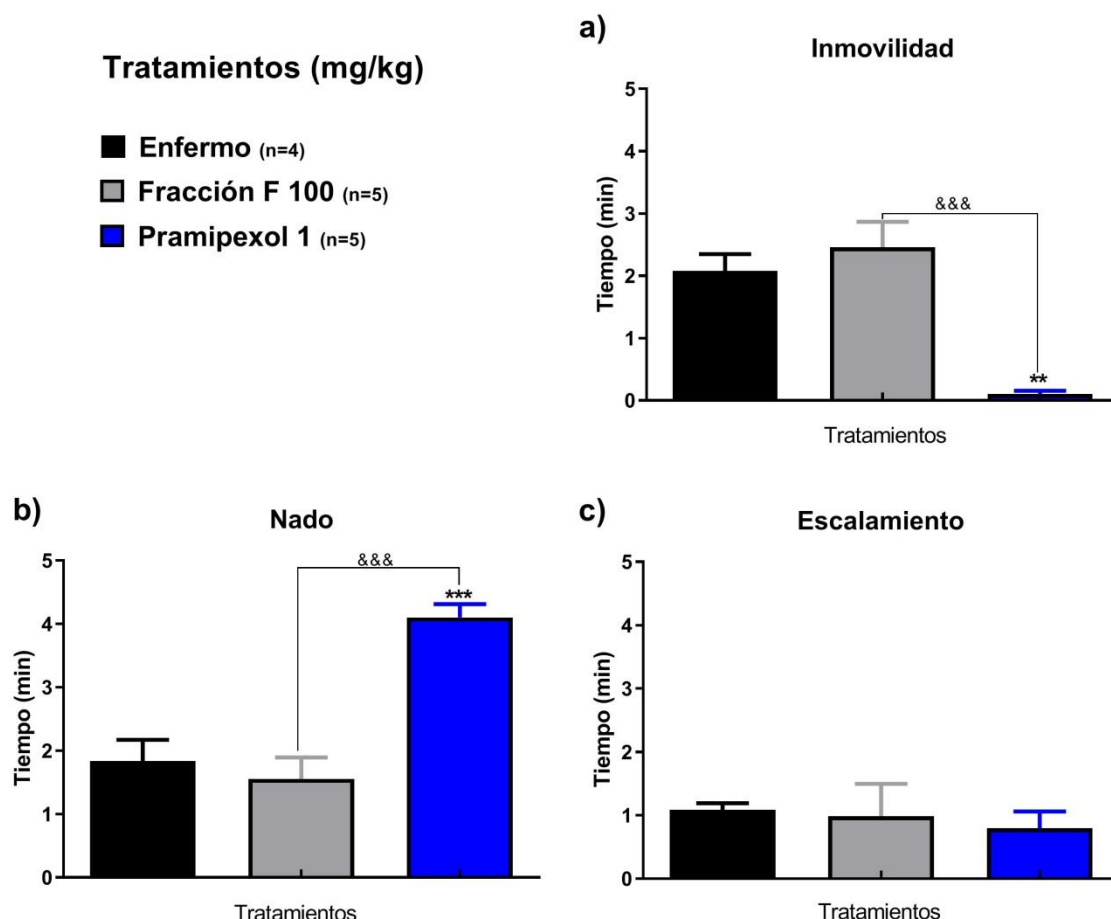


Figura 39. Evaluación preliminar de la fracción F en la prueba de nado forzado. a) Inmovilidad. b) Nado. c) Escalamiento. Cada barra representa el promedio $\pm$ EEM del tiempo empleado en la conducta de inmovilidad, nado o escalamiento (min). ANADEVA de una vía seguido de la prueba *post-hoc* Tukey * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ y *** $P < 0.001$ comparados con el grupo enfermo, &&& $P < 0.001$ comparación entre tratamientos.

8. DISCUSIÓN

La FM es un padecimiento de etiología desconocida caracterizado principalmente por dolor crónico generalizado y múltiples síntomas que incluyen fatiga, alteraciones del sueño, disfunciones cognitivas y episodios depresivos (Clauw, 2009). Afecta gravemente la calidad de vida de quien lo padece y representa un impacto socio-económico importante para la población. La información resultante de las investigaciones preclínicas y clínicas con las que se cuenta en la actualidad es escasa. En tanto que la evidencia de efectividad de la terapéutica actual para este padecimiento es insatisfactoria e insuficiente; en parte, debido a la pluralidad de concepciones que se tienen sobre la FM en la práctica médica. Además, es necesario el establecimiento de modelos animales de FM que permitan reproducir no solo la sintomatología de este tipo de dolor, sino también las principales comorbilidades como biomarcadores que permitan poder profundizar en los mecanismos subyacentes y en los avances en la investigación sobre la FM (Mogil et al., 2010; Blasco-Serra, 2016).

En general, los modelos animales han ofrecido una buena caracterización neuroquímica, anatómica, fisiológica y electrofisiológica en la replicación de diversos padecimientos, lo cual representa ventajas para la estandarización del trasfondo genético y ambiental, la seguridad y los costos sobre la terapéutica en los sujetos humanos. Un punto en donde convergen los humanos y los animales, en cuanto a la investigación del dolor, es el proceso nociceptivo por el cual se manifiesta el dolor. En ambos inferimos la intensidad y manifestación del proceso doloroso con base en su conducta observable. Sin embargo, los humanos poseen la ventaja de poder comunicarlo a través del habla, lo cual permite un acceso más rápido y directo en su alivio. Es decir, implica la experiencia subjetiva que involucra percepciones, sensaciones y sentimientos a través de descriptores y clasificaciones introspectivas (Mogil et al., 2010; Blasco-Serra, 2016).

Los comportamientos o conductas nociceptivas de los animales de experimentación en respuesta a un estímulo nocivo pueden ser calificados de

forma objetiva y confiable. Aunque la mayoría de esas conductas evaluadas se tratan de reflejos simples a nivel espinal (retirada del estímulo aplicado), espino bulbo-espinal (estiramiento abdominal, saltar) o respuestas innatas (vocalización, rasguños, lamidas, sacudidas, proteger la extremidad) que en ocasiones carecen de validez clínica (Mogil, 2009), los avances científicos (como algoritmos de comportamiento basados en video cada vez más sofisticados y automatización de los ensayos para evitar interpretaciones subjetivas y sesgos) junto al uso de herramientas de ingeniería biomédica permitirán conceptualizar y comprender mejor los procesos neurobiológicos detrás del dolor que permitan implementar modelos experimentales mejorados y respondan a las incógnitas en la clínica. (Mogil et al., 2010).

En 2009, Nagakura y colaboradores desarrollaron el modelo de FM inducido por reserpina en ratas; basados en la hipótesis de que la mialgia generada por este fármaco antihipertensivo es producto de una desregulación en las reservas de aminas biogénicas a nivel del SNC, lo que mimetizaría a este síndrome. Estos autores describieron la generación de hiperalgesia muscular y alodinia táctil que permanece por una semana o más, y en la parte comórbida el aumento en el tiempo de inmovilidad en la prueba de nado forzado como conducta indicadora de un estado tipo depresivo. Así también, observaron que los animales respondieron favorablemente al ser tratados con farmacoterapia (pregabalina, duloxetina, pramipexol) utilizada en FM (Nagakura et al., 2009) validando el modelo de utilidad en el cernimiento farmacológico de alternativas de terapia para este síndrome.

La reserpina es un alcaloide obtenido a partir de la raíz del arbusto asiático *Rauwolfia serpentina*, el cual al ser muy liposoluble atraviesa la barrera hematoencefálica sin problema e interfiere en el sistema monoaminérgico inhibiendo irreversiblemente al transportador de las vesículas de almacenamiento, transporte y liberación de monoaminas (dopamina, serotonina, noradrenalina) - VMAT2- (Lee et al., 2015; Minor y Hanff, 2015). La inhibición de estos receptores genera la destrucción de las vesículas, de modo que las terminales sinápticas no pueden concentrar ni almacenar estos neurotransmisores, los cuales se acumulan

en el citosol y como consecuencia se inicia su degradación por parte de enzimas como la monoamino oxidasa (MAO) (Lee et al., 2015; Maldonado y Maeyama, 2015). La depleción de los niveles de monoaminas en el SNC y en el sistema nervioso simpático (Lee et al., 2015; Blasco-Serra, 2016) conlleva a diversos efectos adversos, incluyendo la depresión severa que requiere tratamiento farmacológico u hospitalización de los pacientes. La reserpina es raramente utilizada en humanos en la actualidad (Maldonado y Maeyama, 2015). Sin embargo, ha sido de utilidad para crear modelos animales de enfermedades relacionadas al dolor generalizado caracterizadas por déficits de monoaminas, así como para generar cuadros de alteraciones motoras asociadas con la deficiencia dopaminérgica (Blasco-Serra, 2016).

