



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIHIPERALGÉSICA Y ANTIALODÍNICA
DE *SALVIA AMARISSIMA* ORTEGA Y METABOLITOS ACTIVOS, ASÍ COMO
BÚSQUEDA DE LOS MECANISMOS DE ACCIÓN EN UN MODELO DE
FIBROMIALGIA**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

M. EN C. MORENO PÉREZ GABRIEL FERNANDO

**TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. MARÍA EVA GONZÁLEZ TRUJANO
INSTITUTO NACIONAL DE PSIQUIATRÍA RAMÓN DE LA
FUENTE MUÑIZ**

**COMITÉ TUTOR: DRA. EVA AGUIRRE HERNÁNDEZ
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM
DRA. HERMELINDA SALGADO CEBALLOS
UIM EN ENFERMEDADES NEUROLÓGICAS HOSPITAL
DE ESPECIALIDADES CMNSXXI IMMS**

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX. DICIEMBRE 2022.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIHIPERALGÉSICA Y ANTIALODÍNICA
DE *SALVIA AMARISSIMA* ORTEGA Y METABOLITOS ACTIVOS, ASÍ COMO
BÚSQUEDA DE LOS MECANISMOS DE ACCIÓN EN UN MODELO DE
FIBROMIALGIA**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

M. EN C. MORENO PÉREZ GABRIEL FERNANDO

**TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. MARÍA EVA GONZÁLEZ TRUJANO
INSTITUTO NACIONAL DE PSIQUIATRÍA RAMÓN DE LA
FUENTE MUÑIZ**

**COMITÉ TUTOR: DRA. EVA AGUIRRE HERNÁNDEZ
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM
DRA. HERMELINDA SALGADO CEBALLOS
UIM EN ENFERMEDADES NEUROLÓGICAS
HOSPITAL DE ESPECIALIDADES CMNSXXI IMMS**

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX. 2022.

COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA

OFICIO CPCB/1062/2022

ASUNTO: Oficio de Jurado

M. en C. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
P r e s e n t e

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **12 de septiembre de 2022** se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **DOCTOR EN CIENCIAS** del estudiante **MORENO PÉREZ GABRIEL FERNANDO** con número de cuenta **302869394** con la tesis titulada **“EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIHIPERALGÉSICA Y ANTIALODÍNICA DE *Salvia amarissima* Ortega Y METABOLITOS ACTIVOS, ASÍ COMO BÚSQUEDA DE LOS MECANISMOS DE ACCIÓN EN UN MODELO DE FIBROMIALGIA”**, realizada bajo la dirección de la **DRA. MARÍA EVA GONZÁLEZ TRUJANO**, quedando integrado de la siguiente manera:

Presidente: DR. ADOLFO ANDRADE CETTO
Vocal: DRA. ANAHÍ CHAVARRÍA KRAUSER
Vocal: DRA. MARÍA DE LOS ÁNGELES ARACELI DIAZ RUIZ
Vocal: DR. JOSÉ ALBERTO BÚRQUEZ MONTIJO
Secretario: DRA. HERMELINDA SALGADO CEBALLOS

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

A T E N T A M E N T E
“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 14 de noviembre de 2022

COORDINADOR DEL PROGRAMA



DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA



Agradecimientos institucionales

Al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM.

Al CONACYT, por el apoyo económico mediante la beca 631351 y proyecto No. 226454/256448.

A mi Tutora la Dra. María Eva González Trujano y a los miembros del Comité Tutor la Dra. Eva Aguirre Hernández y la Dra. Hermelinda Salgado Ceballos

Índice

Índice de figuras

Índice de tablas

Resumen	1
Abstract.....	3
1. Introducción.....	5
2. Antecedentes.....	7
2.1 Dolor	7
2.2 Nocicepción	8
2.3 Dolor crónico	11
2.4 Fibromialgia (FM)	13
2.4.1 Descripción general de las alteraciones del SNC en FM	14
2.4.2 Diagnóstico de la FM	14
2.4.3 Excitabilidad del SNC en la FM	15
2.4.4 Alteraciones en la inhibición y FM	17
2.4.5 Alteraciones en nociceptores y FM.....	18
2.5 Terapéutica del dolor	19
2.5.1 Antiinflamatorios no esteroideos (AINEs)	19
2.5.2 Opioides fuertes y débiles	20
2.5.3 Analgésicos adyuvantes	22
2.5.4 Antidepresivos.....	22
2.6 Los productos naturales en la terapéutica del dolor.....	24
2.6.1 Metabolitos secundarios identificados en especies del género <i>Salvia</i> con actividad analgésica y/o anti-inflamatoria.....	24
2.6.2 Terpenoides volátiles.....	24
2.6.3 Terpenoides no volátiles.....	25
2.6.4 Compuestos Fenólicos.....	25
2.6.4.1 Flavonoides.....	26
2.7 El modelo de dolor tipo FM inducido por reserpina.....	26
3. Hipótesis	27
4. Objetivos.....	27
5. Metodología.....	28

5.1 Identificación y procesamiento del material vegetal	28
5.2 Animales	28
5.3 Fármacos y reactivos	28
5.4 Análisis fitoquímico de extractos crudos y contenido de amarisolida A.....	29
5.4.1 Obtención de extractos orgánicos	29
5.4.1.1 Obtención del extracto acuoso.....	30
5.4.2 Análisis cromatográfico de los extractos	30
5.4.3 Identificación de amarisolida A	31
5.5 Evaluación farmacológica.....	31
5.5.1 Evaluación del efecto antinociceptivo y anti-inflamatorio en la prueba de formalina	31
5.5.2 Evaluación del posible mecanismo antinociceptivo de acción del extracto y amarisolida A en la prueba de formalina	32
5.5.3 Evaluación del efecto antinociceptivo en “Hargreaves test”	32
5.5.4 Evaluación del efecto anti-inflamatorio en la prueba de edema inducido con carragenina	32
5.5.4.1 Evaluación del daño tisular.....	33
5.6 Evaluación del efecto antihiperalgésico y antialodínico en el modelo de FM	33
5.6.1 Determinación de citocinas inflamatorias en el tejido nervioso de ratas con FM	35
5.7 Evaluación de sedación como efecto adverso a nivel central	35
5.8 Evaluación de daño gástrico como efecto adverso de anti-inflamatorios.....	35
5.9 Análisis estadístico	36
6. Resultados.....	36
6.1 Obtención de extractos crudos	36
6.2 Análisis fitoquímico y contenido de amarisolida A.....	36
6.3 Evaluación farmacológica.....	38
6.3.1 Evaluación del efecto antinociceptivo y anti-inflamatorio en la prueba de formalina	38
6.3.2 Evaluación del posible mecanismo de acción antinociceptivo del extracto de AcOEt y amarisolida A	41
6.3.3 Evaluación del efecto antinociceptivo del extracto AcOEt y amarisolida A en “Hargreaves test”.....	43
6.3.4 Evaluación del efecto anti-inflamatorio del extracto AcOEt y amarisolida A en la prueba de edema inducido con carragenina	43
6.3.4.1 Efecto sobre el daño tisular producido por la inflamación.....	44

6.4 Evaluación del efecto antihiperalgésico y/o antialodínico del extracto en el modelo de FM.....	46
6.5 Evaluación del efecto antihiperalgésico y/o antialodínico de amarisolida A en el modelo de dolor de tipo FM	51
6.6 Determinación de la concentración de citocinas inflamatorias en el tejido nervioso de ratas en el modelo de FM inducido por reserpina.....	55
6.7 Evaluación del efecto adverso de sedación.....	57
6.8 Evaluación del daño gástrico	57
7. DISCUSIÓN.....	58
7.1 Evaluación fitoquímica de <i>S. amarissima</i>	58
7.2 Evaluación farmacológica.....	60
7.2.1 Efecto antinociceptivo del extracto crudo y amarisolida A	60
7.2.2 Evaluación del posible mecanismo de acción antinociceptivo del extracto de AcOEt y amarisolida A	61
7.2.3 Efecto antinociceptivo del extracto de AcOEt y amarisolida A a nivel central	64
7.2.4 Efecto anti-inflamatorio del extracto de AcOEt y amarisolida A en la prueba de edema inducido con carragenina	64
7.2.4.1 Efecto del daño tisular	65
7.3 Efecto del efecto antihiperalgésico y/o antialodínico de <i>S. amarissima</i>	65
7.4 Concentración de citocinas inflamatorias en el tejido nervioso de ratas en el modelo de FM.....	67
7.5 Efectos adversos de sedación y daño gástrico	68
7.5.1 Daño gástrico.....	69
7.6 Dosis letal media.....	69
8. Conclusiones.....	70
9. Perspectivas	70
10. Referencias Bibliográficas.....	71
Anexo. Artículo requisito para la obtención del grado.....	97

Índice de figuras

Figura 1. Fases de la nocicepción: 1. transducción, 2. transmisión, 3. percepción y 4. modulación..	9
Figura 2. Diagrama de la obtención de extractos de <i>S. amarissima</i> mediante maceración.	30
Figura 3. Perfil cromatográfico de los extractos crudos de <i>S. amarissima</i> .	38
Figura 4. Curso temporal de los efectos antinociceptivos de diferentes extractos de <i>S. amarissima</i> en la prueba de formalina.....	40
Figura 5. Efecto antinociceptivo y ventana de actividad del extracto de AcOEt y amarisolida A en la prueba de formalina.....	41
Figura 6. Evaluación del mecanismo de acción con antagonistas farmacológicos	42
Figura 7. Efecto antinociceptivo del extracto de AcOEt y amarisolida A expresados como porcentaje de efecto máximo posible (EMP %)	43
Figura 8. Cursos temporales de la respuesta inflamatoria del extracto de AcOEt y amarisolida A.....	44
Figura 9. Microfotografías del daño tisular en presencia del extracto de AcOEt y amarisolida A.....	45
Figura 10. Curso temporal del efecto antihiperálgico del extracto de AcOEt en el modelo de FM.....	47
Figura 11. Curso temporal del efecto antialodínico del extracto de AcOEt en el modelo de FM.....	48
Figura 12. Curso temporal del efecto antihiperálgico del extracto de AcOEt en el modelo de FM.....	50
Figura 13. Efecto antihiperálgico de amarisolida A en el modelo de FM.	52
Figura 14. Efecto antialodínico de amarisolida A en el modelo de FM.....	53
Figura 15. Efecto antialodínico sobre la estimulación por frío de amarisolida A en el modelo de FM.	54
Figura 16. Evaluación de la actividad ambuladora del extracto de AcOEt y amarisolida A	57
Figura 17. Presencia de úlceras hemorrágicas inducidas por indometacina en contraste a los grupos tratados con el extracto de AcOEt y amarisolida A.....	58

Índice de tablas

Tabla 1. Niveles de IL-1 β expresados en pg/mg de tejido nervioso de ratas con y sin fibromialgia (FM) y en presencia de amarisolida A o vehículo.....	55
Tabla 2. Niveles de IL-6 expresados en pg/mg de tejido nervioso de ratas con o sin FM y en presencia de amarisolida A o vehículo.	56
Tabla 3. Niveles de TNF- α expresados en pg/mg de tejido nervioso de ratas con o sin FM y en presencia de amarisolida A o vehículo.	56

Resumen

Salvia amarissima Ortega (sinónimo de *Salvia circinnata* Cav.) es una planta utilizada en la medicina tradicional de Oaxaca para padecimientos que cursan con dolor. Si bien el género *Salvia* se ha caracterizado por la presencia principalmente de metabolitos de naturaleza terpénica con potencial analgésico, el espectro de su actividad, algún metabolito responsable y los mecanismos de acción por los cuales *S. amarissima* ejerce sus efectos biológicos son desconocidos. En el presente estudio, el efecto antinociceptivo de las partes aéreas de *S. amarissima* y su metabolito mayoritario activo amarisolida A se investigaron para obtener evidencia científica de sus propiedades de tipo analgésico, conocer su espectro de actividad y algún posible mecanismo de acción involucrado utilizando modelos experimentales de dolor funcional y disfuncional.

El material vegetal se recolectó en Santiago Huaucilla, Oaxaca. El análisis fitoquímico se realizó mediante técnicas cromatográficas de capa fina (CCF), columna abierta (CCA) y de líquidos de alta resolución (CLAR) para identificar y aislar al metabolito más abundante. Un cernimiento farmacológico de los extractos de diferente polaridad de *S. amarissima* se realizó para determinar la actividad antinociceptiva y seleccionar el extracto más activo y con mayor presencia del metabolito. Para ello, un modelo de dolor nociceptivo permitió observar que el extracto de acetato de etilo (AcOEt) presenta efecto antinociceptivo y antiinflamatorio significativo y mayor contenido de amarisolida A. En este modelo, la participación de receptores a opioides y a 5HT_{1A} de serotonina como inhibidores del sistema nervioso central que se acoplan a la vía de señalización de adenilato-ciclasa (AC)-AMPC fue relevante en el efecto de los tratamientos. El efecto antinociceptivo se corroboró con un modelo de dolor con estímulo térmico por su acción central (fase neurogénica) y otro inflamatorio por edema con el que se hizo también la evaluación de daño tisular mediante técnica de histología. En conjunto los resultados permitieron considerar que el extracto y amarisolida A fueran candidatos para evaluar su actividad antialodínica y antihiperálgica utilizando un modelo de dolor disfuncional de tipo fibromialgia (FM) con la finalidad de completar el diseño experimental para conocer el espectro de actividad antinociceptiva. Finalmente, los posibles efectos adversos de sedación y daño gástrico, así como la toxicidad aguda se evaluaron para determinar la seguridad de los tratamientos.

Los resultados fitoquímicos indican que el metabolito bioactivo amarisolida A es más abundante en el extracto de mediana polaridad de *S. amarissima* con una concentración de 50 mg/g de extracto y que se caracteriza por ser un diterpeno neoclerodano. Éste es en parte responsable de la actividad antinociceptiva dosis-dependiente de esta especie presentando una ventana de actividad biológica de entre 0.001-1 mg/kg en comparación con la del extracto entre 0.1-10 mg/kg con $DE_{50}=0.77$ mg/kg. Donde sistemas de inhibición como el de receptores a opioides y el de $5HT_{1A}$ de serotonina mediados por la vía transduccional de proteínas G inhibitorias-adenilato ciclasa-AMP cíclico (PG_i -AC-AMPC) están involucrados. El efecto antinociceptivo se presenta a nivel central y genera disminución de la inflamación al reducir el daño tisular provocado por el edema, sin que se presenten efectos adversos de sedación o daño gástrico a las dosis antinociceptivas como comúnmente se observa con fármacos de la clínica, ni toxicidad aguda ya que la $DL_{50}>2\ 000$ mg/kg. Asimismo, los efectos antihiperalgésico y antialodínico significativos se obtuvieron tanto para el extracto como para amarisolida A en el modelo de FM con una DE_{50} de 92,13 y 63 mg/kg para el extracto y 78 y 7 mg/kg para el compuesto puro, respectivamente, donde hubo modificación selectiva de citocinas inflamatorias dependiente de la región nerviosa para el caso del compuesto puro.

En conclusión, este estudio preclínico integra evidencia científica que demuestra que constituyentes de tipo terpénico neoclerodano del extracto de *S. amarissima*, tal como amarisolida A, son responsables en parte de la potencial actividad farmacológica de *S. amarissima* para la terapéutica del dolor funcional y disfuncional, cuyo amplio espectro depende de la participación de diferentes sistemas de inhibición e inflamación, sin asociarse a efectos adversos relacionados con los analgésicos clásicos de la clínica de tipo antiinflamatorios no esteroideo (AINE) y opioide.

Abstract

Salvia amarissima Ortega (synonym of *Salvia circinnata* Cav.) is a plant used in Oaxaca's traditional medicine for ailments that cause pain. Although the genus *Salvia* has been characterized by the presence of metabolites mainly of terpenic nature with potential analgesic activity, the spectrum of its activity, a responsible metabolite and the mechanisms of action by which *S. amarissima* exerts its biological effects are unknown. In the present study, the antinociceptive effect of *S. amarissima* aerial parts and the active metabolite amarisolide A were investigated to obtain scientific evidence of its analgesic-like properties, its spectrum of activity, and to know the possible mechanism of action involved by using experimental models of functional and dysfunctional pain.

Plant material was collected in Santiago Huaucuililla, Oaxaca. Phytochemical analysis was initially performed using thin-layer chromatographic (TLC), open column (OC), and high-performance liquid chromatographic (HPLC) techniques to identify and isolate the most abundant metabolite. Pharmacological screening of different polarity *S. amarissima* extracts were done to determine the antinociceptive activity and to select the most active extract showing the highest presence of the metabolite amarisolide A. For this, a nociceptive pain model was used, where the ethyl acetate extract (EtOAc) produced the most significant effect, in both the neurogenic (central) and inflammatory phases, and showed the highest content of amarisolide A. In this model, a participation of opioid and 5HT_{1A} serotonin receptors as inhibitors of the central nervous system coupled to the adenylate cyclase (AC)-cAMP signaling pathway was relevant for treatments. The antinociceptive effect was supported by a significant response in a pain model using thermal stimulus due to its central action, as well as in an inflammatory response due to edema, where tissular damage was evaluated by histological analysis. According to these results, the extract and amarisolide A were considered candidates to evaluate their antiallodynic and antihyperalgesic activity using a FM-type pain model in order to complete the exploration of their antinociceptive spectrum. Finally, the possible adverse effects of sedation and gastric damage, as well as acute toxicity, were also evaluated to determine the safety of the treatments.

The phytochemical results indicated that the bioactive metabolite amarisolide A is more abundant in the medium polar extract of *S. amarissima* with a concentration of 50 mg/g extract and it was characterized as a neoclerodane diterpene. This terpene was partly responsible for the dose-dependent antinociceptive activity of this species, presenting its

biological activity at doses of 0.001-1 mg/kg compared to those of the extract among 0.1-10 mg/kg with $ED_{50}=0.77$ mg/kg. Where opioid and $5HT_{1A}$ serotonin receptors followed by the transduction pathway of inhibitory G protein-adenylate cyclase- cyclic AMP (PGi-AC-cAMP) were involved. The antinociceptive effects occurred centrally and decreased inflammation by reducing tissular damage caused by edema. No adverse effects such as sedation or gastric damage were observed at antinociceptive doses, as it is commonly observed with clinical drugs. No acute toxicity was produced since the LD_{50} was calculated >2000 mg/kg. Likewise, significant antihyperalgesic and antiallodynic effects were obtained for both the extract (ED_{50} of 92.13 and 63 mg/kg) and amarisolide A (78 and 7 mg/kg) in the FM model, where a selective modification of inflammatory cytokines was obtained depending on the nervous region in the presence of the pure compound.

In conclusion, this preclinical study integrates scientific evidence showing that neoclerodane terpene-type constituents of *S. amarissima* extract, such as amarisolide A, are partly responsible for the potential pharmacological activity of *S. amarissima* for functional and dysfunctional pain therapy, whose broad spectrum depends on the participation of different targets without being associated with adverse effects related to classic NSAIDs and opioid-type clinical analgesics.

1. Introducción

La Asociación Internacional para el Estudio del Dolor define a éste como una experiencia sensorial y emocional desagradable asociada con, o similar a la asociada con, daño tisular real o potencial (Raja et al., 2020). El dolor, principalmente en su forma crónica, es un problema común, complejo y angustioso que tiene un impacto profundo en las personas y la sociedad (Mills et al., 2019). Este problema mundial afecta del 25 al 29% de la población general con un rango de prevalencia de 8 a 80% que depende de la de cronicidad (Covarrubias-Gómez et al., 2010).

Dentro del espectro del dolor crónico se encuentra el síndrome de fibromialgia (FM) el cual es un trastorno de dolor muscular crónico y fatiga generalizada, rigidez, alteraciones del sueño y problemas cognitivos (Ablin et al., 2008; Clauw, 2014). La FM afecta aproximadamente al 5% de los adultos, principalmente mujeres de 20 a 60 años. Este se caracteriza por alodinia, dolor a un estímulo que de otra manera no sería doloroso (Russell y Larson, 2009) e hiperalgesia una respuesta exagerada a un estímulo doloroso (Woolf, 2011; Staud, 2011). La patogenia de la FM sigue siendo desconocida y sin criterios de diagnóstico objetivos (Ablin et al., 2008; Russell y Larson, 2009; Bellato et al., 2012). Los pacientes con FM tienen una tolerancia reducida al dolor, especialmente al calor y frío (Desmeules et al., 2003). Esto en parte debido a que existe evidencia considerable de circuitos de las redes de dolor y procesamiento anormal del dolor alterados en los individuos con FM (Staud, 2011; Flodin et al., 2014).

Los efectos adversos por la administración de analgésicos son una de las principales causas por la cual las personas que padecen dolor abandonan su tratamiento, especialmente aquellas con dolor crónico (Bacchi et al., 2012). A pesar de que los analgésicos anti-inflamatorios no esteroideos (AINEs) son parte de los medicamentos más prescritos en el mundo para aliviar el dolor y la inflamación, éstos están estrechamente asociados a complicaciones en los sistemas gastrointestinal, cardiovascular y renal (Sostres et al., 2010). El uso de opioides, tanto a corto como a largo plazo, también se ha asociado con una tasa alta de múltiples efectos adversos, tales como sedación, depresión respiratoria, supresión de la tos, motilidad intestinal reducida, náuseas, vómitos y retención urinaria. También se puede desarrollar tolerancia y dependencia tanto física como psicológica (Duthie y Nimmo, 1987). Así, encontrar nuevas alternativas terapéuticas para tratar el dolor y las afecciones inflamatorias es un desafío importante para mejorar la calidad de vida de las personas con esta problemática.

Para la terapia del dolor, las plantas medicinales son una fuente de materia prima de donde se pueden obtener nuevas moléculas de interés farmacológico (Kršiak, 1991; Rivera et al., 2006), ejemplo de ello son los analgésicos ácido acetilsalicílico (Jack, 1997) y la morfina (Hudlicky et al., 1995; Krishnamurti y Rao, 2016).

México es el principal centro de diversidad y diversificación del género *Salvia* (Martínez-Gordillo et al., 2013) e incluso ha servido como fuente para difundir especies de este género a Sudamérica (Jenks y Kim, 2013) con fines etnomédicos para paliar una amplia variedad de enfermedades, incluidas las del sistema nervioso central (SNC) (Imanshahidi y Hosseinzadeh, 2006; Jenks y Kim, 2013; Hamidpour et al., 2014; Xu et al., 2018). En el caso de *S. amarissima*, denominada como “flor azul”, se le atribuyen propiedades como para tratar un “estado frío”, término de filiación cultural utilizado para afecciones del SNC que requieren tratarse con baños o decocción de la planta, esencialmente en los casos en los que los síntomas incluyen dolor muscular, dolor en una mano o un pie (que dificulta el movimiento), dolor de cadera y dolor de espalda (provocado por caídas, golpes o por llevar cargas pesadas) o algunos derivados de problemas de estómago. Así como en el reumatismo, donde los síntomas característicos son dolor en los huesos, tendones articulaciones de los pies y en las rodillas, calambres y pies fríos (García-Hernández et al., 2015).

La naturaleza de los metabolitos bioactivos de las plantas para el tratamiento del dolor es un factor a considerar, ya que los compuestos de tipo alcaloide muestran una alta potencia para ejercer sus efectos, lo cual dificulta el manejo de las dosis debido al riesgo de posibles efectos adversos o tóxicos (Duthie y Nimmo, 1987). Por el contrario, los flavonoides se consideran biomoléculas seguras en una amplia gama de dosis, ya que su potencia y eficacia para aliviar el dolor son moderadas (Ferraz et al., 2020). Los terpenoides son biomoléculas que han demostrado una interesante respuesta farmacológica con un rango de dosis moderado y posibles efectos adversos escasos en el manejo del dolor; por ejemplo, terpenos del tipo neoclerodano caracterizados en *Salvias* han resultado ser adecuados para tratar dolor nociceptivo e inflamatorio en diferentes modelos experimentales (Simón-Arceo et al., 2017; Moreno-Pérez et al., 2019; Ortiz-Mendoza et al., 2020; Tlacomulco-Flores et al., 2020). A pesar de la importancia que tiene *Salvia amarissima* como planta medicinal en Santiago Huaucuililla, Oaxaca y otras regiones de México en el alivio del dolor y afecciones inflamatorias, la información científica para sustentar su uso es escasa. En un estudio preliminar se demostró su eficacia

para reducir el dolor abdominal (Moreno-Pérez et al., 2019). Sin embargo, no hay evidencia preclínica de su espectro farmacológico en otro tipo de dolor.

En el presente estudio se prepararon diferentes extractos de las partes aéreas de *S. amarissima* para identificar el extracto más activo y al menos un posible metabolito responsable de sus propiedades analgésicas inicialmente mediante su evaluación en un modelo de dolor nociceptivo con componente inflamatorio (prueba de formalina). Donde la actividad central y anti-inflamatoria observadas se confirmaron mediante un modelo de dolor térmico “plantar test” que refiere actividad central y un modelo de dolor inflamatorio (edema inducido con carragenina) complementado el estudio con análisis histológico para evaluar el daño tisular. Los posibles efectos adversos comunes en el uso de analgésicos en la clínica también se exploraron, así como la participación de receptores de opioides, TRPV1, 5HT_{1A} de serotonina y la vía de señalización del adenilato ciclasa (AC)-AMPc asociada a la activación de receptores acoplados a proteínas Gi, tanto para el extracto como para el metabolito bioactivo. Finalmente, el extracto y el metabolito caracterizado como amarisolida A fueron evaluados en el modelo de dolor disfuncional de tipo FM inducido con reserpina, posteriormente se obtuvo tejido nervioso con la finalidad de analizar citocinas inflamatorias para completar el espectro de actividad antinociceptiva de esta especie.

2. Antecedentes

2.1 Dolor

De acuerdo con la Asociación Internacional para el Estudio del Dolor, éste se ha definido como una experiencia sensorial y emocional desagradable asociada con, o similar a la asociada con, un daño tisular real o potencial, y descrita en términos de dicho daño (Raja et al., 2020). Ésta se puede clasificar de diferente manera: por su origen o etiología (Ellison, 2017), por su temporalidad, aguda o crónica (Orr et al., 2017) o por su función en nociceptivo e inflamatorio (Orr et al., 2017) o disfuncional (neurogénico, neuropático y psicógeno).

En el dolor agudo se puede producir daño y activación de los nociceptores en el sitio del daño tisular. En tanto que, el dolor crónico se desencadena comúnmente por una lesión o enfermedad que puede perpetuarse por factores distintos de la causa del dolor (Ellison, 2017). El dolor agudo asociado con la lesión del tejido puede durar menos de un mes, pero a veces puede durar más de seis meses. Los estudios preclínicos han demostrado que

la expresión neuronal de nuevos genes (la base para la sensibilización y remodelación neuronal) ocurre dentro de los 20 minutos posteriores a la lesión. El dolor crónico puede iniciar un comportamiento a largo plazo y cambios histológicos dentro de aproximadamente un día después de intervenciones como la ligadura nerviosa transitoria (Orr et al., 2017). Algunas características del dolor crónico y disfuncional que ocurren comúnmente en los pacientes son la hiperalgesia (sensibilidad exacerbada a los estímulos dolorosos), la alodinia (respuesta dolorosa ante estímulos no nocivos) y la hiperestesia (sensibilidad anormal a estímulos sensoriales) (Besson, 1999).

2.2 Nocicepción

Charles Scott Sherrington definió la nocicepción como un mecanismo por el cual se transmiten estímulos nocivos al SNC, el término es utilizado en la evaluación preclínica de los efectos de las plantas o metabolitos bioactivos (Baliki y Apkarian, 2015). Hay cuatro fases en la nocicepción: transducción, transmisión, percepción y modulación. Los nociceptores son neuronas sensibles a los estímulos nocivos y están ubicadas en la piel, vasos sanguíneos, músculos, fascia, articulaciones y vísceras. Estas fibras son predominantemente mielinizadas (A-delta) o no mielinizadas (C), en la transducción estos son activados por estímulos nocivos (mecánicos, térmicos, fríos y/o químicos) y conducen las señales al SNC (Armstrong y Herr, 2021; Moehring et al., 2018). Todos los tejidos, con excepción del neuropilo del SNC, están inervados por fibras aferentes, aunque sus propiedades difieren notablemente, dependiendo de si son fibras somáticas (piel, articulaciones, músculos) o viscerales (tejido cardiovascular o respiratorio, tracto gastrointestinal o renal) y sistemas reproductivos (Dray y Perkins, 1997). Los cuerpos celulares de estos nociceptores se encuentran dentro del ganglio de la raíz dorsal. En la transmisión los nociceptores primarios hacen una sinapsis en la asta dorsal con neuronas de segundo orden, dentro de la Lámina II (sustancia gelatinosa) de la médula espinal. Las neuronas de segundo orden cruzan la médula espinal para ascender en el tracto espinotalámico con sus fibras terminales localizadas predominantemente en el tálamo. En la etapa de percepción el tálamo, las neuronas de tercer orden envían axones a la corteza somatosensorial, donde se produce la localización discreta de los estímulos nocivos, o envían axones al giro del cíngulo anterior, donde se involucran en los componentes emocionales del dolor. La modulación es el último proceso de la nocicepción. En este paso final, la modulación de los estímulos dolorosos antes de la percepción del dolor se realiza mediante inhibición o mejora a través de influencias supraespinales que surgen de

la protuberancia, el bulbo raquídeo y el mesencéfalo (Mitsi y Zachariou, 2016). La inhibición supraespalinal conduce a la liberación de opiáceos endógenos que limitan la liberación de neurotransmisores de la neurona primaria e hiperpolarizan la neurona secundaria por lo que requiere mayores estímulos para alcanzar su potencial de acción (Marchand, 2008). Otras sustancias químicas liberadas en el asta dorsal son la norepinefrina y la serotonina.; ambas son inhibitorias. Lo anteriormente descrito se observa en la **Figura 1** (Ellison, 2017).

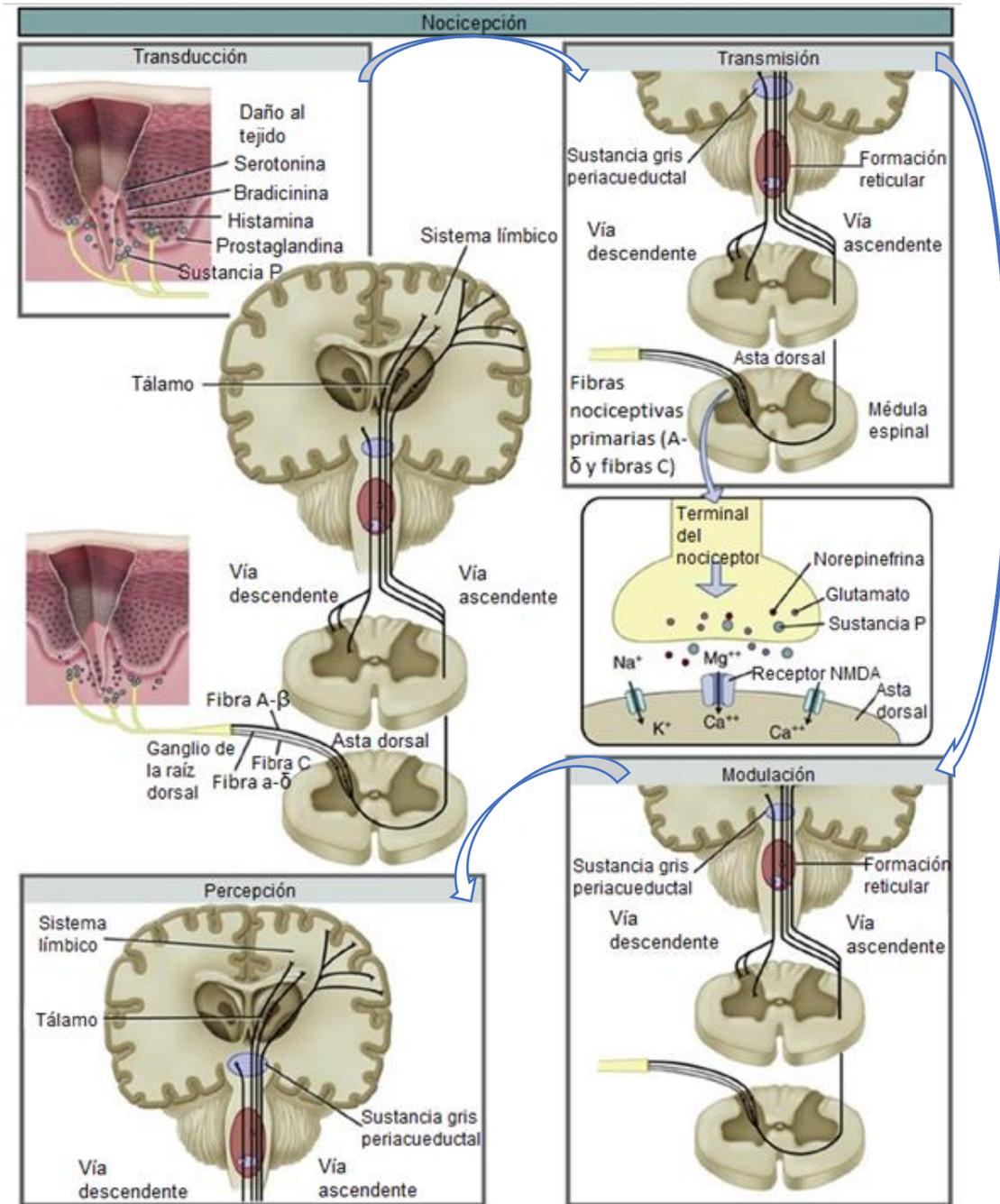


Figura 1. Fases de la nocicepción: 1. transducción, 2. transmisión, 3. percepción y 4. modulación. Modificado de Ellison (2017).

En la nocicepción existen varias fuentes importantes a partir de las cuales se generan mediadores de dolor e inflamación. Estos mediadores pueden actuar a través de diferentes receptores que están distribuidos a través de los nervios centrales y periféricos, muchos de los cuales se encuentran acoplados a proteínas G heterotriméricas y asociadas con la formación de múltiples segundos mensajeros, tales como: AMPc, cGMP y la movilización de calcio (Ca^{2+}) intracelular que activan a proteínas quinasas A, G y C, respectivamente. Otros neurotransmisores son los aminoácidos excitadores, dentro de los cuales se encuentra la acetilcolina (que actúa en el receptor nicotínico), los cuales actúan en los canales iónicos que controlan la permeabilidad iónica de la membrana (Dray y Perkins, 1997; Geppetti et al., 2008). Se sabe que la exposición a algunos mediadores inflamatorios, tales como la prostaglandina E2, la bradicinina, la sustancia P, la histamina, la adenosina y la serotonina, sensibilizan los nociceptores a estímulos mecánicos y térmicos. En vista de la amplia gama de mecanismos conocidos para la transmisión del dolor, no es de sorprender la aparición en la literatura de numerosos compuestos que pueden modular directa o indirectamente su transmisión. La mayoría de los metabolitos que se detallarán a lo largo de la presente investigación producen sus efectos antinociceptivos al modular la liberación de mediadores analgésicos endógenos o al inhibir neurotransmisores algogénicos a través de mecanismos pre o post sinápticos en los niveles tanto central como periférico.

En una condición de nocicepción inflamatoria, los receptores tipo toll (TLR) activan los perfiles de citocinas proinflamatorias en los macrófagos, lo que altera la regulación homeostática del sistema inmune. Los macrófagos son componentes esenciales del sistema inmune innato y del adaptativo, por lo que juegan un papel importante en la inflamación, en la defensa del huésped y en la reparación de tejidos (Gordon y Taylor, 2005; Martinez et al., 2009). Dependiendo del microambiente, estas células se clasifican funcionalmente en tres tipos principales: macrófagos M0 no activados, M1 proinflamatorios de activación clásica y macrófagos M2 anti-inflamatorios activados alternativamente. Los macrófagos M1 son inducidos por citocinas Th1 como interferón γ ($\text{IFN}\gamma$) y el factor de necrosis tumoral α ($\text{TNF-}\alpha$) o por el lipopolisacárido (LPS), típicamente atacan microorganismos y células tumorales, expresan la sintasa de óxido nítrico inducible (iNOS, por sus siglas en inglés) y la mayoría de los TLR (Martinez et al., 2009). En contra parte, los macrófagos M2 son inducidos por las citocinas Th2 interleucinas (IL)-4, -13, -10 y el factor de crecimiento transformante β ($\text{TGF-}\beta$).

Los estudios de Könnner y Brüning (2011) demostraron que los TLR2 y TLR4 están estrechamente relacionados con la respuesta inflamatoria sistémica. Los TLR, de los cuales hay 10 tipos en humanos y 12 en ratones, contienen proteínas adaptadoras cuyo reclutamiento es seguido por una vía de señalización que activa al factor nuclear kappa B (NF- κ B), proteína activadora 1 (AP-1), transductor de señal y activador de transcripción 1 (STAT-1) y factor reclutador del interferón, que median la inflamación, así como la liberación de citocinas (Roy et al., 2016; Lacagnina et al., 2018).

El NF- κ B es un factor de transcripción nuclear importante en la regulación de la respuesta inflamatoria que participa en los procesos biológicos que involucran inflamación, inmunidad, diferenciación, crecimiento celular, tumorigénesis y apoptosis (Li y Verma, 2002). El NF- κ B se regula mediante la unión con moléculas inhibitoras como el factor nuclear potenciador génico del polipéptido ligero kappa de las células B, alfa (I κ B α). Las subunidades NF- κ B p65 se disocian de su proteína inhibidora I κ B α al translocarse desde el citoplasma al núcleo donde influyen en la expresión de citocinas proinflamatorias como TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-8 (Silverman y Maniatis, 2001). El factor de transcripción Nrf2 es en gran parte responsable de la expresión inducible de proteínas involucradas en la respuesta al estrés oxidante, la protección celular y la inhibición de la expresión de citocinas inflamatorias, como IL-6 e IL-1 β . Además, Nrf2 está asociado con la transcripción mediada por NF- κ B de genes de citocinas proinflamatorias (Jiang et al., 2018). La vía de señalización de las proteínas quinasas activadas por mitógeno (MAPK) consiste en una familia de serina/treonina quinasas que son activadas por varios estímulos, incluidos diferentes factores inflamatorios (Kyriakis y Avruch, 2012). Las proteínas MAPK controlan procesos celulares fundamentales, como la proliferación, diferenciación, metabolismo, inflamación y apoptosis. Debido a que MAPK y NF- κ B pueden colaborar sinérgicamente para inducir citocinas proinflamatorias (Kyriakis y Avruch, 2012; Ziaziaris y Munoz, 2014), los metabolitos secundarios de fitomedicamentos con capacidad de inhibición de NF- κ B y MAPK y de manera directa o indirecta de la producción de citocinas, pueden tener ventajas terapéuticas potenciales en el tratamiento de enfermedades inflamatorias.

2.3 Dolor crónico

El dolor crónico a menudo se define como un dolor que dura más de 3 a 6 meses y persiste después de que la lesión original ha sanado (Shibley, 2018). Las personas que sufren de dolor crónico a menudo experimentan diversas alteraciones del funcionamiento físico,

cognitivo y emocional, así como un evidente detrimento en la calidad de vida (Baliki y Apkarian, 2015). Por su duración, el dolor crónico y agudo difieren significativamente, ya que el dolor agudo se considera una respuesta protectora a la lesión y a menudo se limita a un área determinada. Como resultado, los pacientes que sufren de dolor agudo pueden ser diagnosticados y tratados, o incluso el dolor desaparecerá sin tratamiento (Kent et al., 2017). El dolor agudo puede convertirse en dolor crónico si los factores de riesgo no son reconocidos o tratados en las primeras etapas del desarrollo del dolor.

Las investigaciones sobre las características del dolor crónico han llevado a una serie de explicaciones sobre cómo se manifiesta inicialmente el dolor y el mecanismo por el cual el dolor puede provocar reorganizaciones celulares e impactar la plasticidad neuronal (Reichling y Levine, 2009). La plasticidad neuronal se utiliza para describir las reorganizaciones y adaptaciones que son el resultado de estímulos internos o externos que impactan el encéfalo (Puopolo y Mendell, 2016). En el dolor, la plasticidad neuronal vincula los procesos de aprendizaje, memoria y recuperación con los cambios funcionales y estructurales que ocurren como resultado de una lesión (Reichling y Levine, 2009).

La plasticidad neuronal puede hacer que el dolor pase de agudo a crónico. Este mecanismo de protección puede ser alterado por el dolor persistente. Específicamente, las señales transmitidas por los nociceptores pueden alterarse o amplificarse como resultado de una estimulación prolongada/repetitiva, que a su vez puede desencadenar una expresión génica alterada de proteínas, receptores y neurotransmisores en la médula espinal y el cerebro (Perrot et al., 2019). Como resultado, la actividad neuronal aumenta y esto puede intensificar la señalización del dolor hacia el cerebro, así como dentro del cerebro. Por lo tanto, la activación repetida de los nociceptores puede conducir a una plasticidad neuronal que puede crear un estado de dolor hipersensible (Nijs et al., 2021). Este mecanismo se utiliza a menudo para describir el proceso por el cual el dolor pasa de ser agudo a crónico por naturaleza (Kuner y Flor, 2016). Las reorganizaciones celulares tempranas que ocurren como transiciones del dolor de agudo a crónico pueden ser difíciles de detectar, lo cual dificulta revertir estos cambios antes de que surja un estado de dolor hipersensible (Albrecht et al., 2019). Sin embargo, una vía de tratamiento y prevención puede encontrarse en los receptores y proteínas con patrones de expresión alterados en las condiciones de dolor crónico. Entre estos receptores y proteínas pueden encontrarse dianas farmacológicas clave que permitirán un mayor control del dolor crónico (McCormick y Frampton, 2019).

La teoría del “cebado hiperalgésico” dependiente de PKC ϵ podría proporcionar información fundamental sobre los mecanismos celulares que subyacen a una amplia gama de condiciones de los mecanismos celulares que causan la transición de dolor agudo a crónico. La PKC ϵ se expresa en neuronas nociceptivas y juega un papel crucial en la hiperexcitabilidad crónica, pero su inhibición causa poca alteración en la función sensorial normal (Parada et al., 2003). Los paralelismos entre el cebado hiperalgésico y una amplia gama de otros estados de reactividad celular alterada inducidos por el estrés podrían no solo alentar nuevas líneas de investigación en estos campos dispares de investigación, sino que quizás también conducir a un concepto más unificado del papel fisiológico de la PKC ϵ (Reichling y Levine, 2009). Se ha reportado que la hiperalgesia inducida por opioides es dependiente de PKC y que implica un cambio en el acoplamiento de la proteína G (del receptor opioide μ), lo que sugiere una posible relación mecanicista con el cebado hiperalgésico (Bodnar, 2016).

