



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA**

**EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTINOCICEPTIVO DE
LOESELIA MEXICANA (ESPINOSILLA) EN
MODELOS DE DOLOR EN RATONES.**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA**

PRESENTA:

ANDREA BAÑUELOS SÁNCHEZ

DIRECTORA DE TESIS

DRA. ROSA VENTURA MARTÍNEZ

ASESOR TÉCNICO

DRA. GUADALUPE ESTHER ÁNGELES LÓPEZ



Ciudad Universitaria, CD. MX. 2023.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Doctora María Eva González Trujano

VOCAL: Maestra Itzel Susana De la Rosa Lara

SECRETARIO: Doctora Rosa Ventura Martínez

SUPLENTE 1. Doctor Rogelio Gregorio Pereda Miranda

SUPLENTE 2. Doctora Mabel Clara Fragosó Serrano

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LABORATORIO 28 DE DESARROLLO DE MEDICAMENTOS DEL DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA. FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNAM.

DIRECTORA DE TESIS:

Dra. Rosa Ventura Martínez

SUPERVISOR TÉCNICO:

Dra. Guadalupe Esther Ángeles López

SUSTENTANTE:

Andrea Bañuelos Sánchez

Se agradece la beca otorgada a Andrea Bañuelos Sánchez por parte del CONACYT por el desarrollo de diversas actividades como parte del proyecto FOP16-2021-01 con número 000000000319379 aprobado en el marco de la Convocatoria “Ciencia Básica y/o Ciencia de Frontera. Modalidad: Paradigmas y Controversias de la Ciencia 2022”.

NOMBRE DEL PROYECTO: Estudio de la eficacia antinociceptiva de un antagonista del receptor sigma-1 (LMH-2) en un modelo de dolor neuropático inducido por diabetes mellitus.

TABLA DE CONTENIDO

ABREVIATURAS	5
ÍNDICE DE FIGURAS	5
1. INTRODUCCIÓN	9
2. MARCO TEÓRICO	10
2.1 Dolor	10
2.1.1 Clasificación del dolor	10
2.2 Nocicepción	11
2.3 Fármacos utilizados para el tratamiento del dolor	13
2.3.1 Analgésicos antiinflamatorios no esteroideos (AINEs)	13
2.3.2 Opioides	18
2.4 Plantas medicinales para el tratamiento del dolor	21
2.4.1 Loeselia mexicana	22
2.4.1.1 Distribución y hábitat	22
2.4.1.2 Descripción	22
2.4.1.3 Usos medicinales	22
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	24
4. HIPÓTESIS	26
5. OBJETIVOS	26
5.1 Objetivo general	26
5.2 Objetivos particulares	26
6. METODOLOGÍA	26
6.1 Material vegetal	26
6.1.1 Obtención del extracto	26
6.2 Animales de experimentación	27
6.3 Reactivos	28
6.4 Determinación del efecto antinociceptivo del EAE en un modelo de dolor visceral	28
6.5 Determinación del efecto del EAE sobre la motilidad intestinal en ratones	29
6.6 Determinación del efecto antinociceptivo del EAE en el modelo de formalina	30
6.7 Determinación del efecto antinociceptivo del EAE en la placa caliente	32
6.8 Análisis estadístico de datos	34
7. RESULTADOS	35
7.1 Efecto antinociceptivo del extracto acuoso de Loeselia mexicana o “espinosilla” (EAE) en el modelo de writhing	35
7.1.1 Curva dosis respuesta (CDR) del efecto antinociceptivo inducido por el EAE en el modelo de writhing	37
7.2 Efecto del EAE en el modelo de motilidad intestinal en ratones	39
7.3 Efecto antinociceptivo del EAE en la prueba de la formalina en ratones	39
7.4 Efecto antinociceptivo del EAE en el modelo de placa caliente en ratones	42
8. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	43

9. CONCLUSIONES	50
10. PERSPECTIVAS	50
11. REFERENCIAS	50

ABREVIATURAS

AA	4-amino-antipirina
AINEs	Analgésicos antiinflamatorios no esteroideos
ASIC	Siglas del inglés Acid Sensing Ion Channel
CEFOFOR	Centro de Formación Forestal
Cmax	Concentración máxima
COX	Ciclooxigenasa
DE	Dosis Efectiva
EAE	Extracto Acuoso de Espinosilla
FDA	Siglas en inglés de “Administración de Alimentos y Medicamentos”
HR	Humedad Relativa
IASP	Siglas en inglés de “Asociación Internacional para el Estudio del Dolor”
MAA	N-metil-4- aminoantipirina
NA	Noradrenalina
Na ⁺	Ión Sodio
NT	Neurotransmisor
NMDA	N-metil-D-aspartato
OMS	Organización Mundial de Salud
PGs	Prostaglandinas
SNC	Sistema Nervioso Central
SSI	Solución Salina Isotónica
Vd	Volumen de distribución
VEH	Vehículo
5-HT	5-hidroxitriptamina