En el presente proyecto se evaluó el efecto del extracto polar de las inflorescencias de *Tilia americana* var. *mexicana* y su fracción concentrada en flavonoides sola y en combinación con los fármacos de la clínica, tramadol y pramipexol, en las conductas de hiperalgesia y alodinia en el modelo de FM inducida con reserpina en ratas.

8.1 Análisis del material vegetal por la técnica de Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución

Los reportes de estudios fitoquímicos de la *Tilia americana* var. *mexicana* han demostrado que esta especie contiene compuestos de tipo éster, ácidos alifáticos, polifenoles y terpenoides (Aguirre-Hernández et al., 2007; 2010). Los flavonoides son los constituyentes que caracterizan a esta especie y a su género como los componentes principales en los extractos polares (Pérez-Ortega et al., 2008).

La composición de extractos acuosos y orgánicos de las flores, brácteas e inflorescencias de *Tilia americana* var. *mexicana* (generados por maceración consecutiva del material vegetal en disolventes de diferentes polaridades) ha sido descrita mediante la utilización de técnicas cromatográficas. La presencia de flavonoides como quercetin-3-pentosilhexósido, canferol-3-pentosilhexósido, canferitrina, quercitrina, isoquercitrina, astragalina, rutina, canferol-3-O-ramnósido

y tilirósido ha sido previamente reportada (Pérez-Ortega et al., 2008; Martínez et al., 2009; Aguirre-Hernández et al., 2010). Canferitrina, isoquercitrina, astragalina y tilirósido han sido descritos como componentes mayoritarios en varias especies de *Tilia*, tales como *T. cordata*, *T. rubra*, *T. argentea* y *T. platyphyllos* (Martínez et al., 2009; Aguirre-Hernández et al., 2010; Negri et al., 2013).

Los resultados del análisis cromatográfico que se realizó a dicha especie en este proyecto coinciden con la literatura, ya que los perfiles cromatográficos obtenidos del extracto metanólico de inflorescencias y de la fracción **F** rica en flavonoides sugieren la presencia de derivados glicosilados tales como: rutina, quercitrina e isoquercitrina. A través del análisis de la muestra después de hidrólisis ácida se confirmó que muy probablemente son derivados de la aglicona quercetina, lo cual refuerza los datos de trabajos anteriormente publicados donde se refiere que diferentes derivados glicosilados en estas especies de *Tilia* provienen de la aglicona quercetina (Martínez et al., 2011; Cárdenas-Rodríguez et al., 2014).

8.2 Determinación de las conductas de hiperalgesia y alodinia inducidas por reserpina

Existen evidencias de que la disfunción en el metabolismo de las aminas biogénicas es uno de los fundamentos de la fisiopatología del síndrome de FM (Nagakura et al., 2009; DeSantana et al., 2013; Tamano et al., 2016). Con base en estudios farmacológicos se destaca la disminución de dopamina, serotonina y noradrenalina en la médula espinal, tálamo y corteza prefrontal de los animales de experimentación (Nagakura et al., 2009), lo que se asocia con la baja concentración de estas monoaminas en el fluido cerebroespinal de pacientes con FM (Rusell et al., 1992). El papel de la dopamina en el manejo del dolor a nivel de SNC (Wood, 2008) y la participación de noradrenalina y serotonina en la vía descendiente inhibitoria nociceptiva están asociadas a que una interrupción de su presencia se relaciona con la respuesta incrementada ante estímulos nocivos en las neuronas nociceptivas espinales (Mense, 2000). Aunado a esto, con la

inducción por reserpina de dolor tipo FM se ha reportado una prominente activación de las neuronas a nivel SNC, incluyendo la modificación de algunas propiedades de las células de la microglía en la espina dorsal como el aumento en el tamaño, número y proporción de células activadas de la misma forma como sucede con las pacientes (Fig. 40) (Taguchi et al., 2015).

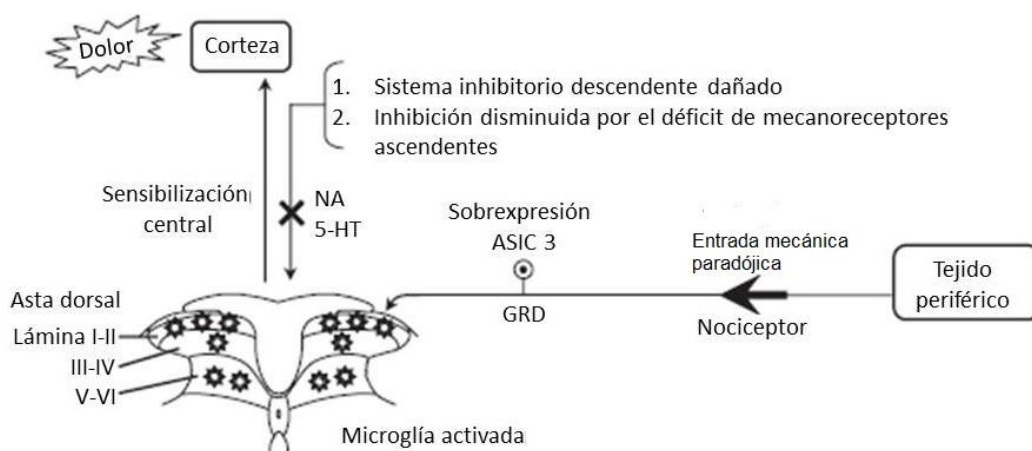


Figura 40. Propuesta de mecanismos periféricos y espinales en el modelo de FM inducida por reserpina.

Modificado de Taguchi et al., 2015.

En el trabajo de Taguchi et al. (2015) se propusieron mecanismos de la nocicepción presentes en el modelo de inducción de FM con reserpina, los cuales incluyen cambios en la sensibilidad mecánica de los nociceptores aferentes primarios de la periferia, caracterizados por una disminución en la proporción de mecanorreceptores de fibras C en conjunto con una exacerbada respuesta en las fibras remanentes. En los ganglios de raíz dorsal (GRD) se comprobó la sobreexpresión genética del mRNA de los canales sensibles a ácido tipo 3 (ASIC por sus siglas en inglés), lo que podría sugerir la conversión de canal protónico a mecanomodulador. En la médula espinal, la microglía se encuentra activada especialmente en la superficie de la lámina I-II, donde la entrada nociceptiva es procesada. La disminución de la proporción de mecanorreceptores de fibras C

ocasiona la falla en el sistema inhibitorio descendente aunado al déficit de noradrenalina y serotonina, lo que se traduce en sensibilización central.

De acuerdo con los resultados obtenidos en estudios preliminares de nuestro grupo con el modelo de FM en ratas Wistar, tanto hembras como machos que fueron administradas vía subcutánea con reserpina a 1 mg/kg (depletador de monoaminas) durante tres días consecutivos, refieren la inducción del dolor tipo FM mediante el descenso en los umbrales nociceptivos representando los estados de hiperalgesia y alodinia que se mantienen por al menos una semana. Para la determinación de los umbrales se emplearon el analgesiómetro Randall-Selitto y los filamentos de Von Frey lo que permitió medir hiperalgesia mecánica y alodinia táctil, respectivamente. En tanto que la aplicación de 60 μ L de acetona en la parte dorsal de la extremidad de las ratas fue de utilidad para determinar el umbral de alodinia a estímulo frío (Choi et al., 1994; Oe et al., 2010). Cabe señalar que estas pruebas son de fácil aplicación y no invasivas, lo que genera menor estrés a los individuos durante su aplicación (Cunha et al., 2004; Blasco-Serra, 2016; Hernandez-Leon et al., 2018). Aunado a esto, tres días de habituación de los animales a la manipulación y al entorno de experimentación tiene como objetivo reducir al máximo los falsos positivos que pudieran originarse como resultado del estrés (Yesilyurt et al., 2015).