2.4 Fibromialgia (FM)

FM es el término actual utilizado para referir el dolor musculoesquelético crónico generalizado del que no se ha podido identificar una causa. Dependiendo del médico que atiende al paciente, hay una serie de afecciones relacionadas que recientemente se han denominado afecciones de dolor crónico superpuesto o trastornos de dolor funcional. Por ejemplo, los gastroenterólogos suelen asociar los síntomas de estos pacientes con los términos trastorno gastrointestinal funcional, síndrome del intestino irritable, dispepsia no ulcerosa o dismotilidad esofágica. Mientras que los urólogos lo consideran dolor pélvico y síntomas urinarios estableciendo términos como cistitis intersticial, prostatitis crónica, vulvodinia y vestibulitis vulvar. En tanto que los dentistas atienden pacientes con FM cuya sintomatología la asocian con síndrome de la articulación temporomandibular (Woolf, 2011). Se cree que estas condiciones de dolor crónico superpuesto tienen una patología subyacente similar con alteraciones en la función del SNC que conducen a un procesamiento nociceptivo aumentado y al desarrollo de síntomas somáticos de fatiga, y alteración del sueño, memoria y estado de ánimo, mediados por dicho sistema. Hay un subconjunto diferente de personas con FM que tienen esta afección como comorbilidad con otro trastorno causado por estímulos nociceptivos continuos, como trastornos autoinmunes, anemia de células falciformes u osteoartritis (Clauw, 2014).

Las alteraciones del procesamiento nociceptivo del SNC en personas con FM se ven exacerbadas por factores psicológicos asociados con el estrés que pueden incrementar la

experiencia del dolor. En la actualidad, los mecanismos que involucran el SNC muestran evidencia más sólida sobre esta patogénesis, ya que comparten características comunes tanto en humanos como en modelos animales, y responden a tratamientos dirigidos a esos mecanismos particulares. Recientemente, varios estudios han comenzado a explorar otros mecanismos potenciales, incluido un componente periférico para la generación de dolor y el papel de la inflamación sistémica (Sluka y Clauw, 2016).

2.4.1 Descripción general de las alteraciones del SNC en FM

Los individuos que padecen FM presentan conductas características de hiperalgesia (aumento del dolor ante estímulos normalmente dolorosos) y/o alodinia (dolor ante estímulos normalmente no dolorosos). La naturaleza generalizada y crónica de este dolor es una característica clínica clave para el diagnóstico de estas personas.

Los síntomas mediados por el SNC, es decir fatiga, dificultades de memoria, trastornos del sueño y del estado de ánimo son comorbilidades frecuentes (Wolfe et al., 2016). En conjunto, estos antecedentes respaldan que el SNC amplifica el dolor y que existe un problema fundamental con el aumento del dolor o el procesamiento sensorial. Estos hallazgos se han corroborado con estudios de neuroimagen funcional y desequilibrio en los niveles de neurotransmisores que modulan el dolor y la transmisión sensorial en individuos con FM (Schmidt-Wilcke y Clauw, 2011). Los tratamientos farmacológicos destinados a aumentar los neurotransmisores antinociceptivos en el SNC o los que reducen los niveles de neurotransmisores excitadores pronociceptivos como el glutamato son parte de la terapia que ha resultado parcialmente eficaz para esta afección. Tratamientos no farmacológicos, como el ejercicio, también pueden ser útiles y modular la neurotransmisión endógena, incluido el aumento de los neurotransmisores antinociceptivos y la reducción del glutamato (Finnerup, 2019). En tanto que las personas con esta afección generalmente no responden favorablemente cuando se administran terapias efectivas para un dolor de tipo agudo o causado por daño tisular o inflamación de los tejidos, tales como los medicamentos del grupo de los AINEs, ya sea con inyecciones locales o procedimientos quirúrgicos (Clauw, 2014).

2.4.2 Diagnóstico de la FM

Los primeros criterios de diagnóstico ampliamente reconocidos para la FM se publicaron en 1990 (Wolfe et al., 1990). Los criterios de diagnóstico requieren que los individuos presenten dolor crónico generalizado y al menos 11 de los 18 puntos sensibles positivos ubicados por lo menos 4 de las 5 áreas corporales, así como índice de dolor generalizado

>7 más puntuación de gravedad de los síntomas >5 o índice de dolor generalizado de 3 a 6 más puntuación de gravedad de los síntomas >9 (Wolfe et al., 1990; Schreiber, 2021). Los primeros investigadores establecieron que la sensibilidad en la FM no se limitaba a los puntos sensibles, sino que de hecho estaba presente de manera difusa (Woolf, 2011; Clauw, 2014). Al mismo tiempo, el músculo esquelético se abandonó en gran medida como fuente del dolor, ya que las imágenes, las biopsias y los estudios metabólicos del músculo generalmente no presentaban evidencias de patología (Simms et al., 1994). También se entendió bien que otros síntomas que no eran dolorosos, como fatiga, problemas del sueño y alteraciones del estado de ánimo, eran extremadamente comunes en la FM y que era mucho más probable que todos fueran causados por factores centrales en lugar de periféricos (Arout et al., 2018). Las alteraciones en el eje hipotalámico hipofisiario suprarrenal (HHA) y la respuesta al estrés, así como en el sistema autónomo y cardiovascular, sugieren efectos sistémicos que pueden aumentar o subyacer al dolor de la FM (Siracusa et al., 2021). Por tanto, existen importantes datos clínicos que sugieren alteraciones del SNC en personas con FM.

2.4.3 Excitabilidad del SNC en la FM

Los neurotransmisores del SNC, que participan en la sensibilización central están elevados en la FM y podrían desempeñar un papel patógeno. Cuatro estudios independientes muestran que los pacientes con FM tienen concentraciones aproximadamente tres veces más altas de sustancia P (SP) en el líquido céfalo raquídeo (LCR) en comparación con los controles normales (Sluka y Clauw, 2016; Siracusa et al., 2021). Sin embargo, los antagonistas de SP han fracasado en ensayos clínicos con pacientes con estados de dolor crónico, lo que plantea interrogantes acerca de la importancia de este neurotransmisor en la transmisión del dolor humano. Además de la SP, también se encuentran elevados los niveles de glutamato en el SNC, medidos tanto en el LCR (Sarchielli et al., 2007) como directamente en el cerebro mediante espectroscopía de protones (¹H-MRS) en individuos con FM (Harris, 2010). De hecho, utilizando la espectroscopía de resonancia magnética de protones, se ha demostrado que los niveles de glutamato en estos pacientes también se elevan en áreas clave del cerebro que procesan el dolor, como la ínsula y, se modifican en respuesta a cambios en el dolor clínico y experimental cuando los pacientes son tratados con éxito (Foerster et al., 2015).

Los mecanismos excitadores centrales que involucran la médula espinal, el tronco encefálico y la corteza también se han implicado en el desarrollo de hiperalgesia en

modelos animales de dolor muscular no inflamatorio inducido por dos inyecciones de solución salina ácida. Paralelamente a los estudios en humanos, los estudios en animales muestran una mayor liberación de glutamato en la médula espinal y la médula ventromedial rostral (RVM) en el modelo de dolor no inflamatorio (Skyba et al., 2005). Estos estudios muestran una mayor liberación de glutamato durante la segunda inyección de solución salina ácida, pero no en la primera, tanto en la médula espinal como en la RVM. También hay un aumento de los niveles de glutamato en la médula espinal después de la inducción del modelo (Skyba et al., 2005). El aumento de glutamato en respuesta a la segunda inyección corresponde al desarrollo de hiperalgesia generalizada de larga duración que ocurre solo después de la segunda inyección. Estos datos sugieren que hay una mayor excitabilidad en el SNC inducida por una única agresión muscular de baja intensidad que hace que el sistema nervioso responda al mismo estímulo de forma exagerada a un estímulo posterior. Como las personas con FM, los modelos animales también son sensibles al bloqueo de los receptores NMDA. El desarrollo de hiperalgesia se retrasa por el bloqueo de los receptores NMDA-glutamato en la médula espinal durante la segunda inyección, pero no en la primera (Brum et al., 2022), y se revierte por el bloqueo de los receptores NMDA glutamato en la médula espinal y RVM después de la inducción del modelo (Skyba et al., 2005; Brum et al., 2022).

El bloqueo de la vía cAMP-mensajero intracelular revierte la hiperalgesia en el modelo de dolor no inflamatorio, mostrando el papel funcional de los mensajeros intracelulares en el mantenimiento de comportamientos similares al dolor. Además, la molécula de señalización intracelular ERK se fosforila en el tálamo paraventricular y el núcleo central de la amígdala en el modelo de dolor no inflamatorio (Brum et al., 2022). Los sitios del tronco encefálico pueden impulsar algunos de los cambios corticales ya que hay una transmisión excitadora postsináptica mejorada desde el núcleo parabraquial al núcleo central de la amígdala (Cheng et al., 2011). La hiperalgesia y los aumentos en la fosforilación de ERK en la amígdala se previenen mediante el bloqueo intracerebroventricular de los canales de Ca^{2+} tipo T (canales T) (Cheng et al., 2011), lo que sugiere que los canales de Ca^{2+} pueden mediar algunos de estos cambios. Por lo tanto, los estudios en animales muestran alteraciones en la excitabilidad central en todo el sistema nociceptivo desde la médula espinal hasta la corteza en modelos de dolor crónico generalizado.

2.4.4 Alteraciones en la inhibición y FM

El SNC equilibra la cantidad de excitación e inhibición. Normalmente hay un equilibrio igual a la cantidad de excitabilidad e inhibición y no hay dolor. En las personas con dolor crónico, este equilibrio cambia de modo que aumenta la excitación y reduce la inhibición, lo que produce dolor. En humanos sanos y animales de laboratorio, la aplicación de un estímulo doloroso intenso produce una analgesia generalizada de todo el cuerpo. Este efecto analgésico, originalmente denominado control inhibitorio nocivo difuso (CIND) y, más recientemente, modulación del dolor condicionada (MDC), se reduce constantemente o incluso está ausente en grupos de personas con FM en comparación con los controles sanos (Bourke et al., 2021). Este fenómeno también se observa en una serie de otros estados de dolor funcional crónico, que incluyen dolor lumbar, trastornos de la articulación temporomandibular y dolor de cabeza (Ramaswamy y Wodehouse, 2021). La MDC atenuada no se encuentra en todos los pacientes con FM o dolor crónico, pero es considerablemente más común en estos pacientes que en los sujetos control. CIND (terminología de la MDC para animales) activa un sitio único en el tallo cerebral, el subnúcleo reticularis dorsalis, pero no involucra otros sitios inhibidores del dolor más conocidos como la sustancia gris periacueductal y la medula rostral ventro-medial (De Resende et al., 2011). Se ha descrito que, en animales, el CIND utiliza receptores opioidérgicos, serotoninérgicos y noradrenérgicos para producir analgesia (Villanueva, 2009). En la FM, la evidencia disponible sugiere que el tono opioide endógeno es normal o incluso está aumentado (Schrepf et al., 2016). Las personas con FM y dolor lumbar crónico tienen niveles más altos de encefalinas en el LCR que los controles (Baraniuk et al., 2004). Hay evidencia emergente de que bloquear la liberación de opioides endógenos con el uso de naltrexona en dosis bajas podría ser una estrategia de tratamiento eficaz en algunos pacientes (Younger y Mackey, 2009). Estos datos juntos son consistentes con la hipótesis de que hay una mayor liberación de ligandos opioides endógenos en la FM que conduce a una alta ocupación de los receptores en la línea de base, en lugar de una deficiencia de la liberación de opioides endógenos, que se esperaría si la disminución de modulación condicionada del dolor se debe a tono opioide endógeno bajo.

En contraste, existe evidencia significativa de que la reducción de la modulación condicionada del dolor en la FM puede resultar de una disminución de la actividad serotoninérgica y noradrenérgica endógena (Russell et al., 1992). Los niveles del principal metabolito de la noradrenalina, 3-metoxi-4-hidroxifenetileno, son más bajos en el LCR de los pacientes con FM. De manera similar, los pacientes con FM tienen niveles

séricos reducidos de serotonina y su precursor, triptófano, así como niveles reducidos del principal metabolito de la serotonina, 5-HIAA, en el LCR (Russell et al., 1992). En paralelo, estudios en animales muestran una reducción de la liberación de serotonina en el tronco encefálico, una mayor expresión del transportador de serotonina y alteraciones en los receptores de serotonina después de una lesión del nervio periférico (Brum et al., 2022), así como una mayor expresión del transportador de serotonina en el tronco encefálico en el modelo de dolor muscular no inflamatorio. Además, el agotamiento de las aminas biógenas en ratas por la reserpina (modelo experimental de FM), produce hiperalgesia cutánea y muscular extensa y duradera en ratas macho y hembra. También hay un aumento en el tiempo de inmovilidad en la prueba de nado forzado, una prueba para la depresión que es una afección comórbida común de la FM (Nagakura et al., 2009). La mejor evidencia de que los niveles bajos de estos neurotransmisores están involucrados en la patogenia de la FM proviene de ensayos clínicos en los que casi cualquier intervención que eleve simultáneamente los niveles de serotonina y noradrenalina (inhibidores de la recaptación de serotonina-noradrenalina (IRSN), como tricíclicos, duloxetina, milnaciprán, tramadol) es eficaz en el tratamiento de la FM y afecciones relacionadas (Clauw, 2014).

2.4.5 Alteraciones en nociceptores y FM

Si bien existe una hipótesis general de que la FM es un "trastorno de dolor central", varios informes muestran evidencia de anomalías de los nervios periféricos. Específicamente, varios estudios informan un número reducido de fibras nerviosas epidérmicas en biopsias de piel en personas con FM en comparación con controles sanos (Üçeyler et al., 2013). Las personas con FM también tienen puntuaciones aumentadas en los cuestionarios de dolor neuropático, alteraciones en los umbrales de detección de frío y calor medidos por pruebas sensoriales cuantitativas y respuestas evocadas por dolor deterioradas (Gota, 2021). Usando microneurografía, Serra y sus colegas muestran que las fibras C mecánicamente insensibles muestran una mayor actividad espontánea y sensibilización a la estimulación mecánica (Serra et al., 2014). La inyección adicional de lidocaína en los músculos de personas con FM redujo significativamente la hiperalgesia local en el lugar de la inyección, la hiperalgesia fuera del lugar de la inyección y redujo el dolor en un 38% (Brutcher et al., 2019; Staud et al., 2014). Por lo tanto, los factores periféricos pueden ser la base de algunos de los dolores que experimentan las personas con FM. Sin embargo, no está claro si estos factores son la causa principal o secundaria de la enfermedad en sí.

2.5 Terapéutica del dolor

Los analgésicos orales convencionales son siempre el primer tratamiento de elección; pueden ser una solución rápida, económica y relativamente segura al problema del dolor. Para tratar un caso de dolor, el médico suele seguir los pasos de la escala analgésica de la Organización Mundial de la Salud (OMS) (Welsby, 2013). Desarrollada inicialmente para el tratamiento del dolor por cáncer, pero aplicable a la mayoría de las condiciones de dolor, la escalera sugiere que los analgésicos deben administrarse por vía oral con dosis y potencia crecientes hasta que se logre el alivio del dolor. Es un abordaje simple y económico que produce alivio del dolor en el 80-90% de los pacientes con cáncer (Brawley et al., 2009). Cuando se aplica al dolor crónico no oncológico, los pacientes rara vez logran un alivio del dolor a largo plazo, ya que los efectos secundarios tienden a limitar la dosis máxima, y se ha informado que el alivio medio del dolor de los opioides es de alrededor del 30% (Hylands-White et al., 2017).

2.5.1 Antinflamatorios no esteroideos (AINes)

El primer escalón de la escalera lo constituyen los analgésicos no opioides, como el paracetamol y los AINes. Actúan para reducir la inflamación y aliviar el dolor, reduciendo la producción de sustancias químicas inflamatorias mediante la inhibición de las enzimas ciclooxigenasa COX-1 y COX-2, (Praveen Rao y Knaus, 2008). Estas enzimas catalizan la producción de dos tipos de eicosanoides: las prostaglandinas (PG), que causan vasodilatación, aumentan la permeabilidad vascular, sensibilizan a los nociceptores e inhiben la secreción de ácido gástrico y la agregación plaquetaria; y los tromboxanos (TX) que provocan agregación plaquetaria y vasoconstricción (Simmons et al., 2004). La COX-1 forma parte de la mayoría de los tejidos del cuerpo y produce prostaglandinas y tromboxanos para tareas como la protección gastrointestinal, el mantenimiento del flujo sanguíneo renal y la agregación plaquetaria (Bacchi et al., 2012). Por el contrario, la COX-2 se induce principalmente en las células inflamatorias en respuesta al daño y, por lo tanto, es la principal responsable de los efectos de la inflamación, incluido el dolor (Atkinson y Fudin, 2020). Los inhibidores de la ciclooxigenasa no selectivos actúan sobre la COX-1 y la COX-2 e incluyen la aspirina, el ibuprofeno y el naproxeno. Los efectos secundarios de estos fármacos se deben principalmente a su inhibición de la COX-1. Las úlceras gastrointestinales y sus complicaciones ocurren en el 2-4% de los pacientes con dosis altas (Atkinson y Fudin, 2020) y, por esta razón, a menudo se administran junto con un inhibidor de la bomba de protones para proteger el revestimiento del estómago de la secreción ácida. Los

inhibidores selectivos de la enzima COX-2 (coxibs), incluidos celecoxib y etoricoxib, se desarrollaron a principios de la década de 1990, y estudios posteriores demostraron que se podía lograr el alivio del dolor sin los efectos secundarios gastrointestinales y renales de los AINEs tradicionales (Sostres et al., 2010). Recientes metaanálisis sobre el uso a largo plazo de dosis altas de AINEs han encontrado que todos aumentan el riesgo de enfermedad coronaria y eventos cerebrovasculares trombóticos, con la excepción del naproxeno, que tiene un efecto supresor de larga duración sobre la producción de TX-A₂ (Capranzano y Angiolillo, 2021). Las directrices del Comité de Medicamentos de Uso Humano de la Agencia Europea de Medicamentos contraindican el uso de coxibs en pacientes con cardiopatía coronaria o accidente cerebrovascular y recomiendan precaución cuando se utilizan en pacientes con factores de riesgo de cardiopatía coronaria. Este comité también concluyó que la relación riesgo / beneficio de los AINEs no selectivos es favorable, pero enfatiza el uso prudente en función de los factores de riesgo de cada paciente. Si se requieren altas dosis de AINEs para controlar el dolor, es sensato utilizar tratamientos alternativos en primera instancia en lugar de exponer a esos pacientes al riesgo cardíaco, gastrointestinal y renal del uso a largo plazo (Bindu et al., 2020).

2.5.2 Opioides fuertes y débiles

El segundo escalón de la escalera agrega opioides débiles, codeína y dihidrocodeína. Los fármacos opioides imitan los efectos analgésicos de las sustancias químicas endógenas (endorfinas) que activan los receptores opioides en el SNC que atenúan la transmisión de señales nociceptivas. El tercer paso requiere opioides fuertes, que son más potentes, pero también tienen efectos secundarios más graves que los opioides débiles (Pascoe, 2000). Los opioides suprimen la actividad nerviosa mediante la activación de receptores opioides acoplados a proteína G_i que promueven la actividad de canales de K⁺ y causan hiperpolarización e inhiben la entrada de Ca²⁺ reduciendo la liberación del transmisor en la célula nerviosa (Friedman y Nabong, 2020). Las redes de opioides endógenos están involucradas en la regulación de muchas funciones fisiológicas, así como en el dolor; por lo tanto, los efectos adversos siempre acompañan a la administración de medicamentos opioides. La depresión respiratoria ocurre a dosis terapéuticas y puede ser fatal, por lo que los pacientes siempre comienzan con una dosis baja que puede incrementarse a medida que se desarrolla la tolerancia. También las náuseas, el estreñimiento, el deterioro cognitivo, la sedación y diversos efectos hormonales son preocupaciones con el uso crónico de opioides (Lynch, 2011). El sistema nervioso desarrolla rápidamente tolerancia

a los efectos de los opioides, incluido el efecto analgésico, lo que significa que la dosis debe aumentarse con el tiempo para lograr el alivio del dolor (Bodnar, 2018). A diferencia de los opioides débiles, los efectos terapéuticos de los fármacos similares a la morfina aumentan en función de la dosis; por lo tanto, la dosis se puede aumentar casi indefinidamente para combatir la tolerancia y el aumento de los niveles de dolor.

Existe una amplia gama de analgésicos opioides que se pueden dividir en clases. En primer lugar, existen alcaloides naturales, como la morfina y la codeína, que pueden extraerse de la amapola (*Papaver somniferum*). Además de los opioides naturales, se ha utilizado una síntesis parcial para crear derivados como la oxycodona, hidromorfona y oximorfona. La segunda clase está compuesta por fenilpiperidinas (meperidina y fentanilo) y pseudopiperidinas (metadona) totalmente sintéticas (Friedman y Nabong, 2020). La familia de receptores opioides se compone de cuatro receptores acoplados a proteína Gi (GPCR): receptor opioide μ , δ , κ y nociceptina (MOR, DOR, KOR, NOR). La activación de los receptores opioides conduce a la señalización de la subunidad de proteína Gi (α , β , γ) y una serie de eventos intracelulares (Cunningham et al., 2019). Los receptores opioides exhiben una unión distinta con preferencias por los ligandos opioides endógenos: β -endorfinas, encefalinas, dinorfinas y nociceptina (Corder et al., 2018). En el SNP, la unión entre el MOR y la β -endorfina ocurre en terminales postsinápticos y conduce a la inhibición de la liberación de la SP. La SP es un miembro de la familia de neuropéptidos de taquiquininas y se cree que facilita la transmisión del dolor a través de receptores de neuroquinina acoplados a proteína G que a menudo se encuentran colocalizados con receptores opioides (Corder et al., 2018). Por lo tanto, la analgesia que proviene de la acción de la endorfina en el SNP es en parte el resultado de la reducción de la liberación de la SP y la transmisión del dolor. En el SNC, la unión entre la β -endorfina y el MOR conduce a la liberación inhibida de GABA, que a su vez aumenta la liberación de DA del área tegmental ventral al núcleo accumbens (NA) (Friedman y Nabong, 2020). Las preferencias vinculantes de los opioides endógenos MOR, DOR, KOR o NOR y las diferencias observadas en sus eventos de señalización han alentado la búsqueda de agonistas que favorezcan una vía de señalización sobre otra. Un ejemplo de estos esfuerzos proviene de informes de estructuras cristalizadas para MOR, DOR, KOR y NORs.

2.5.3 Analgésicos adyuvantes

Los fármacos conocidos como analgésicos no convencionales son aquellos que se desarrollaron inicialmente como antidepresivos y/o antiepilépticos (anticonvulsivos) y que exhiben propiedades analgésicas cuando se administran a pacientes con dolor crónico. La etiqueta “adyuvante” en la escala de la OMS ha llegado a referirse a este tipo de medicamentos, aunque no está claro si eso es lo que originalmente significaba. En condiciones de dolor crónico donde los medicamentos opioides a menudo son ineficaces, como en el caso del dolor neuropático (Ruel y Steagall, 2019) o la FM (Finnerup, 2019) se ha descrito que algunos tipos de fármacos antidepresivos exhiben propiedades analgésicas que no están relacionadas con sus efectos antidepresivos. Los más efectivos son los antidepresivos tricíclicos (ADT) y los inhibidores de la recaptación de serotonina y noradrenalina, que actúan para prevenir la recaptación de noradrenalina y serotonina en el cerebro y la médula espinal. Se cree que proporcionan analgesia mejorando el control del dolor endógeno y aumentando la actividad de la vía inhibitoria descendente; sin embargo, esto sigue sin estar del todo claro (Urits et al., 2019). Los inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina proporcionan poco alivio del dolor (Spina et al., 2012). Los antidepresivos a menudo se recetan a pacientes con dolor crónico para tratar la depresión concomitante y los problemas del sueño, así como para aliviar el dolor. Después de los fármacos anti-inflamatorios y los opioides, los antidepresivos son los fármacos más utilizados para el tratamiento del dolor crónico (Micó et al., 2006).

Los fármacos antiepilépticos también pueden proporcionar analgesia en pacientes con dolor tipo FM y neuropático. La gabapentina y la pregabalina actúan para reducir la liberación de neurotransmisores excitadores como glutamato, noradrenalina, SP y péptido relacionado con el gen de la calcitonina de los terminales nerviosos al inhibir la subunidad alfa-2-delta de la tensión dependiente de voltaje del canal de Ca^{2+} (Alles et al., 2020).

2.5.4 Antidepresivos

A la luz de los riesgos asociados con el uso prolongado de AINEs y analgésicos opioides, se han explorado y utilizado las propiedades analgésicas de fármacos no desarrollados originalmente para el tratamiento del dolor crónico. Es común que los pacientes sientan dolor como resultado de su depresión o que este sea la causa de su depresión (Banks y Kerns, 1996). Algunos ejemplos de antidepresivos que parecen prometedores para el tratamiento del dolor crónico son los ADT y una serie de fármacos que modulan los niveles de serotonina (5-HT), noradrenalina (NE) o dopamina (DA) (Fishbain, 2000;

Micó et al., 2006). La liberación de NE y 5-HT es un mecanismo que se cree que contribuye a las propiedades analgésicas de los ADT, así como a los inhibidores selectivos de la recaptación de 5-HT y a los inhibidores de la recaptación de 5-HT y NE (Fishbain, 2000; Spina et al., 2012). Las propiedades analgésicas de los ATC se han atribuido al bloqueo de los canales iónicos (Na^+ , K^+ , Ca^{2+}), la unión al receptor opioide o un efecto mediado por el receptor opioide, y la disminución de la producción de prostaglandina E2 (PGE2) y el TNF α (Urits et al., 2019). Aunque los antidepresivos tienen propiedades analgésicas que podrían ser útiles para el manejo del dolor crónico, también tienen una propensión a los efectos adversos, alta extracción hepática y perfiles de baja biodisponibilidad oral (Tolosa Vilella et al., 2002). Como resultado, a menudo se sugiere comenzar con dosis iniciales bajas de antidepresivos para el tratamiento del dolor crónico y el aumento hasta una dosis máxima, que puede estar predefinida o es la dosis a la que van a surgir eventos adversos. La gravedad de los eventos adversos provocados por los antidepresivos puede variar desde la boca seca hasta el desarrollo de arritmias cardíacas, o el desarrollo de un caso potencialmente mortal de síndrome serotoninérgico (Micó et al., 2006).

Farmacológicamente, los síntomas de dolor de la FM se reducen con duloxetina (Russell et al., 2008) y milnaciprán (Mease et al., 2009), que son inhibidores de la recaptación de 5-HT/NE, ya que mejoran la neurotransmisión en la vía analgésica descendente. Otros moduladores de la neurotransmisión NE y 5-HT, tales como el tramadol y la amitriptilina, también son eficaces para reducir los síntomas de dolor de la FM (Russell et al., 2000; Holman y Myers, 2005). La pregabalina también se ha utilizado en el tratamiento de pacientes con dolor disfuncional tipo neuropático (Ablin et al., 2013). Estudios clínicos recientes han sugerido que de hecho la pregabalina alivia significativamente los síntomas del dolor de la FM en comparación con el placebo (Häuser et al., 2009; Bellato et al., 2012). La pregabalina es un ligando de alta afinidad de la subunidad $\alpha 2\delta$ del canal de Ca^{2+} dependiente del voltaje y su mecanismo de acción parece estar relacionado con la inhibición de las corrientes de Ca^{2+} . Además, mejora la liberación de NE (Alles et al., 2020).

2.6 Los productos naturales en la terapéutica del dolor

2.6.1 Metabolitos secundarios identificados en especies del género *Salvia* con actividad analgésica y/o anti-inflamatoria

Los metabolitos secundarios han sido una fuente exitosa de potenciales fármacos. Varios medicamentos actuales que han sido aprobados por la Administración de Drogas y Alimentos de EE. UU. (FDA, por sus siglas en inglés), habiéndose desarrollado directa o indirectamente a través del estudio de estos compuestos (Patridge et al., 2016). Por lo tanto, los metabolitos secundarios aún brindan una diversidad estructural única de nuevas entidades químicas en comparación con la química combinatoria estándar, lo que ofrece oportunidades para el descubrimiento de compuestos novedosos de bajo peso molecular (Dias et al., 2012). Además, la morfina fue uno de los primeros compuestos extraídos del opio (*Papaver somniferum*) en forma pura a principios del siglo XIX y se explora ampliamente hasta el día de hoy como analgésico estándar, especialmente para pacientes con cáncer. Desde el advenimiento de la morfina como analgésico, los metabolitos secundarios han jugado un papel importante en el descubrimiento de nuevas entidades químicas y se presentan como fuertes candidatos para el desarrollo de nuevos fármacos para el tratamiento del dolor crónico, incluyendo el dolor oncológico (Li y Vederas, 2009).

2.6.2 Terpenoides volátiles

Los terpenoides son una clase de compuestos orgánicos de origen natural. Esta clase de metabolitos secundarios comprende aproximadamente el 90% de los componentes de los aceites esenciales de las plantas aromáticas. Los aceites esenciales de las especies del género *Salvia* son particularmente ricos en monoterpenos y sesquiterpenos, los cuales están constituidos por 10 y 15 átomos de carbono, respectivamente (Frezza et al., 2019). Los terpenoides son sustancias muy diversas tanto en estructura como en funciones, pero químicamente derivan de la polimerización del isopreno (molécula con 5 carbonos). De hecho, su clasificación está basada en el número de moléculas de isopreno que se enlazan entre sí. Los monoterpenos, ingredientes importantes de los aceites esenciales consisten en dos unidades de isopreno (Wang et al., 2005). En diversas especies vegetales, a algunos de estos compuestos se les atribuyen ciertas actividades biológicas como anticancerígenos, antimicrobianos, antioxidantes, antivirales, analgésicos y anti-inflamatorios (Sharmeen et al., 2020). Los monoterpenos se han convertido en un tema de interés en relación con el desarrollo de analgésicos y anti-inflamatorios con un número cada vez mayor de nuevas solicitudes de patentes (Trivellini et al., 2016; Bernstein et al.,

2018; Salehi et al., 2018; Frezza et al., 2019;). Algunos estudios informan que los monoterpenos son prometedores en relación con la modulación de las citocinas, porque sus características lipofílicas favorecen su absorción y acción rápida (Spelman et al., 2006). También se ha reconocido que los monoterpenos estimulan un aumento de las citocinas antiinflamatorias como la IL-10 (De Souza Siqueira et al., 2013; Quintans et al., 2019).

2.6.3 Terpenoides no volátiles

Los terpenoides no volátiles, dos subclases principales se informan como componentes de las especies de la familia Lamiaceae, en particular, estos son diterpenos y triterpenos. Los primeros están constituidos por 20 átomos de carbono, mientras que los últimos por 30 átomos de carbono (Aldred, 2009). Dentro de los diterpenos, se han reportado siete tipos principales en esta familia. La diferencia consiste en las diversas disposiciones del esqueleto de 20 átomos de carbono para formar abietanos, clerodanos, kauranos, pimaranos, labdanos, entre otros (Wang et al., 2005). Algunos de estos tipos se consideran marcadores quimiotaxonómicos para subfamilias o géneros específicos (Vestri et al., 2001), pero en realidad todos ellos se pueden evidenciar indiferentemente en todas las especies del género *Salvia* por una estructura de base tipo oleano y ursano (Dzubak et al., 2006), siendo el ácido oleanólico y el ácido ursólico, los triterpenos pentacíclicos más reportados en especies pertenecientes a este género (Verano et al., 2013; Martínez et al 2012). Algunos terpenoides como el ácido carnósico están presentes en el género *Salvia*, éste previene el daño oxidativo del cloroplasto y muestra altas propiedades antioxidantes *in vitro* (Birtić et al., 2015).

2.6.4 Compuestos Fenólicos

Los compuestos fenólicos de las plantas del género *Salvia* comparten una actividad antioxidante significativa atribuida a los extractos (Wojdyło et al., 2007). En general, los antioxidantes protegen a las células vegetales del daño causado por los radicales libres que se desarrollan con el metabolismo celular normal o se deben a eventos estresantes, como la radiación UV excesiva, la exposición a contaminantes del suelo o del aire y a enfermedades. Las propiedades antioxidantes de los compuestos fenólicos pueden participar en la eliminación de especies reactivas de oxígeno y especies reactivas de nitrógeno (ERO / ERN) inhibiendo la formación de los mismos al suprimir enzimas o metales asociados con la producción de radicales libres y regular o defender los sistemas antioxidantes de las plantas (Spaak et al., 2008).

Algunas especies del género *salvia* y sus actividades biológicas han sido caracterizadas por la presencia de ácidos fenólicos. En particular, los compuestos más reportados de este tipo en el género son el ácido cafeico y el ácido rosmarínico, junto con sus derivados (Petersen y Simmonds, 2003; Shin *et al.*, 2004; Sedano-Partida *et al.*, 2020).

Los procesos de peroxidación lipídica que causan daño a los ácidos grasos tienden a disminuir la fluidez de la membrana y conducen a numerosos eventos patológicos (Spiteller, 2001) que podrían ser reducidos por los ácidos fenólicos de las plantas debido a su capacidad para modular diferentes especies de oxígeno (Trivellini *et al.*, 2016). El ácido rosmarínico se encuentra entre los principales compuestos fenólicos contenidos en los tejidos de varias especies de plantas que pertenecen a las *Salvias*. La acumulación de estas sustancias está determinada principalmente por el genotipo de la planta, pero también están fuertemente influenciadas por factores fisiológicos o ambientales, como la fenología, el clima, la técnica de crecimiento y las condiciones de estrés (Kiferle *et al.*, 2013).

2.6.4.1 Flavonoides

Los flavonoides son metabolitos secundarios que funcionan como moléculas señalizadoras, agentes desintoxicantes, antioxidantes y ofrecen protección a las plantas contra diversos estreses bióticos y abióticos (Mutha *et al.*, 2021). Estructuralmente, los flavonoides son benzopironas con dos anillos aromáticos (generalmente etiquetados como A y B) unidos a través de un anillo heterocíclico de pirano (generalmente etiquetado como C) y se sintetizan a través de la ruta del ácido shikímico (anteriormente conocida como ruta fenilpropanoide) (Sharma *et al.*, 2019). Se ha demostrado que la ingesta dietética regular de flavonoides se ha asociado con la reducción de la demencia y el retraso en la aparición de Alzheimer y de la enfermedad de Parkinson (Letenneur *et al.*, 2007). Los polifenoles han sido considerados potenciales neuroprotectores y neuromoduladores directos del sistema nervioso debido a su capacidad para atravesar la barrera hematoencefálica (Youdim *et al.*, 2004; Carballo-Villalobos *et al.*, 2016).

2.7 El modelo de dolor tipo FM inducido por reserpina

Diversos modelos animales se han desarrollado para imitar y poder comprender mejor la neurobiología del dolor crónico generalizado. Los modelos más comunes y mejor caracterizados involucran estímulos nocivos repetidos al músculo (Brum *et al.*, 2022). Un modelo de dolor no inflamatorio se induce mediante inyecciones repetidas de solución salina ácida (pH 4.0) en el mismo músculo gastrocnemio y produce una hiperalgesia

generalizada de la piel, el músculo y las vísceras sin daño tisular o inflamación observable (Le Bars et al., 2002) Además, este modelo se asocia con comportamientos similares a la ansiedad y la depresión en un 50-60% de los animales después de la inducción del modelo (Liu et al., 2014).

La reserpina es un compuesto que depleta las aminas biógenas del sistema nervioso al unirse irreversiblemente al transportador vesicular de monoaminas para atenuar el control mediado por éstas. El grupo de Nagakura et al. (2009) confirmó que la reserpina causa una disminución crónica en el contenido de DA, NE y 5-HT en diferentes regiones del SNC, las cuales están involucradas en el procesamiento de la señal de dolor, lo que sugiere que los síntomas de dolor muscular y cutáneo observados en la FM son causados por la participación de aminas biógenas seguida de la atenuación del control del dolor del SNC mediado por éstas.

3. Hipótesis

Si *Salvia amarissima* Ortega posee propiedades antinociceptivas, entonces producirá efecto antihiperalgésico y antialodínico en modelos de dolor debido a la presencia de amarisolida A, en cuyo mecanismo de acción participan receptores a opioides endógenos, a TRPV1, a serotonina (5-HT_{1A}) y citocinas inflamatorias.

4. Objetivos

Objetivo general

Evaluar el espectro de actividad antinociceptiva y/o antiinflamatoria de extractos de *Salvia amarissima* y el metabolito activo amarisolida A en modelos de dolor nociceptivo, inflamatorio y disfuncional tipo FM, así como los posibles mecanismos de acción inhibidores a través de los cuales ejerce su efecto.

Objetivos particulares

1. Comparar la actividad antinociceptiva y antiinflamatoria de extractos de diferente polaridad de las hojas de *S. amarissima* e identificar el más activo en los modelos experimentales de dolor nociceptivo e inflamatorio.
2. Identificar, aislar y purificar al terpeno amarisolida A como posible metabolito con actividad antinociceptiva y/o antiinflamatoria.
3. Calcular la toxicidad aguda (DL₅₀) del extracto crudo más activo de *S. amarissima* y amarisolida A y determinar el rango de dosis efectivas.

4. Corroborar si la actividad del extracto es a nivel central y/o periférica e identificar posibles efectos adversos.
5. Seleccionar el extracto más activo y las dosis a evaluar en el efecto antihiperalgésico y/o antialodínico en el modelo de dolor disfuncional de tipo FM.
6. Evaluar la actividad antihiperalgésica y/o antialodínica de amarisolida A en el dolor de tipo FM.
7. Evaluar la participación de receptores a opioides, TRPV1, 5-HT_{1A} de serotonina, y citocinas IL1 β , IL6 y TNF-alfa como posibles mecanismos involucrados en el efecto tipo analgésico del extracto crudo y amarisolida A.

5. Metodología

5.1 Identificación y procesamiento del material vegetal

S. amarissima fue colectada en el mes de agosto de 2018 en el poblado de Santiago Huaucilla, Oaxaca. Un ejemplar de la especie fue identificado por la Dra. Martha J. Martínez-Gordillo y depositado en el Herbario del IMSS de la Ciudad de México con el número 16360. El material vegetal se secó a temperatura ambiente, se molió finamente y se procesó por maceración en disolventes orgánicos. El extracto acuoso se obtuvo por decocción y liofilización.

5.2 Animales

Ratones macho de la cepa Swiss-Webster (25-30 g) y ratas de ambos sexos de la cepa Wistar (200-230 g) se utilizaron en el estudio agrupadas en al menos 6 animales. Los sujetos experimentales se colocaron en cajas de acrílico con acceso al agua y alimento *ad libitum* mantenidos con temperatura controlada de 22 \pm 2°C. Para el manejo adecuado de los animales se siguieron los lineamientos éticos establecidos en la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. El protocolo fue revisado y aprobado por el comité de ética (CONBIOETICA-09-CEI-01-20170316) e investigación del Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz para los proyectos No. NC123280.0 y NC17073.0.

5.3 Fármacos y reactivos

La indometacina, el WAY100-635 y la reserpina se adquirieron de Sigma–Aldrich Co., el tramadol fue obtenido de los laboratorios Amasa S.A de C.V., la morfina del laboratorio Pisa, y el antagonista de los receptores TRPV1 (A784168) se obtuvo del laboratorio Tocris Bioscience. La solución salina isotónica (0.9% NaCl) se utilizó como el vehículo. La solución para el pletismómetro fue marca imbibiente BBc 97, Ornano, Italia. Todos los fármacos fueron disueltos en agua milliQ. Los fármacos de referencia y

los diferentes tratamientos fueron administrados por vía intraperitoneal (i.p.) en un volumen de 0.1 ml/10 g o 100 g de peso corporal del ratón o rata, respectivamente. La reserpina se administró 3 veces en dosis de 1 mg/kg vía subcutánea (s.c.). Los controles recibieron el mismo volumen de vehículo por la misma vía. El alógeno formalina y los disolventes orgánicos fueron marca J.T. Baker. La formalina se preparó en solución al 1% para inducir la nocicepción. Los fármacos y reactivos fueron preparados el mismo día de los experimentos. Los extractos no polares o medianamente polar fueron resuspendidos en 0.2% de tween 80 en agua milliQ o simplemente en agua en el caso del extracto acuoso o metanólico.

5.4 Análisis fitoquímico de extractos crudos y contenido de amarisolida A

5.4.1 Obtención de extractos orgánicos

El material vegetal se secó a temperatura ambiente y luego se molió finamente. Entonces, un lote de 50 g de este material se procesó mediante maceración en solventes orgánicos en polaridad creciente (150 mL) con el fin de preparar varias fracciones con constituyentes de diferente naturaleza química obtenidos como extractos crudos cuyo rendimiento fue: hexano 0.26 g (0.52%), diclorometano/metanol 3.63 g (7.26%), acetato de etilo (AcOEt) 2.31 g (4.62%), acetona 2.22 g (4.44%) y metanol 4.88 g (9.76%). Estas condiciones fueron elegidas a partir de análisis previos en el laboratorio y los reportados por Flores-Bocanegra et al. (2017) y Maldonado et al. (1996). El macerado de la exposición a cada solvente orgánico se obtuvo después de 72 h (por tres veces sucesivas), se filtró y entonces el solvente se eliminó mediante evaporación rotatoria a presión reducida en un equipo Büchi R-210 (BÜCHI Latinoamérica S. de RL de CV, México). El método de este proceso se ilustra en el diagrama de la **Figura 2**.

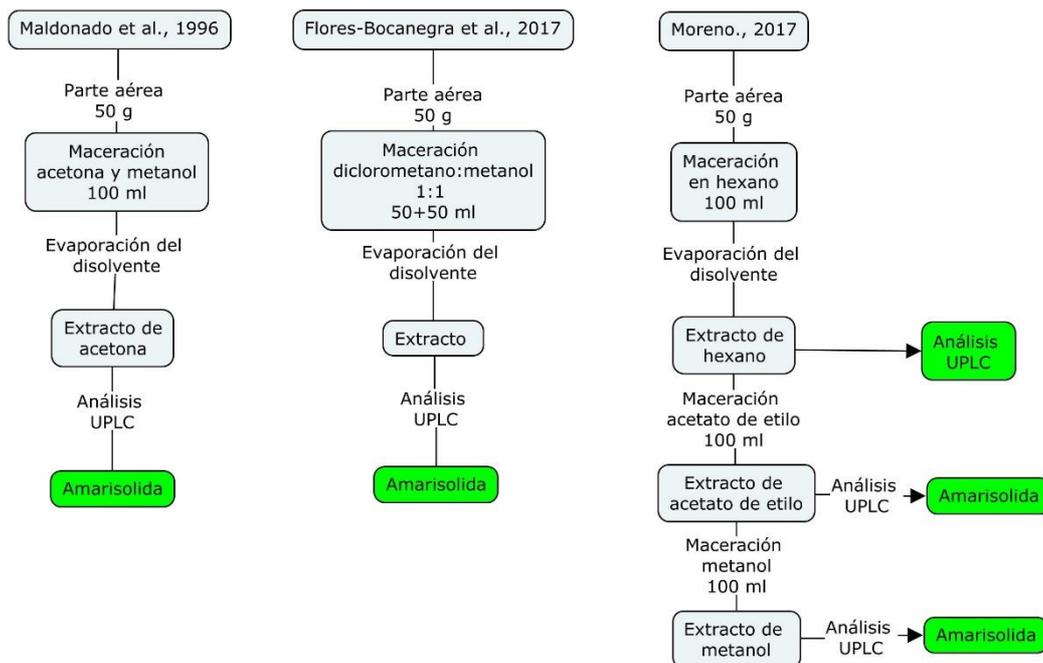


Figura 2. Diagrama de la obtención de extractos de *S. amarissima* mediante maceración.