ÍNDICE DE FIGURAS

		Página
Figura 1	Representación esquemática del proceso de nocicepción, transducción, transmisión, percepción y modulación.	14
Figura 2	Mecanismo de acción de los AINEs.	15
Figura 3	Estructura química de la dipirona o metamizol sódico y sus metabolitos.	17
Figura 4	Estructura química del ketorolaco (sal de trometamina)	18
Figura 5	Estructura química de la morfina y sus metabolitos activos.	20
Figura 6	<i>Loeselia mexicana</i> (Lam.) Brandegees (Polemoniaceae) comúnmente conocida como "espinosilla".	24
Figura 7	Representación de las características que debe presentar un estiramiento abdominal (arqueo de espalda, arrastre del abdomen y el estiramiento de las extremidades traseras).	28
Figura 8	Diseño experimental para la determinación del efecto antinociceptivo de <i>Loeselia mexicana</i> en el modelo de estiramiento abdominal.	29
Figura 9	Medición del recorrido del carbón activado por el intestino delgado, del píloro hasta el ciego. La medición se realizaba con ayuda de una cinta métrica de 70 cm.	30
Figura 10	Diseño experimental para la determinación del efecto del EAE sobre la motilidad intestinal en el modelo de carbón activado.	31
Figura 11	Levantamiento y lamida de la pata derecha, después de la administración de formalina al 3%	32
Figura 12	Diseño experimental para la determinación del efecto antinociceptivo de <i>Loeselia mexicana</i> en el modelo de formalina.	33
Figura 13	Levantamiento de ambas extremidades delanteras, después de colocar al ratón en la placa caliente, con un tiempo de corte de 20 s.	33
Figura 14	Diseño experimental para la determinación del efecto antinociceptivo de EAE en el modelo de placa caliente.	34

Figura 15	Cursos temporales del número de estiramientos abdominales inducidos por ácido acético al 1% en ratones en ausencia (VEH) y en presencia de metamizol sódico (MET, 100 mg/kg) y diferentes dosis del extracto acuoso de <i>Loeselia mexicana</i> o “espinosilla”	37
Figura 16	ABC del número de estiramientos abdominales inducidos por ácido acético en ratones en ausencia (VEH) y en presencia de diferentes dosis del EAE y de MET (100 mg/kg) obtenidos durante 20 minutos.	37
Figura 17	Curva dosis respuesta del efecto antinociceptivo del extracto acuoso de espinosilla (EAE). También se muestra el efecto del VEH y del metamizol (MET, 100 mg/kg). Todos los tratamientos fueron administrados por vía oral (p.o.).	39
Figura 18	Porcentaje del efecto antinociceptivo de la dosis más alta de EAE (316 mg/kg) y del MET (100 mg/kg) utilizado como control positivo.	39
Figura 19	Porcentaje de la motilidad intestinal en ratones con la administración de VEH, del EAE y de LOP utilizada como control positivo.	40
Figura 20	Curso temporal del número de sacudidas de la pata del ratón inducidas por la administración intraplantar de formalina al 3% en presencia del VEH, el EAE y ketorolaco (KET), 5 mg/kg, p.o.), utilizado como control positivo.	41
Figura 21	ABC del número total de sacudidas de la pata derecha trasera del ratón durante la fase neurogénica (A) y la fase inflamatoria (B) en ausencia (VEH) y en presencia del EAE y KET utilizado como control positivo.	42
Figura 22	Curso temporal de la latencia (s) de ratones sobre la placa después de la administración de VEH, el EAE (316 mg/kg, p.o.) o morfina (MOR, 10 mg/kg, i.p.), utilizado como control positivo.	43
Figura 23	ABC de los cursos temporales del efecto del VEH, el EAE o MOR sobre la latencia de los animales sobre la placa caliente.	44

1. INTRODUCCIÓN

El dolor cumple con una función protectora, ya que al percibirlo nos permite alejarnos del estímulo que lo causa, evitando que se genere un daño irreversible al tejido y cumpliendo así una función fisiológica de preservación. Sin embargo, cuando el dolor es inducido por un proceso patológico es necesario conocer el problema que lo causa para tratarlo, al mismo tiempo que se alivia el dolor que se percibe.

Entre los principales fármacos disponibles para el alivio del dolor se encuentran el grupo de los analgésicos antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) y de los opioides. De acuerdo con la Organización Mundial de Salud (OMS), gran parte de la población a nivel mundial también utiliza plantas medicinales para el tratamiento del dolor, ya sean solas o como complemento del tratamiento médico a base de medicamentos convencionales. El uso de las plantas medicinales se basa en la idea de que lo natural es efectivo, tiene un menor costo, es asequible y se tiene el conocimiento empírico de que funciona, además de producir nulos o pocos efectos adversos. Sin embargo, ¿qué tan seguras y eficaces son las plantas medicinales?. Para poder establecer la seguridad y eficacia de estos productos naturales es necesario contar con evidencia de diferentes estudios científicos que ayuden a complementar, apoyar y/o a corroborar la información que se tiene sobre ciertas plantas usadas en la medicina tradicional.