El grupo de trabajo de Nagakura (2009) reportó que la administración de reserpina a la dosis mencionada en este modelo redujo significativamente (36-53%) el umbral de presión muscular de ratas de la cepa Sprague-Dawley y también el umbral de respuesta táctil (85-93%). Nuestros datos mostraron una reducción significativa del 47% y 71% en los respectivos umbrales de ratas de la cepa Wistar. En el caso de la alodinia térmica, Oe et. al (2010) describieron una reducción de aproximadamente 95% en el umbral de alodinia a estímulo frío de ratas Sprague-Dawley que se mantuvo 2-10 días tras la administración de reserpina. Lo obtenido en nuestra evaluación con ratas Wistar correspondió a una reducción del 87% en este umbral. Aunque los resultados experimentales son similares a los reportados en la literatura, hay pequeñas variaciones en las

respuestas medidas que pueden estar asociadas a variabilidad biológica individual, así como a factores sistemáticos de las condiciones del laboratorio de experimentación o del manejo del propio investigador, entre otras (Vukojevic et al., 2007).

8.3 Evaluación del extracto metanólico de inflorescencias y de la fracción F en las conductas nociceptivas del modelo de FM inducidas por reserpina

Los resultados de la evaluación farmacológica de la planta endémica *Tilia americana* var. *mexicana* que se obtuvieron en este estudio expresados como cursos temporales y áreas bajo la curva dan evidencia de las propiedades de esta especie para reducir el dolor tipo FM inducido con reserpina. Tanto la administración del extracto como la fracción rica en flavonoides generaron efectos antihiperálgicos y antialodínicos en las diferentes dosis evaluadas. Preliminarmente se habían reportado efectos de tipo analgésico en los extractos de inflorescencias de diferente polaridad (acuoso, hexánico y metanólico) de esta especie de *Tilia* usando modelos animales de dolor agudo inducido por formalina e inflamatorio artrítico gotoso (Martínez et al., 2009; Martínez et al., 2011). Así como también en el efecto antinociceptivo del extracto metanólico de inflorescencias en el modelo de dolor visceral inducido por ácido acético (Valdés-Ruiz, 2017).

La utilidad de especies de *Tilia* en el tratamiento de dolor ha sido documentada previamente. Se ha probado la actividad antinociceptiva, antiinflamatoria y antioxidante de canferol-3,7-O- α -dirhamnósido y quercetin-3,7-O- α -dirhamnósido flavonoides presentes mayoritariamente en las hojas de *T. argentea* (Yildirim et al., 2000; Toker et al., 2004). Fawzy et al. (2018) reportaron la actividad antiinflamatoria, antinociceptiva y nefroprotectora de *T. cordata* utilizando el modelo de edema inducido por carragenina, en el estiramiento abdominal y en la función renal luego de la nefrotoxicidad ocasionada por la administración de cloruro de cadmio, respectivamente. De igual forma se identificaron flavonoles como quercetina y canferol y glucósidos derivados de estos como vitexina,

canferol 3-O- α -ramnósido, quercetin 3-O- β -galactósido y canferol 3-O-rutinósido en el extracto metanólico de las partes aéreas de esta especie.

En relación con los flavonoides existe suficiente evidencia que avala sus efectos benéficos en el sistema biológico, lo que explica un amplio espectro de posibles usos terapéuticos (Di Carlo et al., 1999 citado en Toker et al., 2004). Particularmente quercetina es considerada un flavonoide con eficacia clínica antiinflamatoria. Ésta ha sido aislada como compuesto bioactivo de diversas plantas medicinales para el alivio del dolor y la inflamación. Sus propiedades antinociceptivas se han demostrado en modelos de nocicepción inducida por estímulos térmicos y químicos, como la prueba de estiramiento abdominal y de formalina, en el dolor inducido por glutamato y capsaicina, y en el ensayo de inmersión de la cola, *tail flick test* y *hot-plate* (Filho et al., 2008; Martínez et al., 2009, 2011). La actividad antiinflamatoria de hesperidina y rutina también ha sido demostrada en el modelo experimental de artritis (Guardia et al., 2001; Martínez et al., 2011; Carballo-Villalobos et al., 2017). La mayoría de los flavonoides conllevan a respuestas inmunológicas no específicas al suprimir la fagocitosis de macrófagos, la liberación de especies oxidantes por parte de los neutrófilos y la activación de células cebadas (Guardia et al., 2001). Por otra parte, los efectos antihiperálgésicos y antialodínicos de quercetina, rutina y hesperidina se han reportado en modelos de neuropatía diabética y de dolor disfuncional tipo FM. Además de observar una disminución en la concentración de factores pro-inflamatorios como TNF- α , IL-1 β e IL-6 en muestras de sangre, nervio ciático y médula espinal de ratas que recibieron este tratamiento (Anjaneyulu y Chopra, 2003; Correa-Roan, 2016; Visnagri et al., 2014 citado en Carballo-Villalobos et al., 2017; Hernández-Leon, 2018).

Varios mecanismos de acción se han propuesto en los efectos antinociceptivos de los flavonoides, los cuales difieren dependiendo de la estructura química de éstos. Es reconocido que la parte glicosídica aumenta la hidrofiliidad, lo que influye en las propiedades farmacocinéticas en los fluidos biológicos y puede alterar su transporte a través de la barrera hematoencefálica

modificando así su actividad neurofarmacológica (Cárdenas-Rodríguez et al., 2014). En cuanto a sus propiedades antinociceptivas, algunos estudios han reportado que, al igual que la miricetina, la quercetina bloquea la vía de las enzimas ciclooxigenasa y lipooxigenasa por lo que disminuye la síntesis de leucotrienos, lipoxinas, tromboxanos y prostaglandinas que interfieren en varias funciones biológicas, entre ellas la respuesta inflamatoria, al activarse en las terminaciones nociceptivas (Di Carlo et al., 1999).

Cabe destacar que los flavonoides como la quercetina son moléculas que por su naturaleza química atrapan las especies reactivas de oxígeno y los radicales libres al ser donadores de electrones y formar metabolitos más estables (Cárdenas-Rodríguez et al., 2014). Así pues, poseen acción antioxidante, como consecuencia, en parte, de la inhibición de la síntesis del óxido nítrico (NO, por sus siglas en inglés), un vasodilatador con presencia en varios sistemas; se ha comprobado que en el SNC estimula receptores NMDA, AMPA y metabotrópicos de glutamato, lo que incrementa la transmisión nociceptiva en terminales nerviosas centrales y desemboca en hiperalgesia y alodinia (Toker et al., 2004; Benavides-Trujillo y Pinzón-Tovar, 2008).

La participación del sistema opioidérgico en la respuesta de alivio del dolor también se ha observado que está involucrada en el efecto de flavonoides, pues en la administración conjunta de quercetina con naloxona (un antagonista de los receptores a opioides) el efecto antinociceptivo se ve disminuido en el modelo de dolor inducido por neuropatía diabética. La administración conjunta de rutina y naltrexona (antagonista opioide no selectivo) en la sustancia gris periacueductal ventrolateral (área cerebral que modifica la vía nociceptiva a través de sus proyecciones inhibitoras y excitadoras hacia el asta dorsal de la médula espinal) evitó el efecto antinociceptivo de rutina evaluado en la fase inflamatoria de la prueba de formalina evidenciando la mediación opioide a nivel central (Anjaneyulu y Chopra, 2003; Hernández-Leon et al., 2015, Hernández-Leon et al., 2018).

Otro de los mecanismos más comúnmente reportados que sustentan la actividad antinociceptiva de los flavonoides es la neurotransmisión serotoninérgica. Se ha observado que al administrar hesperidina y WAY100635 (antagonista selectivo de los receptores 5-HT_{1A}) a ratas en el modelo de artritis gotosa, el efecto antinociceptivo del flavonoide hesperidina se inhibe. En otro estudio se encontró que quercetina regula la actividad iónica del canal/receptor 5-HT_{3A} e impide la unión de su ligando 5-HT de forma competitiva, por lo que favorece la disponibilidad sináptica de este neurotransmisor (Lee et al. 2005; Filho et al., 2008; Martínez et al., 2011). Algo similar sucede con la vía GABAérgica, en un reporte de Goutman et al. (2003) demostraron que quercetina, apigenina, morina y crisina inhiben la corriente iónica mediada por las subunidades $\alpha(1)$, $\beta(1)$, $\gamma(2s)$ del receptor GABA_A y $\rho(1)$ del receptor GABA_C, lo que facilitaría la neurotransmisión de GABA para actuar a través de sus diversos *targets* terapéuticos.