5.4.1.1 Obtención del extracto acuoso

El extracto acuoso se elaboró con 50 g de material vegetal mediante decocción en 200 ml de agua destilada por 10 min. Posteriormente, la decocción se filtró para separar la materia vegetal. La fracción acuosa fue congelada y liofilizada. El proceso consistió en establecer una temperatura de -50 grados centígrados y una presión de 4×10^{-4} mbar.

5.4.2 Análisis cromatográfico de los extractos

Tras la obtención de los extractos de distinta polaridad del material vegetal de *S. amarissima*, una muestra de 5 mg de cada uno se tomó y se disolvió en metanol grado HPLC para su inyección en un cromatógrafo líquido de ultra resolución (UPLC) marca Waters ACQUITY UPLC. Las condiciones de análisis fueron: volumen de inyección: 10 μ l, Columna: Symmetry C-18, método establecido para terpenos de *Salvia* (Gradiente; H_3PO_4 0.1 %/ACN) a $\lambda=254$ nm. El análisis de compuestos fenólicos se realizó en un cromatógrafo de líquidos de alta resolución Agilent Technologies 1220 Infinity LC. La fase móvil fue en gradiente con A: agua al 5% de ácido fórmico y B: metanol, flujo de 0.9 ml/min. Una precolumna Security Guard Cartridges PFD 4 x 3.0 mm y una columna Luna C18(2)100 Å con diámetro de 5 μ m; dimensión: 250 x 4.6 mm de la marca Phenomenex fueron utilizadas. La presión fue = 150 bares con tiempo de corrida de 50 minutos.

5.4.3 Identificación de amarisolida A

La presencia de amarisolida A fue evidenciada mediante cromatografía en capa fina usando cromatofolios con dimensiones de 3.5 x 7 cm. La fase móvil fue una mezcla de AcOEt:MeOH 95:5. La presencia de amarisolida A y otros compuestos de tipo terpeno se detectó mediante el revelador anisaldehído-ácido sulfúrico (Wagner y Bladt, 1996).

La identificación del compuesto mayoritario purificado del extracto de AcOEt se realizó con un cromatógrafo de UPLC acoplado a un espectrómetro de masas Bruker HCT Ultra LC/MS. La fase móvil se realizó en gradiente con dos elementos A: agua al 1% de ácido fórmico y B: acetonitrilo. El tiempo de corrida fue de 35 minutos. Posterior al análisis de cromatografía de líquidos, la muestra se analizó en el cromatógrafo de gases con trampa de iones, el método de ionización de la muestra fue por electrospray, el cual se definió en un rango de búsqueda para el ion molecular de 400 a 600 Daltones (Kennedy & Wiseman, 2010).

5.5 Evaluación farmacológica

5.5.1 Evaluación del efecto antinociceptivo y anti-inflamatorio en la prueba de formalina
El método usado fue similar al descrito por Hunskaar et al. (1986). Los ratones fueron inyectados con 20 µl de formalina al 1% de manera subcutánea en la superficie plantar del miembro posterior derecho. La conducta de sacudida y/o lamida de los ratones fue tomada como la respuesta nociceptiva. Esta constó de dos periodos la primer etapa neurogénica o central que se presenta en los primeros 0-10 min después de la administración de formalina debida a la activación de las fibras tipo C y la segunda denominada inflamatoria o tardía se presenta de los 10 a 30 min asociada a la liberación de serotonina, histamina, prostaglandinas y bradicinina (Shibata et al., 1989). Estas respuestas se registran mediante la observación de las conductas de lamida/ sacudida de la pata estimulada (Le Bars et al., 2002; Tlacomulco-Flores et al., 2020; Moreno-Pérez et al., 2021).

Un cernimiento inicial se realizó probando una dosis de 10 mg/kg (i.p.) de los extractos de *S. amarissima* en incremento de polaridad, tales como hexano, acetato de etilo (AcOEt), acetona, mezcla de diclorometano y metanol y un extracto acuoso (Moreno-Pérez et al., 2019). El rendimiento de amarisolida A tras su purificación fue de 5.03%, lo que permitió su evaluación en la prueba de la formalina. La actividad antinociceptiva de este compuesto aislado del extracto AcOEt como compuesto mayoritario se probó en las dosis de 0.001, 0.01, 0.1, 0.3, 1, 3 y 10 mg/kg, i.p.

5.5.2 Evaluación del posible mecanismo antinociceptivo de acción del extracto y amarisolida A en la prueba de formalina

La participación de los receptores a opioides, TRPV1 y 5HT_{1A} de serotonina se exploró en las fases neurogénica e inflamatoria de la prueba de formalina como posibles mecanismos de acción en el efecto antinociceptivo del extracto de AcOEt (10 mg/kg, i.p.) y amarisolida A (1 mg/kg, i.p.) en presencia de los antagonistas naltrexona (1 mg/kg), A 784168 (1 mg/kg) y WAY 100635 (1 mg/kg), respectivamente. Los antagonistas se administraron 15, 20 y 30 minutos antes del tratamiento antinociceptivo de manera correspondiente. La participación de la vía de señalización de AC-AMPC como mecanismo de señalización de receptores inhibidores se evaluó en la presencia de un inductor de la actividad enzimática de la AC (forskolina, 10 mg/kg, i.p.) y un inhibidor de fosfodiesterasas (enzima que degrada al AMPC) (teofilina, 20 mg/kg, i.p.).

5.5.3 Evaluación del efecto antinociceptivo en “Hargreaves test”

La respuesta nociceptiva a nivel central se corroboró en esta prueba mediante un estímulo térmico en ratones utilizando calor radiante con el aparato de Hargreaves et al. (1988) (Ugo Basile, modelo 37370-001), el cual fue emitido por una fuente calórica con una intensidad de 60 Hz con un tiempo de corte de 20 s para evitar daño en los tejidos de la extremidad posterior derecha donde se hizo incidir el haz térmico. Este ensayo se repitió 3 veces con un espacio de 3 minutos entre cada medición. Los datos se expresaron como el efecto máximo posible en porcentaje (EMP %).

$$\%EMP = \frac{\text{Latencia del tratamiento} - \text{Latencia del vehículo}}{\text{Tiempo máximo de corte} - \text{Latencia del vehículo}} \times 100$$

5.5.4 Evaluación del efecto anti-inflamatorio en la prueba de edema inducido con carragenina

El efecto anti-inflamatorio de los tratamientos se corroboró en ratas a las que se les indujo edema en la extremidad posterior derecha, ello mediante inyección subplantar de 50 µL de carragenina al 1%. El edema se expresó como el aumento en el volumen de la extremidad en mL, después de la inyección de carragenina medido por medio del desplazamiento de volumen utilizando un pletismómetro (Ugo-Basile, Italia). Inmediatamente antes de la inyección de carragenina se tomó el valor basal y cada 30 minutos durante 4 horas después de la inducción de edema y, finalmente se realizó la medición 24 horas posteriores a la administración de carragenina.

5.5.4.1 Evaluación del daño tisular

Después de la prueba de carragenina, todos los animales fueron eutanasiados para diseccionar las extremidades posteriores izquierda y derecha, las cuales se lavaron con solución salina tamponada con fosfato (PBS) para eliminar el exceso de grasa y tejidos conectivos. Todas las muestras se fijaron en una solución de formaldehído al 4% tamponada neutra. Después de 5 días, el exceso de solución de formaldehído se enjuagó con PBS y se retiraron la piel y el hueso de las extremidades traseras. Luego, se crioprotegieron con sacarosa al 30% durante tres días. Las muestras incluidas en Tissue-Tek® se congelaron para obtener secciones de 20 µm de espesor utilizando un criostato Kedeer (Kedeer KD-2950). La tinción tricrómica de Masson se realizó siguiendo las instrucciones del kit comercial (Hycel, Guadalajara, México). A continuación, cada portaobjetos se examinó con un microscopio Leica (Leica DM 1000LED, Wetzlar, Alemania) y se analizó cualitativamente con el software Leica Microsystems Framework v4.7 (Leica, Wetzlar, Alemania). Las imágenes se tomaron al azar en cada diapositiva con un aumento de 20X.

5.6 Evaluación del efecto antihiperálgico y antialodínico en el modelo de FM

El extracto de AcOEt de *S. amarissima* fue seleccionado para su evaluación en el modelo de FM debido a que fue el más activo como antinociceptivo en la fase neurogénica y anti-inflamatoria en el modelo de formalina. Este efecto fue significativo desde la dosis de 0.1 mg/kg y se mantuvo hasta la dosis de 100 mg/kg. Estos resultados se tomaron como referencia para seleccionar las dosis utilizadas en este modelo de dolor disfuncional tipo FM. Aunado al modelo de formalina, el extracto produjo disminución significativa en la inflamación de las extremidades de las ratas sometidas a producida en la prueba de edema inducido por carragenina evaluado a la dosis de 10 mg/kg.

El modelo de FM se realizó de acuerdo con el método descrito por Hernandez-Leon et al. (2019). Para ello se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar (200-250 g), las cuales recibieron un periodo de habituación de 30 minutos al día en los equipos de medición de hiperálgia (Randall-Selitto Ugo-Basile) y alodinia (filamentos de Von Frey) durante 3 días previos al experimento. Para la inducción del modelo se administró reserpina a razón de 1 mg/kg, vía subcutánea (s.c.) por 3 días consecutivos. Estos animales fueron evaluados el día 7 posterior a la administración de reserpina para la identificación de signos compatibles con el desarrollo de conductas tipo alodinia e hiperálgia.

La evaluación consistió en establecer la presencia de hiperalgesia muscular, alodinia táctil y térmica, para lo cual se determinaron los umbrales de respuesta de la siguiente manera:

El umbral de presión muscular se midió utilizando el método previamente descrito por Nagakura et al. (2009). Para ello, una fuerza mecánica en aumento lineal (máximo 250 g) se aplicó al músculo de la extremidad posterior derecha utilizando el aparato de Randall-Selitto (Ugo Basile, Italia) hasta provocar la respuesta de retirada de la extremidad. Entonces, el promedio de tres repeticiones con un intervalo entre estímulos de al menos 30 s se registró para cada sesión.

El umbral de respuesta táctil. Éste consistió en medir la respuesta de alodinia utilizando filamentos de Von Frey (Stoelting Co., Wood Dale, IL). Cada rata se colocó en una jaula de prueba transparente con un piso de malla metálica para aplicarle filamentos de Von Frey (0.6, 1, 1.4, 2, 4, 6, 8, 10 y 15 g) a la superficie plantar de la extremidad posterior derecha. La retirada de la extremidad se consideró como una respuesta positiva y, la falta de retirada en un lapso mayor a 6 segundos se definió como una respuesta negativa. Se comenzó con 2.0 g de fuerza. Siempre que se producía una respuesta positiva a un filamento aplicado se consideraba el siguiente filamento más pequeño. Cuando se produjo una respuesta negativa se aplicó el siguiente filamento superior. La prueba continuó hasta que se recopilaron cuatro respuestas después del primer cambio, posteriormente el umbral de retirada de la pata se convirtió en el umbral de respuesta táctil utilizando una adaptación del paradigma de Dixon arriba-abajo (Chaplan et al., 1994)

Umbral de alodinia térmica (prueba de pulverización de acetona). Éste se evaluó utilizando estímulos fríos con acetona (Yoon et al., 1994), para lo cual cada rata se colocó en un compartimento transparente sobre una rejilla metálica elevada. Con una jeringa de insulina se adicionaron 50 µl de acetona en la superficie dorsal del miembro posterior derecho. Las conductas de lamida y/o sacudida se registraron durante un minuto después de la pulverización. Este ensayo se realizó tres veces con un intervalo de 5 minutos entre medidas y el promedio se consideró como el umbral de alodinia fría.

Las ratas con umbrales iguales o inferiores a 150 g para hiperalgesia muscular, 5 g para la alodinia táctil y 3 segundos para la alodinia térmica fueron administradas con el extracto de AcOEt utilizando las dosis de 3, 30, 100 y 300 mg/kg para establecer la ventana de actividad del extracto en el modelo de dolor de tipo FM.

Con base en los resultados anteriores se decidió evaluar al compuesto purificado como amarisolida A en el modelo y explorar su ventana de actividad biológica utilizando dosis de 3, 10, 30, 100 y 300 mg/kg, siguiendo el mismo procedimiento que el realizado para el extracto.

5.6.1 Determinación de citocinas inflamatorias en el tejido nervioso de ratas con FM

Los niveles de IL-1 β , IL-6 y el TNF- α presentes en los homogenados de la corteza prefrontal (CX), el hipocampo (HIP), y la médula espinal dividida en secciones toraco-dorsal (TD), toraco-ventral (TV), lumbo-dorsal (LD) y lumbo-ventral (LV) de tejido nervioso de ratas con FM se midieron mediante ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) utilizando kits comerciales según las instrucciones del fabricante (kit Elisa de rata, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.). Los ensayos se realizaron por duplicado, los límites de detección para IL-1 β , IL-6 y el TNF- α fueron 5.52, 12.05 y 12.98 pg/ml respectivamente. Los datos fueron recolectados y analizados usando el sistema de lectura para microplacas por espectrometría Agilent BioTek Epoch para calcular las concentraciones de las muestras a partir de las curvas estándar.

5.7 Evaluación de sedación como efecto adverso a nivel central

El posible efecto adverso de sedación por la acción central de los tratamientos y que es observado con analgésicos de tipo opioide fue evaluado con el extracto AcOEt y con Amarisolida A utilizando una prueba de actividad ambulatoria como el campo abierto. Ésta se realizó 30 minutos después de la administración del extracto o amarisolida A. Para ello, los animales se colocaron en una caja dividida en 12 cuadros (10 cm \times 10 cm). El número de cuadros explorados por cada animal se registró en un periodo de 2 minutos. Posterior a esta prueba, los animales fueron introducidos en un cilindro de exploración de acrílico para contabilizar el número de levantamientos que los ratones realizan sobre las extremidades posteriores en un periodo de 5 minutos. La disminución de la conducta exploradora, tanto en el número de cuadros como en levantamientos, se consideró como indicativa de efecto sedante (Hiller y Zetler, 1996).

5.8 Evaluación de daño gástrico como efecto adverso de anti-inflamatorios

Una vez finalizada la prueba de inflamación con carragenina, los animales fueron eutanasiados y los estómagos y ambas extremidades posteriores se disecaron. Los estómagos fueron llenados con 10 ml de formol al 10% por 10 minutos para su fijación. Transcurrido este tiempo, los estómagos fueron cortados por la curvatura mayor y los

restos de alimento y el formol fueron removidos. Posterior a este procedimiento, los estómagos fueron analizados para registrar posibles lesiones gástricas como las comúnmente producidas por fármacos AINEs como la indometacina, utilizada como referencia en este estudio (Whittle, 1977). En tanto que las extremidades posteriores se procesaron mediante histología con la tinción tricrómica de Masson para evaluar el daño tisular por la presencia de edema.

5.9 Análisis estadístico

Los datos se expresan como el promedio \pm error estándar de la media (E.E.M.) de cada tratamiento. Para las curvas dosis-respuesta se utilizó el análisis de varianza (ANADEVA) de un factor seguida de la prueba post-hoc de Dunnett. La evaluación de los cursos temporales se analizó por ANADEVA de dos factores seguida de la prueba post-hoc de Tukey. Una $p < 0.05$ fue considerada como diferencia significativa.

6. Resultados

6.1 Obtención de extractos crudos

El proceso del material mediante maceración con solventes orgánicos en polaridad creciente permitió obtener 5 fracciones con constituyentes de diferente naturaleza química con los siguientes rendimientos: hexano 0.26 g (0.52%), diclorometano/metanol 3.63 g (7.26%), AcOEt 2.31 g (4.62%), acetona 2.22 g (4.44%) y metanol 4.88 g (9.76%). En tanto que para el extracto acuoso se obtuvo un rendimiento de 10.25%.

6.2 Análisis fitoquímico y contenido de amarisolida A

El análisis de los extractos crudos de *S. amarissima* mediante cromatografía en capa fina mostró la presencia de amarisolida A, la cual se comparó con el estándar de referencia. Esta presencia se corroboró para todos los extractos mediante cromatografía líquida de alta resolución donde se determinó la concentración de amarisolida A, la cual fue más abundante en el extracto de AcOEt utilizando el método propuesto por nuestro grupo en contraste con los reportados en la literatura (Maldonado et al., 1996; Flores-Bocanegra et al., 2017). Por lo tanto, el extracto de AcOEt se preparó con otro lote de material vegetal en mayor escala con la finalidad de obtener mayor cantidad de amarisolida A pura.

El análisis del perfil cromatográfico por UPLC permitió detectar un pico reproducible en los diferentes extractos crudos de *S. amarissima*, donde el extracto de AcOEt fue el que mostró mayor abundancia del pico en el tiempo de retención de 7.05 min como se muestra en la Fig. 2, el cual correspondió a la presencia de amarisolida A de acuerdo con su espectro a una longitud de onda de 254 nm y su peso molecular. Por lo anterior, una

muestra del extracto de AcOEt (25 g) se procesó por cromatografía en columna abierta para aislar y purificar el compuesto abundante identificado como amarisolida A con un rendimiento de 50 mg/g de extracto.

Se realizó un fraccionamiento por CCA a partir de 14.85 g del extracto de AcOEt *S. amarissima*, se utilizaron 500 g de sílica gel 60 (63-200 µm (MERCK CAS: 7631-86-9) para preparar el punto de aplicación. El volumen muerto necesario para la hidratación de la sílica gel fue de 1100 mL de hexano mediante gradiente de disolventes de menor a mayor polaridad, se obtuvieron 250 subfracciones de 20 mL. La evaporación de los disolventes con rota evaporador (BÜCHI) permitió concentrarlas para realizar la cromatografía en capa fina que a su vez permitió reunir las que mostraron un perfil cromatográfico equivalente en 8 grupos.

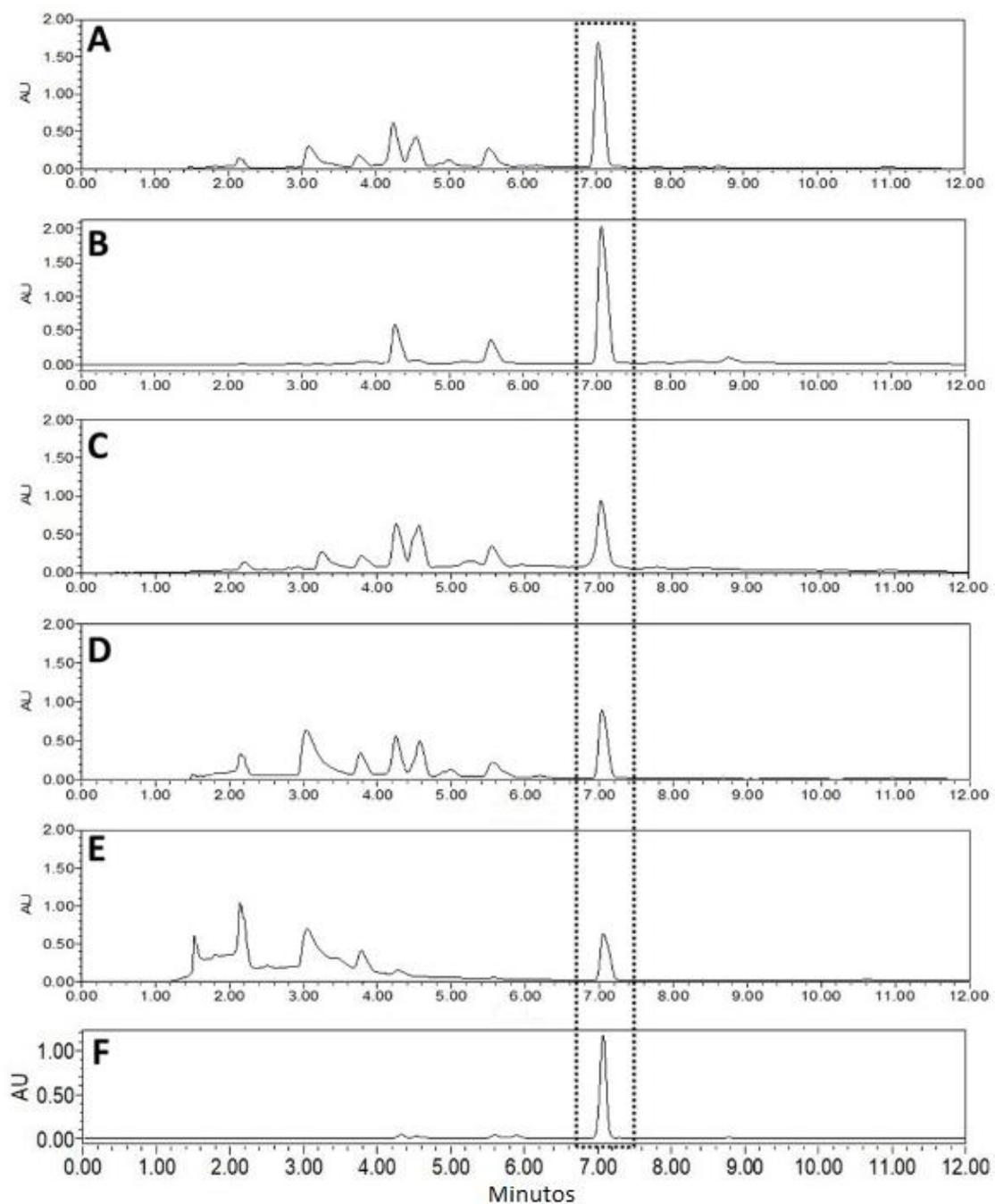


Figura 3. Perfil cromatográfico de los extractos crudos de *S. amarissima* que muestra la presencia de amarissolida A. Comparado con el estándar de referencia cuyo pico se observa al tiempo de retención de 7.05 min. Longitud de onda 256 nm. A) diclorometano/metanol, B) acetato de etilo, C) acetona D) metanol, E) extracto acuoso y F) estándar de amarissolida A.

6.3 Evaluación farmacológica

6.3.1 Evaluación del efecto antinociceptivo y anti-inflamatorio en la prueba de formalina

En el cernimiento preliminar, las curvas de curso temporal permitieron identificar que todos los extractos de diferente polaridad de *S. amarissima* disminuyeron significativamente la nocicepción inducida con formalina al 1% desde el primer minuto

de la fase neurogénica y en toda la fase inflamatoria, donde el extracto de AcOEt fue el más activo entre todos los extractos evaluados (Fig. 4A, Tratamiento $F_{8,50} = 126.10$, $p < 0.0001$, Tiempo $F_{298,149} = 75.93$, $p < 0.001$, Interacción $F_{48,300} = 6.79$, $p < 0.0001$). El área bajo la curva (ABC) de la conducta de sacudida fue calculada a partir de las CCT con la finalidad de evidenciar el efecto sobre la nocicepción en presencia del extracto de AcOEt en comparación con los otros extractos y los fármacos de referencia. Como se observa en la Fig. 4B, el extracto de AcOEt produjo un efecto antinociceptivo similar al del fármaco de referencia (morfina, 1 mg/kg) en la fase neurogénica ($F_{8,50} = 18.62$, $p < 0.0001$) y al tramadol en la fase inflamatoria, siendo equivalente el efecto del extracto acuoso (AQ10) (Fig. 3C, $F_{8,50} = 77.63$, $p < 0.0001$). Fue entonces que el extracto de AcOEt se seleccionó para construir su ventana de actividad biológica mediante una gráfica dosis-respuesta evaluando dosis de 0.1, 1 y 10 mg/kg, i.p. En tanto que amarisolida A, como el metabolito más abundante, se evaluó en dosis de 0.01, 0.1, 0.3 y 1 mg/kg, i.p. El extracto produjo una respuesta dependiente de la dosis con una $DE_{50} = 0.77$ mg/kg, i.p. y significancia estadística desde la dosis de 0.1 mg/kg para alcanzar una inhibición máxima a la dosis de 10 mg/kg, i.p., tanto en la fase neurogénica (Fig. 5A, $F_{4,33} = 21.15$, $p < 0.0001$) como en la inflamatoria (Fig. 5B, $F_{4,33} = 65.92$, $p < 0.0001$) de la prueba de formalina. Amarisolida A en las dosis de 0.3 y 1 mg/kg produjo una respuesta significativa en la fase neurogénica ($p < 0.0001$) (Fig. 5C, $F_{7,41} = 6.93$, $p < 0.0001$). Mientras que, un mejor efecto de amarisolida A se obtuvo en la fase inflamatoria (Fig. 5D, $F_{7,41} = 16.96$, $p < 0.0001$) donde la respuesta significativa se observó a las dosis de 0.01 y 0.1 mg/kg ($p < 0.05$) con un aumento dosis dependiente cuando se administraron 0.3 y 1.0 mg/kg i.p. ($p < 0.0001$). Estas respuestas fueron similares al efecto de la morfina (1 mg/kg, i.p.) (Fig. 5D).

En el cernimiento de actividad farmacológica, el extracto acuoso y el orgánico de AcOEt fueron los más activos, por lo que ambos se seleccionaron para evaluar la toxicidad aguda. En ambos extractos la DL_{50} fue > 2000 mg/kg, sin que se modificara significativamente la ganancia de peso, ni se presentarán alteraciones macroscópicas. En el caso de amarisolida A se calculó una DL_{50} de 530 mg/kg (Moreno-Pérez et al., 2021).

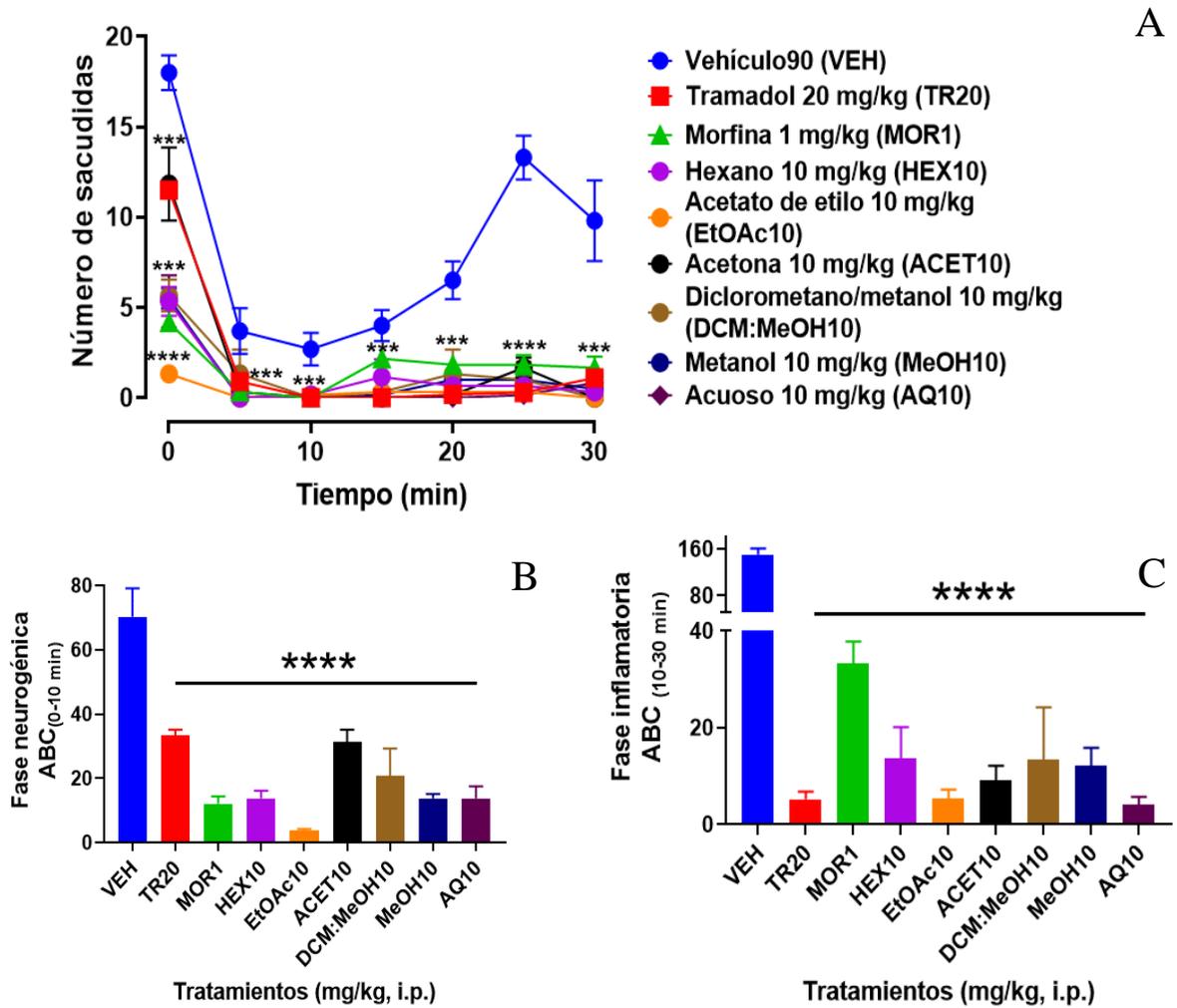


Figura 4. Curso temporal de los efectos antinociceptivos de diferentes extractos de *S. amarissima* (10 mg/kg, i.p.) en la prueba de formalina al 1% en ratones (A). Los datos se expresan como la media \pm E.E.M. de seis repeticiones. ANADEVAs de dos factores seguido de la prueba post-hoc de Tukey. *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ para seis repeticiones. Respuesta antinociceptiva de los fármacos de referencia, morfina (MOR, 1 mg/kg, i.p.) y tramadol (TR20, 20 mg/kg, i.p.), así como los extractos crudos de *S. amarissima* (10 mg/kg, i.p.) se expresa como las fases neurogénica (ABC 0-10 min) (B) e inflamatoria (ABC 10-30 min) (C) en la prueba de formalina. ANADEVAs de una vía seguido de la prueba de Dunnett. **** $p < 0.0001$ para seis repeticiones. Extractos de *S. amarissima* se obtuvieron en polaridad creciente con hexano (HEX), acetato de etilo (AcOEt), una mezcla de diclorometano/metanol (DCM:M), acetona (ACET) y metanol (MeOH), incluso como extracto acuoso (AQ), y en comparación con el vehículo.

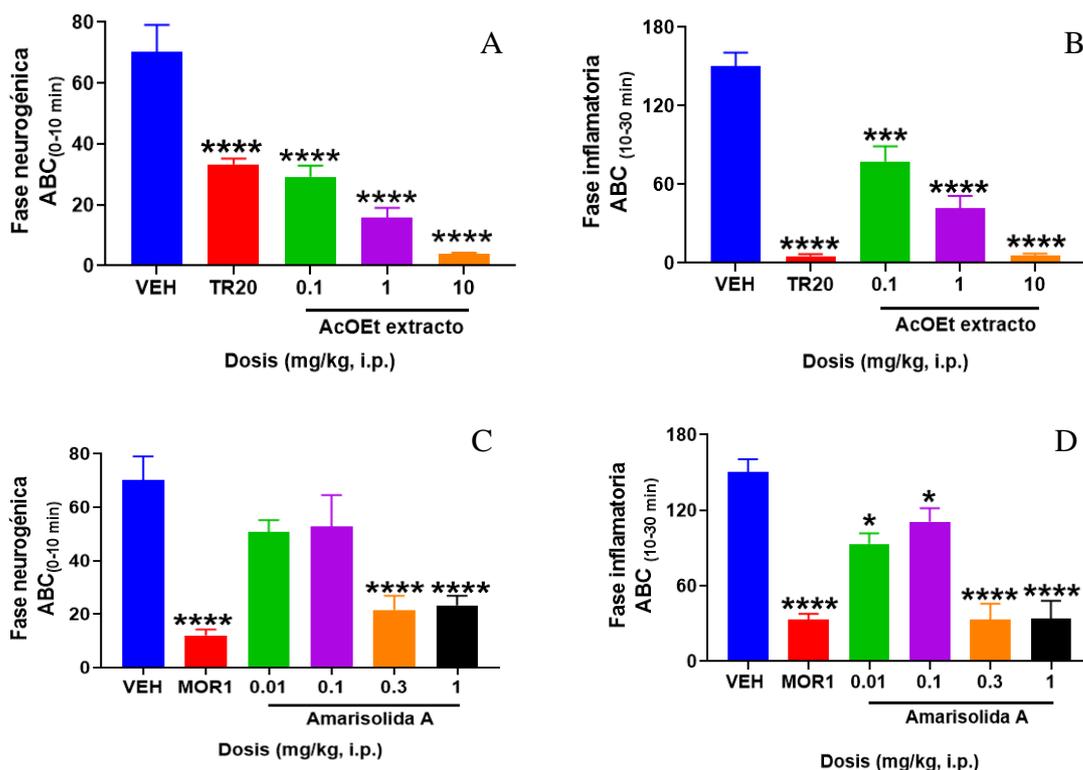


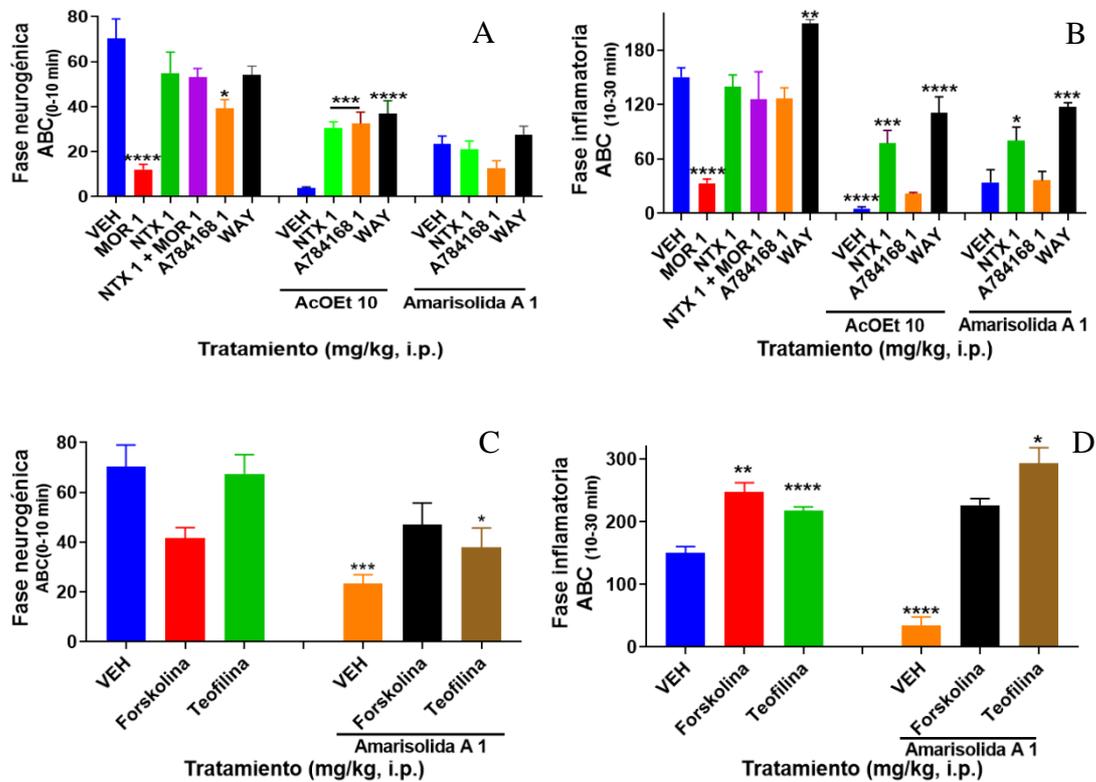
Figura 5. Efecto antinociceptivos de los fármacos de referencia morfina (MOR, 1 mg/kg, i.p.) y diferentes dosis del extracto de acetato de etilo (AcOEt, 0.1–10 mg/kg, i.p.) y amarisolida A (0.01–1 mg/kg, i.p.) expresado como las fases neurogénica (ABC 0-10 min, A y C, respectivamente e inflamatoria (ABC 10-30 min, B y D, respectivamente) de la prueba de formalina al 1% en ratones. Los datos se expresan como la media \pm E.E.M. de seis repeticiones. ANADEVIA de un factor seguido de la prueba de Dunnett. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

6.3.2 Evaluación del posible mecanismo de acción antinociceptivo del extracto de AcOEt y amarisolida A

Tanto el efecto antinociceptivo del extracto de AcOEt (10 mg/kg, i.p.) como el de amarisolida A (1 mg/kg, i.p.) fue inhibido en presencia del antagonista opioide naltrexona (1 mg/kg, i.p.). En el caso del extracto fue inhibido de manera parcial en ambas fases (neurogénica e inflamatoria) (Fig. 6A). En tanto que el efecto de amarisolida A fue inhibido solo en la fase inflamatoria (Fig. 6B).

Los efectos antinociceptivos del extracto de AcOEt (10 mg/kg, i.p.) también se inhibieron parcialmente en presencia de A-784168 (antagonista TRPV1, 1 mg/kg, i.p.) y WAY100635 (antagonista serotonina 5-HT_{1A}, 1 mg/kg, i.p.) en la fase neurogénica (Fig. 6A, $F_{12,67} = 9.08$, $p < 0.001$). Mientras que en el caso de la amarisolida A, su efecto antinociceptivo se modificó solo en la fase inflamatoria en presencia de WAY100635 (Fig. 6B, $F_{12,67} = 17.89$, $p < 0.0001$).

Considerando que tanto los receptores a opioides como el 5-HT_{1A} de serotonina están acoplados a una proteína G inhibidora, la cual disminuye la participación de la vía de señalización de AC y el segundo mensajero AMPc, y ambos participan en el efecto del extracto y/o amarisolida A, entonces solo el efecto del metabolito se evaluó en la presencia de un inhibidor de la fosfodiesterasa (teofilina, 20 mg/kg i.p.), enzima que degrada al AMPc y en presencia de forskolina (10 mg/kg, i.p.), un inductor de la actividad enzimática de la AC. Los resultados mostraron que el pretratamiento con forskolina y teofilina inhibieron totalmente el efecto antinociceptivo significativo de los animales que recibieron amarisolida tanto en la fase neurogénica (Fig. 6C, $F_{13,78}=7.11$, $p < 0.0001$) como en la inflamatoria (Fig. 6D, $F_{13,78} = 34.49$, $p < 0.0001$).



6.3.3 Evaluación del efecto antinociceptivo del extracto AcOEt y amarisolida A en “Hargreaves test”

Debido a que el extracto AcOEt y amarisolida A presentaron efecto antinociceptivo en la fase neurogénica de la prueba de formalina, ello sugirió que su actividad se ejerce a nivel central. Por tanto, los efectos antinociceptivos de ambos se exploraron en la prueba de “plantar test”, cuyo estímulo térmico refuerza la acción central antinociceptiva. La respuesta registrada como el efecto antinociceptivo máximo posible para el extracto fue de $22.63 \pm 5\%$ y $25.24 \pm 5.34\%$ en las dosis probadas de 1, 10 mg/kg, respectivamente. Mientras que para amarisolida A se obtuvieron respuestas de $28.19 \pm 5.63\%$ y $65.98 \pm 8.86\%$ para las dosis de 0.1 y 1 mg/kg, respectivamente. Estos efectos fueron similares o incluso mejores que los observados con el fármaco de referencia tramadol (20 mg/kg, i.p.) en comparación con el grupo que recibió el vehículo (Fig. 7, $F_{5,30} = 12.83$, $p < 0.0001$).

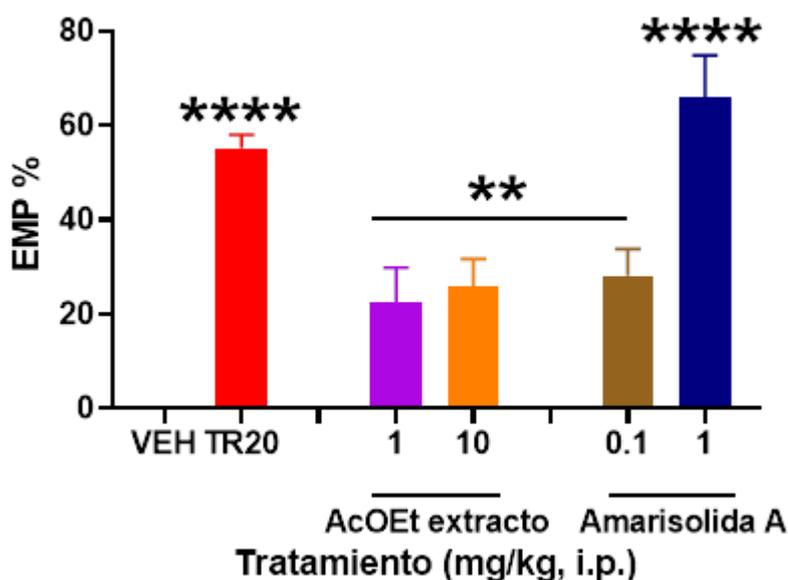


Figura 7. Efecto antinociceptivo del extracto de acetato de etilo (AcOEt, 1 y 10 mg/kg, i.p.), amarisolida A (0,1 y 1 mg/kg, i.p.) o tramadol (TR, 20 mg/kg, i.p.) expresados como porcentaje de efecto máximo posible (EMP %) en comparación con el grupo vehículo (VEH) en la prueba plantar en ratas. Los datos se expresan como la media \pm E.E.M. de seis repeticiones. ANADEV A de un factor seguido de la prueba de Dunnett post-hoc. ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$

6.3.4 Evaluación del efecto anti-inflamatorio del extracto AcOEt y amarisolida A en la prueba de edema inducido con carragenina

El extracto de AcOEt (1 mg/kg, i.p.) no modificó la respuesta inflamatoria inducida en presencia de carragenina en las primeras 4 h de observación. Sin embargo, con esta dosis se observó disminución significativa de la inflamación a las 24 h. El incremento de la

dosis a 10 mg/kg, i.p., generó la disminución significativa de la respuesta inflamatoria desde las primeras 2 h. Este efecto significativo y dependiente de la dosis se mantuvo hasta el último registro de la respuesta realizado a las 24 h, siendo similar al obtenido con el fármaco de referencia indometacina (20 mg/kg, i.p.). Donde la significancia en el efecto anti-inflamatorio del fármaco de referencia comenzó desde los 90 minutos y el extracto a los 150 minutos después de la inyección de carragenina.

En el caso de amarisolida A, la dosis de 0.1 mg/kg no produjo efecto significativo como se observa en todo el periodo de evaluación (Fig. 8). Sin embargo, el aumento de la dosis a 1 mg/kg generó respuesta significativa desde los 120 minutos y hasta las 24 h de tratamiento y administración de la carragenina (Fig. 6, Tratamiento $F_{5,30} = 11.21$, $p < 0.0001$; Tiempo $F_{3,30,99,05} = 77.13$, $p < 0.0001$; Interacción $F_{40,240} = 3.85$, $p < 0.0001$).

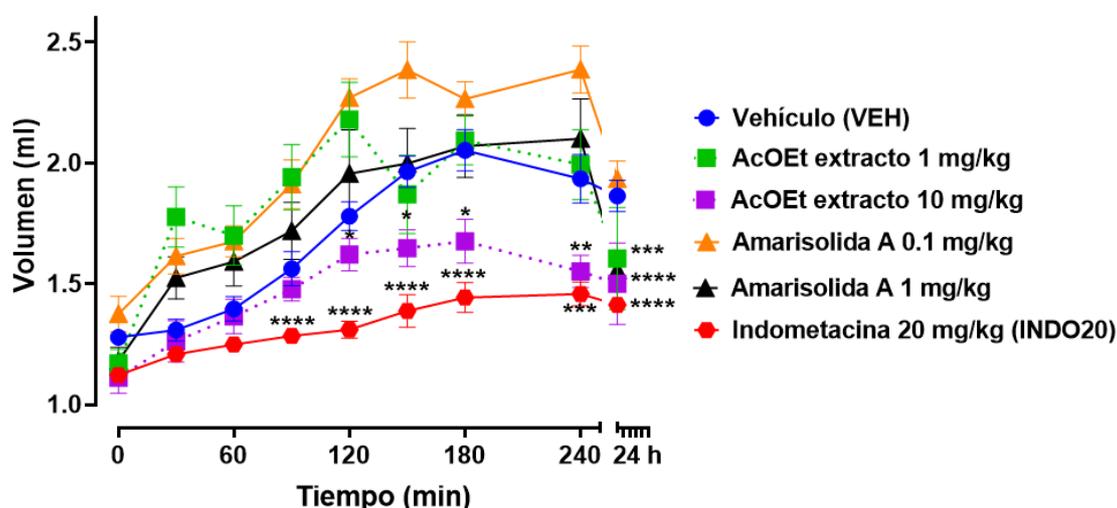


Figura 8. Cursos temporales de la respuesta inflamatoria inducida en presencia de carragenina del extracto de acetato de etilo (AcOEt, 1 y 10 mg/kg, i.p.), amarisolida A (0.1 y 1 mg/kg, i.p.) de *S. amarissima* e indometacina (INDO, 20 mg/kg, i.p.) en comparación con el grupo vehículo (VEH). Los datos muestran el volumen en mL, de la pata inflamada evaluado cada 30 min en un período de 4 h, con un registro final a las 24 h después de la administración de carragenina. Los datos se analizaron mediante ANADEVa de medidas repetidas de dos factores seguido de comparaciones múltiples post-hoc de Tukey. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ para seis repeticiones.

6.3.4.1 Efecto sobre el daño tisular producido por la inflamación

Las fotomicrografías mostradas en la figura 8 describen las fibras musculares de las extremidades traseras izquierda y derecha de ratas que recibieron una inyección intraplantar de carragenina. Las extremidades traseras izquierdas se utilizaron como control sin inflamación (Fig. 9G), en las que es posible notar las fibras musculares intactas. En contraste, en las extremidades traseras derechas obtenidas de ratas inyectadas con el agente alérgeno para producir edema, se observan fibras musculares atroficas en

diferentes extensiones debido a la proliferación de colágeno y edema identificado como retención de líquido entre las fibras (Fig. 9C). La atrofia evidente de las fibras musculares en ratas que recibieron vehículo y carragenina es observada en la figura 9C. El daño tisular por la inflamación se redujo en presencia del fármaco de referencia indometacina (20 mg/kg, i.p.) indicando la preservación de las fibras musculares, edema reducido y sin infiltración celular (Fig. 9F). El extracto de AcOEt (1 y 10 mg/kg, i.p) de una manera dependiente de la dosis inhibió el daño tisular reduciendo el edema y la infiltración celular inducida por la inyección de carragenina. Similar efecto se observó en el caso de amarisolida A (1 mg/kg, i.p.), donde se observaron fibras musculares más conservadas con edema reducido, pero la infiltración celular se mantuvo a las 24 h de la evaluación. No se obtuvieron cambios con la dosis de dosis de 0.1 mg/kg del compuesto solo.

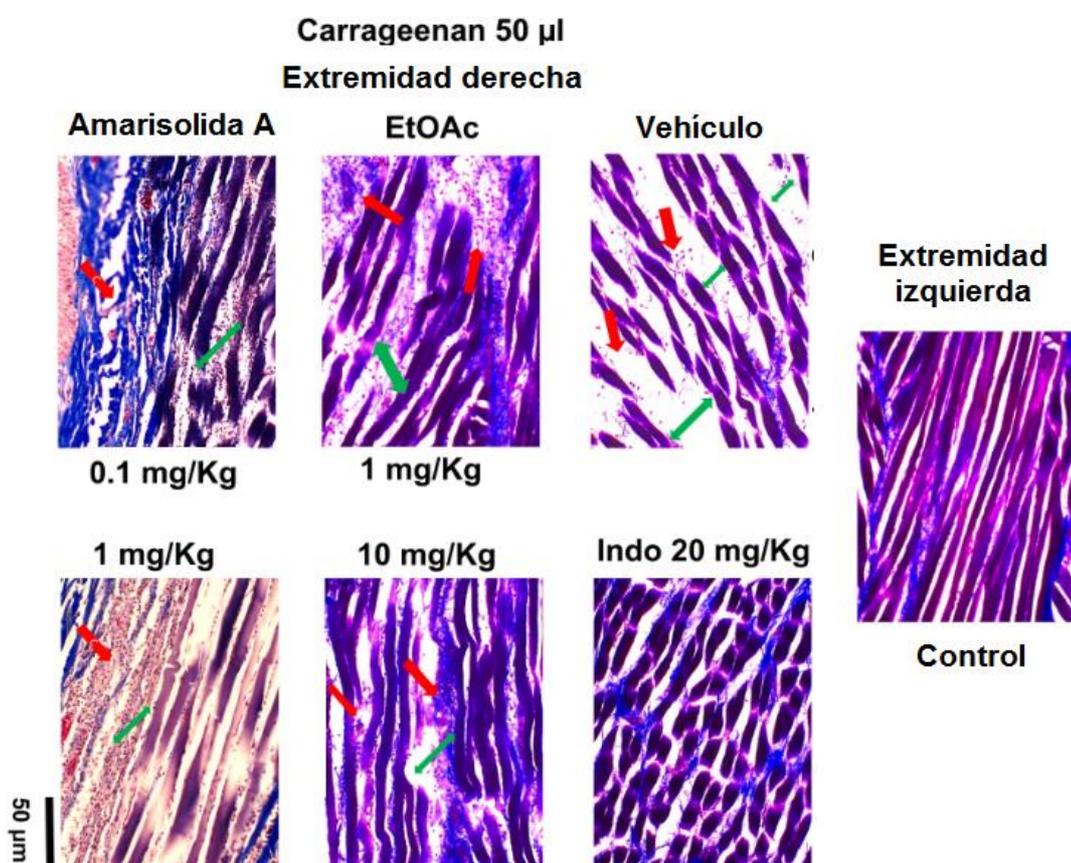


Figura 9. Microfotografías del daño tisular en presencia del extracto de acetato de etilo (1 y 10 mg/kg, i.p.), amarisolida A (0.1 y 1 mg/kg, i.p.) de *S. amarissima* y el fármaco de referencia indometacina (INDO, 20 mg/kg, i.p.) frente al vehículo en el análisis histológico tras edema inducido por carragenina en el miembro posterior derecho de rata. Las flechas rojas indican el infiltrado celular y las flechas verdes muestran las fibras musculares atróficas. Una microfotografía representativa de una pata trasera izquierda intacta, muestra el tejido no inflamado tomado como control, tinción tricrómica de Masson.

6.4 Evaluación del efecto antihiperálgico y/o antialodínico del extracto en el modelo de FM

La curva de curso temporal de ratas sanas que recibieron el vehículo muestra un umbral de presión muscular de 250 g como la respuesta máxima soportada, la cual fue mantenida a lo largo del registro de 4 h (Fig. 10A). En contraste, las ratas con sensibilidad generada por la reserpina, la cual fue registrada como conducta de hiperálgia, soportaron 100 g como máximo umbral de presión muscular en el séptimo día después de administrar la reserpina debido al desarrollo de dolor tipo FM (Fig. 10B). La administración del extracto de AcOEt (3-300 mg/kg, i.p.) produjo aumento significativo en el umbral soportado desde los primeros 30 ó 60 minutos del registro. Respuesta que fue dependiente de la dosis y que se mantuvo a lo largo del registro de 4 h. Mientras que el tramadol presentó un máximo efecto en los primeros 30 min que alcanzó el alivio total de la conducta hiperálgica. No obstante, este efecto fue de corta duración al decaer hasta dejar de generar alivio al término del registro (Fig. 10A).

El cálculo del área bajo la curva a partir de las curvas de curso temporal se realizó con la finalidad de identificar la significancia estadística entre los efectos de los diferentes tratamientos, lo cual permitió observar que el extracto produjo desde un 35% hasta un 52% de reducción de la conducta nociceptiva alcanzando una meseta en 300 mg/kg, i.p. con una DE_{50} de 91.04 mg/kg (Fig. 10B). El máximo efecto alcanzado fue similar al producido por el tramadol (10 mg/kg, i.p.) (Fig. 10B).

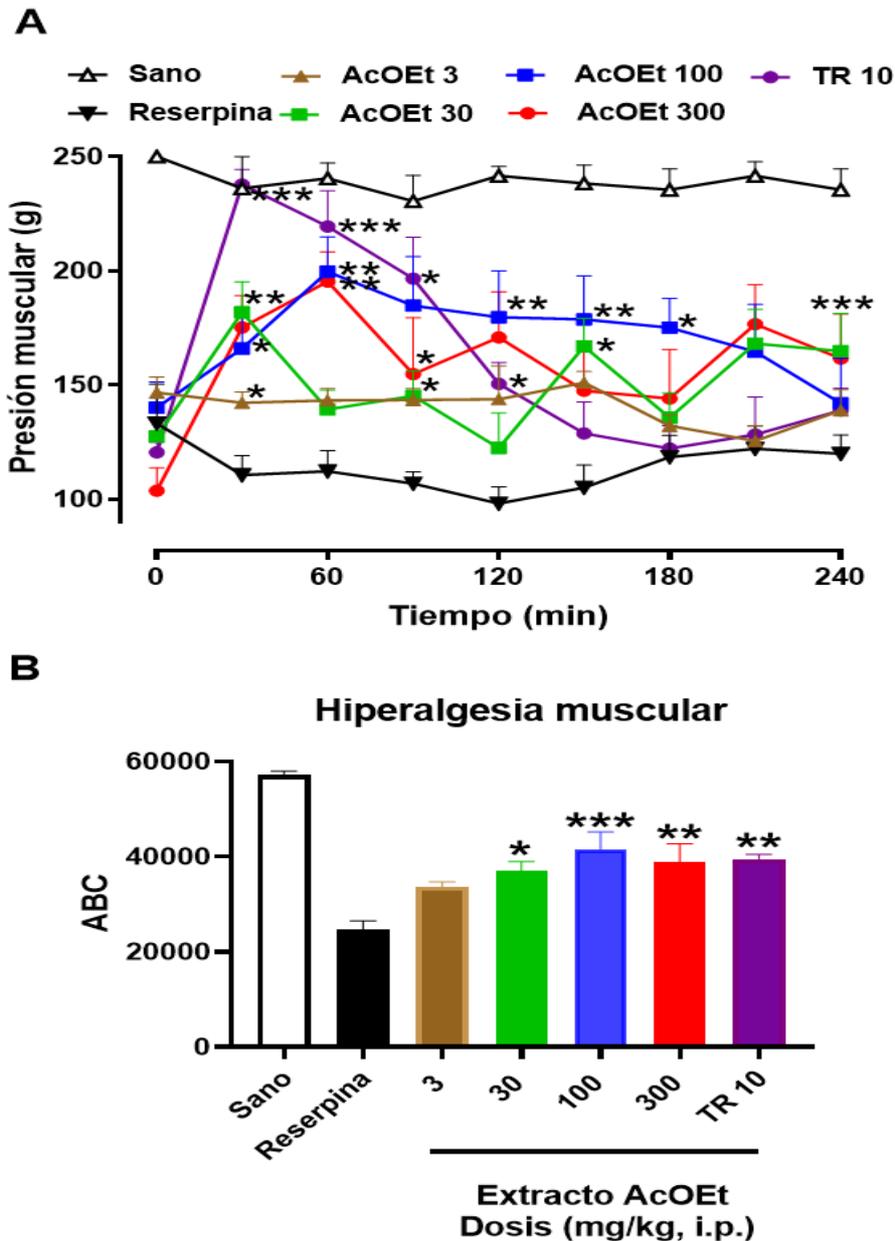


Figura 10. Curso temporal del efecto antihiperalgésico del extracto de acetato de etilo en el modelo de FM inducido por reserpina, (A) presión muscular en el séptimo día después de la inducción. Cada punto representa la media \pm E.E.M de la fuerza en gramos soportada en el músculo gastrocnemio medio (presión muscular) del miembro posterior derecho en comparación con RES (reserpina 1 mg/kg, s.c.), Veh (grupo de vehículo) y TR10 (tramadol 10 mg/kg, i.p.). ANADEVA de dos factores seguido de la prueba post-hoc de Tukey. * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$, *** $p < 0.0001$. (B) Representación del ABC del curso temporal. ANADEVA de un factor seguido de la prueba post-hoc de Dunnett. ** $p < 0.05$, *** $p < 0.01$, **** $p < 0.001$.

De manera similar, las curvas de curso temporal de la respuesta al estímulo de frío permiten observar que la reserpina generó un aumento en el tiempo que el animal invierte en sacudir/lamer la extremidad posterior derecha aproximadamente 7 veces más que la respuesta obtenida en el grupo vehículo (Fig. 11A). Este incremento en el tiempo de respuesta fue parcialmente revertido por todas las dosis probadas de extracto AcOEt y

fue constante a lo largo de las 4 h de evaluación. El efecto antialodínico fue calculado como un 69% a 88% con una DE_{50} de 18.12 mg/kg, mientras que para tramadol (10 mg/kg) fue de 57% de alivio (Fig. 11B).

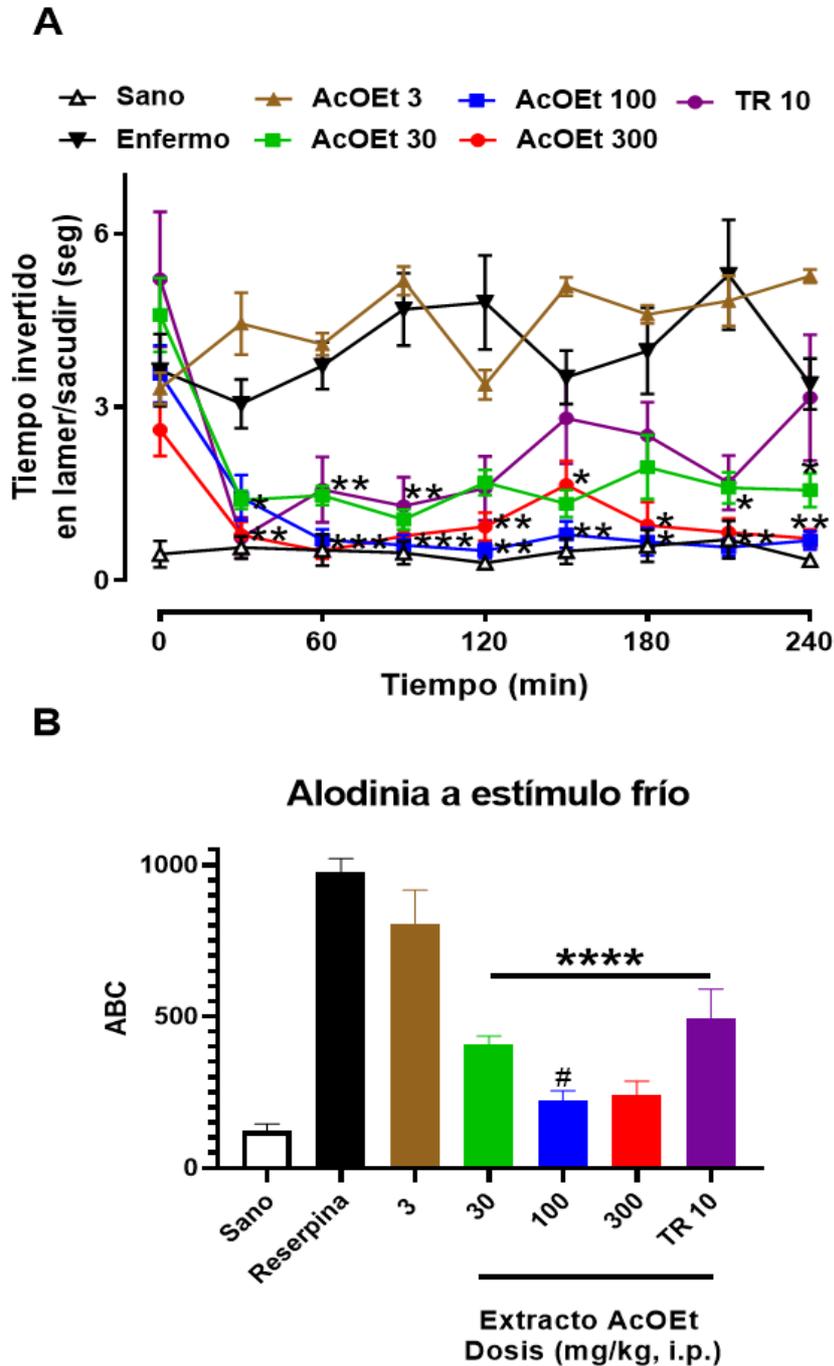


Figura 11. (A) Curso temporal del efecto antialodínico del extracto de acetato de etilo en el modelo de FM inducido por reserpina en el séptimo día después de la inducción. Cada punto representa la media \pm E.E.M del tiempo acumulado de respuesta al estímulo frío (acetona) en la superficie dorsal de la extremidad posterior derecha durante 1 min en comparación con RES (reserpina 1 mg/kg, s.c.), Veh (grupo de vehículo) y TR10 (tramadol 10 mg/kg, i.p.). ANADEV de dos factores seguido de la prueba post-hoc de

Tukey. * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$. (B) Representación del ABC del curso temporal obtenido para alodinia a estímulo frío. ANADEVa de un factor seguido de la prueba post-hoc de Dunnett. **** $p < 0.001$.

En el caso de la alodinia al estímulo táctil, la RES disminuyó el umbral en un 60% respecto al grupo Veh (Fig. 12A). La administración de las diferentes dosis produjo un efecto antialodínico entre el 34% y el 78% y en este umbral el efecto fue más constante a lo largo de las 4 h de evaluación con una DE_{50} de 58.56 mg/kg. En el caso del tramadol el alivio fue del 58% (Fig. 12A y B).

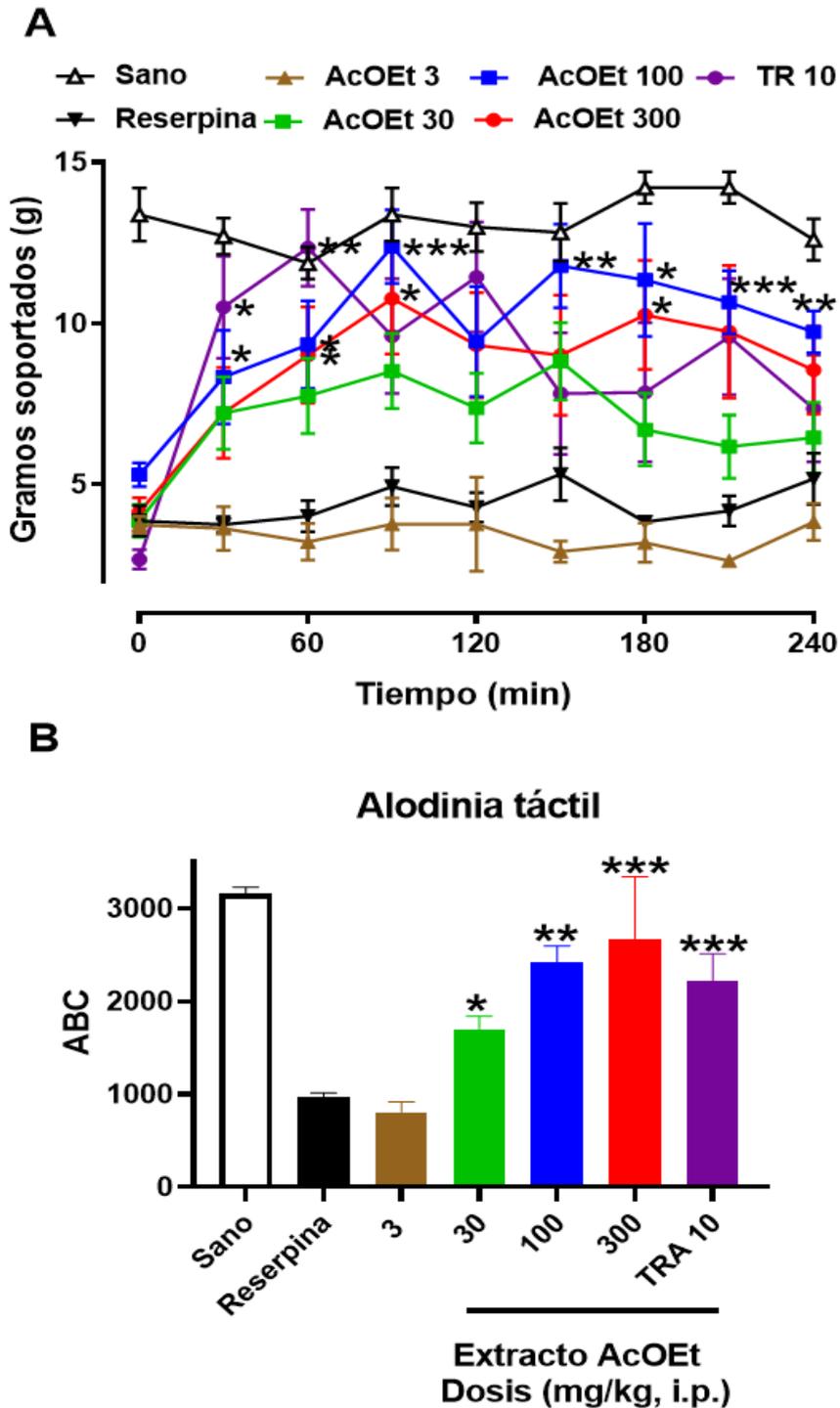


Figura 12. (A) Curso temporal del efecto antihiperalgésico del extracto de acetato de etilo en el modelo de FM inducido por reserpina en el séptimo día después de la inducción. Cada punto representa la media \pm E.E.M de la fuerza en gramos soportada en la superficie plantar (umbral de retirada) del miembro posterior derecho de la extremidad en comparación con RES (reserpina 1 mg/kg, s.c.), Veh (grupo de vehículo) y TR10 (tramadol 10 mg/kg, i.p.). ANADEVa de dos factores seguido de la prueba post-hoc de Tukey. * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$. (B) Representación del ABC del curso temporal obtenido para alodinia táctil. ANADEVa de un factor seguido de la prueba post-hoc de Dunnett. ** $p < 0.05$, *** $p < 0.01$, **** $p < 0.001$.

6.5 Evaluación del efecto antihiperalgésico y/o antialodínico de amarisolida A en el modelo de dolor de tipo FM

Dado que el análisis cromatográfico del extracto de AcOEt de *S. amarissima* reveló la presencia abundante de la amarisolida A, este compuesto fue evaluado en las dosis de 3, 10, 100 y 300 mg/kg produciendo recuperación significativa en la hiperalgnesia muscular inducida por la reserpina, la que fue acentuada con la dosis de 300 mg/kg (Fig. 13B). El cálculo del ABC determinó un efecto antihiperalgésico del 19% para la dosis de 10 mg/kg y del 40% para la dosis de 100 mg/kg, alcanzando 54.77% en la dosis de 300 mg/kg. Lo anterior permitió calcular una DE_{50} de 201.84 mg/kg (Fig. 13B).

En el caso de la alodinia por estimulación táctil, las dosis de 100 y 300 mg/kg de amarisolida A produjeron efectos significativos en el curso temporal donde llegó a generar la recuperación del umbral a nivel del grupo sano (Fig. 14A). El ABC obtenida con amarisolida A en la dosis de 100 mg/kg produjo un efecto antialodínico del 76% para una DE_{50} de 63.46 mg/kg. La dosis de 300 mg/kg produjo una inhibición del 45.91% semejante a la del tramadol del 57% (Fig. 14B).

Amarisolida A produjo efecto antialodínico al estímulo del frío con las dosis de 10, 100 y 300 mg/kg. El nivel de alivio producido fue del 42, 83.2 y 86.45%, respectivamente, con una DE_{50} de 12.29 mg/kg. El tramadol produjo alivio del 57%. (Fig. 15B). Las dosis de 100 y 300 mg/kg alcanzaron el umbral del grupo Veh a lo largo del tiempo de evaluación (Fig. 15A).

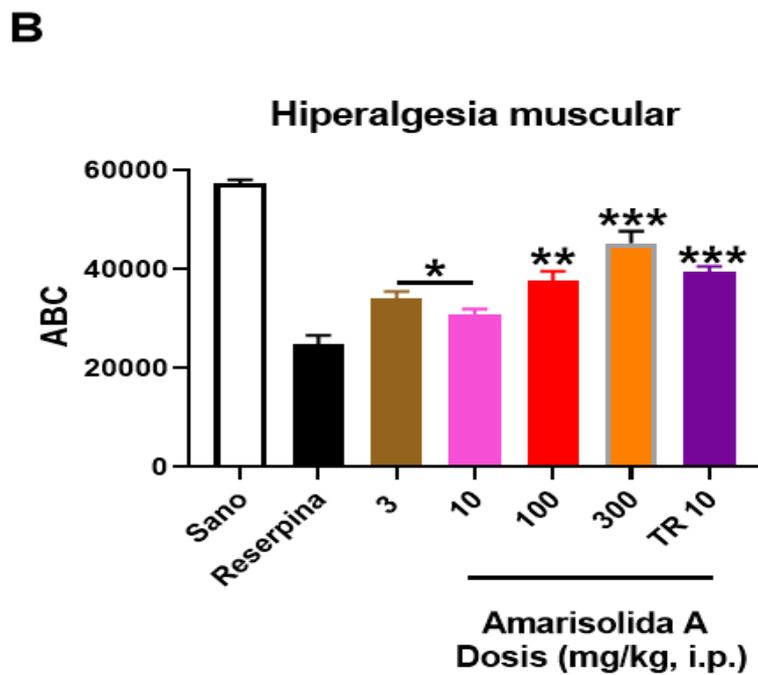
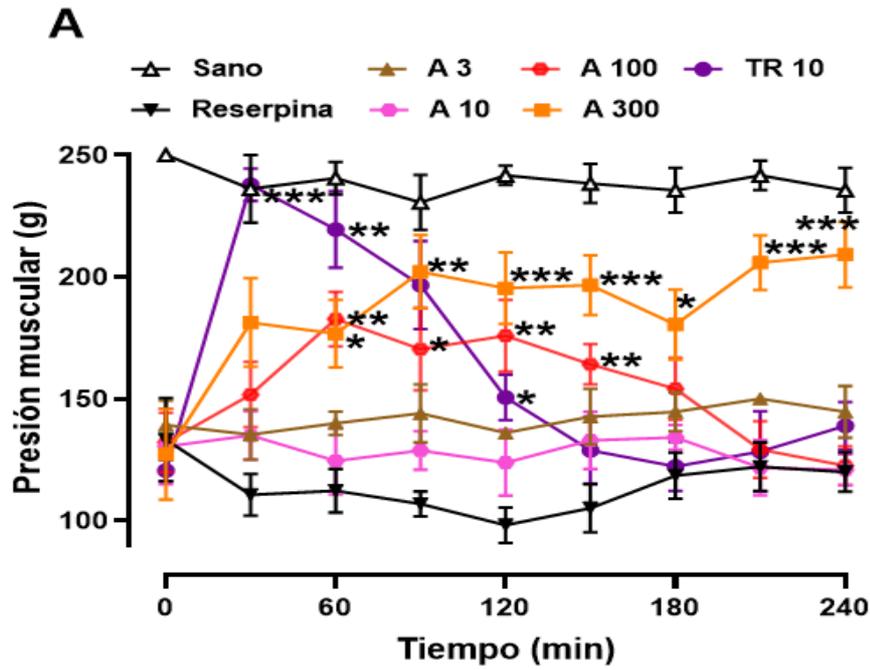


Figura 13. Efecto antihiperalgésico de amarisolidida A en el modelo de fibromialgia (FM) inducido por Reserpina (Res). (A) Evolución temporal del umbral de presión muscular. Cada punto representa la media \pm SEM promedio de la fuerza soportada en el músculo gastrocnemio. ANADEVAs de 2 factores seguido de la prueba post-hoc de Tukey. (B) Área bajo la curva (ABC) de la evolución temporal obtenida con cada uno de los tratamientos. ANADEVAs de 1 vía seguido de prueba post-hoc de Dunnett en comparación con el grupo tratado con Res. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

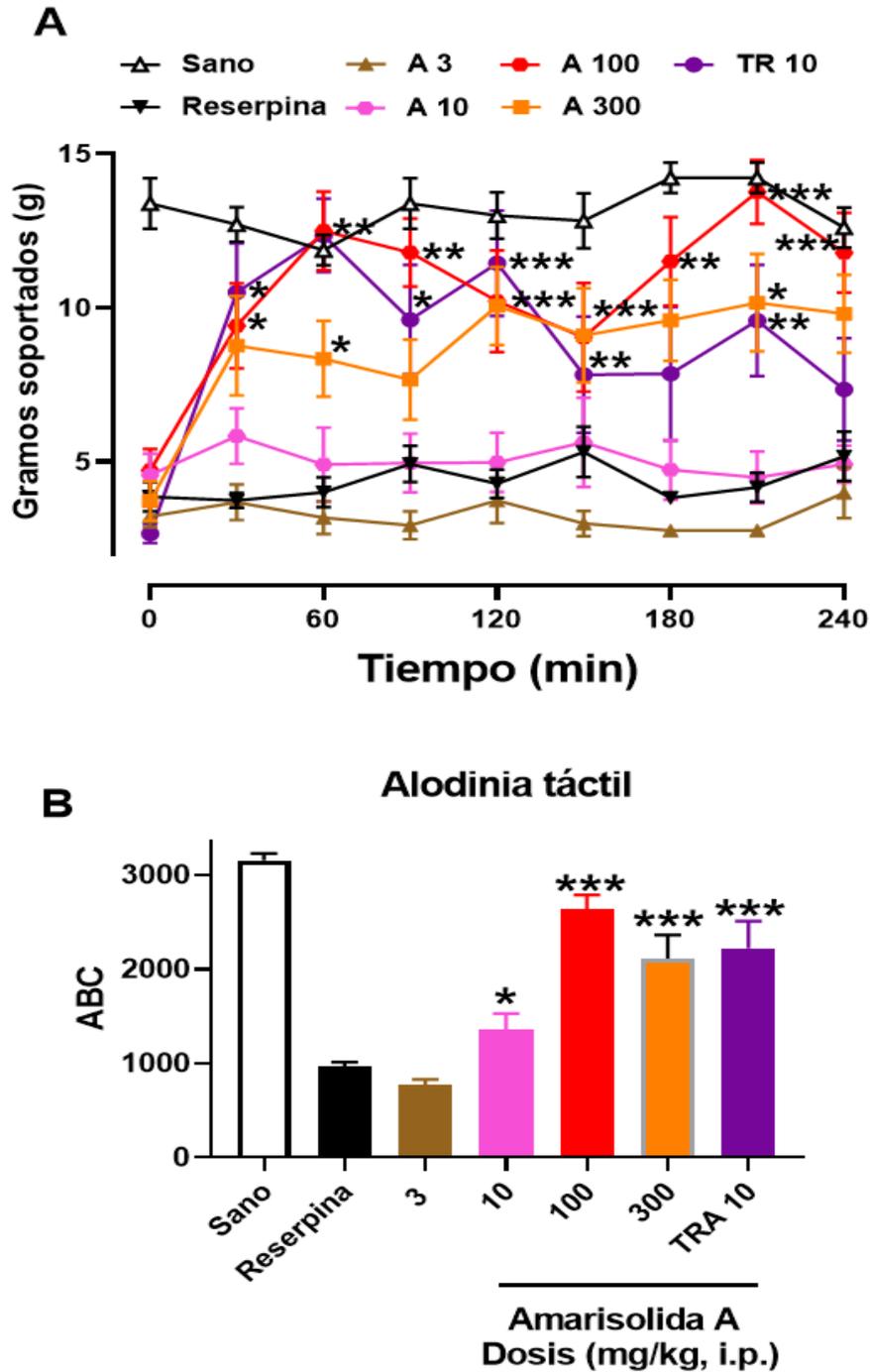


Figura 14. Efecto antialodínico de amarisolidida A en el modelo de fibromialgia (FM) inducido por Reserpina (Res). (A) Evolución temporal del umbral de gramos soportados. Cada punto representa la media \pm SEM promedio de la fuerza soportada en la superficie plantar del miembro posterior derecho. ANADEVAs de 2 factores seguido de la prueba post-hoc de Tukey. (B) ABC de alodinia táctil. ANADEVAs de 1 vía seguido de prueba post-hoc de Dunnett en comparación con el grupo tratado con Res. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

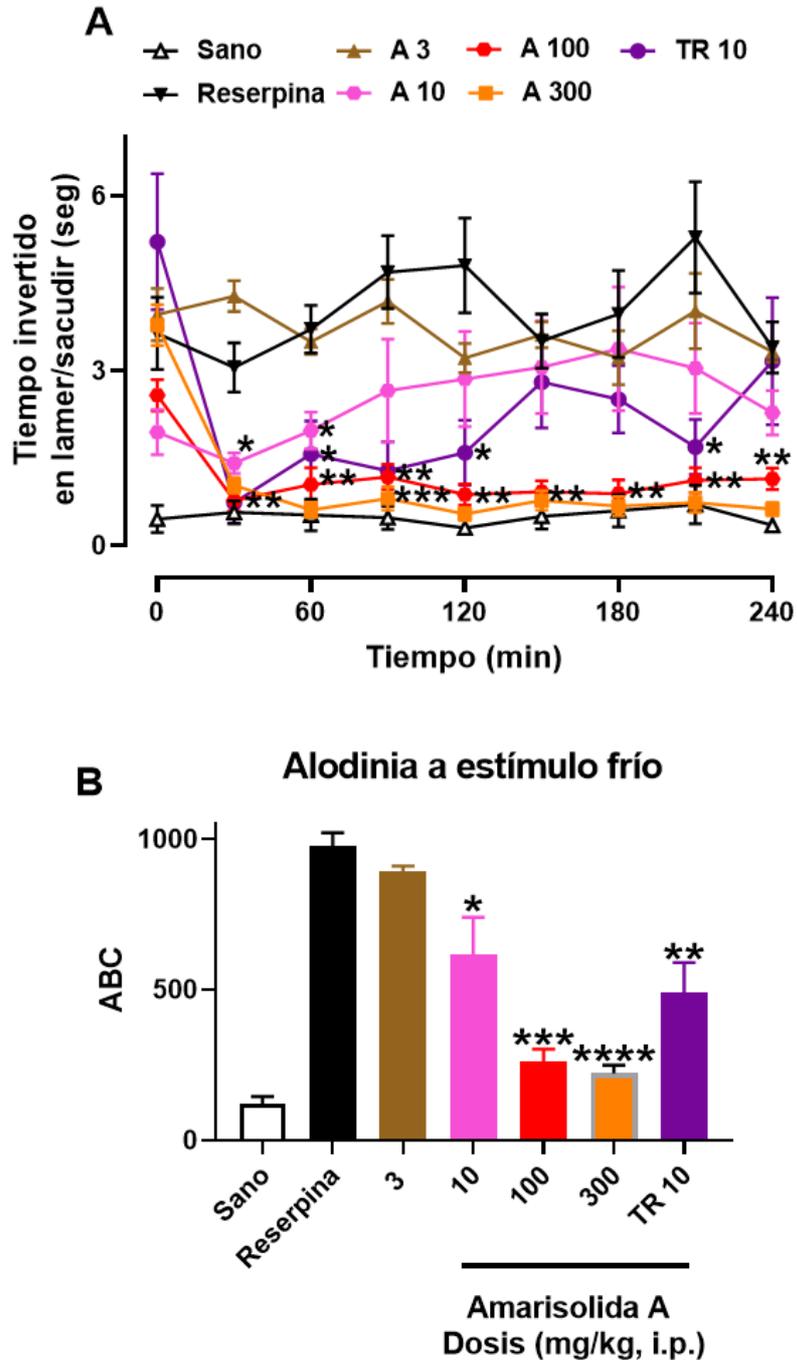


Figura 15 . Efecto antialodínico sobre la estimulación por frío de amarisolida A. (A) curso temporal del umbral de respuesta al estímulo táctil. Cada punto representa la media \pm E.E.M. del tiempo de respuesta acumulado al sacudir o lamer el miembro posterior derecho. (B) ABC, efecto antialodínico sobre la estimulación con frío de amarisolida A en el modelo experimental de FM inducida por reserpina. ANADEVIA de 1 vía seguido de la prueba post-hoc de Dunnett. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

6.6 Determinación de la concentración de citocinas inflamatorias en el tejido nervioso de ratas en el modelo de FM inducido por reserpina

En el tejido nervioso de las ratas se realizó la cuantificación de los niveles tisulares de citocinas inflamatorias en los grupos FM, amarisolidina A y vehículo mediante la técnica de ELISA. En las Tablas 1-3 se muestran los niveles de IL-1 β en animales inducidos con FM, los cuales presentaron cambios en las concentraciones de esta citocina variando entre tejidos y secciones evaluadas. Los animales inducidos con FM mostraron disminución significativa de esta citocina en CX ($F_{2,6} = 3,511$ $p < 0.05$), en tanto que hubo un aumento significativo en HIP ($F_{2,6} = 3,640$ $p < 0.01$) y TD ($F_{5,8} = 2.56$ $p < 0.04$) y LD $F_{2,14} = 11.90$ $p < 0.05$ en comparación con el grupo sano. Las secciones TV y LV no mostraron cambios. El tratamiento con amarisolidina A en ratas con FM redujo la expresión de la citocina inflamatoria en todos los tejidos y secciones evaluadas en comparación con el grupo con FM que sólo recibió el vehículo (Tabla 1).

Tabla 1. Niveles de IL-1 β expresados en pg/mg de tejido nervioso de ratas con y sin fibromialgia (FM) y en presencia de amarisolidina A o vehículo.

Tejido	Sanos	Res	Res+amarisolida A (100 mg/kg)
CX	0.0917 \pm 0.1741	0.3820 \pm 0.0153 ^{&}	0.3251 \pm 0.005
HIP	0.2507 \pm 0.0758	0.4852 \pm 0.005 ^{&}	0.043 \pm 0.002 ^{***}
TD	0.2806 \pm 0.0739	0.5527 \pm 0.2550 ^{&}	0.4322 \pm 0.1528
LD	0.4293 \pm 0.1500	1.255 \pm 0.1931 ^{&}	0.4795 \pm 0.1055 [*]
TV	0.7343 \pm 0.2312	0.9130 \pm 0.1841	0.1895 \pm 0.0745 [*]
LV	0.1841 \pm 0.1063	0.3110 \pm 0.0929	0.0868 \pm 0.0100 [*]

CX: Corteza prefrontal, HIP: Hipocampo, TD: Torácico dorsal, LD: Lumbar dorsal, TV: Torácico ventral, LV: Lumbar ventral. RES: reserpina. Sanos vs Res & $p > 0.05$; Res + amarisolidina 100 mg/kg, * $p > 0.05$, *** $p > 0.001$.

Los niveles de IL-6 en animales inducidos con FM presentaron disminución significativa de esta citocina en todas las secciones de la médula espinal evaluadas, aunque sólo en las secciones TD y LV se obtuvo significancia estadística ($F_{2,6} = 123.2$ $p < 0.001$). Las ratas con FM que recibieron tratamiento con amarisolidina A presentaron un aumento importante

de esta citocina en CX y en la sección LV de la médula ($F_{2,6} = 10.47$ $p < 0.01$) en comparación con el grupo con FM que sólo recibió el vehículo (Tabla 2).

Tabla 2. Niveles de IL-6 expresados en pg/mg de tejido nervioso de ratas con o sin FM y en presencia de amarisolidida A o vehículo.

Tejido	Sanos	Res	Res+amarisolidida A (100 mg/kg)
CX	0.0139±0.0010	0.01945±0.0004	0.3688±0.0132**
HIP	0.0533±0.0094	0.0560±0.0107	0.0409±0.0031
TD	0.0818±0.0107	0.0345±0.0107 ^{&}	0.0465±0.0298
LD	0.3203±0.0502	0.2178±0.1128	0.0764
TV	0.3926±0.0976	0.1878±0.0783	4.60±1.325**
LV	0.3344±0.0771	0.0543±0.0129 ^{&}	0.0286±0.0153

CX: Corteza prefrontal, HIP: Hipocampo, TD: Torácico dorsal, LD: Lumbar dorsal, TV: Torácico ventral, LV: Lumbar ventral. RES: reserpina. Sanos vs Reserpina & $p > 0.05$; Res + amarisolidida A 100 mg/kg vs Reserpina + Veh, ** $p > 0.01$

Finalmente, los niveles de TNF- α en animales inducidos con FM no fueron diferentes de los obtenidos con el grupo sano o con el tratamiento con amarisolidida, a excepción de la sección LV que presentó una disminución significativa en las ratas con FM ($F_{2,14} = 11,90$ $p < 0.001$), la cual fue recuperada con un aumento significativo en presencia de amarisolidida A ($F_{2,4} = 9,96$ $p < 0.028$) (Tabla 3).

Tabla 3. Niveles de TNF- α expresados en pg/mg de tejido nervioso de ratas con o sin FM y en presencia de amarisolidida A o vehículo.