Se ha demostrado que quercetina, canferol, crisina, apigenina, entre otros flavonoides actúan como inhibidores de las enzimas MAO_A y MAO_B (Sloley et al., 2000), además se han llevado a cabo ensayos de *docking* para comprobar que existe interacción con ambas isoformas de la enzima y una completa unión de quercetina con el sitio activo de MAO_B. Algunos contenidos del mecanismo de acción aún se desconocen (Dhiman et al., 2019). Por otra parte se ha implicado la participación de quercetina en receptores dopaminérgicos D₂, D₃ y α_2 adrenérgicos para llevar a cabo su efecto antinociceptivo al verse éste disminuido al combinarse con sulpirida o yohimbina, sus respectivos antagonistas específicos y potenciado con quinpirol (agonista dopaminérgico D₂/D₃) (Pattipati et al., 2003; Kaur et al., 2005). Otro posible mecanismo de la actividad antinociceptiva de la quercetina tiene que ver con la inhibición de la proteína quinasa C (PKC por sus siglas en inglés), cuya activación está relacionada con cambios en la percepción dolorosa. Se sabe que la quercetina es capaz de reducir la hiperalgesia y la hiperexcitabilidad de fibras C en rata ocasionadas por el aumento en la liberación de sustancia P y aminoácidos como el glutamato, lo que aumenta los niveles de diacilglicerol (DAG) y activa a PKC (Anjaneyulu y Chopra, 2003).

8.3. Evaluación de pramipexol en las conductas nociceptivas del modelo de FM inducida por reserpina

Con la evidencia acumulada de las disfunciones dopaminérgicas en la FM, no es sorprendente que se evalúen agonistas de dopamina como opción terapéutica para este padecimiento (Wood et al., 2007). Pramipexol es un agonista dopaminérgico con alta especificidad por la subfamilia de receptores D_2 , especialmente por los subtipos D_3 -que pertenecen a ésta junto con D_2 y D_4 -. Estos receptores están acoplados a proteínas G inhibitorias (Gai y Gao) que inhiben a la enzima adenilato ciclasa y por ende la formación de AMPc, lo que favorece la entrada de K^+ y reduce la entrada de iones Ca^{2+} a través de canales dependientes de voltaje. Se sabe que tanto los receptores D_2 como los D_3 están involucrados en el dolor y la antinocicepción, pero aún falta determinar cuál de ellos participa en el síndrome de FM (Schmidt-Wilcke y Clauw, 2010).

Se ha reportado la eficacia del tratamiento con pramipexol en parámetros como dolor, depresión, funcionalidad, fatiga y estado de salud global de pacientes con FM (Maj et al., 1997; Holman y Myers, 2005). Existen publicaciones que describen que la administración continua de pramipexol puede modificar la liberación espontánea de dopamina, noradrenalina y serotonina en neuronas de cerebro de rata, lo que sugiere que la actividad terapéutica de pramipexol se atribuye al aumento en la neurotransmisión de dopamina y serotonina (Barone et al., 2010).

Los resultados que obtuvimos tras la administración de este fármaco coinciden con lo reportado por Nagakura et al. (2009) respecto a la eficacia antihiperálgica y antialodínica táctil de pramipexol a la dosis de 1 mg/kg y la subefectividad de la dosis de 0.1 mg/kg en esos umbrales nociceptivos inducidos por reserpina en el modelo animal de FM. La evaluación farmacológica de pramipexol en el umbral de alodinia a estímulo frío de este modelo no ha sido previamente reportada. Nuestros resultados demuestran que su efectividad además de ser sostenida es dosis-dependiente.

8.4 Evaluación de tramadol en las conductas nociceptivas del modelo de FM inducida por reserpina

En la actualidad no existe evidencia de que los opioides sean efectivos en el tratamiento de la FM, probablemente porque algunas pacientes mantienen una pérdida en la expresión genética de los receptores a opioides tipo μ (Christoph et al., 2007; Kaneko et al., 2014). Sin embargo, son varios los grupos de trabajo que han evaluado la actividad terapéutica de tramadol en este padecimiento con resultados positivos. Tramadol es un analgésico sintético de acción central con un mecanismo de acción que combina la afinidad parcial a receptores a opioides tipo μ y la inhibición de la recaptura de noradrenalina y serotonina, además de que uno de sus metabolitos (O-dimetiltramadol) también posee actividad antinociceptiva selectiva a receptores μ (Wood et al., 2007; Schmidt-Wilcke y Clauw, 2010).

En los estudios preclínicos y clínicos reportados previamente se ha probado la intervención de la neurotransmisión noradrenérgica y serotoninérgica en la antinocicepción generada por tramadol en modelos animales de nocicepción como *tail flick test* y *hot-plate* y encontraron que su efecto antinociceptivo se bloqueaba al administrar sistémicamente yohimbina o ritanserina (antagonista adrenérgico α_2 y serotoninérgico respectivamente) (Raffa et al., 1992). Por otra parte Kaneko et al. (2014) describieron el efecto antialodínico táctil de tramadol en el modelo de FM inducida por reserpina en ratas y observaron que la actividad de este fármaco disminuyó parcialmente al administrar naloxona (antagonista opioide), lo que afirma la participación del sistema opioide en la generación de este efecto. En cuanto a interacciones farmacológicas favorables se ha observado que la administración de una tableta combinada de tramadol con paracetamol a pacientes con FM resultó una ser una opción terapéutica segura y moderadamente efectiva para el dolor y síntomas relacionados (Bennett et al., 2003). Kim et al. (2009) reportaron la potenciación del efecto antihiperálgico de milnacipram al administrarlo conjuntamente con tramadol en el modelo animal de FM inducida por solución salina acidificada.

Nuestros resultados concuerdan con el trabajo de Kaneko et al. (2014) donde se mostró que el efecto antialodínico táctil de tramadol a dosis de 10 mg/kg se mantuvo únicamente dos horas tras su administración. Así mismo reportaron que la duración del efecto evaluado en este umbral fue de una hora al administrar la dosis de 3 mg/kg. En nuestro estudio, la respuesta de este grupo también fue significativa respecto al grupo con FM, así como en el umbral de alodinia a estímulo frío. La actividad antihiperalgésica y antialodínica a estímulo frío que observamos en este modelo luego de la administración aguda de tramadol refuerzan lo reportado previamente en modelos de dolor neuropático (Christoph et al., 2007).

8.5 Evaluación de las combinaciones producto natural/fármaco en las conductas nociceptivas del modelo de FM inducidas por reserpina

El estudio de las interacciones farmacológicas es una práctica común en el ámbito médico, pues las terapias combinadas pueden generar efectos benéficos o perjudiciales para las pacientes (Valdés-Ruíz, 2017). Este trabajo forma parte del desarrollo de evidencia científica preclínica que justifique la sugerencia o advertencia de uso de infusiones o tinturas de *Tilia americana* var. *mexicana* en administración conjunta con fármacos utilizados para el tratamiento del dolor en la FM.

Se ha propuesto que la base para obtener interacciones farmacológicas de tipo sinérgico es que los mecanismos de acción de los componentes de la combinación a evaluar sean diferentes (Hernández-Leon, 2018). Como ya fue mencionado anteriormente, los flavonoides como rutina e isoquercitrina, cuya presencia pudimos sugerir en la fracción **F**, generan su actividad antinociceptiva por diferentes vías y al parecer podrían compartir algunas de ellas con pramipexol y/o tramadol.

Lo anteriormente mencionado fue constatado en el umbral de hiperalgnesia muscular, ya que no se observó un efecto positivo en la interacción farmacológica en las combinaciones de la fracción **F** con tramadol o pramipexol. Lo cual se

observó de manera similar en el umbral de alodinia táctil con la combinación de la fracción **F** con tramadol. Mientras que, en el caso de la combinación con pramipexol, este umbral y en ambas combinaciones con tramadol o pramipexol en el umbral de alodinia a estímulo frío, la interacción farmacológica resultó en un antagonismo ya que los efectos antialodínicos observados fueron significativamente menores a la suma teórica esperada. Esto pudiera deberse a que uno de los mecanismos de acción reportados para rutina está relacionado con la inhibición de la recaptura de serotonina y noradrenalina (Zhang et al., 2004; Machado et al., 2008) e inclusive regula el sistema opioidérgico en la vía descendente inhibitoria de la nocicepción (Hernández-Leon et al., 2015). Aunado a eso, se ha reportado que quercetina inhibe la unión de 5-HT a su receptor 5HT-_{3A} y con ello se favorece la disponibilidad sináptica de este neurotransmisor en las vías de antinocicepción (Lee et al., 2005). También se ha implicado la participación de quercetina en receptores dopaminérgicos D₂ y D₃ (Pattipati et al., 2003). Por ello al combinarse la fracción **F** con tramadol (un agonista parcialmente opioide e inhibidor de la recaptura de 5-HT y NA) o pramipexol (agonista dopaminérgico D₃), el efecto no se ve facilitado a nivel de los nociceptores de fibras A δ , que participan en la conducción dolorosa de los umbrales de alodinia a estímulos térmicos fríos inducidos por reserpina en ratas.