Tejido	Sanos	Res	Res+amarisolidida A (100 mg/kg)
CX	1.3518	1.4504±0.1004	1.3518±0.3528
HIP	1.8707	1.056±0.3476	1.8655±0.8429
TD	0.7914	0.6928±0.0332	0.9366±0.0726
LD	0.6253	0.09179±0.2099	1.2905±0.084

TV	1.2584	1.0753±0.4015	1.2947±0.2007
LV	0.9055	0.5267±0.0571 ^{&}	1.6839±0.2396*

CX: Corteza prefrontal, HIP: Hipocampo, TD: Torácico dorsal, LD: Lumbar dorsal, TV: Torácico ventral, LV: Lumbar ventral. RES: reserpina. Sanos vs Reserpina, & p > 0.05; Res + amarisolidida 100 mg/kg vs Reserpina + Veh, * p > 0.05.

6.7 Evaluación del efecto adverso de sedación

En la conducta de actividad ambulatoria o levantamientos evaluados para corroborar el posible efecto sedante en los ratones a los que se les administró el extracto AcOEt y amarisolidida A no hubo diferencias significativas en comparación con los animales que recibieron el vehículo, ni en la exploración de campo abierto ni en el cilindro, respectivamente (Fig. 16A y 16B).

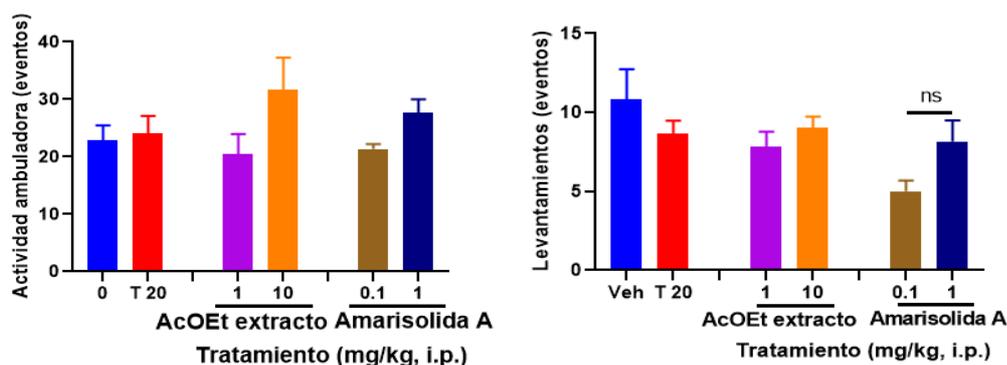


Figura 16. (A) Evaluación de la actividad ambulatoria del extracto de acetato de etilo (AcOEt, 1 y 10 mg/kg, i.p.), amarisolidida A (0,1 y 1 mg/kg, i.p.) en comparación con tramadol (T 20 mg/kg, i.p.) y el grupo vehículo (VEH) en la prueba de campo abierto. (B) evaluación del efecto de sedación expresado como levantamientos en un cilindro acrílico del extracto de acetato de etilo (AcOEt, 1 y 10 mg/kg, i.p.), amarisolidida A (0,1 y 1 mg/kg, i.p.) en comparación con tramadol (T 20 mg/kg, i.p.) y el grupo vehículo (VEH)

6.8 Evaluación del daño gástrico

Después de la evaluación macroscópica de los estómagos de los animales que recibieron el fármaco de referencia (indometacina, 20 mg/kg, i.p.) se corroboró la presencia de úlceras hemorrágicas típicas (Fig. 17A). En tanto que el tejido gástrico obtenido de ratones que recibieron el extracto de AcOEt (1 y 10 mg/kg, Fig. 17C y 17D) o amarisolidida A (0,1 y 1 mg/kg, Fig. 17E y 17F) no mostró presencia de daño gástrico, siendo semejante al tejido obtenido del grupo de vehículo (Fig. 16B).

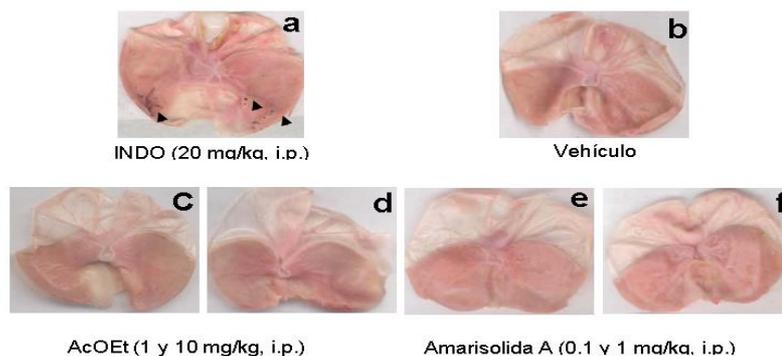


Figura 17. Microfotografías que muestran la presencia de úlceras hemorrágicas inducidas por indometacina (20 mg/kg, i.p.). En contraste con la ausencia de daño gástrico en estómagos disecados de ratones que recibieron vehículo (b), extracto de acetato de etilo de *S. amarissima* (1 y 10 mg/kg, i.p., c y d) o amarisolida A (0,1 y 1 mg/kg, e y f).

7. DISCUSIÓN

En el presente proyecto se realizó el estudio de extractos acuoso y orgánicos de *S. amarissima* y su metabolito bioactivo identificado como el diterpeno neoclerodano amarsolida A mediante el uso de diferentes modelos experimentales de dolor que incluyeron el tipo nociceptivo, inflamatorio y disfuncional. Lo anterior con el fin de conocer el espectro de actividad antinociceptiva de esta especie y corroborar sus efectos a nivel central y periférico. Dado que el mecanismo de acción de la actividad antinociceptiva de *S. amarissima* no se conoce, en este proyecto se investigó la participación de los receptores a opioides, de serotonina 5HT_{1A} y la vía de señalización de AC-AMPC a la cual se sabe están acoplados dichos receptores (Lee et al., 2019), así como también se confirmó la participación de citocinas inflamatorias. Todos los extractos preparados con diferente polaridad, incluyendo el extracto acuoso, presentaron actividad antinociceptiva. Sin embargo, el extracto de AcOEt fue el que mostró mayor significancia, en parte debido a la mayor presencia del metabolito amarsolida A caracterizado en la comparación de los perfiles cromatográficos de los extractos.

7.1 Evaluación fitoquímica de *S. amarissima*

Una vez realizado el cernimiento farmacológico de los extractos, éstos fueron evaluados mediante técnicas cromatográficas tanto cualitativas como cuantitativas, estas evaluaciones mostraron la presencia de metabolitos de naturaleza terpenoide, los cuales son ubicuos y característicos del género *Salvia* (Jenks y Kim, 2013). La evaluación del efecto antinociceptivo de los diferentes extractos de *S. amarissima* mediante la prueba de

formalina mostro que el extracto de AcOEt inhibió las conductas dolorosas con mayor significancia. El análisis de los perfiles cromatográficos de los extractos confirmó la presencia de amarisolida A en todos ellos con una abundancia mayor en el extracto de AcOEt.

Amarisolida A fue purificada mediante columna cromatográfica con un rendimiento de 5.03%, este fue superior al reportado por Flores-Bocanegra y colaboradores (2017) quienes reportaron un rendimiento de 2.58% a partir de un extracto de diclorometano:metanol 1:1. El grupo de Salinas-Arellano (2020) obtuvo un rendimiento de 11.6% con la fracción de AcOEt del extracto acuoso. La diferencia en los rendimientos puede explicarse al tomar en cuenta que los métodos de extracción y purificación fueron diferentes y que las colectas del material vegetal fueron realizadas en tiempos y lugares distintos, si bien los rendimientos son distintos los resultados de la presente investigación concuerdan con los de los grupos de investigación anteriormente mencionados en donde Amarisolida A fue el diterpeno mayoritario en los extractos evaluados.

Existen reportes sobre constituyentes de naturaleza terpenoide implicados en los efectos antinociceptivos de las especies de *Salvia* y de géneros de otras familias botánicas (Quiñonez-Bastidas y Navarrete, 2021; Hernandez-Leon et al., 2021) como la β -amirina, el carnosol, el ácido oleanólico y el ácido ursólico evaluados en diferentes modelos de dolor (McCurdy et al., 2006; Rodrigues et al., 2012; Park et al., 2013; Arranz et al., 2015; Nile et al., 2016; Thirupathi et al., 2017).

Es importante señalar que los diterpenos de esqueleto clerodano son abundantes en las *Salvias* de México (Rodríguez-Hahn et al., 1995; Ortiz-Mendoza et al., 2022) y son metabolitos que han mostrado eficacia antinociceptiva en modelos de dolor nociceptivo, inflamatorio y neuropático: por ejemplo, las salvinorinas A y B redujeron los estiramientos abdominales y el tiempo invertido en lamer en la prueba de formalina (Tlacomulco-Flores et al., 2020). En tanto que el 7-ceto-neoclerodan-3,13-dien-18,19:15,16-diolido presente en *Salvia semiartrata* inhibió de manera dependiente de la dosis ($DE_{50} = 4.15$ mg/kg) los estiramientos abdominales inducidos con ácido acético al 1% (Ortiz-Mendoza et al., 2020).

Estos datos ofrecen evidencias de la influencia de constituyentes de naturaleza terpénica en los efectos antinociceptivos de especies de *Salvia* para afecciones dolorosas, así como la oportunidad que ofrece el estudio farmacológico y la exploración de los mecanismos

de acción de los metabolitos presentes en ellas en busca de moléculas para la terapéutica del dolor.

7.2 Evaluación farmacológica

7.2.1 Efecto antinociceptivo del extracto crudo y amarisolida A

La evaluación del efecto antinociceptivo de los diferentes extractos de *S. amarissima* mediante la prueba de formalina mostró que el extracto de AcOEt inhibió las conductas dolorosas de forma significativa. Si bien, el análisis de los perfiles cromatográficos de los extractos reveló la presencia de amarisolida A en todos ellos, la mayor abundancia se observó en el extracto de AcOEt.

La administración del extracto de AcOEt de *S. amarissima* fue capaz de inhibir significativamente las conductas nociceptivas en la prueba de formalina tanto en la fase neurogénica como en la inflamatoria. El efecto fue significativo y dependiente de la dosis 0.1, 1 y 10 mg/kg. Estos resultados concuerdan con los reportados para extractos obtenidos de *S. purpurea*, donde Cuevas-Morales y colaboradores (2022) evaluaron el efecto antinociceptivo del extracto de acetona, metanol y acuoso y todos produjeron efecto antinociceptivo significativo en ambas fases, siendo el extracto de mediana polaridad el más eficaz y en el que terpenos tales como α -amirina y ácido ursólico fueron los componentes mayoritarios del extracto. Estos resultados se refuerzan con lo reportado por Ortiz-Mendoza y colaboradores (2020) quienes encontraron que el extracto de AcOEt de *S. semiartrata* (300 mg/kg) evaluado en esta prueba, disminuyó las conductas nociceptivas tanto en la fase neurogénica como en la inflamatoria considerando la participación de un diterpeno de esqueleto neoclerodano como el metabolito más abundante.

La inhibición de las conductas nociceptivas en ambas fases de la prueba de formalina sugiere que los metabolitos presentes en extractos de mediana polaridad de distintas especies del género *Salvia* tienen acción tanto a nivel central como periférica en parte debido a las propiedades liposolubles que poseen los compuestos de tipo terpeno (Butelman et al., 2009). Tal es el caso del ácido ursólico y oleanólico (2.1 y 1.6 mg/kg), identificados en extractos de mediana polaridad como el AcOEt, los cuales produjeron un efecto antinociceptivo en el modelo de dolor abdominal inducido con ácido acético (Martínez et al., 2012). En tanto que el carnosol produjo un efecto antinociceptivo en dosis de 0.5, 1 y 2 mg/kg en la fase inflamatoria de la prueba de formalina en ratones (Emami et al., 2013). Así, el ácido betulínico, uno de los componentes mayoritarios del

extracto de AcOEt de *S. amarissima*, fue reportado como uno de los constituyentes bioactivos del extracto *Rosa taiwanensis* en dosis de 0.1, 0.5 y 1 mg/kg, en la fase inflamatoria de la prueba de formalina (Tsai et al., 2015).

En nuestro estudio amarisolida A fue evaluada de forma individual inhibiendo las conductas nociceptivas en ambas fases de la prueba de la formalina. Datos similares fueron observados con la salvinatorina A (0.5, 1 y 2 mg/kg) y el 7-ceto-neoclerodan-3,13-dien-18,19:15,16-diolido (0.1, 1 y 10 mg/kg) presentes en *S. divinorum* (Aviello et al., 2011) y *S. semiartrata* (Ortiz-Mendoza et al., 2020), respectivamente, los cuales inhibieron ambas conductas en ambas fases de la prueba de formalina.

La inhibición de las conductas nociceptivas en la fase neurogénica e inflamatoria del extracto de *S. amarissima* podría no sólo depender de la presencia de amarisolida A, ya que se sabe que existe contenido de otros metabolitos de naturaleza terpénica presentes en el extracto de mediana polaridad que también se han reportado como responsables de la actividad antinociceptiva de otras especies de plantas medicinales, tal es el caso del ácido ursólico con una DE₅₀ antinociceptiva de 44 mg/kg obtenido de *Agastache mexicana* (Verano et al., 2013), así como el ácido oleanólico que en menor dosis (0.1, 0.3 y 1 mg/kg) redujo de manera significativa los comportamientos nociceptivos en ambas fases de la prueba de formalina (Soares et al., 2019). Mientras que la α y β -amirina (30 y 100 mg/kg) produjeron antinocicepción evaluadas en un modelo de nocicepción orofacial (Holanda Pinto et al., 2008), donde el β -sitosterol (500 mg/kg) como componente mayoritario en el extracto de AcOEt de *Philodendron bipinnatifidum* (500 mg/kg) inhibió significativamente las conductas nociceptivas inducidas con la formalina en ambas fases (Scapinello et al., 2019). Estos datos en conjunto permiten considerar que las propiedades medicinales para el alivio del dolor de *S. amarissima* son el resultado de la interacción sinérgica de diferentes constituyentes bioactivos, donde metabolitos de naturaleza terpénica juega un papel importante en la terapéutica del dolor.

7.2.2 Evaluación del posible mecanismo de acción antinociceptivo del extracto de AcOEt y amarisolida A

En este estudio se realizó la evaluación de algún posible mecanismo de acción involucrado en el efecto antinociceptivo tanto del extracto como del compuesto puro de *S. amarissima*. Para ello se utilizó naltrexona como bloqueador selectivo de los receptores opioides, el cual produjo la inhibición parcial del efecto del extracto de AcOEt y amarisolida A. Se sabe que el circuito neuronal opioide es una de las vías importantes de

la modulación de la nocicepción descendente y un blanco farmacológico de interés para los productos naturales (Corder et al., 2018; Hernandez-Leon et al., 2016). En especies del género *Salvia* se ha explorado la participación del sistema opioide reportando sus efectos antinociceptivos en extractos de mediana polaridad, tales como el de *S. officinalis*, los cuales se inhiben parcialmente al tratar a los ratones con naloxona (5 mg/kg) (Qnais et al., 2010). En forma similar, el efecto antinociceptivo de las salvinorinas A y B (30 mg/kg) aisladas de *S. divinorum* se evitó con naloxona (3 mg/kg) (Tlacomulco-Flores et al., 2020). Estos resultados en conjunto sugieren que el efecto antinociceptivo de diterpenos neoclerodanos de especies de *Salvia* involucra parcialmente la participación del sistema opioide.

En contraste, la administración de un antagonista de receptores TRPV1 (A 784168) produjo respuesta antinociceptiva *per se* en la fase neurogénica de la formalina, reforzando la idea de que posee propiedades para atravesar la barrera hematoencefálica y producir su acción a nivel central (Cui et al., 2006). El ácido ursólico (2 mg/kg) produjo antinocicepción significativa en la administración intracolónica de capsaicina al 0.3 % (un agonista TRPV1) en ratones (Verano et al., 2013). Se ha reportado que el ácido ursólico inhibe el flujo de calcio inducido por la capsaicina en el receptor TRPV1 sugiriendo la actividad antagonista de este receptor (Zhang et al., 2011). Sin embargo, la presencia del antagonista no modificó el efecto antinociceptivo del extracto de AcOEt ni de amarsolida-A manteniéndose la respuesta antinociceptiva en ambas fases de la formalina. Estos resultados sugieren que la participación de este receptor no está involucrada en el mecanismo de acción antinociceptivo a nivel central o periférico del extracto de AcOEt o amarisolida A.

En relación con la exploración de la participación del sistema serotoninérgico, ésta se evaluó por medio de la presencia del WAY100635, antagonista del receptor 5-HT_{1A}, donde se observó que éste redujo el efecto antinociceptivo del extracto tanto a nivel central como periférico al disminuir las conductas nociceptivas de ambas fases. Resultados de esta evaluación son similares con los observados en la evaluación de la mezcla de los diterpenos salvinorina A y B (30 mg/kg) obtenidos del extracto de mediana polaridad de *S. divinorum*, donde los animales administrados previamente con WAY100635 presentaron menos efecto antinociceptivo (Tlacomulco-Flores et al., 2020) sugiriendo la participación del receptor de serotonina 5-HT_{1A} en el efecto antinociceptivo de ambas especies de *Salvia*. Se ha demostrado que el receptor 5-HT_{1A}, pero no así el 5-

HT₂ ni el 5-HT₃, juega un papel importante en la vía descendente de la antinocicepción desde el tronco encefálico hasta la médula espinal en ratas intactas, en ratas con lesión nerviosa y en ratas con inflamación (Liu et al., 2002). El estudio de la interacción del receptor de serotonina 5-HT_{1A} y compuestos de tipo neoclerodano son escasos en la literatura. No obstante, el efecto antinociceptivo de diversos productos naturales de tipo flavonoide (Wu et al., 2021) y terpeno (Verano et al., 2013) con actividad antinociceptiva se han asociado con la participación de este receptor en la inhibición del dolor.

Tomando en cuenta la participación de receptores inhibidores en el efecto antinociceptivo de *S. amarissima* y su metabolito mayoritario, los cuales pertenecen al sistema opioide y serotoninérgico, respectivamente, y a que estos receptores están acoplados a proteínas Gi para producir su efecto inhibidor (Kanbara et al., 2014; Cortes-Altamirano et al., 2018), en este estudio se decidió explorar adicionalmente el sistema de señalización de AC-AMPC. Para ello se utilizó un fármaco inductor de la actividad de la AC (enzima que sintetiza al AMPC) (Laurenza et al., 1989) y un inhibidor de las fosfodiesterasas (enzimas que inhiben la degradación del AMPC) (Banner y Page, 1995). Los resultados mostraron que ambos fármacos revirtieron el efecto antinociceptivo de amarisolida A en la fase neurogénica de la prueba de formalina reforzando la participación de esta vía de señalización acoplada a los receptores inhibidores de opioides y 5-HT_{1A} de serotonina. En la literatura se reporta que el efecto del extracto de AcOEt de *S. miltiorrhiza* (0.2 mg/kg) se asoció con la acción inhibidora sobre la AC, en parte por la presencia del ácido rosmarínico (0.1 mg/kg), un éster del ácido cafeico que se ha encontrado como metabolito bioactivo de esta especie y otras del género *Salvia* (Kohda et al., 1989). La vía de señalización de AC-AMPC son considerados blancos terapéuticos en el desarrollo de nuevos fármacos con acción analgésica, tal es el caso del ST034307 (3 mg/kg) el cual produjo antinocicepción en el modelo de dolor inducido por movimiento dental en ratas mediante el bloqueo selectivo de la AC (Cheng et al., 2019). Otro fármaco es el SQ22536 cuya acción inhibidora sobre la AC disminuyó la hiperalgesia y la alodinia en un modelo de dolor neuropático en ratas con diabetes tipo 2 (Feng et al., 2017). Estos estudios en conjunto con nuestros resultados refuerzan la idea de que los productos naturales como amarisolida A o sintéticos como los mencionados, pueden producir efectos de tipo analgésico mediados por receptores acoplados a las vías de señalización del AC-AMPC.

7.2.3 Efecto antinociceptivo del extracto de AcOEt y amarisolida A a nivel central

El efecto antinociceptivo central del extracto de AcOEt y amarisolida A observado en la fase neurogénica de la prueba de formalina se reforzó con el resultado de la respuesta antinociceptiva en el “plantar test”, donde el efecto máximo posible (EMP) evaluado como la latencia de retiro presentó un incremento significativo para el extracto y amarisolida A similar al fármaco de referencia tramadol. Se sabe que en esta prueba se estimulan los nociceptores (fibras A δ y C) responsables de conducir las señales nociceptivas al SNC (Cuellar et al., 2010; Hargreaves et al., 1988). Respuestas similares fueron reportadas con el extracto de AcOEt (100 mg/kg) de *S. divinorum* en la prueba de “plantar test” en ratas (Simón-Arceo et al., 2017) y para el extracto de cloroformo de *S. wiedemannii* (500 mg/kg) en la prueba de retirada de la cola “tail flick” (Ustun y Sezik, 2011) reforzando la actividad a nivel del SNC de los metabolitos de diferentes *Salvias*.

7.2.4 Efecto anti-inflamatorio del extracto de AcOEt y amarisolida A en la prueba de edema inducido con carragenina

Para evidenciar el posible efecto anti-inflamatorio del extracto de *S. amarissima* y de amarisolida A se probó su efecto en el edema inducido con la carragenina, la cual es una prueba para la evaluación de fármacos anti-inflamatorios (Otterness y Moore, 1988), la cual involucra la participación de mediadores de inflamación aguda (Di Rosa et al., 1971). La prueba consiste en una fase inicial donde se promueve la liberación de autacoides como la histamina, serotonina y bradicininas, así como de una fase de aceleración de la inflamación que se ha correlacionado con la inducción de la enzima COX-2 que incrementa la producción de PGs (Vinegar et al., 1969). Además, interviene la migración de neutrófilos, macrófagos y células al sitio de inflamación, las cuales pueden producir especies reactivas de oxígeno que desempeñan un papel modulador en la respuesta inmune inflamatoria (Ghildiyal et al., 2013) y el estrés oxidante (Mizokami et al., 2016). La presencia de carragenina produce la disminución gradual del umbral nociceptivo siendo significativo a los 180 min con una respuesta máxima a las 24 h post administración (Morris, 2003). En esta prueba, el extracto de AcOEt (10 mg/kg) produjo efecto anti-inflamatorio similar a la del fármaco de referencia indometacina (20 mg/kg). Mientras que amarisolida A (1 y 10 mg/kg) redujo significativamente el edema 24 h posteriores a la administración. Resultados similares se observaron con el efecto anti-inflamatorio del extracto de AcOEt de *S. divinorum* debido a la presencia de los terpenos neoclerodanos salvinatorinas A y B, como componentes mayoritarios en el extracto. Qnais y colaboradores (2010) reportaron que el extracto de butanol de *S. officinalis* (10 mg/kg)

también produjo un efecto anti-inflamatorio significativo 3 h posteriores a la administración de carragenina. Mientras que Nogai y colaboradores (2020) demostraron que el extracto de etanol de *S. lanata* (100 mg/kg) inhibió la inflamación producida por carragenina a partir de los 60 minutos de iniciada la prueba. Si bien existe variabilidad en la latencia al efecto anti-inflamatorio entre estas distintas especies del género *Salvia*, éstas coinciden en su potencial anti-inflamatorio en parte dependiente de compuestos de tipo terpénico, en donde la naturaleza química neoclerodana juega un papel importante en la búsqueda y desarrollo de nuevos fármacos anti-inflamatorios.

7.2.4.1 Efecto del daño tisular

Se sabe que el edema inducido por carragenina promueve la extravasación de proteínas plasmáticas y acumulación de granulocitos principalmente neutrófilos en el sitio inflamatorio (Crunkhorn y Meacock, 1971), lo cual estimula la liberación de mediadores proinflamatorios e inflamatorios tales como bradicinina, histamina, taquicinas y especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (Morris, 2003). Todos estos factores modifican la estructura de las fibras mostrando más espacio entre las fibras e infiltración celular, proceso que también se ha observado mediante el análisis histológico de tejido inflamado de ratas donde se inhiben la extravasación celular (Morris, 2003). En nuestro estudio, el extracto de AcOEt de *S. amarissima* conservó la arquitectura tisular de las extremidades de las ratas inyectadas con carragenina de una manera dependiente de la dosis, donde amarisolida A (1 mg/kg) mantuvo la arquitectura tisular, aunque con una infiltración celular mayor. Este resultado refuerza el efecto antiedema observado con el extracto de mediana polaridad de *S. divinorum* al evitar la inflamación inducida con carragenina en ratas con dolor neuropático (Simón-Arceo et al., 2017). Si bien no hay datos histológicos de otras especies de *Salvia*, si se ha reportado preservación de la arquitectura tisular de manera dosis dependiente en extractos polares de algunas especies de la misma familia (Rameshrad et al., 2015; Fathiazad et al., 2016).

7.3 Efecto del efecto antihiperálgico y/o antialodínico de *S. amarissima*

Debido a que los efectos antinociceptivos del extracto y su metabolito presentaron significancia a nivel central en ratones, ambos tratamientos se exploraron en el modelo de dolor disfuncional de FM inducido con reserpina en ratas. Los resultados muestran que el extracto de AcOEt de *S. amarissima* y amarisolida A, producen un efecto antinociceptivo de tipo antihiperálgico y antialodínico al modificar favorablemente los umbrales de respuesta a estímulos mecánicos y térmicos en el modelo de FM. La

búsqueda en ScienceDirect con los términos “*Salvia*” y “fibromialgia” permitió identificar 13 resultados para artículos de investigación, en tanto que los términos “diterpeno” y “fibromialgia” en el repositorio PubMed desplegaron 7 resultados. Esto establece que la información respecto al género *Salvia* y metabolitos de naturaleza terpénica como terapia complementaria para el tratamiento de la FM es escasa y refuerza la importancia del estudio de estas especies para la terapia del dolor disfuncional.

La evaluación del extracto de AcOEt y amarisolida A en el modelo de FM inducida con reserpina expresada como cursos temporales y áreas bajo la curva de las respuestas de tipo dolorosas que son reducidas significativamente dan evidencia de las propiedades de esta especie para atenuar el dolor tipo FM. En nuestro conocimiento, actualmente no se cuenta con reportes sobre la eficacia de extractos o compuestos puros del género *Salvia* en modelos de dolor tipo FM. No obstante, algunas especies se han estudiado en modelos de dolor disfuncional de tipo neuropático, tal es el caso del diterpeno tanshinona IIA presente en *S. multiorrhiza*, el cual de manera dependiente de la dosis (10, 25 y 50 mg/kg) disminuyó las conductas de hiperalgia mecánica en el modelo de ligamiento del nervio espinal en ratas (Liu et al., 2010). Este diterpeno reprimió eficazmente la activación de la microglía espinal en un modelo de dolor neuropático, donde la expresión de las citocinas inflamatorias en TNF- α e IL-1 β disminuyó en la médula espinal (Cao et al., 2015). De hecho, para la inducción de FM con reserpina se ha reportado la prominente activación a nivel SNC que incluye a la activación de la microglía de la misma forma como sucede con los pacientes que padecen este síndrome (Taguchi et al., 2015).

Las propiedades antihiperalgésicas y antialodínicas de algunas especies vegetales son escasas, pero ya han sido reportadas, tal es el caso del extracto etanólico de *S. lachnostachys* cuya actividad antinociceptiva se atribuyó al diterpeno fruticulina A utilizando modelos experimentales de inflamación en ratones (edema de pata y pleuresía inducida por inyección de carragenina) e hiperalgia (Von Frey electrónico). La administración oral del extracto de *S. lachnostachys* (100 mg/kg) y fruticulina A (3 mg/kg) mostró actividad antihiperalgésica inhibiendo el TNF- α (Piccinelli et al., 2014). Nuestros resultados concuerdan además con la evaluación del efecto antihiperalgésico del extracto de AcOEt de *S. divinorum* (100 mg/kg) en la prueba de neuropatía por constricción del nervio ciático, donde este efecto fue prevenido cuando las ratas recibieron el antagonista opioide del receptor Kappa nor-binaltorfimina a razón de 1 mg/kg (Simón-Arceo et al., 2017). El extracto de las hojas de *S. officinalis* y sus

componentes principales, los ácidos rosmarínico y cafeico, mostraron eficacia sobre el dolor neuropático inducido por la lesión por constricción crónica del nervio ciático en ratones y se evaluaron conductas nociceptivas mediante pruebas mecánicas, químicas, térmicas y recuperación funcional del nervio ciático en diferentes intervalos de tiempo (día 0, 1, 7, 14 y 21). El extracto etanólico de *S. officinalis* administrado vía oral (100 y 200 mg/kg) y sus metabolitos el ácido rosmarínico (10 y 20 mg/kg, i.p.) y ácido cafeico (30 y 40 mg/kg, i.p.) produjeron una mejora significativa en la hiperalgesia mecánica y térmica, alodinia al frío y aumento del índice funcional ciático en ratones (El Gabbas et al., 2019). En conjunto estos resultados apoyan el potencial terapéutico de especies de *Salvia* y sus metabolitos de naturaleza terpénica en el alivio del dolor, no sólo funcional sino de manera relevante también en el dolor disfuncional.

7.4 Concentración de citocinas inflamatorias en el tejido nervioso de ratas en el modelo de FM

La patogenia de la FM no se comprende aun completamente. Las hipótesis establecen que la predisposición genética, los eventos estresantes, los mecanismos periféricos (inflamatorios) y centrales (cognitivo-emocionales) interactúan para crear una inadecuada percepción del dolor debido a modificaciones neuro-morfológicas "dolor nociplásico" (Sarzi-Puttini et al., 2020).

La activación y regulación de los patrones de citocinas está implicada en una variedad de estados patológicos con cierta complejidad; por ejemplo, sepsis, artritis reumatoide, espondilitis anquilosante, enfermedad de Crohn, esclerosis múltiple y enfermedades de la piel (Sommer y Kress, 2004). Por lo anterior existe la hipótesis de que las citocinas pueden estar involucradas en la generación de dolor e hiperalgesia en condiciones inflamatorias y neuropáticas (Bazzichi et al., 2007).

El concepto de comportamiento de enfermedad inducido por citocinas (Dantzer, 2004), es un conjunto de cambios fisiológicos y de comportamiento que experimentan los pacientes durante el curso de una infección. Éstos se consideran respuestas adaptativas diseñadas para mantener la homeostasis durante la infección (Hart, 1988). Se ha demostrado que los cambios de comportamiento se deben a los efectos de las citocinas proinflamatorias en los objetivos celulares del cerebro, tras la estimulación, el sistema inmunitario secreta citocinas proinflamatorias que transmiten un mensaje al cerebro y reorganizan las prioridades de comportamiento (Capuron y Miller, 2011). La inyección

sistémica o central de IL-1 β , IL-6 y TNF- α en animales induce un comportamiento de enfermedad (Salvador et al., 2021).

Dado que los pacientes con FM refieren algunos síntomas similares a los del comportamiento de enfermedad inducido por citocinas y en el modelo de FM inducido por reserpina se ha reportado la modificación de éstas (Cordero et al., 2014), en el presente estudio se evaluaron los niveles tisulares de IL-1 β , IL-6 y TNF- α en ratas con FM que recibieron el vehículo comparadas con las que recibieron tratamiento con amarisolida A encontrando diferencias significativas en tejido nervioso.

Se sabe que la activación del inflamasoma NLRP3 produce incremento en las concentraciones de IL-1 β (Cordero et al., 2014) donde productos naturales como el ácido ferúlico (30 mg/kg) generan un efecto inhibitor del inflamasoma produciendo un descenso en las concentraciones de IL-1 β (Doss et al., 2016). El tratamiento con quercetina también inhibe de forma dosis dependiente la secreción de IL-1 β de inflamasoma NLRP3 (Domiciano et al., 2017). Los resultados de nuestro estudio refuerzan cambios en los niveles tisulares de IL-1 β o IL-6 y TNF- α en ratas con FM, principalmente en el caso de IL-1 β y más limitados con IL-6 y TNF- α que pudieron depender de las diferencias en condiciones experimentales establecidas en cada estudio. Aunque es un hecho que los niveles de IL-6 en suero y plasma en pacientes con FM en comparación con los controles, no presenta una diferencia significativa (Wallace et al., 2001).

7.5 Efectos adversos de sedación y daño gástrico

La sedación es considerada como un efecto adverso común y relevante (Hall y Stanley, 2019) de fármacos analgésicos con acción central como los opioides debido a que la activación de los receptores opioides μ y κ provoca este efecto de manera dependiente de la dosis (Trescot et al., 2008). Es importante mencionar que el extracto de AcOEt o amarisolida A no produjeron el efecto adverso de sedación a las dosis antinociceptivas como se demostró en la evaluación de su actividad ambulatoria, la cual fue igual en comparación con el control. Las especies de *Salvia* se han caracterizado en la medicina tradicional, no sólo por su actividad antinociceptiva, sino también por sus actividades ansiolíticas. No obstante, en nuestro conocimiento los metabolitos bioactivos de esta acción depresora del SNC no se han explorado lo suficiente en estudios preclínicos o clínicos. En contraste se han reportado efectos de tipo ansiolítico para el aceite esencial de las partes aéreas de *S. miltiorrhiza* (100 y 200 mg/kg, p.o.) usando la prueba del

laberinto en cruz en ratas (Song y Li, 2015). Mientras que este efecto también se observó con el extracto hidroalcohólico (100 mg/kg, i.p.) de las partes aéreas de *S. reuterana* (Rabbani et al., 2005) y las flores y hojas de *S. elegans* (50 y 100 mg/kg, p.o.) en ratones, utilizando tanto la prueba de laberinto en cruz como el de campo abierto, donde la actividad ambuladora no se modificó (Herrera-Ruiz et al., 2006). Un caso interesante fue el observado en hojas de *S. divinorum* mediante un estudio de electroencefalografía en ratas, donde se produjo actividad depresora y potenciación del sueño inducido por pentobarbital sódico. *S. divinorum* se preparó y evaluó como extracto de hexano, AcOEt y metanol (10, 30 y 100 mg/kg, i.p.), donde sus efectos centrales se enfatizaron por la presencia de diterpenos como las salvinorinas aisladas del extracto de mediana polar (González-Trujano et al., 2016).

7.5.1 Daño gástrico

El daño gástrico es uno de los efectos adversos comúnmente observado en el consumo de analgésicos del tipo AINEs, ello se debe en parte a la inhibición que éstos causan sobre la producción de PGs a través de la COX 1, enzima que también se encarga del mantenimiento de la integridad de la mucosa gastrointestinal (Sostres et al., 2013). En estudios previos donde se han evaluado especies de *Salvia* se ha descrito que el extracto hidroalcohólico de *S. officinalis* en un modelo de lesión gástrica inducida por etanol DE₅₀ 84 mg/kg. La úlcera inducida por ácido acético y la acidez total de la secreción gástrica también se redujeron, el carnosol fue identificado como un posible componente activo para el efecto gastro protector de este extracto (Mayer et al., 2009), *S. plebeia* se evaluó mediante dos ensayos inducidos por lesiones gástricas, HCl/EtOH e indometacina/betanocol en ratones. El extracto de MeOH y su fracción EtOAc fueron efectivos, el ácido rosmarínico aislado de *S. plebeia* fue activo en el mismo método a 10 y 20 mg/kg (Nugroho et al., 2012). Estos resultados refuerzan las propiedades terapéuticas de *S. amarissima*, así como la ausencia de daño gástrico como los AINEs.

7.6 Dosis letal media

Debido a que el tratamiento con el extracto o amarisolida A no produjeron efectos adversos en dosis antinociceptivas eficaces, también se exploraron dosis reportadas como tóxicas para diversas sustancias. En dicha evaluación de toxicidad aguda se administraron dosis altas que permitieron corroborar que es una especie segura para su uso medicinal ya que se calculó una DL₅₀ mayor a 2000 mg/kg, la cual la coloca en una categoría 5 en el sistema de clasificación globalmente armonizado, indicado como

producto químico no tóxico (OECD, 2002). Adicionalmente se ha reportado la toxicidad aguda de la infusión de *S. amarissima* (5 000 mg/kg), la cual no produjo muertes en ratones en un estudio sobre el efecto anti-hiperglicemiante de esta especie (Flores-Bocanegra et al., 2017). Los extractos de acetona, metanol y acuoso de *S. purpurea* (2 000 mg/kg) tampoco produjeron muertes en ratones en la prueba de toxicidad aguda (Cuevas-Morales et al., 2022), en conjunto estos datos ofrecen información del amplio índice terapéutico de especies del género *Salvia*.

8. Conclusiones

Los resultados de esta investigación integran evidencia científica preclínica que demuestra que diterpenos de tipo clerodano aislados del extracto de AcOEt de *S. amarissima*, tal como amarisolida A, producen efecto antinociceptivo en modelos de dolor nociceptivo, inflamatorio y disfuncional. Ello involucrando la participación de receptores inhibidores de tipo opioide y 5HT_{1A} de serotonina, ambos receptores acoplados a la vía de señalización clásica del AC-AMPC, así como actividad antiinflamatoria mediada por citocinas, esencialmente IL-1 β . El que el extracto y amarisolida A hayan producido eficacia antihiperalgésica y antialodínica en un modelo de dolor disfuncional como lo es en fibromialgia se soporta por su acción en múltiples blancos terapéuticos del dolor y como analgésico y anti-inflamatorio de amplio espectro no asociado a efectos adversos relacionados con los analgésicos de la clínica clásicos de tipo AINE y opioide.

9. Perspectivas

- Continuar con el estudio fitoquímico de los componentes de naturaleza polar de *S. amarissima* para elucidar la identidad de éstos.
- Evaluar el efecto del extracto de etilo y amarisolida A en otras comorbilidades o afecciones del sistema nervioso central, tales como trastornos del sueño, disfunciones cognitivas, depresión, ansiedad, epilepsia.
- Realizar combinaciones del extracto, fracciones o compuestos puros con fármacos utilizados en la clínica con diferente mecanismo de acción para producir interacción farmacológica sinérgica a fin de generar opciones terapéuticas para el dolor disfuncional tipo FM.
- Identificar otros posibles mecanismos de acción tanto del extracto de *S. amarissima* como de la amarisolida A.

10. Referencias Bibliográficas

- Ablin, J., Fitzcharles, M.A., Buskila, D., Shir, Y., Sommer, C., Häuser, W., 2013. Treatment of fibromyalgia syndrome: Recommendations of recent evidence-based interdisciplinary guidelines with special emphasis on complementary and alternative therapies. *Evidence-based Complement. Altern. Med.* 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/485272>
- Ablin, J., Neumann, L., Buskila, D., 2008. Pathogenesis of fibromyalgia – A review. *Jt. Bone Spine.* 75, 273–279. <https://doi.org/10.1016/J.JBSPIN.2007.09.010>
- Albrecht, D.S., Forsberg, A., Sandström, A., Bergan, C., Kadetoff, D., Protsenko, E., Lampa, J., Lee, Y.C., Höglund, C.O., Catana, C., Cervenka, S., Akeju, O., Lekander, M., Cohen, G., Halldin, C., Taylor, N., Kim, M., Hooker, J.M., Edwards, R.R., Napadow, V., Kosek, E., Loggia, M.L., 2019. Brain glial activation in fibromyalgia – A multi-site positron emission tomography investigation. *Brain. Behav. Immun.* 75, 72–83. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2018.09.018>
- Aldred, E., 2009. Terpenes, in: Aldred, E., Buck, C., Kenneth, V. (Eds.), *Pharmacology*. Churchill Livingstone, pp. 167–174. <https://doi.org/10.1016/b978-0-443-06898-0.00022->
- Alles, S.R.A., Cain, S.M., Snutch, T.P., 2020. Pregabalin as a pain therapeutic: beyond calcium channels. *Front. Cell. Neurosci.* 14. <https://doi.org/10.3389/fncel.2020.00083>
- Armstrong SA, Herr MJ., [Updated 2021]. Physiology, nociception. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK551562/>
- Arranz, E., Mes, J., Wichers, H.J., Jaime, L., Mendiola, J.A., Reglero, G., Santoyo, S., 2015. Anti-inflammatory activity of the basolateral fraction of Caco-2 cells exposed to a rosemary supercritical extract. *J. Funct. Foods.* 13, 384–390. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.01.015>
- Aroust, C.A., Sofuoglu, M., Bastian, L.A., Rosenheck, R.A., 2018. Gender differences in the prevalence of fibromyalgia and in concomitant medical and psychiatric disorders: a national veterans health administration study. *J. Women's Heal.* 27, 1035. <https://doi.org/10.1089/JWH.2017.6622>

- Atkinson, T.J., Fudin, J., 2020. Nonsteroidal antiinflammatory drugs for acute and chronic pain. *Phys. Med. Rehabil. Clin. N. Am.* 31, 219–231. <https://doi.org/10.1016/J.PMR.2020.01.002>
- Aviello, G., Borrelli, F., Guida, F., Romano, B., Lewellyn, K., De Chiaro, M., Luongo, L., Zjawiony, J.K., Maione, S., Izzo, A.A., Capasso, R., 2011. Ultrapotent effects of salvinorin A, a hallucinogenic compound from *Salvia divinorum*, on LPS-stimulated murine macrophages and its anti-inflammatory action in vivo. *J. Mol. Med.* 89, 891–902. <https://doi.org/10.1007/s00109-011-0752-4>
- Bacchi, S., Palumbo, P., Sponta, A., Coppolino, M.F., 2012. Clinical pharmacology of non-steroidal anti-inflammatory drugs: a review. *antiinflamm. antiallergy. Agents Med. Chem.* 11, 52–64. <https://doi.org/10.2174/187152312803476255>
- Baliki, M.N., Apkarian, A.V., 2015. Nociception, pain, negative moods, and behavior selection. *Neuron.* 87, 474–491. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.06.005>
- Banks, S.M., Kerns, R.D., 1996. Explaining high rates of depression in chronic pain: A diathesis-stress framework. *Psychol. Bull.* 119, 95–110. <https://doi.org/10.1037/0033-2909.119.1.95>
- Banner, K.H., Page, C.P., 1995. Theophylline and selective phosphodiesterase inhibitors as anti-inflammatory drugs in the treatment of bronchial asthma. *Eur. Respir. J.* 8, 996–1000.
- Baraniuk, J.N., Whalen, G., Cunningham, J., Clauw, D.J., 2004. Cerebrospinal fluid levels of opioid peptides in fibromyalgia and chronic low back pain. *BMC Musculoskelet. Disord.* 5, 1–7. <https://doi.org/10.1186/1471-2474-5-48/FIGURES/6>
- Bazzichi, L., Rossi, A., Massimetti, G., Giannaccini, G., Giuliano, T., De Feo, F., Ciapparelli, A., Dell’Osso, L., Bombardieri, S., 2007. Cytokine patterns in fibromyalgia and their correlation with clinical manifestations. *Clin. Exp. Rheumatol.* 25, 225–230.
- Bellato, E., Marini, E., Castoldi, F., Barbasetti, N., Mattei, L., Bonasia, D.E., Blonna, D., 2012. Fibromyalgia syndrome: etiology, pathogenesis, diagnosis, and treatment. *Pain Res. Treat.* 2012, 426130. <https://doi.org/10.1155/2012/426130>

- Bernstein, N., Akram, M., Daniyal, M., Koltai, H., Fridlender, M., Gorelick, J., 2018. Antiinflammatory potential of medicinal plants: a source for therapeutic secondary metabolites, in: *Advances in Agronomy*. Academic Press Inc., pp. 131–183. <https://doi.org/10.1016/bs.agron.2018.02.003>
- Besson, J.M., 1999. The neurobiology of pain. *Lancet*. 353, 1610–1615. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(99\)01313-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(99)01313-6)
- Bindu, S., Mazumder, S., Bandyopadhyay, U., 2020. Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and organ damage: A current perspective. *Biochem. Pharmacol.* 180, 114147. <https://doi.org/10.1016/J.BCP.2020.114147>
- Birtić, S., Dussort, P., Pierre, F.X., Bily, A.C., Roller, M., 2015. Carnosic acid. *Phytochemistry*. 115, 9–19. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2014.12.026>
- Bodnar, R.J., 2018. Endogenous opiates and behavior: 2016. *Peptides*. 101, 167–212. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2018.01.011>
- Bourke, J.H., Wodehouse, T., Clark, L. V., Constantinou, E., Kidd, B.L., Langford, R., Mehta, V., White, P.D., 2021. Central sensitisation in chronic fatigue syndrome and fibromyalgia; a case control study. *J. Psychosom. Res.* 150, 110624. <https://doi.org/10.1016/j.jpsychores.2021.110624>
- Brawley, O.W., Smith, D.E., Kirch, R.A., 2009. Taking action to ease suffering: advancing cancer pain control as a health care priority. *CA. Cancer J. Clin.* 59, 285–289. <https://doi.org/10.3322/caac.20030>
- Brum, E.S., Becker, G., Fialho, M.F.P., Oliveira, S.M., 2022. Animal models of fibromyalgia: What is the best choice? *Pharmacol. Ther.* 230, 107959. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2021.107959>
- Brutcher, R.E., Kurihara, C., Bicket, M.C., Moussavian-Yousefi, P., Reece, D.E., Solomon, L.M., Griffith, S.R., Jamison, D.E., Cohen, S.P., 2019. Compounded topical pain creams to treat localized chronic pain: A randomized controlled trial. *Ann. Intern. Med.* 170, 309–318. <https://doi.org/10.7326/M18-2736>
- Butelman, E.R., Prisinzano, T.E., Deng, H., Rus, S., Kreek, M.J., 2009. Unconditioned behavioral effects of the powerful κ -opioid hallucinogen salvinorin A in nonhuman primates: Fast onset and entry into cerebrospinal fluid. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 328,

588–597. <https://doi.org/10.1124/jpet.108.145342>

Cao, F. Le, Xu, M., Wang, Y., Gong, K.R., Zhang, J.T., 2015. Tanshinone IIA attenuates neuropathic pain via inhibiting glial activation and immune response. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 128, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2014.11.004>

Capranzano, P., Angiolillo, D.J., 2021. Antithrombotic management of elderly patients with coronary artery disease. *JACC Cardiovasc. Interv.* 14, 723–738. <https://doi.org/10.1016/j.jcin.2021.01.040>

Capuron, L., Miller, A.H., 2011. Immune system to brain signaling: Neuropsychopharmacological implications. *Pharmacol. Ther.* 130, 226–238. <https://doi.org/10.1016/J.PHARMTHERA.2011.01.014>

Carballo-Villalobos, A.I., González-Trujano, M.E., Pellicer, F., López-Muñoz, F.J., 2016. Antihyperalgesic effect of hesperidin improves with diosmin in experimental neuropathic pain. *Biomed Res. Int.* 2016, 8263463. <https://doi.org/10.1155/2016/8263463>

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. *J. Neurosci. Methods.* 53, 55–63. [https://doi.org/10.1016/0165-0270\(94\)90144-9](https://doi.org/10.1016/0165-0270(94)90144-9)

Cheng, S.J., Chen, Chien Chang, Yang, H.W., Chang, Y.T., Bai, S.W., Chen, Chih Cheng, Yen, C.T., Min, M.Y., 2011. Role of extracellular signal-regulated kinase in synaptic transmission and plasticity of a nociceptive input on capsular central amygdaloid neurons in normal and acid-induced muscle pain mice. *J. Neurosci.* 31, 2258–2270. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5564-10.2011>

Cheng, Y., Huang, P., Meng, B., Gan, L., Wu, D., Cao, Y., 2019. Antinociceptive effects of the adenylyl cyclase inhibitor ST034307 on tooth-movement-induced nociception in rats. *Arch. Oral Biol.* 98, 81–86. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2018.11.012>

Clauw, D.J., 2014. Fibromyalgia: A clinical review. *JAMA - J. Am. Med. Assoc.* 311, 1547–1555. <https://doi.org/10.1001/jama.2014.3266>

Corder, G., Castro, D.C., Bruchas, M.R., Scherrer, G., 2018. Endogenous and exogenous opioids in pain. *Annu. Rev. Neurosci.* 41, 453–473. <https://doi.org/10.1146/annurev->

- Cordero, M.D., Alcocer-Gómez, E., Culic, O., Carrión, A.M., De Miguel, M., Díaz-Parrado, E., Pérez-Villegas, E.M., Bullón, P., Battino, M., Sánchez-Alcazar, J.A., 2014. NLRP3 inflammasome is activated in fibromyalgia: The effect of coenzyme Q10. *Antioxidants Redox Signal.* 20, 1169–1180. <https://doi.org/10.1089/ars.2013.5198>
- Cortes-Altamirano, J.L., Olmos-Hernandez, A., Jaime, H.B., Carrillo-Mora, P., Bandala, C., Reyes-Long, S., Alfaro-Rodríguez, A., 2018. Review: 5-HT1, 5-HT2, 5-HT3 and 5-HT7 receptors and their role in the modulation of pain response in the central nervous system. *Curr. Neuropharmacol.* 16, 210. <https://doi.org/10.2174/1570159x15666170911121027>
- Covarrubias-Gómez, A., Guevara-López, U., Gutiérrez-Salmerón, C., Betancourt-Sandoval, J.A., Córdova-Domínguez, J.A., 2010. Epidemiology of chronic pain in Mexico. *Rev. Mex. Anesthesiol.* 33, 207–213.
- Cuellar, J.M., Manering, N.A., Klukinov, M., Nemenov, M.I., Yeomans, D.C., 2010. Thermal nociceptive properties of trigeminal afferent neurons in rats. *Mol. Pain.* 6. <https://doi.org/10.1186/1744-8069-6-39>
- Cuevas-Morales, C., Zavala-Ocampo, L.M., Miguel-Chávez, R.S., González-Trujano, M.E., Basurto-Peña, F.A., Muñoz-Ocotoero, V., Aguirre-Hernández, E., 2022. Evaluación farmacológica de la actividad antinociceptiva y análisis fitoquímico de los extractos activos de *Salvia purpurea* Cav. *Bot. Sci.* 100, 383–396. <https://doi.org/10.17129/BOTSCI.3013>
- Cui, M., Honore, P., Zhong, C., Gauvin, D., Mikusa, J., Hernandez, G., Chandran, P., Gomtsyan, A., Brown, B., Bayburt, E.K., Marsh, K., Bianchi, B., McDonald, H., Niforatos, W., Neelands, T.R., Moreland, R.B., Decker, M.W., Lee, C.H., Sullivan, J.P., Faltynek, C.R., 2006. TRPV1 receptors in the CNS play a key role in broad-spectrum analgesia of TRPV1 antagonists. *J. Neurosci.* 26, 9385–9393. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1246-06.2006>
- Cunningham, C.W., Elballa, W.M., Vold, S.U., 2019. Bifunctional opioid receptor ligands as novel analgesics. *Neuropharmacology.* 151, 195–207. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2019.03.006>

- Dantzer, R., 2004. Cytokine-induced sickness behaviour: A neuroimmune response to activation of innate immunity. *Eur. J. Pharmacol.* 500, 399–411. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2004.07.040>
- De Resende, M.A., Silva, L.F.S., Sato, K., Arendt-Nielsen, L., Sluka, K.A., 2011. Blockade of opioid receptors in the medullary reticularis nucleus dorsalis, but not the rostral ventromedial medulla, prevents analgesia produced by diffuse noxious inhibitory control in rats with muscle inflammation. *J. Pain.* 12, 687–697. <https://doi.org/10.1016/j.jpain.2010.12.009>
- De Souza Siqueira, Q.J., Menezes, P.P., Santos, M.R.V., Bonjardim, L.R., Almeida, J.R.G.S., Gelain, D.P., Araújo, A.A.D.S., Quintans, L.J., 2013. Improvement of p-cymene antinociceptive and anti-inflammatory effects by inclusion in β -cyclodextrin. *Phytomedicine.* 20, 436–440. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2012.12.00>
- Desmeules, J.A., Cedraschi, C., Rapiti, E., Baumgartner, E., Finckh, A., Cohen, P., Dayer, P., Vischer, T.L., 2003. Neurophysiologic evidence for a central sensitization in patients with fibromyalgia. *Arthritis Rheum.* 48, 1420–1429. <https://doi.org/10.1002/art.10893>
- Di Rosa, M., Giroud, J.P., Willoughby, D.A., 1971. Studies of the mediators of the acute inflammatory response induced in rats in different sites by carrageenan and turpentine. *J. Pathol.* 104, 15–29. <https://doi.org/10.1002/PATH.1711040103>
- Dias, D.A., Urban, S., Roessner, U., 2012. A Historical overview of natural products in drug discovery. *Metabolites.* 2, 303–336. <https://doi.org/10.3390/metabo2020303>
- Domiciano, T.P., Wakita, D., Jones, H.D., Crother, T.R., Verri, W.A., Arditi, M., Shimada, K., 2017. Quercetin inhibits inflammasome activation by interfering with asc oligomerization and prevents interleukin-1 mediated mouse vasculitis. *Sci. Rep.* 7, 1–11. <https://doi.org/10.1038/srep41539>
- Doss, H.M., Dey, C., Sudandiradoss, C., Rasool, M.K., 2016. Targeting inflammatory mediators with ferulic acid, a dietary polyphenol, for the suppression of monosodium urate crystal-induced inflammation in rats. *Life Sci.* 148, 201–210. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2016.02.004>
- Dray, A., Perkins, M., 1997. Kinins and Pain, in: Farmer, S.G.B.T.-T.K.S. (Ed.),

- Handbook of immunopharmacology. Academic Press, London, pp. 157–172.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-012249340-9/50011-5>
- Duthie, D.J.R., Nimmo, W.S., 1987. Adverse effects of opioid analgesic drugs, in: British Journal of Anaesthesia. Oxford University Press, pp. 61–77.
<https://doi.org/10.1093/bja/59.1.61>
- Dzubak, P., Hajduch, M., Vydra, D., Hustova, A., Kvasnica, M., Biedermann, D., Markova, L., Urban, M., Sarek, J., 2006. Pharmacological activities of natural triterpenoids and their therapeutic implications. Nat. Prod. Rep. 23, 394–411.
<https://doi.org/10.1039/b515312n>
- El Gabbas, Z., Bezza, K., Laadraoui, J., Ait Laaradia, M., Kebbou, A., Oufquir, S., Boukhira, A., Aboufatima, R., Chait, A., 2019. *Salvia officinalis*, rosmarinic and caffeic acids attenuate neuropathic pain and improve function recovery after sciatic nerve chronic constriction in mice. Evidence-based Complement. Altern. Med. 2019, 17. <https://doi.org/10.1155/2019/1702378>
- Ellison, D.L., 2017. Physiology of pain. Crit. Care Nurs. Clin. North Am. 29, 397–406.
<https://doi.org/10.1016/j.cnc.2017.08.001>
- Emami, F., Ali-Beig, H., Farahbakhsh, S., Mojabi, N., Rastegar-Moghadam, B., Arbabian, S., Kazemi, M., Tekieh, E., Golmanesh, L., Ranjbaran, M., Jalili, C., Noroozadeh, A., Sahraei, H., 2013. Hydroalcoholic extract of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) and its constituent carnosol inhibit formalin-induced pain and Inflammation in mice. Pakistan J. Biol. Sci. 16, 309–316.
<https://doi.org/10.3923/PJBS.2013.309.316>
- Fathiazad, F., Rameshrad, M., Asghari, S., Hamedeyazdan, S., Garjani, A., Maleki-Dizaji, N., 2016. Phytochemical screening and anti-inflammatory effect of *Marrubium vulgare* L. methanol extract on carrageenan- induced paw inflammation in rats. Pharm. Sci. 23, 3–11. <https://doi.org/10.15171/PS.2017.02>
- Feng, H., Lu, G., Li, Q., Liu, Z., 2017. Inhibition of adenylyl cyclase in the spinal cord alleviates painful diabetic neuropathy in zucker diabetic fatty rats. Can. J. Diabetes. 41, 177–183. <https://doi.org/10.1016/j.jcjd.2016.09.006>
- Ferraz, C.R., Carvalho, T.T., Manchope, M.F., Artero, N.A., Rasquel-Oliveira, F.S., Fattori, V., Casagrande, R., Verri, W.A., 2020. Therapeutic potential of flavonoids

- in pain and inflammation: Mechanisms of action, pre-clinical and clinical data, and pharmaceutical development. *Molecules*. 25, 762. <https://doi.org/10.3390/molecules25030762>
- Finnerup, N.B., 2019. Nonnarcotic methods of pain management. *N. Engl. J. Med.* 380, 2440–2448. <https://doi.org/10.1056/nejmra1807061>
- Fishbain, D., 2000. Evidence-based data on pain relief with antidepressants. *Ann. Med.* 32, 305–316. <https://doi.org/10.3109/07853890008995932>
- Flodin, P., Martinsen, S., Löfgren, M., Bileviciute-Ljungar, I., Kosek, E., Fransson, P., 2014. Fibromyalgia is associated with decreased connectivity between pain- and sensorimotor brain areas. *Brain Connect.* 4, 587–594. <https://doi.org/10.1089/brain.2014.0274>
- Flores-Bocanegra, L., González-Andrade, M., Bye, R., Linares, E., Mata, R., 2017. α -Glucosidase inhibitors from *Salvia circinata*. *J. Nat. Prod.* 80, 1584–1593. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.7b00155>
- Foerster, B.R., Nascimento, T.D., DeBoer, M., Bender, M.A., Rice, I.C., Truong, D.Q., Bikson, M., Clauw, D.J., Zubieta, J.K., Harris, R.E., DaSilva, A.F., 2015. Brief report: Excitatory and inhibitory brain metabolites as targets of motor cortex transcranial direct current stimulation therapy and predictors of its efficacy in fibromyalgia. *Arthritis Rheumatol.* 67, 576–581. <https://doi.org/10.1002/art.38945>
- Frezza, C., Venditti, A., Serafini, M., Bianco, A., 2019. phytochemistry, chemotaxonomy, ethnopharmacology, and nutraceuticals of Lamiaceae. *Stud. Nat. Prod. Chem.* 62, 125–178. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64185-4.00004-6>
- Friedman, A., Nabong, L., 2020. Opioids: pharmacology, physiology, and clinical implications in pain medicine. *Phys. Med. Rehabil. Clin. N. Am.* 31, 289–303. <https://doi.org/10.1016/j.pmr.2020.01.007>
- García-Hernández, K.Y., Vibrans, H., Rivas-Guevara, M., Aguilar-Contreras, A., 2015. This plant treats that illness? the hot-cold system and therapeutic procedures mediate medicinal plant use in San Miguel Tulancingo, Oaxaca, Mexico. *J. Ethnopharmacol.* 163, 12–30. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2015.01.001>
- Geppetti, P., Nassini, R., Materazzi, S., Benemei, S., 2008. The concept of neurogenic

inflammation. *BJU Int. Suppl.* 101, 2–6. <https://doi.org/10.1111/j.1464-410X.2008.07493.x>

Ghildiya, S., Gautam, M.K., Joshi, V.K., Goel, R.K., 2013. Anti-inflammatory activity of two classical formulations of *Laghupanchamula* in rats. *J. Ayurveda Integr. Med.* 4, 23. <https://doi.org/10.4103/0975-9476.109546>

González-Trujano, M.E., Brindis, F., López-Ruiz, E., Ramírez-Salado, I., Martínez, A., Pellicer, F., 2016. Depressant effects of *Salvia divinorum* involve disruption of physiological sleep. *Phyther. Res.* 30, 1137–1145. <https://doi.org/10.1002/PTR.5617>

Gordon, S., Taylor, P.R., 2005. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat. Rev. Immunol.* 5, 953–964. <https://doi.org/10.1038/nri1733>

Gota, C.E., 2021. Fibromyalgia: recognition and management in the primary care office. *Med. Clin. North Am.* 105, 285–296. <https://doi.org/10.1016/j.mcna.2020.09.012>

Hall, K.R., Stanley, A.Y., 2019. Literature review: Assessment of opioid-related sedation and the pasero opioid sedation scale. *J. PeriAnesthesia Nurs.* 34, 132–142. <https://doi.org/10.1016/J.JOPAN.2017.12.009>

Hamidpour, M., Hamidpour, R., Hamidpour, S., Shahlari, M., 2014. Chemistry, pharmacology, and medicinal property of sage (*Salvia*) to prevent and cure illnesses such as obesity, diabetes, depression, dementia, lupus, autism, heart disease, and cancer. *J. Tradit. Complement. Med.* 4, 82–88. <https://doi.org/10.4103/2225-4110.130373>

Hargreaves, K., Dubner, R., Brown, F., Flores, C., Joris, J., 1988. A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. *Pain.* 32, 77–88. [https://doi.org/10.1016/0304-3959\(88\)90026-7](https://doi.org/10.1016/0304-3959(88)90026-7)

Harris, R.E., 2010. Elevated excitatory neurotransmitter levels in the fibromyalgia brain. *Arthritis Res. Ther.* 12. <https://doi.org/10.1186/AR3136>

Hart, B.L., 1988. Biological basis of the behavior of sick animals. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 12, 123–137. [https://doi.org/10.1016/S0149-7634\(88\)80004-6](https://doi.org/10.1016/S0149-7634(88)80004-6)

Häuser, W., Bernardy, K., Üçeyler, N., Sommer, C., 2009. Treatment of fibromyalgia syndrome with gabapentin and pregabalin - A meta-analysis of randomized

- controlled trials. *Pain*. 145, 69–81. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2009.05.014>
- Hernandez-Leon, A., Fernández-Guasti, A., González-Trujano, M.E., 2016. Rutin antinociception involves opioidergic mechanism and descending modulation of ventrolateral periaqueductal grey matter in rats. *Eur. J. Pain (United Kingdom)*. 20, 274–283. <https://doi.org/10.1002/ejp.720>
- Hernandez-Leon, A., Fernández-Guasti, A., Martínez, A., Pellicer, F., González-Trujano, M.E., 2019. Sleep architecture is altered in the reserpine-induced fibromyalgia model in ovariectomized rats. *Behav. Brain Res.* 364, 383–392. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2018.01.005>
- Hernandez-Leon, A., Moreno-Pérez, G.F., Martínez-Gordillo, M., Aguirre-Hernández, E., Valle-Dorado, M.G., Díaz-Reval, M.I., González-Trujano, M.E., Pellicer, F., 2021. Lamiaceae in mexican species, a great but scarcely explored source of secondary metabolites with potential pharmacological effects in pain relief. *Molecules*. 26, 7632. <https://doi.org/10.3390/molecules26247632>
- Herrera-Ruiz, M., García-Beltrán, Y., Mora, S., Díaz-Véliz, G., Viana, G.S.B., Tortoriello, J., Ramírez, G., 2006. Antidepressant and anxiolytic effects of hydroalcoholic extract from *Salvia elegans*. *J. Ethnopharmacol.* 107, 53–58. <https://doi.org/10.1016/J.JEP.2006.02.003>
- Hiller, K. -O., Zetler, G., 1996. Neuropharmacological studies on ethanol extracts of *Valeriana officinalis* L.: behavioural and anticonvulsant properties. *Phyther. Res.* 10, 145–151. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-1573\(199603\)10:2<145::AID-PTR793>3.0.CO;2-W](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-1573(199603)10:2<145::AID-PTR793>3.0.CO;2-W)
- Holanda Pinto, S.A., Pinto, L.M.S., Guedes, M.A., Cunha, G.M.A., Chaves, M.H., Santos, F.A., Rao, V.S., 2008. Antinociceptive effect of triterpenoid α,β -amyryn in rats on orofacial pain induced by formalin and capsaicin. *Phytomedicine*. 15, 630–634. <https://doi.org/10.1016/J.PHYMED.2007.11.016>
- Holman, A.J., Myers, R.R., 2005. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of pramipexole, a dopamine agonist, in patients with fibromyalgia receiving concomitant medications. *Arthritis Rheum.* 52, 2495–2505. <https://doi.org/10.1002/ART.21191>

- Hudlicky, T., Butora, G., Fearnley, S.P., Gum, A.G., Stabile, M.R., 1995. A historical perspective of morphine syntheses, in: studies in natural products chemistry. Elsevier, pp. 43–154. [https://doi.org/10.1016/S1572-5995\(96\)80025-1](https://doi.org/10.1016/S1572-5995(96)80025-1)
- Hunnskaar, S., Berge, O.G., Hole, K., 1986. Dissociation between antinociceptive and anti-inflammatory effects of acetylsalicylic acid and indomethacin in the formalin test. *Pain*. 25, 125–132. [https://doi.org/10.1016/0304-3959\(86\)90014-X](https://doi.org/10.1016/0304-3959(86)90014-X)
- Hylands-White, N., Duarte, R. V., Raphael, J.H., 2017. An overview of treatment approaches for chronic pain management. *Rheumatol. Int.* 37, 29–42. <https://doi.org/10.1007/s00296-016-3481-8>
- Imanshahidi, M., Hosseinzadeh, H., 2006. The pharmacological effects of *Salvia* species on the central nervous system. *Phyther. Res.* 20, 427–437. <https://doi.org/10.1002/ptr.1898>
- Jack, D.B., 1997. One hundred years of aspirin. *Lancet*. 350, 437–439. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(97\)07087-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(97)07087-6)
- Jenks, A. a., Kim, S.-C.C., 2013. Medicinal plant complexes of *Salvia* subgenus Calospatha: An ethnobotanical study of new world sages. *J. Ethnopharmacol.* 146, 214–224. <https://doi.org/10.1016/J.JEP.2012.12.035>
- Jiang, P.Y., Zhu, X.J., Zhang, Y.N., Zhou, F.F., Yang, X.F., 2018. Protective effects of apigenin on LPS-induced endometritis via activating Nrf2 signaling pathway. *Microb. Pathog.* 123, 139–143. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.06.031>
- Kanbara, T., Nakamura, A., Takasu, K., Ogawa, K., Shibasaki, M., Mori, T., Suzuki, T., Hasegawa, M., Sakaguchi, G., Kanemasa, T., 2014. The contribution of Gi/o protein to opioid antinociception in an oxaliplatin-induced neuropathy rat model. *J. Pharmacol. Sci.* 126, 264–273.
- Kent, M.L., Tighe, P.J., Belfer, I., Brennan, T.J., Bruehl, S., Brummett, C.M., Buckenmaier, C.C., Buvanendran, A., Cohen, R.I., Desjardins, P., Edwards, D., Fillingim, R., Gewandter, J., Gordon, D.B., Hurley, R.W., Kehlet, H., Loeser, J.D., Mackey, S., McLean, S.A., Polomano, R., Rahman, S., Raja, S., Rowbotham, M., Suresh, S., Schachtel, B., Schreiber, K., Schumacher, M., Stacey, B., Stanos, S., Todd, K., Turk, D.C., Weisman, S.J., Wu, C., Carr, D.B., Dworkin, R.H., Terman, G., 2017. The ACTION–APS–AAPM pain taxonomy (AAAPT) multidimensional

- approach to classifying acute pain conditions. *Pain Med.* 18, 947–958.
<https://doi.org/10.1093/PM/PNX019>
- Kiferle, C., Maggini, R., Pardossi, A., 2013. Influence of nitrogen nutrition on growth and accumulation of rosmarinic acid in sweet basil (*Ocimum basilicum* L.) grown in hydroponic culture. *Aust. J. Crop Sci.* 7, 321–327.
- Kohda, H., Takeda, O., Tanaka, S., Yamasaki, K., Yamashita, A., Kurokawa, T., Ishibashi, S., 1989. Isolation of inhibitors of adenylate cyclase from dan-shen, the root of *Salvia miltiorrhiza*. *Chem. Pharm. Bull.* 37, 1287–1290.
<https://doi.org/10.1248/CPB.37.1287>
- Könner, A.C., Brüning, J.C., 2011. Toll-like receptors: Linking inflammation to metabolism. *Trends Endocrinol. Metab.* 22, 16–23.
<https://doi.org/10.1016/j.tem.2010.08.007>
- Krishnamurti, C., Rao, S., 2016. The isolation of morphine by Serturmer. *Indian J. Anaesth.* 60, 861. <https://doi.org/10.4103/0019-5049.193696>
- Kršiak, M., 1991. Ethopharmacology: A historical perspective. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 15, 439–445. [https://doi.org/10.1016/S0149-7634\(05\)80124-1](https://doi.org/10.1016/S0149-7634(05)80124-1)
- Kuner, R., Flor, H., 2016. Structural plasticity and reorganisation in chronic pain. *Nat. Rev. Neurosci.* 18, 20–30. <https://doi.org/10.1038/nrn.2016.162>
- Kyriakis, J.M., Avruch, J., 2012. Mammalian MAPK signal transduction pathways activated by stress and inflammation: A 10-year update. *Physiol. Rev.* 92, 689–737.
<https://doi.org/10.1152/physrev.00028.2011>
- Laurenza, A., Sutkowski, E.M.H., Seamon, K.B., 1989. Forskolin: a specific stimulator of adenylyl cyclase or a diterpene with multiple sites of action? *Trends Pharmacol. Sci.* 10, 442–447. [https://doi.org/10.1016/S0165-6147\(89\)80008-2](https://doi.org/10.1016/S0165-6147(89)80008-2)
- Lacagnina, M.J., Watkins, L.R., Grace, P.M., 2018. Toll-like receptors and their role in persistent pain. *Pharmacol. Ther.* 184, 145–158.
<https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2017.10.006>
- Le Bars, D., Gozariu, M., Cadden, S., 2002. Animal models of nociception. *Pharmacol. Rev.* 53, 597–652.

- Lee, H., Ahn, S., Ann, J., Ha, H., Yoo, Y.D., Kim, Y.H., Hwang, J.Y., Hur, K.H., Jang, C.G., Pearce, L. V., Esch, T.E., Lewin, N.E., Blumberg, P.M., Lee, J., 2019. Discovery of dual-acting opioid ligand and TRPV1 antagonists as novel therapeutic agents for pain. *Eur. J. Med. Chem.* 182, 111634. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.111634>
- Letenneur, L., Proust-Lima, C., Le Gouge, A., Dartigues, J.F., Barberger-Gateau, P., 2007. Flavonoid intake and cognitive decline over a 10-year period. *Am. J. Epidemiol.* 165, 1364–1371. <https://doi.org/10.1093/aje/kwm036>
- Li, J.W.H., Vederas, J.C., 2009. Drug discovery and natural products: End of an era or an endless frontier? *Science.* 325, 161–165. <https://doi.org/10.1126/science.1168243>
- Li, Q., Verma, I.M., 2002. NF- κ B regulation in the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* 2, 725–734. <https://doi.org/10.1038/nri910>
- Liu, Y., Wang, L., Li, X., Lv, C., Feng, D., Luo, Z., 2010. Tanshinone IIA improves impaired nerve functions in experimental diabetic rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 399, 49–54. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.07.037>
- Liu, Y.T., Shao, Y.W., Yen, C.T., Shaw, F.Z., 2014. Acid-induced hyperalgesia and anxio-depressive comorbidity in rats. *Physiol. Behav.* 131, 105–110. <https://doi.org/10.1016/J.PHYSBEH.2014.03.030>
- Liu, Z.Y., Zhuang, D.B., Lunderberg, T., Yu, L.C., 2002. Involvement of 5-hydroxytryptamine 1A receptors in the descending anti-nociceptive pathway from periaqueductal gray to the spinal dorsal horn in intact rats, rats with nerve injury and rats with inflammation. *Neuroscience.* 112, 399–407. [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(02\)00038-6](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(02)00038-6)
- Lynch, T., 2011. Management of drug-drug interactions: considerations for special populations--focus on opioid use in the elderly and long term care. *Am. J. Manag. Care.* 17 Suppl 1.
- Maldonado, E., Cárdenas, J., Bojórquez, H., Escamilla, E.M., Ortega, A., 1996. Amarisolide, a neo-clerodane diterpene glycoside from *Salvia amarissima*. *Phytochemistry.* 42, 1105–1108. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(96\)00147-1](https://doi.org/10.1016/0031-9422(96)00147-1)
- Marchand, S., 2008. The physiology of pain mechanisms: from the periphery to the brain.

Rheum. Dis. Clin. North Am. 34, 285–309.
<https://doi.org/10.1016/J.RDC.2008.04.003>

Martínez-Gordillo, M., Fragoso-Martínez, I., García-Peña, M. del R., Montiel, O., 2013. Géneros de Lamiaceae de México, diversidad y endemismo Rev. Mex. Biodivers. pp. 30–86. <https://doi.org/10.7550/RMB.30158>

Martínez, A.L., González-Trujano, M.E., Chávez, M., Pellicer, F., 2012. Antinociceptive effectiveness of triterpenes from rosemary in visceral nociception. J. Ethnopharmacol. 142, 28–34. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2012.03.052>

Martinez, F.O., Helming, L., Gordon, S., 2009. Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective. Annu. Rev. Immunol. 27, 451–483. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.021908.132532>

Mayer, B., Baggio, C.H., Freitas, C.S., dos Santos, A.C., Twardowschy, A., Horst, H., Pizzolatti, M.G., Micke, G.A., Heller, M., dos Santos, É.P., Otuki, M.F., Marques, M.C.A., 2009. Gastroprotective constituents of *Salvia officinalis* L. Fitoterapia. 80, 421–426. <https://doi.org/10.1016/J.FITOTE.2009.05.015>

McCormick, T., Frampton, C., 2019. Assessment of acute and chronic pain. Anaesth. Intensive Care Med. 20, 405–409. <https://doi.org/10.1016/J.MPAIC.2019.05.010>

McCurdy, C.R., Sufka, K.J., Smith, G.H., Warnick, J.E., Nieto, M.J., 2006. Antinociceptive profile of salvinorin A, a structurally unique kappa opioid receptor agonist. Pharmacol. Biochem. Behav. 83, 109–113. <https://doi.org/10.1016/J.PBB.2005.12.011>

Mease, P.J., Clauw, D.J., Gendreau, R.M., Rao, S.G., Kranzler, J., Chen, W., Palmer, R.H., 2009. The efficacy and safety of milnacipran for treatment of fibromyalgia. a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. J. Rheumatol. 36, 398–409. <https://doi.org/10.3899/JRHEUM.080734>

Micó, J.A., Ardid, D., Berrocoso, E., Eschalier, A., 2006. Antidepressants and pain. Trends Pharmacol. Sci. 27, 348–354. <https://doi.org/10.1016/J.TIPS.2006.05.004>

Mills, S.E.E., Nicolson, K.P., Smith, B.H., 2019. Chronic pain: a review of its epidemiology and associated factors in population-based studies. Br. J. Anaesth. 123, e273–e283. <https://doi.org/10.1016/j.bja.2019.03.023>

- Mitsi, V., Zachariou, V., 2016. Modulation of pain, nociception, and analgesia by the brain reward center. *Neuroscience*. 338, 81. <https://doi.org/10.1016/J.NEUROSCIENCE.2016.05.017>
- Mizokami, S.S., N Hohmann, M.S., Staurengo-Ferrari, L., Carvalho, T.T., Zarpelon, A.C., Possebon, M.I., de Souza, A.R., S Veneziani, R.C., Arakawa, N.S., Casagrande, R., Verri, W.A., 2016. Pimaradienoic acid inhibits carrageenan-induced inflammatory leukocyte recruitment and edema in mice: inhibition of oxidative stress, nitric oxide and cytokine production. *PLoS ONE*. 11, 2. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0149656>
- Moehring, F., Halder, P., Seal, R.P., Stucky, C.L., 2018. Uncovering the cells and circuits of touch in normal and pathological settings. *Neuron*. 100, 349–360. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.10.019>
- Moreno-Pérez, G.F., González-Trujano, M.E., Martínez-Gordillo, M.J., Miguel-Chávez, R.S., Basurto-Peña, F.A., Dorazco-González, A., Aguirre-Hernández, E., 2019. Amarisolide A and pedalitin as bioactive compounds in the antinociceptive effects of *Salvia circinata* (Lamiaceae). *Bot. Sci.* 97, 355–365. <https://doi.org/10.17129/botsci.2187>
- Moreno Pérez, F., Hernandez Leon, A., Valle Dorado, M.G., Cano Martínez, A., Narváez González, F., Eva, A.H., Salgado Ceballos, H., González-Trujano, M.E., 2021. Neoclerodane diterpenic influence in the antinociceptive and anti-inflammatory properties of *Salvia circinnata* Cav. *J. Ethnopharmacol.* 268, 113550. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.113550>
- Morris, C.J., 2003. Carrageenan-induced paw edema in the rat and mouse., in: *Methods in Molecular Biology* (Clifton, N.J.). Humana Press, pp. 115–121. <https://doi.org/10.1385/1-59259-374-7:115>
- Mutha, R.E., Tatiya, A.U., Surana, S.J., 2021. Flavonoids as natural phenolic compounds and their role in therapeutics: an overview. *Future J. Pharm. Sci.* 7, 1–13. <https://doi.org/10.1186/S43094-020-00161-8>
- 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.

<https://doi.org/10.1016/J.PAIN.2009.05.024>

- Nijs, J., Lahousse, A., Kapreli, E., Bilika, P., Saraçoğlu, İ., Malfliet, A., Coppieters, I., De Baets, L., Leysen, L., Roose, E., Clark, J., Voogt, L., Huysmans, E., 2021. Nociplastic pain criteria or recognition of central sensitization? pain phenotyping in the past, present and future. *J. Clin. Med.* 10, 3203. <https://doi.org/10.3390/JCM10153203>
- Nile, S.H., Ko, E.Y., Kim, D.H., Keum, Y.S., 2016. Screening of ferulic acid related compounds as inhibitors of xanthine oxidase and cyclooxygenase-2 with anti-inflammatory activity. *Brazilian J. Pharmacogn.* 26, 50–55. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2015.08.013>
- Nogai, L., Kumar, T., Lohumi, P., 2020. Evaluation of *Salvia lanata* leaf extract for anti-inflammatory and antioxidant activity. *Asian J. Pharm. Clin. Res.* 13, 113–117. <https://doi.org/10.22159/ajpcr.2020.v13i12.39516>
- Nugroho, A., Kim, M.H., Choi, J., Baek, N.I., Park, H.J., 2012. *In vivo* sedative and gastroprotective activities of *Salvia plebeia* extract and its composition of polyphenols. *Arch. Pharmacol. Res.* 35, 1403–1411. <https://doi.org/10.1007/S12272-012-0810-7>
- OECD., 2002. Test No. 423: Acute Oral toxicity - Acute Toxic Class Method, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, section 4, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264071001-en>.
- Orr, P.M., Shank, B.C., Black, A.C., 2017. The role of pain classification systems in pain management. *Crit. Care Nurs. Clin. North Am.* 29, 407–418. <https://doi.org/10.1016/j.cnc.2017.08.002>
- Ortiz-Mendoza, N., Zavala-Ocampo, L.M., Martínez-Gordillo, M.J., González-Trujano, M.E., Peña, F.A.B., Rodríguez, I.J.B., Chávez, J.A.R., Dorazco-González, A., Aguirre-Hernández, E., 2020. Antinociceptive and anxiolytic-like effects of a neoclerodane diterpene from *Salvia semiatrata* aerial parts. *Pharm. Biol.* 58, 620–629. <https://doi.org/10.1080/13880209.2020.1784235>
- Otterness, I.G., Moore, P.F., 1988. Carrageenan foot edema test. *Methods Enzymol.* 162, 320–327. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(88\)62086-6](https://doi.org/10.1016/0076-6879(88)62086-6)

- Parada, C.A., Yeh, J.J., Reichling, D.B., Levine, J.D., 2003. Transient attenuation of protein kinase C ϵ can terminate a chronic hyperalgesic state in the rat. *Neuroscience*. 120, 219–226. [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(03\)00267-7](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(03)00267-7)
- Park, S.-H., Sim, Y.-B., Kang, Y.-J., Kim, S.-S., Kim, C.-H., Kim, S.-J., Suh, H.-W., 2013. Mechanisms involved in the antinociceptive effects of orally administered oleanolic acid in the mouse. *Arch. Pharm. Res.* 36, 905–11. <https://doi.org/10.1007/s12272-013-0093-7>
- Pascoe, P.J., 2000. Opioid analgesics. *Vet. Clin. North Am. - Small Anim. Pract.* 30, 757–772. [https://doi.org/10.1016/S0195-5616\(08\)70005-6](https://doi.org/10.1016/S0195-5616(08)70005-6)
- Patridge, E., Gareiss, P., Kinch, M.S., Hoyer, D., 2016. An analysis of FDA-approved drugs: Natural products and their derivatives. *Drug Discov. Today*. 21, 204–207. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2015.01.009>
- Perrot, S., Cohen, M., Barke, A., Korwisi, B., Rief, W., Treede, R.D., 2019. The IASP classification of chronic pain for ICD-11: Chronic secondary musculoskeletal pain. *Pain*. 160, 77–82. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000001389>
- Petersen, M., Simmonds, M.S.J., 2003. Rosmarinic acid. *Phytochemistry* 62, 2, 121–125. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(02\)00513-7](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(02)00513-7)
- Piccinelli, A.C., Figueiredo De Santana Aquino, D., Morato, P.N., Kuraoka-Oliveira, Â.M., Strapasson, R.L.B., Dos Santos, É.P., Stefanello, M.É.A., Oliveira, R.J., Kassuya, C.A.L., 2014. Anti-inflammatory and antihyperalgesic activities of ethanolic extract and fruticulin a from *Salvia lachnostachys* leaves in mice. *Evidence-based Complement. Altern. Med.* 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/835914>
- Praveen Rao, P.N., Knaus, E.E., 2008. Evolution of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs): Cyclooxygenase (COX) inhibition and beyond. *J. Pharm. Pharm. Sci.* 11, 81–110. <https://doi.org/10.18433/j3t886>
- Puopolo, M., Mendell, L.M., 2016. Nociceptors: The gateway to pain, in: *The Curated Reference Collection in Neuroscience and Biobehavioral Psychology*. Elsevier Science Ltd., pp. 613–624. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809324-5.03129-1>
- Qnais, E.Y., Abu-Dieyeh, M., Abdulla, F.A., Abdalla, S.S., 2010. The antinociceptive

- and anti-inflammatory effects of *Salvia officinalis* leaf aqueous and butanol extracts. *Pharm. Biol.* 48, 1149–1156. <https://doi.org/10.3109/13880200903530763>
- Quintans, J.S.S., Shanmugam, S., Heimfarth, L., Araújo, A.A.S., Almeida, J.R.G. d. S., Picot, L., Quintans-Júnior, L.J., 2019. Monoterpenes modulating cytokines - A review. *Food Chem. Toxicol.* 123, 233–257. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.10.058>
- Quiñonez-Bastidas, G.N., Navarrete, A., 2021. Mexican plants and derivatives compounds as alternative for inflammatory and neuropathic pain treatment—a review. *Plants.* 10, 865. <https://doi.org/10.3390/plants10050865>
- Rabbani, M., Sajjadi, S.E., Jafarian, A., Vaseghi, G., 2005. Anxiolytic effects of *Salvia reuterana* Boiss. on the elevated plus-maze model of anxiety in mice. *J. Ethnopharmacol.* 101, 100–103. <https://doi.org/10.1016/J.JEP.2005.03.034>
- Raja, S.N., Carr, D.B., Cohen, M., Finnerup, N.B., Flor, H., Gibson, S., Keefe, F.J., Mogil, J.S., Ringkamp, M., Sluka, K.A., Song, X.-J., Stevens, B., Sullivan, M.D., Tutelman, P.R., Ushida, T., Vader, K., 2020. The revised International Association for the Study of Pain definition of pain. *Pain.* 1976–1982. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000001939>
- Ramaswamy, S., Wodehouse, T., 2021. Conditioned pain modulation—A comprehensive review. *Neurophysiol. Clin.* 51, 197–208. <https://doi.org/10.1016/j.neucli.2020.11.002>
- Rameshrad, M., Salehian, R., Fathiazad, F., Hamedeyazdan, S., Garjani, M., Maleki-Dizaji, N., Vosooghi, R., 2015. The effects of *Ocimum basilicum* ethanol extract on carrageenan induced paw inflammation in rats. *Pharm. Sci.* 20, 149–156. <https://doi.org/10.5681/PS.2015.004>
- Reichling, D.B., Levine, J.D., 2009. Critical role of nociceptor plasticity in chronic pain. *Trends Neurosci.* 32, 611–618. <https://doi.org/10.1016/J.TINS.2009.07.007>
- Rivera, J., Alegre, C., Nishishinya, M.B., Pereda, C.A., 2006. Evidencias terapéuticas en fibromialgia. *Reumatol. Clin.* 2, 34–37. [https://doi.org/10.1016/s1699-258x\(06\)73080-7](https://doi.org/10.1016/s1699-258x(06)73080-7)
- Rodrigues, M.R.A., Kanazawa, L.K.S., Neves, T.L.M.H. Das, Silva, C.F. Da, Horst, H.,

- Pizzolatti, M.G., Santos, A.R.S., Baggio, C.H., Werner, M.F.D.P., 2012. Antinociceptive and anti-inflammatory potential of extract and isolated compounds from the leaves of *Salvia officinalis* in mice. *J. Ethnopharmacol.* 139, 519–526. <https://doi.org/10.1016/J.JEP.2011.11.042>
- Rodríguez-Hahn, L., Esquivel, B., Cárdenas, J., 1995. Neo-clerodane diterpenoids from american *Salvia* species. *Phytochem. Med. Plants.* 311–332. https://doi.org/10.1007/978-1-4899-1778-2_12
- Roy, A., Srivastava, M., Saqib, U., Liu, D., Faisal, S.M., Sugathan, S., Bishnoi, S., Baig, M.S., 2016. Potential therapeutic targets for inflammation in toll-like receptor 4 (TLR4)-mediated signaling pathways. *Int. Immunopharmacol.* 40, 79–89. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2016.08.026>
- Ruel, H.L.M., Steagall, P. V., 2019. Adjuvant analgesics in acute pain management. *Vet. Clin. North Am. - Small Anim. Pract.* 49, 1127–1141. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2019.07.005>
- Russell, I.J., Larson, A.A., 2009. Neurophysiopathogenesis of fibromyalgia syndrome: a unified hypothesis. *Rheum. Dis. Clin. North Am.* <https://doi.org/10.1016/j.rdc.2009.06.005>
- Russell, I.J., Mease, P.J., Smith, T.R., Kajdasz, D.K., Wohlreich, M.M., Detke, M.J., Walker, D.J., Chappell, A.S., Arnold, L.M., 2008. Efficacy and safety of duloxetine for treatment of fibromyalgia in patients with or without major depressive disorder: Results from a 6-month, randomized, double-blind, placebo-controlled, fixed-dose trial. *Pain.* 136, 432–444. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2008.02.024>
- Russell, I.J., Vaeroy, H., Javors, M., Nyberg, F., 1992. Cerebrospinal fluid biogenic amine metabolites in fibromyalgia/fibrositis syndrome and rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 35, 550–556. <https://doi.org/10.1002/art.1780350509>
- Russell, J., Kamin, M., Bennett, R.M., Schnitzer, T.J., Green, J.A., Katz, W.A., 2000. Efficacy of tramadol in treatment of pain in fibromyalgia. *J. Clin. Rheumatol.* 6, 250–257. <https://doi.org/10.1097/00124743-200010000-00004>
- Salehi, B., Valussi, M., Jugran, A.K., Martorell, M., Ramírez-Alarcón, K., Stojanović-Radić, Z.Z., Antolak, H., Kręgiel, D., Mileski, K.S., Sharifi-Rad, M., Setzer, W.N., Cádiz-Gurrea, M. de la L., Segura-Carretero, A., Şener, B., Sharifi-Rad, J., 2018.