8.6 Evaluación preliminar de la fracción F en la prueba de nado forzado

En este apartado se propone que, al igual que con los umbrales nociceptivos, la depleción de aminas biogénicas ocasionada por reserpina al inhibir irreversiblemente el transportador VMAT2, genera las conductas tipo depresivas en este modelo animal, pues disminuye el transporte y con ello el metabolismo de estas monoaminas a nivel de SNC (Nagakura et al., 2009; Hernández-Leon et al., 2018). Existen teorías monoaminérgicas que aseguran que la alteración en los sistemas noradrenérgicos, serotoninérgicos y dopaminérgicos está involucrada en la depresión. Los mecanismos de acción de los antidepresivos disponibles actualmente se enfocan en equilibrar uno o más de estos sistemas y restaurar su

eficacia relativa en uno o más sitios sinápticos; por ejemplo, a través de la modificación de la sensibilidad de receptores post-sinápticos (Kano et al., 2008).

En la prueba de nado forzado se somete a los animales a un ambiente aversivo del cual no pueden escapar, por lo que se genera un estado análogo a la desesperanza, uno de los síntomas principales de la depresión (Cryan et al., 2005). Se ha comprobado que las conductas observadas en esta prueba están relacionadas con mecanismos monoaminérgicos, pues se sabe que los tratamientos que actúan inhibiendo la recaptura de serotonina favorecen la conducta de nado; mientras que aquellos que funcionan modulando la actividad dopaminérgica o noradrenérgica promueven el escalamiento (Slattery y Cryan, 2012; Hernández-León, 2018).

Existen reportes acerca de las propiedades antidepresivas que se le atribuyen a los flavonoides presentes en diferentes plantas medicinales, tal es el caso de rutina, que en el trabajo de Machado et al. (2008) se aisló de *Schinus molle* y fue capaz de reducir la conducta de inmovilidad en la prueba de suspensión de la cola (otro ensayo para evaluar tratamientos antidepresivos cuyo fundamento es similar al de la prueba de nado forzado). Además de ser un componente determinante en el efecto tipo antidepresivo de *Hypericum perforatum* (conocida popularmente como hierba de San Juan) (Zhang et al., 2004). Hernández-Leon (2018) evaluó la efectividad de rutina para revertir el comportamiento tipo depresivo en ratas en el modelo de FM inducida por reserpina utilizando la prueba de nado forzado. Observó que el grupo experimental tratado con este flavonoide redujo la conducta de inmovilidad e incrementó la de nado. Entre los mecanismos de acción que se han propuesto se encuentran la inhibición de la recaptura serotoninérgica y noradrenérgica, ya que al administrar para-clorofenilalanina (PCPA, inhibidor selectivo irreversible de la triptófano hidroxilasa) o alfametil-p-tirosina (AMPT, inhibidor selectivo irreversible de la tirosina hidroxilasa) previnieron el efecto tipo antidepresivo de rutina; siendo estas las enzimas responsables de la síntesis de serotonina y noradrenalina

respectivamente. La inhibición de la actividad de ambas isoformas de la MAO es otra posible vía de acción sugerida (Zhang et al., 2004; Machado et al., 2008).

La posible presencia de rutina e isoquercitrina en la fracción **F** permitió suponer que esta fracción generaría efecto tipo antidepresivo (Hernández-Leon, 2018). Sin embargo, esto no se observó en nuestros resultados, probablemente debido a que la dosis utilizada no fue suficiente para generar dicha actividad. Se encontró que la administración de la fracción **F** afectó la coordinación motora de los animales de experimentación, al aumentar el número de caídas del cilindro rotatorio, y redujo el número de cuadros explorados en la prueba de actividad ambulatoria. No obstante, la disminución de esta actividad no fue suficiente para obtener significancia estadística respecto al control con FM. El efecto sedante de *Tilia americana* var. *mexicana* se ha descrito en el trabajo de Aguirre-Hernández et al. (2007) quienes administraron el extracto metanólico de inflorescencias de *Tilia* a ratones y observaron una reducción de la actividad ambulatoria de 50-60%. La disminución de esta actividad también fue reportada tras la administración de flavonoides como rutina (Fernández et al., 2006). Se cree que los receptores a benzodiacepinas GABA_A y los receptores serotoninérgicos 5-HT_{1A} están implicados al disminuir el efecto tipo sedante con la administración conjunta de flumazenil y WAY100635, como sus respectivos antagonistas (Aguirre-Hernández et al., 2016).

En contraste con los flavonoides evaluados, pramipexol fue eficaz al disminuir el tiempo de inmovilidad y aumentar el tiempo de nado comparado con el grupo de FM, lo que indica que el mecanismo de acción involucrado sería la vía serotoninérgica. Es claro que no se descarta la coexistencia con otros mecanismos al tratarse de un agonista de dopamina. Dhir et al (2007) realizaron estudios neuroquímicos en donde estimaron los niveles de dopamina y serotonina en tejido cerebral de ratones en modelos experimentales de depresión y encontraron que al administrar ropinirol (agonista dopaminérgico D₂/D₃) había un aumento importante de serotonina en todo el tejido, demostrando las conexiones neuronales entre los sistemas dopaminérgico y serotoninérgico, específicamente

en la sustancia nigra y en la vía nigro-rafé. Lo que no descarta su posible participación en nuestros resultados.

Las propiedades antidepresivas de agonistas de receptores dopaminérgicos D₃ como pramipexol y pergolida se han reportado previamente en el modelo de nado forzado en ratas tratadas con reserpina (Maj et al., 1997) y en ensayos clínicos de pacientes con Parkinson (Barone et al., 2010) y FM (Holman y Myers, 2005). Nuestros resultados concuerdan con lo reportado con Maj et al. (1997) al observar que la administración de 1 mg/kg de pramipexol vía s.c. mostró una actividad tipo antidepresiva significativa. Este efecto pudiera estar relacionado a la preferencia del fármaco a unirse a receptores D₃ cuya distribución anatómica juega un papel importante en los circuitos neuronales implicados en estados depresivos (Kano et al., 2008).

9. CONCLUSIÓN

Tilia americana var. *mexicana* produce efecto antihiperalgésico y antialodínico en un modelo experimental de FM en parte por sus componentes de tipo flavonoide. Los resultados obtenidos representan evidencia científica que refuerza el uso de esta especie como alternativa terapéutica para este padecimiento. Sin embargo, su administración en conjunto con fármacos de la clínica con evidencia moderada en su utilidad para el alivio del dolor en FM como tramadol o pramipexol no es recomendable al no generar mayor beneficio que de manera individual.

10. PERSPECTIVAS

- Continuar con el estudio fitoquímico de los componentes de la fracción rica en flavonoides de *Tilia* mediante la técnica de espectrometría de masas o resonancia magnética nuclear para elucidar la identidad de los mismos.
- Identificar los componentes de extractos no polares de *Tilia* y evaluar su posible actividad farmacológica en el modelo de dolor tipo FM inducida por reserpina.

- Evaluar el efecto extracto o la fracción rica en flavonoides de *Tilia* en otras comorbilidades (trastornos del sueño, fatiga, disfuncionalidades cognitivas) del síndrome de FM a través del modelo animal de FM inducido por reserpina.
- Realizar distintas combinaciones del extracto o la fracción rica en flavonoides de *Tilia* con otros fármacos de la clínica con diferente mecanismo de acción para conocer su interacción farmacológica en el modelo de FM inducida por reserpina.
- Determinar si estas interacciones producto natural/fármaco son de tipo farmacodinámico o farmacocinético mediante diferentes evaluaciones de los mecanismos de acción presentes.

11. REFERENCIAS

Ablin, J., Neumann, L., Buskila, D. (2008). Pathogenesis of fibromyalgia – a review. *Joint Bone Spine* 75: 273–279.

Aguirre-Hernández E, et al. (2007). Pharmacological evaluation of the anxiolytic and sedative effects of *Tilia americana* L. var. *mexicana* in mice. *Journal of Ethnopharmacology*. 109(1): 140-145.

Aguirre-Hernández E, et al. (2010). HPLC/MS analysis and anxiolytic-like effect of quercetin and kaempferol flavonoids from *Tilia americana* var. *mexicana*. *Journal of Ethnopharmacology*. 127(1): 91-97.