- Nepeta* species: From farm to food applications and phytotherapy. Trends Food Sci. Technol. 80, 104–122. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.07.030>
- Salinas-Arellano, E., Pérez-Vásquez, A., Rivero-Cruz, I., Torres-Colin, R., González-Andrade, M., Rangel-Grimaldo, M., Mata, R., 2020. Flavonoids and terpenoids with PTP-1b inhibitory properties from the infusion of *Salvia amarissima* Ortega. Molecules. 25, 3530. <https://doi.org/10.3390/molecules25153530>
- Salvador, A.F., de Lima, K.A., Kipnis, J., 2021. Neuromodulation by the immune system: a focus on cytokines. Nat. Rev. Immunol. 21, 526–541. <https://doi.org/10.1038/s41577-021-00508-z>
- Sarchielli, P., di Filippo, M., Nardi, K., Calabresi, P., 2007. Sensitization, glutamate, and the link between migraine and fibromyalgia. Curr. Pain Headache Reports. 115, 11, 343–351. <https://doi.org/10.1007/S11916-007-0216-2>
- Sarzi-Puttini, P., Giorgi, V., Marotto, D., Atzeni, F., 2020. Fibromyalgia: an update on clinical characteristics, aetiopathogenesis and treatment. Nat. Rev. Rheumatol. 16, 645–660. <https://doi.org/10.1038/s41584-020-00506-w>
- Scapinello, J., Müller, L.G., Schindler, M.S.Z., Anzollin, G.S., Siebel, A.M., Boligon, A.A., Niero, R., Saraiva, T.E.S., Maus, N.P., Betti, A.H., Oliveira, J.V., Magro, J.D., de Oliveira, D., 2019. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of *Philodendron bipinnatifidum* Schott ex Endl (Araceae). J. Ethnopharmacol. 236, 21–30. <https://doi.org/10.1016/J.JEP.2019.02.037>
- Schmidt-Wilcke, T., Clauw, D.J., 2011. Fibromyalgia: from pathophysiology to therapy. Nat. Rev. Rheumatol. 518, 518–527. <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2011.98>
- Schreibman, C., 2021. Understanding fibromyalgia 2020. Physician Assist. Clin. 6, 89–96. <https://doi.org/10.1016/J.CPHA.2020.09.002>
- Schrepf, A., Harper, D.E., Harte, S.E., Wang, H., Ichesco, E., Hampson, J.P., Zubieta, J.K., Clauw, D.J., Harris, R.E., 2016. Endogenous opioidergic dysregulation of pain in fibromyalgia: A PET and fMRI study. Pain. 157, 2217–2225. <https://doi.org/10.1097/J.PAIN.0000000000000633>
- Sedano-Partida, M.D., dos Santos, K.P., Sala-Carvalho, W.R., Silva-Luz, C.L., Furlan, C.M., 2020. A review of the phytochemical profiling and biological activities of

- Hyptis* Jacq.: a Brazilian native genus of Lamiaceae. *Brazilian J. Bot.* 43, 213–228.
<https://doi.org/10.1007/s40415-020-00582-y>
- Serra, J., Collado, A., Solà, R., Antonelli, F., Torres, X., Salgueiro, M., Quiles, C., Bostock, H., 2014. Hyperexcitable C nociceptors in fibromyalgia. *Ann. Neurol.* 75, 196–208. <https://doi.org/10.1002/ANA.24065>
- Sharma, A., Shahzad, B., Rehman, A., Bhardwaj, R., Landi, M., Zheng, B., 2019. Response of phenylpropanoid pathway and the role of polyphenols in plants under abiotic stress. *Molecules.* 24, 2452. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES24132452>
- Sharmeen, J.B., Suroowan, S., Rengasamy, R.R.K., Mahomoodally, M.F., 2020. Chemistry, bioactivities, mode of action and industrial applications of essential oils. *Trends Food Sci. Technol.* 101, 89–105. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.04.025>
- Shibata, M., Ohkubo, T., Takahashi, H., Inoki, R., 1989. Modified formalin test: characteristic biphasic pain response. *Pain.* 38, 347–352. [https://doi.org/10.1016/0304-3959\(89\)90222-4](https://doi.org/10.1016/0304-3959(89)90222-4)
- Shin, K.M., Kim, I.T., Park, Y.M., Ha, J., Choi, J.W., Park, H.J., Lee, Y.S., Lee, K.T., 2004. Anti-inflammatory effect of caffeic acid methyl ester and its mode of action through the inhibition of prostaglandin E₂, nitric oxide and tumor necrosis factor- α production. *Biochem. Pharmacol.* 68, 2327–2336. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2004.08.002>
- Shipley, M., 2018. Chronic widespread pain and fibromyalgia syndrome. *Medicine.* 46, 4, 252–255.
- Silverman, N., Maniatis, T., 2001. NF- κ B signaling pathways in mammalian and insect innate immunity. *Genes Dev.* 15, 2321–2342. <https://doi.org/10.1101/gad.909001>
- Simmons, D.L., Botting, R.M., Hla, T., 2004. Cyclooxygenase Isozymes: The biology of prostaglandin synthesis and inhibition. *Pharmacol. Rev.* 56, 387–437. <https://doi.org/10.1124/PR.56.3.3>
- Simms, R.W., Roy, S.H., Hrovat, M., Anderson, J.J., Skrinar, G., Lepoole, S.R., Zerbini, C.A.F., Luca, C. De, Jolesz, F., 1994. Lack of association between fibromyalgia syndrome and abnormalities in muscle energy metabolism. *Arthritis Rheum.* 37,

794–800. <https://doi.org/10.1002/art.1780370603>

- Simón-Arceo, K., González-Trujano, M.E., Coffeen, U., Fernández-Mas, R., Mercado, F., Almanza, A., Contreras, B., Jaimes, O., Pellicer, F., 2017. Neuropathic and inflammatory antinociceptive effects and electrocortical changes produced by *Salvia divinorum* in rats. *J. Ethnopharmacol.* 206, 115–124. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2017.05.016>
- Siracusa, R., Di Paola, R., Cuzzocrea, S., Impellizzeri, D., 2021. Fibromyalgia: Pathogenesis, mechanisms, diagnosis and treatment options update. *Int. J. Mol. Sci.* 22, 8. <https://doi.org/10.3390/ijms22083891>
- Skyba, D.A., Lisi, T.L., Sluka, K.A., 2005. Excitatory amino acid concentrations increase in the spinal cord dorsal horn after repeated intramuscular injection of acidic saline. *Pain.* 119, 142–149. <https://doi.org/10.1016/J.PAIN.2005.09.025>
- Sluka, K.A., Clauw, D.J., 2016. Neurobiology of fibromyalgia and chronic widespread pain. *Neuroscience.* 338, 114–129.
- Soares, I.C.R., Santos, S.A.A.R., Coelho, R.F., Alves, Y.A., Vieira-Neto, A.E., Tavares, K.C.S., Magalhaes, F.E.A., Campos, A.R., 2019. Oleanolic acid promotes orofacial antinociception in adult zebrafish (*Danio rerio*) through TRPV1 receptors. *Chem. Biol. Interact.* 299, 37–43. <https://doi.org/10.1016/J.CBI.2018.11.018>
- Sommer, C., Kress, M., 2004. Recent findings on how proinflammatory cytokines cause pain: peripheral mechanisms in inflammatory and neuropathic hyperalgesia. *Neurosci. Lett.* 361, 184–187. <https://doi.org/10.1016/J.NEULET.2003.12.007>
- Song, Z., Li, X., 2015. Expression profiles of rosmarinic acid biosynthesis genes in two *Salvia miltiorrhiza* lines with differing water-soluble phenolic contents. *Ind. Crop. Prod.* 71, 24–30.
- Sostres, C., Gargallo, C.J., Arroyo, M.T., Lanas, A., 2010. Adverse effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs, aspirin and coxibs) on upper gastrointestinal tract. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* 24, 121–132. <https://doi.org/10.1016/j.bpg.2009.11.005>
- Spaak, J., Merlocco, A.C., Soleas, G.J., Tomlinson, G., Morris, B.L., Picton, P., Notarius, C.F., Chan, C.T., Floras, J.S., 2008. Dose-related effects of red wine and alcohol on

- hemodynamics, sympathetic nerve activity, and arterial diameter. *Am. J. Physiol. - Hear. Circ. Physiol.* 294, H605–H612. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.01162.2007>
- Spelman, K., Burns, J.J., Nichols, D., Winters, N., Ottersberg, S., Tenborg, M., 2006. Modulation of cytokine expression by traditional medicines: A review of herbal immunomodulators. *Altern. Med. Rev.* 11, 128–150.
- Spina, E., Trifirò, G., Caraci, F., 2012. Clinically significant drug interactions with newer antidepressants. *CNS Drugs.* 26, 39–67. <https://doi.org/10.2165/11594710-000000000-00000>
- Spiteller, G., 2001. Lipid peroxidation in aging and age-dependent diseases. *Exp. Gerontol.* 36, 1425–1457. [https://doi.org/10.1016/S0531-5565\(01\)00131-0](https://doi.org/10.1016/S0531-5565(01)00131-0)
- Staud, R., 2011. Brain imaging in fibromyalgia syndrome. *Clin. Exp. Rheumatol.* 29, 6 supp.
- Staud, R., Weyl, E.E., Bartley, E., Price, D.D., Robinson, M.E., 2014. Analgesic and anti-hyperalgesic effects of muscle injections with lidocaine or saline in patients with fibromyalgia syndrome. *Eur. J. Pain* 18, 803–812. <https://doi.org/10.1002/J.1532-2149.2013.00422.X>
- Taguchi, T., Katanosaka, K., Yasui, M., Hayashi, K., Yamashita, M., Wakatsuki, K., Kiyama, H., Yamanaka, A., Mizumura, K., 2015. Peripheral and spinal mechanisms of nociception in a rat reserpine-induced pain model. *Pain.* 156, 415–427. <https://doi.org/10.1097/01.J.PAIN.0000460334.49525.5E>
- Thirupathi, A., Silveira, P., Nesi, R., Pinho, R., 2017. β -Amyrin, a pentacyclic triterpene, exhibits anti-fibrotic, anti-inflammatory, and anti-apoptotic effects on dimethyl nitrosamine–induced hepatic fibrosis in male rats. *Hum. Exp. Toxicol.* 36, 113–122. <https://doi.org/10.1177/0960327116638727>
- Tlacomulco-Flores, L.L., Déciga-Campos, M., González-Trujano, M.E., Carballo-Villalobos, A.I., Pellicer, F., 2020. Antinociceptive effects of *Salvia divinorum* and bioactive salvininorins in experimental pain models in mice. *J. Ethnopharmacol.* 248, 112276. <https://doi.org/10.1016/J.JEP.2019.112276>
- Tolosa Vilella, C., Duñó Ambròs, R., Escoté Llobet, S., 2002. Tricyclic antidepressive drugs: Adverse effects and benefits of its therapeutic drug monitoring. *Med. Clin.*

- (Barc). 119, 620–626. [https://doi.org/10.1016/s0025-7753\(02\)73517-3](https://doi.org/10.1016/s0025-7753(02)73517-3)
- Trescot, A.M., Datta, S., Lee, M., Hans, H., 2008. Opioid pharmacology. *Pain Physician*. 11, 2. <https://doi.org/10.36076/ppj.2008/11/s133>
- Trivellini, A., Lucchesini, M., Maggini, R., Mosadegh, H., Villamarin, T.S.S., Vernieri, P., Mensuali-Sodi, A., Pardossi, A., 2016. Lamiaceae phenols as multifaceted compounds: Bioactivity, industrial prospects and role of “positive-stress.” *Ind. Crops Prod.* 83, 241–254. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.12.039>
- Tsai, D.S., Huang, M.H., Tsai, J.C., Chang, Y.S., Chiu, Y.J., Lin, Y.C., Wu, L.Y., Peng, W.H., 2015. Analgesic and anti-inflammatory activities of *Rosa taiwanensis* Nakai in mice. *J. Med. Food.* 18, 592–600. <https://doi.org/10.1089/jmf.2014.3197>
- Üçeyler, N., Zeller, D., Kahn, A.K., Kewenig, S., Kittel-Schneider, S., Schmid, A., Casanova-Molla, J., Reiners, K., Sommer, C., 2013. Small fibre pathology in patients with fibromyalgia syndrome. *Brain.* 136, 1857–1867. <https://doi.org/10.1093/brain/awt053>
- Urits, I., Peck, J., Orhurhu, M.S., Wolf, J., Patel, R., Orhurhu, V., Kaye, A.D., Viswanath, O., 2019. Off-label antidepressant use for treatment and management of chronic pain: evolving understanding and comprehensive review. *Curr. Pain Headache Rep.* 23, 9. <https://doi.org/10.1007/S11916-019-0803-Z>
- Ustun, O., Sezik, E., 2011. Analgesic activity of *Salvia wiedemannii* Boiss. Used in Turkish folk medicine. *Rec. Nat. Prod.* 5, 328–331. <https://doi.org/10.1055/s-0031-1282811>
- Verano, J., González-Trujano, M.E., Déciga-Campos, M., Ventura-Martínez, R., Pellicer, F., 2013. Ursolic acid from *Agastache mexicana* aerial parts produces antinociceptive activity involving TRPV1 receptors, cGMP and a serotonergic synergism. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 110, 255–264. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2013.07.020>
- Vestri Alvarenga, S., Pierre Gastmans, J., Do Vale Rodrigues, G., Roberto H. Moreno, P., De Paulo Emerenciano, V., 2001. A computer-assisted approach for chemotaxonomic studies - Diterpenes in Lamiaceae. *Phytochemistry.* 56, 583–595. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)00424-6](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)00424-6)

- Villanueva, L., 2009. Diffuse Noxious Inhibitory Control (DNIC) as a tool for exploring dysfunction of endogenous pain modulatory systems. *Pain*. 143, 161–162. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2009.03.003>
- Vinegar, R., Schreiber, W., Hugo, R., 1969. Biphasic development of carrageenin edema in rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 166, 96–103.
- Wallace, D.J., Linker-Israeli, M., Hallegua, D., Silverman, S., Silver, D., Weisman, M.H., 2001. Cytokines play an aetiopathogenetic role in fibromyalgia: A hypothesis and pilot study. *Rheumatology*. 40, 743–749. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/40.7.743>
- Wang, G., Tang, W., Bidigare, R.R., 2005. Terpenoids as therapeutic drugs and pharmaceutical agents, in: Zhang, L., Demian, A.L. (Eds.), *Natural Products: Drug Discovery and Therapeutic Medicine*. Humana Press, pp. 197–227. https://doi.org/10.1007/978-1-59259-976-9_9
- Welsby, P.D., 2008. Who analgesic ladder. *J. R. Coll. Physicians Edinb.* 38, 284. https://doi.org/10.1007/978-3-642-28753-4_102537
- Whittle, B.J.R., 1977. Mechanism underlying gastric mucosal damage induced by indomethacin and bile-salts, and the actions of prostaglandins. *Br. J. Pharmacol.* 60, 455–460. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1977.tb07522.x>
- Wojdyło, A., Oszmiański, J., Czemerys, R., 2007. Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. *Food Chem.* 105, 940–949. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.04.038>
- Wolfe, F., Clauw, D.J., Fitzcharles, M.-A., Goldenberg, D.L., Häuser, W., Katz, R.L., Mease, P.J., Russell, A.S., Russell, I.J., Walitt, B., 2016. 2016 Revisions to the 2010/2011 fibromyalgia diagnostic criteria. *Semin. Arthritis Rheum.* 46, 319–329. <https://doi.org/10.1016/J.SEMARTHTRIT.2016.08.012>
- Wolfe, F., Smythe, H.A., Yunus, M.B., Bennett, R.M., Bombardier, C., Goldenberg, D.L., Tugwell, P., Campbell, S.M., Abeles, M., Clark, P., Fam, A.G., Farber, S.J., Fiechtner, J.J., Michael Franklin, C., Gatter, R.A., Hamaty, D., Lessard, J., Lichtbroun, A.S., Masi, A.T., McCain, G.A., John Reynolds, W., Romano, T.J., Jon Russell, I., Sheon, R.P., 1990. The american college of rheumatology 1990 criteria for the classification of fibromyalgia. *Arthritis Rheum.* 33, 160–172.

<https://doi.org/10.1002/art.1780330203>

- Woolf, C.J., 2011. Central sensitization: Implications for the diagnosis and treatment of pain. *Pain*. 152, S2–S15. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2010.09.030>
- Wu, J.Y., Li, Y., Li, B.L., Wang, Y.G., Cui, W.G., Zhou, W.H., Zhao, X., 2021. Evidence for 5-HT_{1A} receptor-mediated antiallodynic and antihyperalgesic effects of apigenin in mice suffering from mononeuropathy. *Br. J. Pharmacol.* 178, 4005–4025. <https://doi.org/10.1111/BPH.15574>
- Xu, J., Wei, K., Zhang, G., Lei, L., Yang, D., Wang, W., Han, Q., Xia, Y., Bi, Y., Yang, M., Li, M., 2018. Ethnopharmacology, phytochemistry, and pharmacology of Chinese *Salvia* species: A review. *J. Ethnopharmacol.* 225, 18–30. <https://doi.org/10.1016/J.JEP.2018.06.029>
- Yoon, C., Young Wook, Y., Heung Sik, N., Sun Ho, K., Jin Mo, C., 1994. Behavioral signs of ongoing pain and cold allodynia in a rat model of neuropathic pain. *Pain*. 59, 369–376. [https://doi.org/10.1016/0304-3959\(94\)90023-X](https://doi.org/10.1016/0304-3959(94)90023-X)
- Youdim, K.A., Qaiser, M.Z., Begley, D.J., Rice-Evans, C.A., Abbott, N.J., 2004. Flavonoid permeability across an *in situ* model of the blood-brain barrier. *Free Radic. Biol. Med.* 36, 592–604. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2003.11.023>
- Younger, J., Mackey, S., 2009. Fibromyalgia symptoms are reduced by low-dose naltrexone: A pilot study. *Pain Med.* 10, 663–672. <https://doi.org/10.1111/j.1526-4637.2009.00613.x>
- Zhang, Y., Sreekrishna, K., Lin, Y., Huang, L., Eickhoff, D., Degenhardt, C., Xu, T., 2011. Modulation of transient receptor potential (TRP) channels by Chinese herbal extracts. *Phyther. Res.* 25, 1666–1670. <https://doi.org/10.1002/ptr.3427>
- Ziaziaris, W., Munoz, L., 2014. Mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2 in neuroinflammation, heat shock protein 27 phosphorylation, and cell cycle: Role and targeting fadi maged shokry gurgis. *Mol. Pharmacol.* 85, 345–356. <https://doi.org/10.1124/mol.113.090365>



Neo-clerodane diterpenic influence in the antinociceptive and anti-inflammatory properties of *Salvia circinnata* Cav.

Moreno-Pérez Fernando^a, Hernandez-Leon Alberto^a, Valle-Dorado María Guadalupe^a, Cano-Martínez Agustina^c, Narváez-González Fernando^b, Aguirre-Hernández Eva^d, Salgado-Ceballos Hermelinda^e, González-Trujano María Eva^{a,*}

^a Laboratorio de Neurofarmacología de Productos Naturales de La Dirección de Investigaciones en Neurociencias Del Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de La Fuente Muñoz, Ciudad de México, México

^b ISSSTE Hospital Regional General Zaragoza, Ciudad de México, México

^c Departamento de Fisiología, Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez, Ciudad de México, México

^d Laboratorio de Productos Naturales, Departamento de Ecología y Recursos Naturales, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria Coyoacán, 04510, CDMX, México

^e Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Neurológicas, Hospital de Especialidades, Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS, México

ARTICLE INFO

Keywords:
Amarisolide A
Folk medicine
Pain
Salvia amarissima
TRPV1 receptors

ABSTRACT

Ethnopharmacological relevance: Mexico is considered an ancestral center of diversity of *Salvia* species, however many of them lack scientific information. *Salvia circinnata* Cav. (syn. *Salvia amarissima* Ortega) is an endemic species used in traditional medicine to treat disorders attributed to a cold state like anxiety in the central nervous system, as well as gastrointestinal ailments and pain relief.

Aim of the study: To give preclinical evidence about the pharmacological properties of this species by investigating its antinociceptive and anti-inflammatory effects, the chemical nature of at least one metabolite, and a possible mechanism of action and adverse effects, using different experimental models of pain.

Material and methods: Different crude extracts of *Salvia circinnata* Cav. aerial parts were prepared using increasing polarity and evaluated in the formalin test in mice. This screening allowed to select and evaluate an ethyl acetate extract (EtOAc), as the most bioactive extract, and a metabolite. Antinociceptive and anti-inflammatory activities were confirmed using the plantar test and carrageenan-induced edema. The antinociceptive effects of the extracts were compared to that observed with morphine (1 mg/kg), tramadol (20 mg/kg) or indomethacin (20 mg/kg) as reference drugs. Participation of opioids and TRPV1 receptors was investigated, as well as acute toxicity and adverse effects of sedation and gastric damage.

Results: EtOAc (0.1–10 mg/kg) of *S. circinnata* Cav. showed a dose-dependent and significant antinociceptive activity, associated in part with the presence of a neo-clerodane glycoside amarisolide A (0.01–1 mg/kg), in the neurogenic and inflammatory phases of the formalin test. Central action of both treatments was corroborated in the plantar test, whereas anti-inflammatory effects were confirmed with the extract (1 and 10 mg/kg) and amarisolide A (1 mg/kg) in the carrageenan-induced edema test. An opioid mechanism in both treatments, and the TRPV1 receptor modulation in the extract were involved. No acute toxicity and adverse effects were noticed with the extract and pure compound in comparison to the reference drugs.

Conclusion: These results provide preclinical evidence of the ethnopharmacological antinociceptive *S. circinnata* Cav. properties, in which the neo-clerodane diterpene glycoside amarisolide A was partially responsible involving the participation of the opioid receptors, while TRPV1 receptor modulation was implicated in the anti-

Abbreviations: Economic Cooperation and Development, OECD; Ethyl acetate extract, EtOAc; High Performance Liquid Chromatography, HPLC; Maximum possible effect, MPE; Naltrexone, NTX; Non-steroidal anti-inflammatory drugs, NSAIDs; Phosphate Buffer Solution, PBS; Tramadol, TR; Transient receptor vanilloid potential 1, TRPV1; Ultraviolet, UV.

* Corresponding author.

E-mail addresses: mmspoolest@gmail.com (M.-P. Fernando), albertoh-leon@hotmail.com (H.-L. Alberto), lvalle-59@hotmail.com (V.-D. María Guadalupe), cmamx2002@yahoo.com.mx (C.-M. Agustina), drnarvaez@hotmail.com (N.-G. Fernando), eva_aguirre@ciencias.unam.mx (A.-H. Eva), melsalce@yahoo.com (S.-C. Hermelinda), evag@imp.edu.mx (G.-T. María Eva).

<https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.113550>

Received 23 August 2020; Received in revised form 27 October 2020; Accepted 30 October 2020

Available online 3 November 2020

0378-8741/© 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.

inflammatory activity may be because of the presence of other constituents. This information supports the use of this species in folk medicine for pain therapy.

1. Introduction

According to the International Association for the Study of Pain, it is defined as an unpleasant sensory and emotional experience associated with, or resembling that associated with, actual or potential tissue damage (Raja et al., 2020). Pain, mainly in its chronic form, is a common, complex, and distressing problem that has a profound impact on individuals and society (Mills et al., 2019). This worldwide problem affects from 25 to 29% general population; however, it has been reported a prevalence range from 8 to 80%. Those discrepancies are due to methodological controversies regarding the definition of chronicity (Covarrubias-Gómez et al., 2010).

Undesirable effects due to the own analgesic drugs administration are the cause why people feeling pain abandon their treatment, especially in chronic use (Bacchi et al., 2012). Despite the non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) are one of the most widely prescribed medication in the world to alleviate pain and inflammation, they are closely associated to complications in the gastrointestinal, cardiovascular and renal systems (Sostres et al., 2010). Whereas opioid use, both short term and long term, is associated with a high rate of multiple adverse effects, such as sedation, respiratory depression, cough suppression, reduced intestinal motility, nausea, vomiting and urinary retention. Tolerance to the opioid effects and both physical and psychological dependence may also be developed (Duthie and Nimmo, 1987). Thus, finding new therapeutic alternatives for treating pain and inflammatory conditions are an important challenge to increase the quality of life of humanity.

For pain therapy, medicinal plants are a source of raw material to obtain new molecules of pharmacological interest (Krsiak, 1991; Rivera-Arce et al., 2003). For example, the analgesic drugs acetylsalicylic acid (Jack, 1997; Szczeklik, 2006) and morphine (Hudlicky et al., 1995; Krishnamurti and Rao, 2016). Mexico is the main center of diversity and diversification of *Salvia* (Martínez-Gordillo et al., 2013) and it has even served as a source to spread *Salvia* to South America (Jenks and Kim, 2013) used with ethnomedical purposes to alleviate a wide variety of ailments, including those of the central nervous system (Imanshahidi and Hosseinzadeh, 2006; Jenks and Kim, 2013; Hamidpour et al., 2014; Xu et al., 2018). It is the case of *S. circinnata* Cav. (syn. *S. amarissima* Ortega), named as "flor azul" (blue flower), which is attributed to a cold state used as bath (decoction) for a set of symptoms that include muscle ache, pain in a hand or foot (which makes movement difficult), hip pain and back pain (caused by falls, blows or by carrying heavy loads) or some derived from stomach problems. In rheumatism, the symptoms are pain in the bones, tendons and joints of the feet, knee pain, cramps and cold feet (García-Hernández et al., 2015).

Nature of bioactive metabolites for pain therapy is an important point to consider, since alkaloids show high potency making difficult their dosage management because of the risk of adverse effects (Duthie and Nimmo, 1987). Flavonoids are considered safe biomolecules in a wide range of doses, but their potency and efficacy to alleviate pain are moderated (Ferraz et al., 2020). Terpenoids are biomolecules which have demonstrated an interesting pharmacological response with a moderate range of doses and possible scarce adverse effects in the management of pain, for example, some of the neo-clerodane chemical structure (Simón-Arce et al., 2017; Moreno-Pérez et al., 2019; Ortiz-Mendoza et al., 2020; Tlacomulco-Flores et al., 2020).

Despite the great importance that *Salvia circinnata* Cav. has as a medicinal plant widely used in Santiago Huauclilla, Oaxaca and other regions of Mexico in pain relief and inflammatory affections, there is not enough scientific information to corroborate it. In a preliminary study, it was demonstrated its efficacy to reduce abdominal pain (Moreno-Pérez

et al., 2019). However, there is no preclinical evidence of its pharmacological spectrum of activity in another type of nociceptive pain. For this, in the present study, different extracts of increasing polarity were screened in the formalin test to identify the most bioactive fraction and one responsible metabolite. Antinociception at central level and anti-inflammatory activity were confirmed using plantar test and the carrageenan-induced edema and histology analysis, respectively. Common adverse effects observed in clinic analgesic drugs and the participation of opioids and TRPV1 receptors as possible mechanism of action were also explored in the bioactive extract and metabolite of this plant species used in folk medicine to alleviate pain.

2. Materials and methods

2.1. Plant material

S. circinnata Cav. (syn. *Salvia amarissima* Ortega) (Lamiaceae) was collected in August 2018 in the locality of Santiago Huauclilla, Oaxaca in Mexico. A voucher specimen was identified by Taxonomist Dr Martha J. Martínez-Gordillo and deposited in the IMSS Herbarium of Mexico City, Mexico, with the number 16360.

The plant material was dried at room temperature and then finely ground. Then, 50 g of this material was processed by maceration in organic solvents in increasing polarity (150 mL) in order to prepare several fractions with constituents of different chemical nature obtained as crude extracts with a corresponding yield as follows: hexane 0.26 g (0.52%), dichloromethane/methanol 3.63 g (7.26%), ethyl acetate (EtOAc) 2.31 g (4.62%), acetone 2.22 g (4.44%), and methanol 4.88 g (9.76%). These conditions were chosen from previous analysis in the laboratory and those reported by Flores-Bocanegra et al. (2017) and Maldonado et al. (1996). Macerated from exposition to each organic solvent was obtained after 72 h (for three successive times), filtrated and then, the solvent was eliminated using rotatory evaporation in a Büchi R-210 equipment (BUCHI Latinoamérica S. de R.L. de C.V., Mexico, City).

An aqueous extract was also prepared by decoction of dry material (50 g) in boiling water (200 mL) for 10 min. Then, filtered and lyophilized to obtain a brown powder with a yield of 5.13 g (10.26%).

2.2. High performance liquid chromatography (HPLC) analysis

Crude extracts were analyzed using samples of 5 mg each dissolved in methanol (1 mL). Amarisolide A was prepared in a concentration of 1 mg/mL. After filtration in a 0.22 µm (filters GHP, Acrodisc 13, Waters), samples were injected into an equipment UPLC Waters Acquity-H class fitted with a photodiode array detector (UPLC, Acquity Waters, Singapore). Data were processed with an Empower chromatographic software version 3 (Waters, Milford, MA, USA) under the following conditions: volume of injection of 10 µL, column: Symmetry C-18 (150 × 4.6 mm, 5 mm, 100 Å (Waters, Ireland) with thermostat at 35 °C. The mobile phase consisted of acetonitrile/water acidified 0.1% phosphoric acid, v/v. The initial gradient mixture was 70%(A):30%(B). The concentration of solvent B was gradually increased to 100%. Finally, gradient returned to the initial concentrations (70%:30%) in a total time of 12 min at constant flow rate of 0.7 mL/min and a UV detection at 254 nm.

A continuous peak of an abundant metabolite was detected in the chromatographic profile of medium polarity crude extracts, where EtOAc extract was the one showing the major abundance at this peak (Fig. 1). Thus, the EtOAc extract (25 g) was chosen to perform an open column chromatography to isolate and purify the abundant compound.

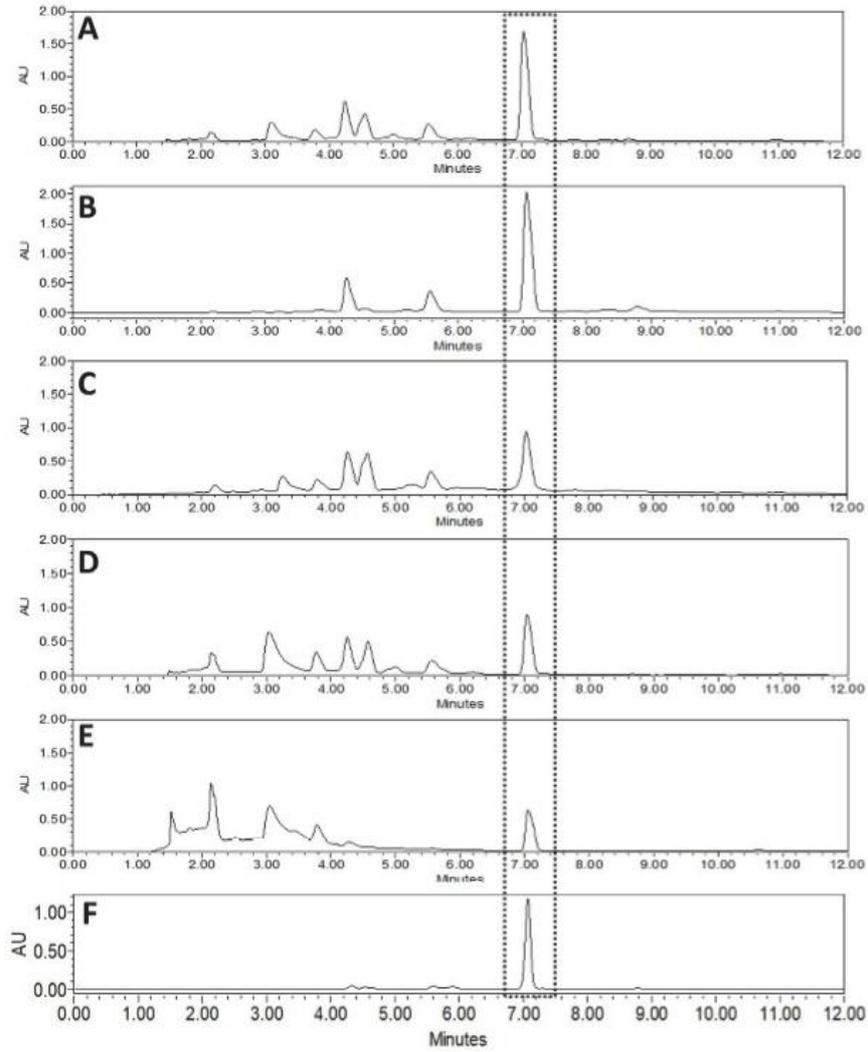


Fig. 1. Chromatographic profile of the crude extracts of *S. cinnata* Cav. showing the presence of amarisolide A. It is compared to the reference standard which peak is observed at the retention time of 7.05 min. Wavelength 256 nm. A) Dichloromethane/methanol, B) ethyl acetate, C) acetone D) methanol, E) aqueous extract, and F) amarisolide A standard.

Two hundred and fifty sub-fractions were obtained from the open column chromatography. Thin-layer chromatography (TLC plates 3.5 × 7 cm in a mobile phase of EtOAc: methanol 95:5) allowed to group similar of them in 8 pools. The abundant metabolite was detected in medium polarity pools as an intense purple spot revealed with anisaldehyde sulfuric acid spray reagent (Wagner and Bladt, 1996). After isolation and purification of white crystals with a yielded of 5.03%, a neo-clerodane diterpene glycoside was identified as amarisolide A compared with a pure standard in the HPLC analysis.

3. Experimental pharmacology

3.1. Animals

Male Swiss-Webster mice (25–30 g) and male Wistar rats (200–230 g) were used in groups of at least 6 animals (only male animals were used in the study essentially to maintain a homogeneous endocrine experimental condition). Animals remained in vivarium in acrylic boxes with access to water and food *ad libitum* with a controlled temperature (22 ± 2 °C) until experiments began. Guidelines established from bioethical committee at local institution (CONBIOETICA-09-CEI-01-20170316), as well as national (NOM-062-ZOO-1999) and international for care and use of laboratory animals were followed. This research was approved also for the research committee in the National Institute of Psychiatry Ramón de la Fuente Muñiz (No. NCI23280.0 and NCI17073.0).

3.2. Drugs and reagents

Indomethacin, naltrexone and carrageenan were purchased from Sigma-Aldrich Co. Tramadol was obtained from Amasa S.A de C.V. laboratories and morphine by Laboratories Pisa SA de CV (Mexico, City). The 3,6-dihydro-3-(trifluoromethyl)-N-[4-[(trifluoromethyl)sulfonyl]-phenyl]-[1(2H),2'-bipyridine]-4-carboxamide (A 784168) was purchased by TOCRIS Bioscience (Bristol) and dissolved in 0.1% DMSO/MilliQ water. The solution for the plethysmometer was BBc-97, Ormano (Italy). All drugs were dissolved in milliQ water. The reference drugs and treatments were administered intraperitoneally (i.p.) in a volume of 0.1 mL/10 g or 100 g of body weight, mouse or rat, respectively. Vehicle group received isotonic saline solution (0.9% NaCl) in the same volume and by the same route of administration. As algogenic agent 1% formalin (Baker) solution was used. Drugs and reagents were freshly prepared the day of the experiments. The organic extracts were resuspended in 0.2% tween 80 in milliQ water or simply water in the case of the aqueous extracts, both evaluated as the corresponding vehicle.

4. Experimental design

4.1. Antinociceptive and anti-inflammatory activity

Formalin test. This method was like that described by Hunskaar et al. (1986). Mice were injected with 20 µL of 1% formalin into the plantar surface of the right hind limb. Immediately, the number of flinches performed with the injected mouse paw were counted as a nociceptive response. This test consisted of two periods of behavior evaluation, an early phase known as central or neurogenic (from 0 to 10 min), and the late phase described as an inflammatory or central-peripheral stage registered from 10 to 30 min after administration after algogenic agent formalin.

A screening to select the most active extract was done by testing a dosage of 10 mg/kg, i.p. of extracts of *S. circinnata* from different polarity. This dosage was considered as a reference from the preliminary study using an abdominal pain model (Moreno-Pérez et al., 2019). Then, a dose-antinociceptive response analysis in the formalin test was completed with the selected crude extract using doses in logarithmic increase (0.1, 1 and 10 mg/kg, i.p.). Effects on the neurogenic and

inflammatory phases were confirmed in the plantar test and carrageenan-induced edema, respectively.

After chromatographic analysis, the abundant metabolite was purified and identified as a neo-clerodane diterpene glycoside, previously characterized as amarisolide A (Moreno-Pérez et al., 2019). This compound was evaluated at doses of 0.01, 0.1, 0.3 and 1 mg/kg, i.p., in the formalin test. The rationale of this range of doses was to obtain antinociception between 20 and 80% to calculate an effective dose fifty (ED50).

As a possible mechanism of action, a participation of the opioids or TRPV1 receptors in the antinociceptive effects of the EtOAc extract (10 mg/kg, i.p.) and amarisolide A (1 mg/kg, i.p.) was explored in the presence of the antagonists naltrexone (1 mg/kg) or A 784168 (1 mg/kg), which were administered fifteen and 20 min before antinociceptive treatment, respectively.

4.2. Plantar test

To confirm central antinociceptive effect of the EtOAc extract and amarisolide A, nociception was induced by a thermal stimulus using radiant heat with the Hargreaves apparatus (Ugo Basile, model 37370-001) (Hargreaves et al., 1988). The stimulus was a beam emitted by a calorific source with an intensity of 60 Hz with a cutting time of 20 s to avoid tissue damage in the right hind limb. This test was repeated 3 times with a space of 3 min between each measurement. Data were expressed as the percentage of the maximum possible effect (MPE%) comparing treatment (Tx) vs vehicle (veh) and calculated as follows:

$$\text{MPE}\% = (\text{Tx latency} - \text{Veh latency}) / (\text{maximum cutting time} - \text{Veh latency}) \times 100$$

4.3. Carrageenan-induced edema test

In order to corroborate an anti-inflammatory activity, as suggested by data from the second phase of the formalin test, the effect of the extract (1 and 10 mg/kg, i.p.) and amarisolide A (0.1 and 1 mg/kg, i.p.) was evaluated in the edema induced by subplantar injection of 50 µL of 1% carrageenan into the right hind limb of rats. Edema was expressed as the increase in the volume of the limb (mL) after the carrageenan injection. It was measured by registering the volume displacement produced by the immersion of the inflamed rat paw in a plethysmometer (Ugo-Basile, Italy). This test is typically used to follow the evolution of the inflammatory response. For this, the baseline value was taken immediately before the carrageenan injection. Then, edema volume was registered every 30 min for a period of 4 h. Finally, a register was done 24 h after the administration of carrageenan. Once the carrageenan test was concluded, animals were euthanized to obtain their stomachs to gastric damage observation, and both posterior extremities for histological analysis.

4.4. Histological analysis

After the carrageenan test, all animals were euthanized to dissect the left and right hind-limbs, which were washed with phosphate buffered saline (PBS) to remove excess fat and connective tissues. All samples were fixed in neutral buffered 4% formaldehyde solution. After 5 days, the excess formaldehyde solution was rinsed with PBS and the skin and bone were removed from the hind-limbs. Then, they were cryoprotected with 30% sucrose for three days. After that, samples Tissue-Tek®-embedded were frozen to obtain 20 µm thick sections using a Kede cryostat (Kedee KD-2950). Masson's trichrome staining was performed following the commercial kit instructions (Hycel, Guadalajara, México). Each slide was then examined with a Leica microscope (Leica DM 1000LED, Wetzlar, Germany) and qualitative analyzed with Leica Microsystems Framework v4.7 software (Leica, Wetzlar, Germany).

Images were taken randomly in each slide under a $\times 20$ magnification.

5. Adverse effects and toxicity

5.1. Sedative effects

Sedation is an adverse effect commonly observed in the depressant activity produced by opioid analgesics. Therefore, ambulatory activity of mice was evaluated 30 min after the EtOAc extract or amarisolide A administration using the open field test. For this, mice were individually placed into a box divided in 12 squares (10 cm \times 10 cm) to register the number of squares explored by each animal in a period of 2 min. After this test, animals were placed into an acrylic cylinder to count number of lifts showed on the hind limbs for a period of 5 min (Hiller and Zetler, 1996). The significant decrease in the explorative activity was an indicative of sedative effect.

5.2. Gastric damage

After each stomach was dissected, they were filled with 10 mL of 10% formalin and fixed for 10 min. Then, each stomach was opened by the greater curvature and washed to remove residues. Finally, the stomachs were scanned to observe possible gastric lesions and compared to those produced by indomethacin, a NSAID reference (Whittle, 1977).

5.3. Acute toxicity

To know the toxic dose of the EtOAc extract, mice were treated with a maximal dosage of 2000 mg/kg, i.p. according to the indication of the Organization for Economic Cooperation and Development (OECD, 2001). If 100% of animals died at a dosage of 2000 mg/kg, lower doses should be explored at 1000, 100 or 10 mg/kg, i.p. using a minimal number of mice according to the method described by Lorke (1983). Mice surviving in each dose were kept under observation for the following 14 days. Both, weight and signs like ambulatory activity were registered. At the end of the period of observation, mice were euthanized for macroscopic evaluation. The median lethal dose (LD50) is calculated with the geometric average of doses producing 0% and 100% of death (Lorke, 1983).