Aguirre-Hernández, E. et al. (2016). Anxiolytic and sedative-like effects of flavonoids from *Tilia americana* var. *mexicana*: GABAergic and serotonergic participation. *Salud Mental*. 39(1): 37-46.

Anjaneyulu, M., Chopra, K. (2003). Quercetin, a bioflavonoid, attenuates thermal hyperalgesia in a mouse model of diabetic neuropathic pain. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*. 27: 1001-1005.

Arnold, L. et al. (2011). Improving the recognition and diagnosis of fibromyalgia. *Mayo Clinic Proceedings*. 86(5): 457-464.

Barone, P. et al. (2010). Pramipexole for the treatment of depressive symptoms in patients with Parkinson's disease: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *The Lancet Neurology*. 9: 573-580.

Bassols, A. et al. (1999). An epidemiological comparison of pain complaints in the general population of Catalonia, Spain. 83: 9-16.

Bautista, A., Chang, G. (2017). Antidepressants. En: J. Pope, T. Deer (eds.). *Treatment of chronic pain conditions*. 1 ed. USA: Springer pp 83-85

Belenguer et al. (2009). Clasificación de la fibromialgia. Revisión sistemática de la literatura. *Reumatología Clínica*. 5(2): 55-62.

Benavides-Trujillo, M., Pinzón-Tovar, A. (2008). Óxido nítrico: implicaciones fisiopatológicas. *Revista Colombiana de Anestesiología*. 36(1): 45-52.

Bennett, R. et al. (2003). Tramadol and acetaminophen combination tablets in the treatment of fibromyalgia pain: a double-blind, randomized, placebo-controlled study. *American Journal of Medicine*. 114: 537-545.

Blasco Serra, A. (2016). Estudio conductual, electrofisiológico e inmunohistoquímico del modelo de fibromialgia inducido por reserpina en ratas (Tesis de doctorado). Universidad de Valencia. España.

Boulanger L., et al. (2012). Predictors of pain medication selection among patients diagnosed with fibromyalgia. *Pain practice: The Official Journal of World Institute of Pain*. 12(4): 226-275.

Cabo-Meseguer, A., Cerdá-Olmedo, G., Trillo-Mata, J. (2017). Fibromyalgia: Prevalence, epidemiologic profiles and economic costs. *Medicina Clínica*. 149(10): 441-448.

Carballo-Villalobos et al. (2017). Pro-inflammatory cytokines involvement in the hesperidin antihyperalgesic effects at peripheral and central levels in a neuropathic pain model. *Inflammopharmacology*. 25(2): 265-269.

Cárdenas-Rodríguez, et al. (2014). Anticonvulsant and antioxidant effects of *Tilia americana* var. *mexicana* and flavonoids constituents in the pentylenetetrazole-induced seizures. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2014.

Caspi, A., Sugden, K., Moffitt, TE., Taylor, A., Craig, IW., Harrington, H., McClay, J., Mill, J., Martin, J., Braithwaite, A., Poulton, R. (2003). Influence of life stress on depression: moderation by a polymorphism in the 5-HTT gene. *Science*. 301(5631): 386-389.

Chan, S., Hayek S., Veizi, E. (2018) Mechanisms of Physiologic Pain. En: J. Cheng, R.W. Rosenquist (eds.) *Fundamentals of Pain Medicine*. 1° ed. USA: Springer. pp 13-19.

Chaplan S. R., Bach F. W., Pogrel J. W., Chung J. M., Yaksh T. L. (1994). Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. *Journal of Neuroscience Methods* 53:55–63.

Cheng, J., Rosenquist, R. (2018). Fundamentals of Pain Medicine. EUA: Springer International Publishing.

Choi, Y., Yoon, YW., Na, HS., Kim, SH., Chung, JM. (1994). Behavioral signs of ongoing pain and cold allodynia in a rat model of neuropathic pain. PAIN. 59(3): 369-376.

Christoph, T. et al. (2007). Tramadol has a better potency ratio relative to morphine in neuropathic than in nociceptive pain models. Drugs. 8(1): 51-57.

Clauw, DJ. (2009). Fibromyalgia: an overview. The American Journal of Medicine 122(12): S3-S13.

Clauw, DJ. (2014). Fibromyalgia: a clinical review. Journal of the American Medical Association. 311(15): 1547-1555.

Cobarrubias-Gómez, A., Carrillo-Torres, O. (2016). Actualidades conceptuales sobre fibromialgia. Revista Mexicana de Anestesiología. 39(1): 58-63.

Cohen, H. (2017). Controversies and challenges in fibromyalgia: a review and a proposal. Therapeutic Advances in Musculoskeletal Disease. 9(5): 115-127.

Collado, A., Conesa, A. (2009). Tratamiento farmacológico de la fibromialgia: hacia la neuromodulación química. Reumatología Clínica. 5(S2): 27-31.

CONABIO (2019). Tilia americana. Disponible en: <http://bdi.conabio.gob.mx/fotoweb/inicio.fwx> Consultado el 12/07/19.

Consejería de Sanidad. (2014). Atención a pacientes con FM. (Varios autores). Dirección general de asistencia sanitaria. España.

Correa Roan, LE. (2016). Evaluación del dolor en un modelo experimental de fibromialgia en ratas Wistar macho tratadas con el flavonoide Quercetina (Tesis de licenciatura). Universidad Nacional Autónoma de México. México.

Cruz-Franco et al. (2010). Tratamiento farmacológico de la fibromialgia: la experiencia a través de tres años. Revista de la Facultad de Medicina de la UNAM. 53(3): 11-18.

Cryan, J. F., Valentino, R. J., Lucki, I. (2005). Assessing substrates underlying the behavioral effects of antidepressants using the modified rat forced swimming test. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. 29: 547–569.

de Souza et al. (2009). The deficit of pain inhibition in fibromyalgia is more pronounced in patients with comorbid depressive symptoms. *Clinical Journal of Pain*. 25(2): 123-127.

DeSantana, J., Da Cruz, K., Sluka, K. (2013). Animal models of fibromyalgia. *Arthritis Research & Therapy*. 15(222): 1-13.

Deuis, J., Dvorakova, L., Vetter, I. (2017). Methods used to evaluate pain behaviors in rodents. *Frontiers in Molecular Neuroscience*. 10:284.

Dhiman, P. et al. (2019). Quercetin and related chromenone derivatives as monoamine oxidase inhibitors: Targeting neurological and mental disorders. *Molecules*. 24(418): 1-18.

Dhir, A., Kulkarni S.K. (2007). Involvement of dopamine (DA)/serotonin (5-HT)/ sigma (σ) receptor modulation in mediating the antidepressant action of ropinirole hydrochloride, a D₂/D₃ dopamine receptor agonist. *Brain Research Bulletin*. 74: 58-65.

Di Carlo, G. et al. (1999). Flavonoids: Old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Life Science* 65(4): 337-353.

Dixon W. J. (1980). Efficient analysis of experimental observations. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 20:441–462.

Dreamstime (2019). Nerve response to pain and touch. Disponible en: <https://thumbs.dreamstime.com/z/nerve-response-to-pain-touch-noxious-receptors-skin-pathways-brain-via-spinal-cord-thalamus-created-adobe-46581299.jpg>. Consultado el 11/07/19.

Docplayer (2019). Universidad Veracruzana. Facultad de Química Farmacéutica Biológica Disponible en: <https://docplayer.es/85155812-Universidad-veracruzana-facultad-de-quimica-farmaceutica-biologica.html> Consultado el 22/07/19

Docplayer (2019) Comparación del efecto tipo antidepresivo de fluoxetina y duloxetina entre ratas macho y hembra. Disponible en: <https://docplayer.es/71446172-Comparacion->

[del-efecto-tipo-antidepresivo-de-fluoxetina-y-duloxetina-entre-ratas-macho-y-hembra.html](#)

Consultado el 22/07/19.

Ehrlich, G. (2003). Pain is real; fibromyalgia isn't. *The Journal of Rheumatology*. 30(8): 1666-1667.

Farlex Medical Dictionary. (2009). Tender points. Disponible en <https://medical-dictionary.thefreedictionary.com/Tender+points>. Consultado el 11/08/19.

Fernández, S. et al. (2006). Central nervous system depressant action of flavonoid glycosides. *European Journal of Pharmacology*. 539: 168-176.

Filho, et al. (2008). Quercetin: Further investigation of its antinociceptive properties and mechanisms of action. *Archives of Pharmacal Research*. 31(6): 713-721.

Fox, S. (2011). *Fisiología humana*. McGraw Hill. 12° edición. México. pp 264-267.

García-Bardón, F., Castel-Bernal, B., Vidal-Fuentes J. (2006). Evidencia científica de los aspectos psicológicos en la fibromialgia. Posibilidades de intervención. *Reumatología Clínica*. 2(1): S38-S43.

Gilbón, L., Soria, S. (2018). Evaluación química y farmacológica de fracciones de *Tilia americana* var. *mexicana*. Centro de Estudios Tecnológicos Industrial y de Servicios No. 57 "Ignacio Allende". Texto prototipo didáctico.

Goldenberg, D. (2009). Diagnosis and differential diagnosis of fibromyalgia. *The American Journal of Medicine*. 122: S14-S21.

Goutman, J. et al. (2003). Flavonoid modulation of ionic currents mediated by GABA_A and GABA_C receptors. *European Journal of Pharmacology* 461: 79-87.

Guardia, T. et al. (2001). Anti-inflammatory properties of plant flavonoids. Effects of rutin, quercetin and hesperidin on adjuvant arthritis in rat. *Il Farmaco*. 56: 683-687.

Guedes Brito, R., et al. (2018). Natural products as promising pharmacological tools for the management of fibromyalgia symptoms – A review. En: W. Wilke (ed.) *Discussions of unusual topics in fibromyalgia*. 1 ed. USA: IntechOpen pp 55-78.

Halawa, O., Edwards, D. (2015). Etiology. En: E. Lawson, M. Wallace (eds.) Fibromyalgia. Clinical guidelines and treatments. 1 ed. USA: Springer pp 35-43.

Hall, C. S. (1936). Emotional behavior in the rat. III. The relationship between emotionality and ambulatory activity. *Journal of Comparative Psychology*, 22(3), 345-352

Hernández Leon, A. (2018). Caracterización de un modelo experimental de fibromialgia en ratas ovariectomizadas y evaluación del efecto del flavonoide rutina y su combinación con fluoxetina (Tesis de doctorado). Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional. México.

Hernández-Leon, A. et al. (2018). Sex differences and estradiol involvement in hyperalgesia and allodynia in an experimental model of fibromyalgia. *Hormones and Behavior* 97: 39-46.

Hernández-Leon, A., Fernández-Guasti, A., González-Trujano, M.E. (2015). Rutin antinociception involves opioidergic mechanism and descending modulation of ventrolateral periaqueductal grey matter in rats. *European Journal of Pain*. 20: 274-283.

Holman, A., Myers, R. (2005). A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of pramipexole, a dopamine agonist, in patients with fibromyalgia receiving concomitant medications. *Arthritis & Rheumatism*. 52(8): 2495-2505.

Inanici, F., Yunus, M. (2004). History of fibromyalgia: Past to present. *Current Pain and Headache Reports*. 8(5): 369–378.

Jiménez-Silva, A. (2017). Boletín CONAMED-OPS. Órgano de difusión del Centro Colaborador en materia de Calidad y Seguridad del paciente. México.

Kaneko, K. et al. (2014). The analgesic effect of tramadol in animal models of neuropathic pain and fibromyalgia. *Neuroscience Letters*. 562: 28-33.

Kano, O. et al. (2008). Beneficial effect of pramipexole for motor function and depression in Parkinson's disease. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*. 4(4): 707-710.

Kaur, R., Singh, D., Chopra, K. (2005). Participation of α_2 receptors in the antinociceptive activity of quercetin. *Journal of Medicinal Food*. 8(4): 529-532.

Kelly, A., Mauer, K. (2015). Medications, En: E. Lawson, M. Wallace (eds.) Fibromyalgia. Clinical guidelines and treatments. 1 ed. USA: Springer pp 109-115.

Kim, D., Nedeljkovic S. (2017). Nonsteroidal Anti-Inflammatory Medications En: RJ. Yong et al. (eds). Pain Medicine. 1° ed. USA: Springer pp 161-162.

Kim, S. et al. (2009). Effect of the combined use of tramadol and milnacipran on pain threshold in an animal model of fibromyalgia. The Korean Journal of International Medicine. 24(2): 139-142.

Kumar, K., Elavarasi, P. (2016). Definition of pain and classification of pain disorders. Journal of Advanced Clinical & Research Insights. 3(3): 87-90.

Labrid, C. (1994). Pharmacologic properties of Daflon 500 mg. Angiology. 45: 524-530.

Lee, B. et al. (2005). Quercetin inhibits the 5-hydroxytryptamine type 3 receptor-mediated ion current by interacting with pre-transmembrane domain I. Molecules and Cells. 20(1): 69-73.

Lee, K. et al. (2015). The anti-hypertensive drug reserpine induces neuronal cell death through inhibition of autophagic flux. Biochemical and Biophysical Research Communications. 462:402-408.

Machado, D. et al. (2008). Antidepressant-like effect of rutin isolated from the ethanolic extract from *Schinus molle* L. in mice: Evidence for the involvement of the serotonergic and noradrenergic systems. European Journal of Pharmacology. 587: 163-168.

Mahmood, S. (2017). Cognitive-Behavioral Therapy. En: RJ. Yong et al. (ed). Pain Medicine. 1 ed. USA: Springer pp 205-206

Maj, J. et al. (1997). Antidepressant effects of pramipexole, a novel dopamine receptor agonist. Journal of Neural Transmission. 104: 525-533.

Maj, J. et al. (1997). Antidepressant effects of pramipexole, a novel dopamine receptor agonist. Journal of Neural Transmission. 104: 525-533.

Maldonado, M., Maeyama, K. (2015). The metabolism of histamine in rat hypothalamus and cortex after reserpine treatment. *Neurochemistry International*. 85-86: 31-39.

Martínez, AL. et al. (2009). Antinociceptive activity of *Tilia americana* var. *mexicana* inflorescences and quercetin in the formalin test and in an arthritic pain model in rats. *Neuropharmacology*. 56: 564-571.

Martínez, AL. et al. (2011). Hesperidin produces antinociceptive response and synergistic interaction with ketorolac in an arthritic gout-type pain in rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 97(4):683-690.

Martínez-Lavín, M. (2007). Biology and therapy of fibromyalgia. Stress, the stress response system, and fibromyalgia. *Arthritis Research & Therapy*. 9(4): 1-7.

Martínez-Lavín, M. (2011). A novel holistic explanation for the fibromyalgia enigma: autonomic nervous system dysfunction. *Fibromyalgia Frontiers*. 10(1): 1-5.

McMahon, S., Bennett, D., Bevan S. (2007) Mediadores inflamatorios y moduladores del dolor. En: S. McMahon, M. Koltzenburg (eds.) *Tratado de dolor de Wall y Melzack*. 5° ed. USA: Elsevier. pp 49.

Medical Dictionary (2019). Pain. Disponible en: <https://medical-dictionary.thefreedictionary.com/pain> [Consultado el 22 de junio de 2019].

Mense, S. (2000). Neurobiological concepts of fibromyalgia- the possible role of descending spinal tracts. *Scand Journal of Rheumatology*. 29(113): 24-29.

Meyer, R., Ringkamp, M., Campbell, J, Raja S. (2007). Mecanismos periféricos de la nocicepción cutánea En: S. McMahon, M. Koltzenburg (eds.) *Tratado de dolor de Wall y Melzack*. 5° ed. USA: Elsevier pp 3-33.

Minor, T., Hanff, T. (2015). Adenosine signaling in reserpine-induced depression in rats. *Behavioural Brain Research*. 286: 184-191.

Mogil, J., Davis, K., Derbyshire, S. (2010). The necessity of animal models in pain research. *PAIN*. 151:12-17

Montaner, J. (26 de septiembre de 2007). *La frecuencia cardiaca discrimina a los pacientes con fibromialgia*. Entrevista a Manuel Martínez Lavín [internet]. Disponible en: http://www.consumer.es/web/es/salud/investigacion_medica/2007/09/24/167217.php

Montgomery, P., Cobb, B., Conner, A. (2017). The Role of Pain Classification Systems in Pain Management. *Critical Care Nursing Clinics of North America*. 29: 407-418.

Montoya D. (2011). Actualización breve sobre Fibromialgia: diagnóstico diferencial y opciones de tratamiento disponibles. Alcmeon, Revista Argentina de Clínica Neuropsiquiátrica. 17(2): 189-198.

Moreno, C., Prada, DM. (2004). Fisiopatología del dolor clínico. En: Uribe Granja, M. (ed.). Guía Neurológica 3. Asociación Colombiana de Neurología. Colombia: ExLibris Editores. pp 9-21

Nagakura Y., et al. (2012). Different pathophysiology underlying animal models of fibromyalgia and neuropathic pain: Comparison of reserpine-induced myalgia and chronic constriction injury rats. *Behavioural Brain Research*. 226:242-249.