5.4. Statistical analysis

Data are expressed as the mean \pm S.E.M. of six repetitions. Data from the temporal course curves were evaluated by a two-way analysis of variance (ANOVA) followed by post-hoc Tukey's *t*-test. The area under the curve (AUC) was calculated by the trapezoidal method to build the dose-response graphics. These data were analyzed by a one-way ANOVA followed by post-hoc Dunnett's test or Tukey's test. Statistical analysis was done using GraphPad Prism version 8.0.2 for Windows (GraphPad Software INC, La Jolla, CA, USA). A $p < 0.05$ was considered to declare significant difference.

6. Results

6.1. Presence of amarisolide A in the crude extracts

In Fig. 1, the peak of amarisolide A is depicted in the chromatographic profile as the common and most abundant metabolite observed in the retention time of 7.05 min at wavelength 256 nm (Fig. 1).

Antinociceptive effects of *S. circinnata* Cav. crude extracts in the neurogenic and inflammatory phases of the formalin test.

In the preliminary screening using 1% formalin intraplantar, the temporal course curves allowed to identify that all extracts of different polarity of *S. circinnata* significantly decreased nociception from the first minute of the neurogenic phase and in the entire period of the inflammatory phase. However, EtOAc extract was the most active among

all the extracts evaluated (Fig. 2A, Treatment F8,50 = 126.10, $p < 0.0001$; Time F2,98,149 = 75.93, $p < 0.001$; Interaction F48,300 = 6.79, $p < 0.0001$).

Nociception calculated as an area under the curve (AUC) from the temporal course curves allowed to describe and compare the significant reduction in this response in the presence of the EtOAc extract in comparison to all the extracts and reference drugs. As observed in Fig. 2B, EtOAc extract resembled the antinociceptive effect of the reference drug morphine (1 mg/kg) in the neurogenic phase (F8,50 = 18.62, $p < 0.0001$) and tramadol and the aqueous extract (AQ10) in the inflammatory phase (Fig. 2C, F8,50 = 77.63, $p < 0.0001$).

Based on the comparative screening, the EtOAc extract was selected as the most active to build its dose-response plot using doses of 0.1, 1 and 10 mg/kg, i.p. Whereas, the identified abundant metabolite amarisolide A was evaluated at doses from 0.01 to 1 mg/kg, i.p. in a logarithmic increase. The extract produced a dose-dependent response with an ED50 = 0.77 mg/kg, i.p. and statistical significance from 0.1 mg/kg to reach a maximal inhibition at a dosage of 10 mg/kg, i.p., in both neurogenic (Fig. 3A, F4,33 = 21.15, $p < 0.0001$) and inflammatory (Fig. 3B, F4,33 = 65.92, $p < 0.0001$) phases of the formalin test. Amarisolide A at a dosage of 0.3 and 1 mg/kg produced the same significant response in the neurogenic phase ($p < 0.0001$) (Fig. 3C, F7,41 = 6.93, $p < 0.0001$). While, better effect of amarisolide A was obtained in the inflammatory phase (Fig. 3D, F7,41 = 16.96, $p < 0.0001$). A significant response was observed from doses of 0.01 and 0.1 mg/kg ($p < 0.05$) that increased in a dose-dependent manner when doses of 0.3 and 1.0 mg/kg, i.p. were tested ($p < 0.0001$). These responses resembled the effect of morphine (1 mg/kg, i.p.) (Fig. 3D).

Opioid and TRPV1 receptors involvement in the antinociceptive effects of *S. circinnata* Cav. and amarisolide A in the formalin test.

Antinociceptive effect of morphine was avoided in the presence of the opioid antagonist naltrexone, whereas naltrexone alone did not modify the formalin-induced nociception in any phases (Fig. 4A and B, respectively). In contrast, the TRPV1 antagonist A 784168 *per se* produced slight antinociceptive effect only in the neurogenic phase. The antinociceptive effects of the EtOAc extract (10 mg/kg, i.p.) in the neurogenic phase was partially avoided in the presence of both naltrexone and A 784168 (Fig. 4A, F5,34 = 9.37, $p < 0.001$). Whereas in the case of amarisolide A, its antinociceptive effect was not modified in this phase (Fig. 4A). Regarding the inflammatory phase, naltrexone, but not A 784168, partially decreased the antinociceptive effect of both the EtOAc extract and amarisolide A (Fig. 4B, F5,34 = 18.40, $p < 0.0001$).

6.2. Antinociceptive effect in the plantar test

A central action in the antinociceptive effect of the EtOAc extract and amarisolide A was corroborated using the plantar test in rats. A significant antinociceptive response was registered as maximal possible effect (MPE%) using the extract (1 and 10 mg/kg, i.p.) and amarisolide A (0.1 and 1 mg/kg, i.p.) to obtain a response of $22.63 \pm 5\%$ and $25.24 \pm 5.34\%$ or $28.19 \pm 5.63\%$ and $65.98 \pm 8.86\%$, respectively. These effects were similar, or even better in the case of 1 mg/kg of amarisolide A, to that observed with indomethacin (20 mg/kg, i.p.) in comparison to the vehicle group (Fig. 5, F5,30 = 12.83, $p < 0.0001$).

6.3. Carrageenan-induced inflammation test

The EtOAc extract at a dosage of 1 mg/kg, i.p., did not modify the inflammatory response induced in the presence of carrageenan in the first 4 h of observation. In contrast, a significant diminution in inflammation was reached at this dosage after 24 h (Fig. 6). When dosage of the extract was increased at 10 mg/kg, i.p., it showed significant diminution in the inflammation response from the first 2 h. This significant effect remained until the last register at 24 h resembling that obtained with indomethacin (20 mg/kg, i.p.) (Fig. 6). The significant anti-inflammatory effect of the reference drug began from the early 90 min

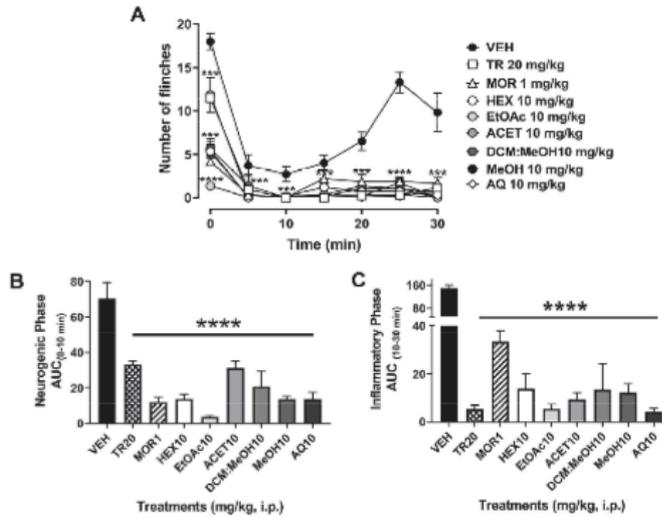


Fig. 2. Temporal course curves of the antinociceptive effects of the several *S. circinnata* Cav. crude extracts (10 mg/kg, i.p.) after 1% formalin test in mice (A). Data are expressed as the mean \pm S.E.M. of six repetitions. Two-way repeated measures ANOVA followed by post-hoc Tukey's test. ****p < 0.001, *****p < 0.0001 for six repetitions. Antinociceptive response of the reference drugs, morphine (MOR, 1 mg/kg, i.p.) and tramadol (TR20, 20 mg/kg, i.p.), as well as the *S. circinnata* Cav. crude extracts (10 mg/kg, i.p.) is expressed as the neurogenic (AUC0-10 min) (B) and inflammatory (AUC10-30 min) (C) phases of the 1% formalin test in mice. One-way ANOVA followed by Dunnett's test. ****p < 0.0001 for six repetitions. Extracts of *S. circinnata* Cav. were obtained in increasing polarity with hexane (HEX), ethyl acetate (EtOAc), a mixture dichloromethane/methanol (DCM:M), acetone (ACET) and methanol (MeOH), even as an aqueous (AQ) extract, and compared to the vehicle group (VEH).

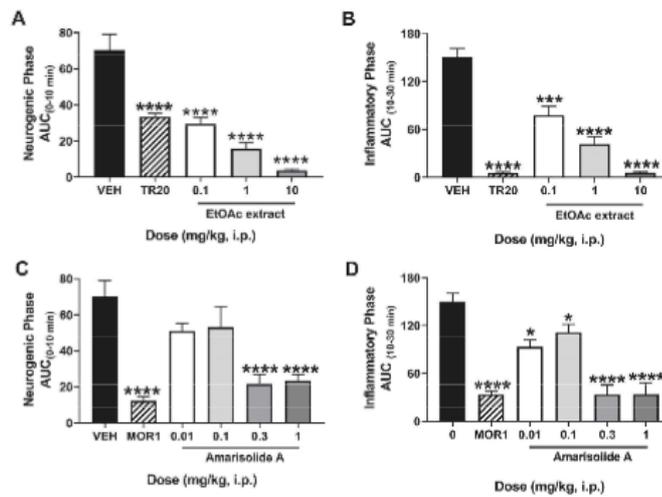


Fig. 3. Antinociceptive effects of the reference drugs morphine (MOR, 1 mg/kg, i.p.) and different doses of the ethyl acetate extract (EtOAc, 0.1–10 mg/kg, i.p.) and amarisolide A (0.01–1 mg/kg, i.p.) expressed as the neurogenic (AUC0-10 min, A and C, respectively) and inflammatory (AUC10-30 min, B and D, respectively) phases of the 1% formalin test in mice. Data are expressed as the mean \pm S.E.M. of six repetitions. One-way ANOVA followed by Dunnett's test. *p < 0.05, ***p < 0.001, *****p < 0.0001.

after carrageenan injection (Fig. 6). In the case of amarisolide A, a dosage of 0.1 mg/kg did not produce effect in the entire period of evaluation (Fig. 6). However, its dosage of 1 mg/kg showed a significant response after 24 h of treatment and carrageenan administration (Fig. 6, Treatment F5,30 = 11.21, p < 0.0001; Time F3,30,99.05 = 77.13, p < 0.0001; Interaction F40,240 = 3.85, p < 0.0001).

6.4. Histological analysis

Microphotographs in Fig. 7A showed the muscle fibers of left and right hind-limbs of rats receiving intraplantar injection of carrageenan. Left hind limbs were used as control group (without inflammation), in which it is possible to notice the intact muscle fibers. In contrast, on the

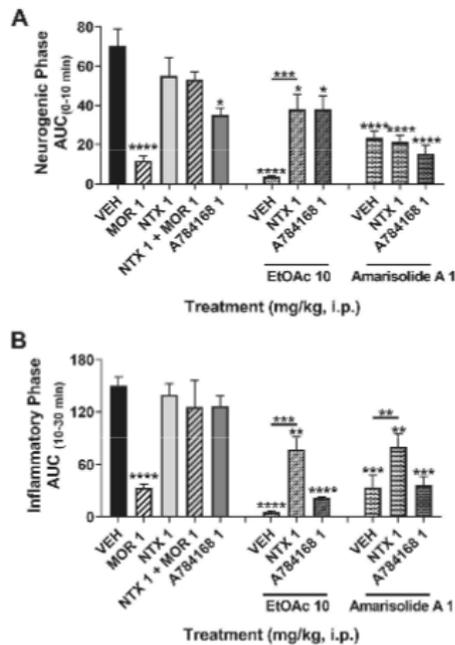


Fig. 4. Antinociceptive effects expressed as neurogenic (AUC0-10 min) (A) and inflammatory (AUC10-30 min) (B) phases of the 1% formalin in mice receiving vehicle (VEH, I.p.), morphine (MOR, 1 mg/kg), naltrexone (NTX, 1 mg/kg), A 784168 (TRPV1, 1 mg/kg) alone and in the presence of the *S. circinnata* Cav. ethyl acetate extract (EtOAc, 10 mg/kg) or amarisolide A (1 mg/kg). Data are expressed as the mean \pm S.E.M. of six repetitions. One-way ANOVA followed by post-hoc Dunnett's test. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

right hind-limbs obtained from rats injected with the algogenic agent to produce edema, atrophic muscle fibers were observed in different extents due to the excessive collagen proliferation. Major atrophy in muscle fibers was noticed in rats receiving vehicle and carrageenan, this inflammatory damage was reduced in the presence of indomethacin showing a preservation of the muscular fibers, reduced edema and no cell infiltration. In a similar manner, both doses of *S. circinnata* Cav. EtOAc extract in a dose-dependent fashion (1 and 10 mg/kg, i.p.) inhibited tissue damage reducing edema and cell infiltration induced by carrageenan injection (Fig. 7A). Similar effect was observed in the case of amarisolide A at a dosage of 1 mg/kg, i.p., where muscular fibers were observed more preserved with reduced edema, but cell infiltration remained at 24 h of the evaluation. No changes were obtained with a dosage of 0.1 mg/kg (Fig. 7A).

7. Adverse effects and acute toxicity

7.1. Sedative evaluation for the EtOAc extract and amarisolide A

Ambulatory activity of mice administrated with the ethyl acetate extract and amarisolide A did not show significant differences in comparison to animals receiving vehicle as evaluated in the open-field and cylinder exploration (data not showed).

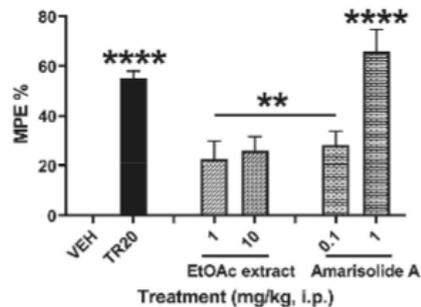


Fig. 5. Antinociceptive effects of the ethyl acetate extract (EtOAc, 1 and 10 mg/kg, i.p.), amarisolide A (0.1 and 1 mg/kg, i.p.) or tramadol (TR, 20 mg/kg, i.p.) expressed as the percentage of maximal possible effect (MPE%) in comparison to the vehicle (VEH) group in the plantar test in rats. Data are expressed as the mean \pm S.E.M. of six repetitions. One-way ANOVA followed by post-hoc Dunnett's test. ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$.

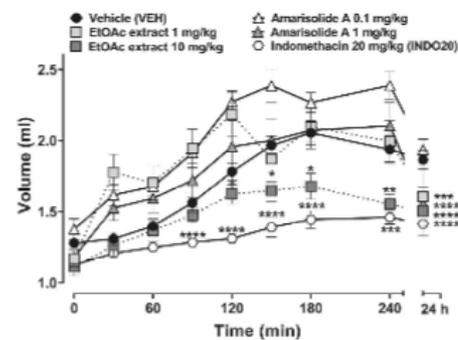


Fig. 6. Temporal course curves (TCC) of the inflammatory response induced in the presence of carrageenan show the effect of the *S. circinnata* Cav. ethyl acetate extract (EtOAc, 1 and 10 mg/kg, i.p.), amarisolide A (0.1 and 1 mg/kg, i.p.) and indomethacin (INDO, 20 mg/kg, i.p.) in comparison to the vehicle group. Data show the volume (mL) of the inflamed paw evaluated each 30 min in a period of 4 h, with a final register at 24 h after carrageenan administration. Data from TCC were analyzed by two-way repeated-measures ANOVA followed by post-hoc Tukey's multiple comparisons. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ for six repetitions. VEH = vehicle.

7.2. Gastric damage

After macroscopic evaluation, it was observed that stomachs from animals receiving the reference NSAID drug indomethacin showed typical hemorrhagic ulcers (7B-a). Whereas, gastric tissue obtained from mice receiving the ethyl acetate extract (1 and 10 mg/kg, Fig. 7B and c and 7B-d) or amarisolide A (0.1 and 1 mg/kg, Fig. 7B-e and 7B-f) did not show any presence of gastric damage that resembled the tissue obtained from vehicle group (Fig. 7B-f).

7.3. Acute toxicity

The acute toxicity was explored using the Lorke method (1983) to

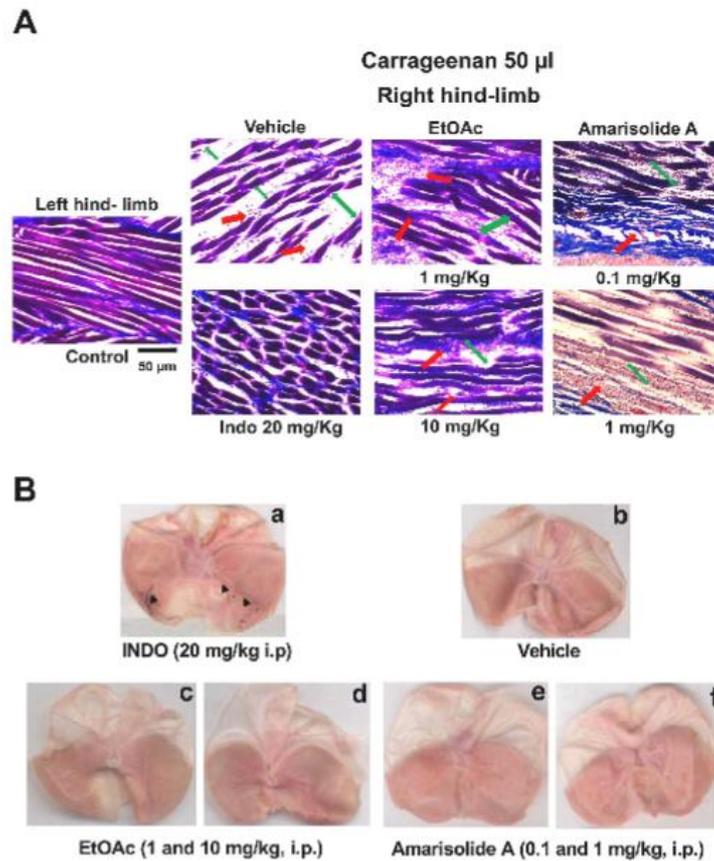


Fig. 7. Microphotographs of anti-inflammatory effects of the *S. circinnata* Cav. ethyl acetate extract (1 and 10 mg/kg, i.p.), amarisolide A (0.1 and 1 mg/kg, i.p.) and the reference drug indomethacin (INDO, 20 mg/kg, i.p.) compared to the vehicle in the histological analysis after carrageenan-induced edema in the rat right hind-limb (A). Notice that red arrows indicate cell infiltrate and green arrows show the atrophic muscle fibers. A representative microphotograph of an intact left hind-limb shows the non-inflamed tissue taken as control. Microphotographs showed the presence of hemorrhagic ulcers induced by indomethacin (20 mg/kg, i.p.) (B-a). In contrast to the absence of gastric damage in stomachs dissected from mice receiving vehicle (B-b), *S. circinnata* Cav. ethyl acetate extract (1 and 10 mg/kg, i.p., B-c and B-d) or amarisolide A (0.1 and 1 mg/kg, B-e and B-f). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

calculate a lethal fifty dose major to 2000 mg/kg, without affection in the weight nor macroscopic tissue changes in mice.

8. Discussion

In a preliminary study, the analgesic properties of *S. circinnata* Cav. were explored using an abdominal pain model (Moreno-Pérez et al., 2019). In the present study, we extended the knowledge of the antinociceptive spectrum of activity of *S. circinnata* Cav. and the neo-clerodane diterpene glycoside amarisolide A using different nociceptive and inflammatory pain models reinforcing central and

peripheral actions. Since mechanism of action for the *S. circinnata* Cav. antinociceptive effects has not been previously reported, in this study, it was explored the participation of opioids and TRPV1 receptors as targets for pain therapy (Lee et al., 2019).

A significant antinociceptive effect of this species was observed in several extracts obtained from different polarity. However, major activity was showed in the EtOAc extract that also demonstrated major presence of amarisolide A in the chromatographic profile. Antinociceptive activity of the medium polar extract of *S. circinnata* Cav. agreed with other reports of *Salvia* species (Jenks and Kim, 2013). *S. aegyptiaca* acetone extract (250–2000 mg/kg) (Al-Yousuf et al., 2002)

and *S. officinalis* butanol extract (10–316 mg/kg) showed dose-dependent antinociceptive effect in both phases of the formalin test (Qnais et al., 2010). Whereas, a chloroform extract from *S. wiedemannii* aerial parts produced antinociceptive effects in the tail-flick and writhing tests in mice (Ustun and Sezik, 2011).

Terpenic nature of several constituents has been involved in the antinociceptive effects of *Salvia* species, such as β -amirin, carnosol, oleanolic acid and ursolic acid already studied in different pain models (Baricevic et al., 2001; McCurdy et al., 2006; Rodrigues et al., 2012; Park et al., 2013; Nile et al., 2016; Arranz et al., 2015; Thirupathi et al., 2017). It is important to mention that neo-clerodane terpenes have shown potential antinociceptive activity (Li et al., 2016), for example salvinorin A (Simón-Arceo et al., 2017; Tlacumulco-Flores et al., 2020), 7-keto-neoclerodan-3,13-dien-18,19:15,16-diolide diterpene (Ortiz-Mendoza et al., 2020) or amarisolide A. These have required minimal doses to produce central analgesic effect like some alkaloids. However, alkaloids are potent analgesics but associated with adverse effects. All these data allow to know the influence of constituents of terpenic nature in the curative effects of *Salvia* species for pain affections.

Mechanism of action for the *S. circinnata* Cav. antinociceptive effects has not been previously reported. Opioidergic neural circuit is one of the most important pathways involved in the modulation of descending nociception and target of natural products (Hernandez-Leon et al., 2016). In this study, a selective blocker of opioid receptors produced partial inhibition of the antinociceptive effect of the EtOAc extract and amarisolide A. Participation of opioid neurotransmission in the antinociceptive effects of medium polar extracts of *Salvia* species has been previously reported, such as in the case of *S. officinalis* (Qnais et al., 2010) and *S. divinorum* (Tlacumulco-Flores et al., 2020). In the antinociceptive effect of *S. divinorum* there was also an involvement of a neo-clerodane terpenoid like salvinorin A (Lamb et al., 2012; Simón-Arceo et al., 2017; Tlacumulco-Flores et al., 2020).

Regarding TRPV1 receptor, it is a relevant therapeutic target involved in nociception expressed in primary afferents (Immke and Gavva, 2006). TRPV1 receptors activation also sends an efferent signal at peripheral terminal via secretion of inflammatory agents, causing local neurogenic inflammation with vasodilation and edema which leads to increased capillary permeability (Julius, 2013). In this study, A 784168 produced antinociceptive response *per se* in the neurogenic phase of formalin reinforcing its action as a potent and selective TRPV1 receptor antagonist that possesses good brain penetration (Cui et al., 2006). Its presence partially avoided the antinociceptive effects of the EtOAc extract but not those of amarisolide A, remaining its own antinociceptive response in the neurogenic phase. These results suggest participation of this receptor in the central effect of the EtOAc extract, where amarisolide A is an important bioactive compound of *S. circinnata* Cav. but not the unique responsible to its antinociceptive activity. Thus, several mediators can be involved in its pharmacological effect at central and peripheral levels to alleviate pain.

It was noticed a faster antinociceptive response of treatments in the formalin test in contrast to a delay of almost 2 h in the carrageenan edema. It depended on the kind of algogenic substance inducing inflammatory response, since 1% formalin produces immediate and significant reduction of nociceptive threshold from the first minutes (0–10 min) by central influence and in the following 60 min involving a peripheral action of mediators (Hunskar et al., 1986). Whereas, carrageenan produces a weak and gradual diminution in the nociceptive threshold becoming significant at 120 min, with a maximal response around 5 h post-injection (Morris, 2003). Carrageenan-induced edema by exudation of fluid and plasma proteins and accumulation of mainly neutrophilic granulocytes at the inflammatory site (Crunkhorn and Meacock, 1971). It strongly stimulates the release of proinflammatory and inflammatory mediators, including bradykinin, histamine, tachykinins, and reactive oxygen and nitrogen species (Morris, 2003). All these factors modify fiber structure showing more space between fibers and cell infiltration as observed by histological analysis in mice

receiving vehicle, but prevented by treatment with the extract, amarisolide A and the reference drug indomethacin. Anti-inflammatory activity of *S. officinalis* (Baricevic et al., 2001; Pierri et al., 2017) and *S. divinorum* (Simón-Arceo et al., 2017) leaf extract reduced the carrageenan-induced paw edema in rats because of the presence of clerodane terpenes. More than one constituent in the *S. circinnata* Cav. extract may participate by different actions to suppress the release of inflammatory mediators and consequently reduce capillary permeability and inhibit extravasation of plasma proteins. Nevertheless, the neo-clerodane terpene amarisolide A plays a relevant role as a partially responsible bioactive metabolite.

It is important to mention that EtOAc extract or amarisolide A at antinociceptive doses did not produce adverse effects such as pronounced sedation, a relevant side-effect for central actions. Neither gastric damage, an adverse effect commonly observed in analgesics like NSAIDs due to inhibition of the prostaglandin production via cyclooxygenase 1 that also disrupts the maintenance of gastrointestinal mucosal integrity (Sostres et al., 2013). This result reinforces curative properties of *S. circinnata* Cav. for gastrointestinal affections in folk medicine (Nambo, 2015; Moreno-Pérez et al., 2019). A LD50 major to 2000 mg/kg places this extract in a category 5 in the globally harmonized system of classification, which labels it as non-toxic chemical product. Previous report of acute toxicity of an infusion from *S. circinnata* reported no dead at 5 g/kg in mice (Flores-Bocanegra et al., 2017). All these data together give evidence of the pharmacological activity for *S. circinnata* Cav. to reduce nociception without significant presence of the common adverse effects recognized for analgesics drugs.

In conclusion, constituents of *S. circinnata* Cav. with medium polar nature, such as a neo-clerodane diterpene glycoside like amarisolide A, participate in its antinociceptive effects through actions at central and peripheral levels with participation of opioids and TRPV1 receptors. Our data contribute to the scientific evidence of the ethnopharmacological knowledge of this species in folk medicine to relieve pain conditions.

Authors contribution

González-Trujano ME contributed to the elaboration of the experimental design, follow-up of the experiments, data analysis, preparation of the manuscript and financial support of the study. Moreno-Pérez F, Hernández-Leon Alberto and Narváez-González F contributed to the elaboration of the *in vivo* pharmacological experiments, data analysis and preparation of the manuscript. Aguirre-Hernández E and Salgado-Ceballos H contributed to the experimental design, follow-up of the experiments, data analysis and preparation of the manuscript. Valledorado María Guadalupe and Cano-Martínez Agustina contributed to the experimental design, follow-up of the histological experiments, data analysis and preparation of the manuscript.

Declaration of competing interest

Authors declared no conflict of interest

Acknowledgments

This research was financed by project CONACYT-256448 approved by the National Council of Science and Technology. Research projects NCI23280.0 and NCI7073.0 from the Ramón de la Fuente Muñiz National Institute of Psychiatry. We thank Guillermo Vázquez Díaz for his technical assistance, Psic. Aide for proof-reading manuscript, and Dr. Edith Sánchez-Jaramillo and Nashiely Yáñez-Recendis for facilities to use the microscopy equipment and having histology microphotographs. Gabriel Fernando Moreno-Pérez thanks Postgraduate in Biological Sciences at the National Autonomous University of Mexico for having received Ph.D. academic training and CONACYT fellowship number 631351.

References

- Al-Youfi, M., Bashir, A., Ali, B., Tanira, M.O., Blunden, G., 2002. Some effects of *Salvia aegyptiaca* L. on the central nervous system in mice. *J. Ethnopharmacol.* 81, 121–127. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(02\)00057-0](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(02)00057-0).
- Arranz, E., Mes, J., Wichers, H.J., Jaime, L., Mendiola, J.A., Reglero, G., Santoyo, S., 2015. Anti-inflammatory activity of the basolateral fraction of Caco-2 cells exposed to a rosemary supercritical extract. *J. Funct. Foods*, 13, 384–390. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.01.015>.
- Bacchi, S., Palumbo, P., Sponta, A., Coppolino, M.F., 2012. Clinical pharmacology of non-steroidal anti-inflammatory drugs: a review. *Antiinflamm. Antiallerg. Agents Med. Chem.* 11, 52–64. <https://doi.org/10.2174/187152112803476255>.
- Barilevic, D., Sosa, S., Della Loggia, R., Tubaro, A., Simonovska, B., Krana, A., Zupanec, A., 2001. Topical anti-inflammatory activity of *Salvia officinalis* L. leaves: the relevance of ursolic acid. *J. Ethnopharmacol.* 75, 125–132. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(00\)00396-2](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(00)00396-2).
- Covarrubias-Gómez, A., Guevara-López, U., Gutiérrez-Salmerón, C., Betancourt-Sandoval, J.A., Córdova-Domínguez, J.A., 2010. Epidemiology of chronic pain in Mexico. *Rev. Mex. Anestesiol.* 33, 207–213.
- Crunkhorn, P., Meacock, S.C.R., 1971. Mediators of the inflammation induced in the rat paw by carrageenin. *Br. J. Pharmacol.* 42, 392–402. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1971.tb01724.x>.
- Cui, M., Honoré, P., Zhong, C., Guvin, D., Mikusa, J., Hernández, G., Chandran, P., Gontoyan, A., Brown, B., Bayburt, E.K., Marsh, K., Bianchi, B., McDonald, H., Niforatos, W., Neelands, T.R., Moreland, R.B., Decker, M.W., Lee, C.H., Sullivan, J. P., Faltynek, C.R., 2006. TRPV1 receptors in the CNS play a key role in broad-spectrum analgesia of TRPV1 antagonists. *J. Neurosci.* 26, 9385–9393. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.1246-06.2006>.
- Duthie, D.J.R., Nimmo, W.S., 1987. Adverse effects of opioid analgesic drugs. *Br. J. Anaesth.* 59, 61–77. <https://doi.org/10.1093/bja/59.1.61>.
- Ferraz, C.R., Carvalho, T.T., Manchope, M.F., Artero, N.A., Rasquejo-Oliveira, F.S., Fattori, V., Casagrande, R., Verri, W.A., 2020. Therapeutic potential of flavonoids in pain and inflammation: mechanisms of action, pre-clinical and clinical data, and pharmaceutical development. *Molecules* 25, 762. <https://doi.org/10.3390/molecules25030762>.
- Flores-Bocanegra, L., González-Andrade, M., Bye, R., Linares, E., Mata, R., 2017. α -Glucosidase inhibitors from *Salvia circinata*. *J. Nat. Prod.* 80, 1584–1593. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.7b00155>.
- García-Hernández, K.Y., Vilhena, H., Rivas-Guerra, M., Aguilar-Contreras, A., 2015. This plant treats that illness? the hot-cold system and therapeutic procedures mediate medicinal plant use in San Miguel Tulancingo, Oaxaca, Mexico. *J. Ethnopharmacol.* 163, 12–30. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2015.01.001>.
- Hamidpour, M., Hamidpour, R., Hamidpour, S., Shahli, M., 2014. Chemistry, pharmacology, and medicinal property of sage (*Salvia*) to prevent and cure illnesses such as obesity, diabetes, depression, dementia, lupus, autism, heart disease, and cancer. *J. Tradit. Complement. Med.* 4, 82–88. <https://doi.org/10.4103/2225-4110.130373>.
- Hargreaves, K., Dubner, R., Brown, F., Flores, C., Joris, J., 1988. A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. *Pain* 32, 77–88. [https://doi.org/10.1016/0304-3959\(88\)90026-7](https://doi.org/10.1016/0304-3959(88)90026-7).
- Hernández-Leon, A., Fernández-Guasti, A., González-Trujano, M.E., 2016. Rutin antinociceptive involves opioidergic mechanism and descending modulation of ventrolateral periaqueductal grey matter in rats. *Eur. J. Pain* 20, 274–283. <https://doi.org/10.1002/ejp.720>.
- Hiller, K.-O., Zetler, G., 1996. Neuropharmacological studies on ethanolic extracts of *Valeriana officinalis* L.: behavioural and anticonvulsant properties. *Phytother. Res.* 10, 145–151. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-1573\(199603\)10:2<145::AID-PTFR793>3.0.CO;2-W](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-1573(199603)10:2<145::AID-PTFR793>3.0.CO;2-W).
- Hudlický, T., Batorá, G., Fearnley, S.P., Gum, A.G., Stabile, M.R., 1995. A historical perspective of morphine syntheses. In: *Studies in Natural Products Chemistry*, pp. 43–154. [https://doi.org/10.1016/S1572-5995\(96\)80025-1](https://doi.org/10.1016/S1572-5995(96)80025-1).
- Hunskar, S., Berge, O.-G., Hole, K., 1986. Dissociation between antinociceptive and anti-inflammatory effects of acetylsalicylic acid and indomethacin in the formalin test. *Pain* 25, 125–132. [https://doi.org/10.1016/0304-3959\(86\)90014-X](https://doi.org/10.1016/0304-3959(86)90014-X).
- Imanishahidi, M., Hosseinzadeh, H., 2006. The pharmacological effects of *Salvia* species on the central nervous system. *Phytother. Res.* 20, 427–437. <https://doi.org/10.1002/ptr.1898>.
- Imme, D.C., Gavva, N.R., 2006. The TRPV1 receptor and nociception. *Semin. Cell Dev. Biol.* 17, 582–591. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2006.09.004>.
- Jack, D.B., 1997. One hundred years of aspirin. *Lancet* 350, 437–439. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(97\)07087-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(97)07087-6).
- Jenks, A.A., Kim, S.C., 2013. Medicinal plant complexes of *Salvia* subgenus *Calospatha*: an ethnobotanical study of new world sages. *J. Ethnopharmacol.* 146, 214–224. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2012.12.035>.
- Julius, D., 2013. TRP channels and pain. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 29, 355–384. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-101011-155833>.
- Krishnamurti, C., Rao, S.C., 2016. The isolation of morphine by Sertarner. *Indian J. Anaesth.* 60, 861–862. <https://doi.org/10.4103/0019-5049.193696>.
- Krstak, M., 1991. Ethnopharmacology: a historical perspective. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 15, 439–445. [https://doi.org/10.1016/S0149-7634\(05\)80124-1](https://doi.org/10.1016/S0149-7634(05)80124-1).
- Lamb, K., Tidgewell, K., Simpson, D.S., Bohn, L.M., Prisinzano, T.E., 2012. Antinociceptive effects of herkinrin, a MOR receptor agonist derived from salvinorin A in the formalin test in rats: new concepts in mu-opioid receptor pharmacology: from a symposium on new concepts in mu-opioid pharmacology. *Drug Alcohol Depend.* 121, 181–188. <https://doi.org/10.1016/j.drugalcdep.2011.10.026>.
- Lee, H., Ahn, S., Ann, J., Ha, H., Yoo, Y.D., Kim, Y.H., Hwang, J.Y., Hur, K.H., Jang, C.G., Pearce, L.V., Esch, T.E., Lewin, N.E., Blumberg, P.M., Lee, J., 2019. Discovery of dual-acting opioid ligand and TRPV1 antagonists as novel therapeutic agents for pain. *Eur. J. Med. Chem.* 182, 111634. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.111634>.
- Li, R., Morris-Natschke, S.L., Lee, K.H., 2016. Clerodane diterpenes: sources, structures, and biological activities. *Nat. Prod. Rep.* 33, 1166–1226. <https://doi.org/10.1039/c5np00137d>.
- Loke, D., 1983. A new approach to practical acute toxicity testing. *Arch. Toxicol.* 54, 275–287. <https://doi.org/10.1007/BF01234480>.
- Maldonado, E., Cárdenas, J., Bojórquez, H., Escamilla, E.M., Ortega, A., 1996. Amarisolid, a neo-clerodane diterpene glycoside from *Salvia amarisoma*. *Phytochemistry* 42, 1105–1108. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(96\)00147-1](https://doi.org/10.1016/0031-9422(96)00147-1).
- Martínez-Gordillo, M., Frago-Martínez, L., García-Peña, M. del R., Montiel, O., 2013. Lamiaceae Genus Mexico, diversity and endemism. *Rev. Mex. Biodivers.* 84, 30–86. <https://doi.org/10.7550/RMB.30158>.
- McCurdy, C.R., Suika, K.J., Smith, G.H., Warnick, J.E., Nieto, M.J., 2006. Antinociceptive profile of salvinorin A, a structurally unique kappa opioid receptor agonist. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 83, 109–113. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2005.12.011>.
- Mills, S.E.E., Nicolson, K.P., Smith, B.H., 2019. Chronic pain: a review of its epidemiology and associated factors in population-based studies. *Br. J. Anaesth.* 123, e273–e283. <https://doi.org/10.1016/j.bja.2019.03.023>.
- Moreno-Ezquer, G.F., González-Trujano, M.E., Martínez-Gordillo, M.J., Miguel-Chávez, R. S., Basurto-Peña, F.A., Dorazo-González, A., Aguirre-Hernández, E., 2019. Amarisolid A and pedalin as bioactive compounds in the antinociceptive effects of *Salvia circinata* (Lamiaceae). *Bol. Soc. Bot. Mex.* 97, 355–365. <https://doi.org/10.17129/botci.2147>.
- Morris, C.J., 2003. Carrageenan-induced paw edema in the rat and mouse. *Methods Mol. Biol.* 11, 70–76. <https://doi.org/10.1385/1-59259-374-7.115>.
- Nambo, C.A., 2015. Ethnobotany of Santiago Huauclilla, Oaxaca and Pharmacological Evaluation of *Zinnia peruviana*. Bachelor Thesis, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico city.
- Nile, S.H., Ko, E.Y., Kim, D.H., Keum, Y.S., 2016. Screening of ferulic acid related compounds as inhibitors of xanthine oxidase and cyclooxygenase-2 with anti-inflammatory activity. *Brazilian J. Pharmacogn.* 26, 50–55. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2015.08.013>.
- OECD, 2001. OECD guideline for testing of chemicals. In: *Acute Oral Toxicity—Fixed Dose Procedure*. OECD. <https://doi.org/10.1787/9789264070943-en>.
- Ortiz-Mendoza, N., Zavala-Ocampo, L.M., Martínez-Gordillo, M.J., González-Trujano, M. E., Peña, F.A.B., Rodríguez, L.J.B., Chávez, J.A.R., Dorazo-González, A., Aguirre-Hernández, E., 2020. Antinociceptive and anxiolytic-like effects of a neo-clerodane diterpene from *Salvia semirata* aerial parts. *Pharm. Biol.* 58, 620–629. <https://doi.org/10.1080/13880209.2020.1784235>.
- Park, S.-H., Sim, Y.-B., Kang, Y.-J., Kim, S.-S., Kim, C.-H., Kim, S.-J., Suh, H.-W., 2013. Mechanisms involved in the antinociceptive effects of orally administered oleonolic acid in the mouse. *Arch. Pharm. Res.* 36, 905–911. <https://doi.org/10.1007/s12272-013-0093-7>.
- Pierré, E.G., Castro, R.C., Vizioli, E.O., Ferreira, C.M.R., Cavalcheiro, J., Tiniñis, A.G., Chin, C.M., Santos, A.G., 2017. Anti-inflammatory action of ethanolic extract and clerodane diterpenes from *Cuscuta sylvestris*. *Brazilian J. Pharmacogn.* 27, 495–501. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2016.12.008>.
- Qutis, E.Y., Abu-Dweyeh, M., Abdulla, F.A., Abdalla, S.S., 2010. The antinociceptive and anti-inflammatory effects of *Salvia officinalis* leaf aqueous and butanol extracts. *Pharm. Biol.* 48, 1149–1156. <https://doi.org/10.3109/13880200903530763>.
- Raja, S.N., Carr, D.B., Cohen, M., Finnerup, N.R., Flor, H., Gibson, S., Keefe, F.J., Mogil, J. S., Ringkamp, M., Shukla, K.A., Song, X.-J., Stevens, B., Sullivan, M.D., Tutelman, P. R., Ushida, T., Väder, K., 2020. The revised international association for the study of pain definition of pain. *Pain* (in press). <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000001939>.
- Rivera-Arce, E., Chávez-Soto, M.A., Gattuso, M., Lozoya-Legorreta, X., 2003. Guava leaf for the treatment of gastrointestinal disorders. *Rev. Fitoterapia* 3, 101–112.
- Rodrigues, M.R.A., Kanazawa, I.K.S., Neves, T.L.M., das Silva, C.F. da, Horst, H., Fazzalatti, M.G., Santos, A.R.S., Baggio, C.H., Werner, M.F.D.P., 2012. Antinociceptive and anti-inflammatory potential of extract and isolated compounds from the leaves of *Salvia officinalis* in mice. *J. Ethnopharmacol.* 139, 519–526. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2011.11.042>.
- Simón-Arce, K., González-Trujano, M.E., Coffeen, U., Fernández-Mas, R., Mercado, F., Almanza, A., Contreras, B., Jaimes, O., Pellicer, F., 2017. Neuropathic and inflammatory antinociceptive effects and electrocortical changes produced by *Salvia divinorum* in rats. *J. Ethnopharmacol.* 206, 115–124. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2017.05.018>.
- Sostres, C., Gargallo, C.J., Arroyo, M.T., Lanás, A., 2010. Adverse effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs, aspirin and coxibs) on upper gastrointestinal tract. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* 24, 121–132. <https://doi.org/10.1016/j.bpg.2009.11.005>.
- Szcekklik, A., 2006. The history of aspirin: the discoveries that changed contemporary medicine. *Paths of Discovery*. Pontifical Academy of Sciences, 18, 175–184.
- Thirupathi, A., Silveira, P., Nest, R., Pinho, R., 2017. β -Amyrin, a pentacyclic triterpene, exhibits anti-fibrotic, anti-inflammatory, and anti-apoptotic effects on dimethyl nitrosamine-induced hepatic fibrosis in male rats. *Hum. Exp. Toxicol.* 36, 113–122. <https://doi.org/10.1177/0960327116638727>.
- Tlacomulco-Flores, L.L., Dérica-Campos, M., González-Trujano, M.E., Carballo-Villalobos, A.L., Pellicer, F., 2020. Antinociceptive effects of *Salvia divinorum* and bioactive salvinorins in experimental pain models in mice. *J. Ethnopharmacol.* 248, 112276. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2019.112276>.

- Ustun, O., Sezik, E., 2011. Analgesic activity of *Salvia wriedemannii* Boiss. Used in Turkish folk medicine. *Record Nat. Prod.* 5, 328–331. <https://doi.org/10.1055/s-0031-1282811>.
- Wagner, H., Bladt, S., 1996. *Plant Drug Analysis, Plant Drug Analysis*. Springer Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-00574-9>.
- Whittle, B.J.R., 1977. Mechanisms underlying gastric mucosal damage induced by indomethacin and bile-salts, and the actions of prostaglandins. *Br. J. Pharmacol.* 60, 455–460. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1977.tb07522.x>.

- Xu, J., Wei, K., Zhang, G., Lei, L., Yang, D., Wang, W., Han, Q., Xia, Y., Bi, Y., Yang, M., Li, M., 2018. Ethnopharmacology, phytochemistry, and pharmacology of Chinese *Salvia* species: a review. *J. Ethnopharmacol.* 225, 18–30. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2018.06.029>.