Nagakura, Y. et al. (2009). Biogenic amine depletion causes chronic muscular pain and tactile allodynia accompanied by depression: A putative animal model of fibromyalgia. *PAIN*. 146: 26-33.

Nagakura, Y., Oe, T., Aoki, T., Matsuoka, N., (2009). Biogenic amine depletion causes chronic muscular pain and tactile allodynia accompanied by depression: a putative animal model of fibromyalgia. *PAIN*. 146: 26–33.

Naturalista (2019). Tilo Americano. Disponible en: <https://www.naturalista.mx/taxa/206762-Tilia-americana-mexicana>. Consultado el 22 de junio de 2019

Negri, G., Santi, D., Tabach, R. (2013). Flavonol glycosides found in hydroethanolic extracts from *Tilia cordata*, a species utilized as anxiolytics. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*. 15(2): 217-224.

Nishishinya, MB. et al. (2007). Revisión sistemática de las intervenciones no farmacológicas y tratamientos alternativos en la fibromialgia. *Medicina clínica*. 1-9.

Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2000. Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales.

Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación.

OMS (2008). Scoping Document for WHO Treatment Guideline on Non-malignant Pain in Adults. Adopted in WHO Steering Group on Pain Guideline. 2008. Disponible en: http://www.who.int/medicines/areas/quality_safety/Scoping_WHO_Guide_non-malignant_pain_adults.pdf. Consultado el 08/08/2019.

Pascual, M.E. et al. (2002). Simplified screening by TLC of plant drugs. *Pharmaceutical Biology*. 40(2): 139-143.

Pasqual Marques, A. et al. (2017). Prevalence of fibromyalgia: literature review update. *Revista Brasileira de Reumatologia*. 57(4): 356-363.

Pattipati, N., Amanpreet, S., Shrinivas, K. (2003). D₂-dopamine receptor and α_2 -adrenoreceptor-mediated analgesic response of quercetin. *Indian Journal of Experimental Biology*. 41: 1400-1404.

Perena, MJ. et al. (2000). Neuroanatomía del dolor. *Revista de la Sociedad Española del Dolor*. 7(2): 5-10.

Pérez-Ortega, G. et al. (2008). Sedative and anxiolytic efficacy of *Tilia americana* var. *mexicana* inflorescences and quercetin in the formalin test and in an arthritic pain model in rats. *Neuropharmacology*. 56: 564-671.

Petersel, D., Dror, V., Cheung, R. (2011). Central amplification and fibromyalgia: Disorder of pain processing. *Journal of Neuroscience Research*. 89(29): 29-34.

Porsolt, R., Anton, G., Blavet, N., Jalfre, M. (1978). Behavioural despair in rats: A new model sensitive to antidepressant treatment. *European Journal of Pharmacology* 47: 379-391.

Raffa, R.B. et al. (1992). Opioid and nonopioid components independently contribute to the mechanism of action of tramadol, an 'atypical' opioid analgesic. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 260(1): 275-285.

Rajneesh, K., Bolash, R. (2018) Pathways of Pain Perceptions and Modulation. En: J. Cheng, R.W. Rosenquist (eds.) *Fundamentals of Pain Medicine*. 1° ed. USA: Springer. pp 7-10.

Rivera, J. et al. (2006). Evidencias terapéuticas de la fibromialgia. I Simposio de dolor en reumatología. *Reumatología Clínica*. 2: S34-S37

Rivera, J., Alegre, C., Nishishinya, MB., Pereda, CA. (2006). Evidencias terapéuticas en fibromialgia. 1° Simposio de dolor en reumatología. *Reumatología Clínica*. 2: S34-S37.

Russell, J., Vaeroy, H., Javors, M. (1992). Cerebrospinal fluid biogenic amine metabolites in fibromyalgia/fibrositis syndrome and rheumatoid arthritis. *Arthritis and Rheumatism*. 35(5): 550-556.

Saad, M., de Medeiros, R. (2013). Complementary therapies for fibromyalgia syndrome – a rational approach. *Current Pain and Headache Reports*. 17(354): 1-8.

Sañudo, B. et al. (2010). Evidencias para la prescripción de ejercicio físico en pacientes con fibromialgia. *Revista Andaluza de Medicina de Deporte*. 3(4): 159-169.

Schäfers, M., Sorkin, L., Sommer, C. (2003). Intramuscular injection of tumor necrosis factor-alpha induces muscle hyperalgesia in rats. *PAIN*. 104: 579-588.

Schmidt-Wilcke, T., Clauw, DJ. (2010). Pharmacotherapy in fibromyalgia (FM)- Implications for the underlying pathophysiology. *Pharmacology & Therapeutics*. 127: 283-294.

Scholz, J., Woolf, C. (2002). Can we conquer pain? *Nature Neuroscience supplement*. 5: 1062-1067.

Slattery, D., Cryan, J. (2012). Using the rat forced swim test to assess antidepressant-like activity in rodents. *Nature Protocols*. 7(6): 1009-1014.

Sloley, B.D. et al. (2000). Identification of kaempferol as a monoamine oxidase inhibitor and potential neuroprotectant in extracts of *Ginkgo biloba* leaves. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 52: 451-459.

Taguchi et al. (2015). Peripheral and spinal mechanisms of nociception in a rat reserpine-induced pain model. *PAIN*. 156: 415-427.

Tamano, R. et al. (2016). Effect of spinal monoaminergic neuronal system dysfunction on pain threshold in rats, and the analgesic effect of serotonin and norepinephrine reuptake inhibitors. *Neuroscience Letters*. 615(26): 78-82.

Tatem, K., Quinn, J., Phadke, A., Qing, Y. Gordish-Dressman, H., Nagaraju, K. (2014). Behavioral and locomotor measurements using an open field activity monitoring system for skeletal muscle diseases. *Journal of Visualized Experiments*. 91: 1-7.

Tort, S. et al. (2012). Monoamine oxidase inhibitors (MAOIs) for fibromyalgia syndrome. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 4(CD009807): 1-37.

Valdés Ruíz, J. (2017). Evaluación antinociceptiva de la interacción farmacológica de un analgésico antiinflamatorio no esteroideo con *Tilia americana* en un modelo experimental de dolor (Tesis de licenciatura). Universidad Nacional Autónoma de México. México.

Vanderah, T.W. (2007). Pathophysiology of pain. *The Medical Clinics of North America*. 91:1-12.

Vukojevic, K., Lovric-Kojundzic, S., Sapunar, D. (2007). Hyperalgesia-type response reveals no difference in pain-related behavior between Wistar and Sprague-Dawley rats. *Bosnian Journal of Basic Medical Sciences*. 7(2): 123-128.

Walitt, B. et al. (2015). Selective serotonin reuptake inhibitors for fibromyalgia syndrome. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 6(CD011735): 1-67.

Wikipedia (2019). Flavonoide. Disponible en: <https://es.wikipedia.org/wiki/Flavonoide>
Consultado el 02/10/19.

Wolfe, F. et al. (2010). The American College of Rheumatology preliminary diagnostic criteria for fibromyalgia and measurement of symptom severity. *Arthritis care & research*. 62(5): 600-610.

Wood, P. (2008). Role of central dopamine in pain and analgesia. *Expert Reviews in Neurotherapeutics* 8(5): 781-797.

Wood, P., Holman, A., Jones, K.(2007). Novel pharmacotherapy for fibromyalgia. *Expert Opinion on Investigational Drugs*. 16(6): 829-841.

Woodbury, A., Leung, A. (2015). Adjuvant treatments for fibromyalgia. En: E. Lawson, M. Wallace (eds.) *Fibromyalgia. Clinical guidelines and treatments*. 1 ed. USA: Springer pp 129.

Woolf, C., Mannion, R. (1999). Neuropathic pain: aetiology, symptoms, mechanisms, and management. *The Lancet*. 353 (9168): 1959-1964.

Yildirim, A. et al. (2000). Comparison of antioxidant and antimicrobial activities of tilia (*Tilia argentea* Desf. ex DC), sage (*Salvia triloba* L.) and black tea (*Camellia sinensis*) extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48, 5030–5034.

Yunus M., Masi A. (1985). Juvenile fibromyalgia syndrome: a clinical study of 33 patients and matched normal controls. *Arthritis Rheumatology* 28:138–145.

Zhang, Z. (2004). Therapeutic effects of herbal extracts and constituents in animal models of psychiatric disorders. *Life Sciences*. 75: 1659-1699.