En este trabajo se propuso determinar el efecto antinociceptivo de *Loeselia mexicana*, mejor conocida como espinosilla, la cual es una planta endémica de México utilizada en la medicina tradicional mexicana para el alivio del dolor e inflamación del estómago, fiebres puerperales, disentería, bilis, tifoidea, bronquitis, gripe, ronquera, tos y dolor de cabeza. A pesar de su uso en la medicina tradicional para el alivio del dolor, aún no se cuenta con evidencias científicas de la actividad analgésica de esta especie mexicana. Por lo tanto, para dar el sustento científico del uso de esta planta para el alivio del dolor, en esta tesis se incluyen los resultados de la evaluación del efecto analgésico del extracto acuoso de *Loeselia mexicana* en diferentes modelos de dolor en ratones.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Dolor

La Asociación Internacional para el Estudio del Dolor (IASP, por sus siglas en inglés) define el dolor como “una experiencia sensorial y emocional desagradable asociada o similar a la asociada a una lesión tisular real o potencial” (IASP, 2020). Las características sensitivas y emocionales del dolor varían según el origen, experiencias previas del paciente y el entorno que lo rodea, lo cual lo hace una experiencia subjetiva única para cada paciente. Como se mencionó, el dolor cumple una función protectora para los seres vivos, ya que gracias a él se pueden evitar los estímulos que inducen daño a los tejidos alejándonos de estímulos dañinos. Cuando éste es provocado por una patología, resulta ser la alerta de que algo anda mal en el organismo y permite detectar enfermedades para poder tratarlas. El dolor es uno de los principales motivos de asistencia médica en el mundo y una de las principales causas del uso de analgésicos, ya sea por prescripción médica o adquiridos de manera libre, lo cual puede conducir a un uso descontrolado de estos medicamentos y a la posibilidad de generar efectos adversos.

2.1.1 Clasificación del dolor

El dolor puede clasificarse de diferentes maneras; por su duración, en agudo o crónico; por su intensidad, en leve, moderado o severo; por su patogenia, en neuropático, nociceptivo o psicógeno y; por su localización, en somático o visceral (Díaz, 2005). Debido a que los diferentes modelos utilizados en esta tesis se asocian con la localización del dolor, a continuación se profundiza al respecto:

Dolor somático. El dolor somático es aquel que aparece después de un estímulo potencialmente dañino y que activa a los receptores del dolor (nociceptores) que se encuentran localizados en piel, músculos o articulaciones. El dolor somático generalmente se percibe como un dolor bien localizado y el paciente no tiene problema en ubicarlo y/o describirlo (Dagnino, 1994).

Dolor visceral. El dolor visceral es el resultado de la activación de los nociceptores en los órganos viscerales torácicos, pélvicos o abdominales, suele provenir de distensión, inflamación o isquemia de algunos de estos órganos (Kansal y Hughes, 2016). Este tipo de dolor se describe como difuso y mal localizado, viene acompañado de reflejos motores y autonómicos como vómitos, náuseas y tensión muscular (cólico). Este dolor no siempre está asociado a una lesión visceral; por ejemplo, realizar un corte en el intestino no causa dolor. Mientras que un espasmo en el músculo liso de la vejiga si es doloroso, aunque no haya una lesión con daño al tejido (Cervero, 1999). Esta característica del dolor visceral se debe a las propiedades funcionales de los receptores periféricos de los nervios que inervan ciertos órganos viscerales y el hecho de que ciertas vísceras no están inervadas por receptores sensoriales. El dolor visceral es relativamente frecuente, se sabe que cerca de un 25% de la población mundial lo ha experimentado. Aunque en muchos casos no hay un motivo evidente de la presencia del dolor, a menudo se les denomina trastorno "idiopático" o "funcional" (Grundy y cols., 2019). El dolor visceral se inicia por una sensibilización de los sensores aferentes primarios que inervan la víscera, hiperexcitabilidad de las neuronas ascendentes neuronales que reciben la información sináptica de las vísceras y desregulación de las vías descendentes que modulan la transmisión nociceptiva espinal (Kansal y Hughes, 2016).

2.2 Nocicepción

Como es bien sabido, el dolor no es lo mismo que la nocicepción, ya que el dolor tiene un componente subjetivo muy importante, mientras que la nocicepción no. La nocicepción es el proceso fisiológico neuronal que permite percibir estímulos químicos, mecánicos o térmicos que son interpretados a nivel central como dolorosos. En ese sentido, la percepción de dichos estímulos inicia en los receptores del dolor, también conocidos como "nociceptores", que son fibras nerviosas especializadas en detectar y responder a estímulos nocivos. Éstas se encargan de traducir un estímulo doloroso en una señal eléctrica y transmitirla desde la periferia hasta el sistema nervioso central (SNC) mediante axones. Las fibras nerviosas de los nociceptores se clasifican como A δ y C. Las fibras A δ son fibras mielinizadas, con rápida velocidad de conducción de la

señal nerviosa. Las fibras C no tienen mielina (amielínicas) y tienen una baja velocidad de conducción del impulso nervioso (Pedrajas y Cols., 2008).

La nocicepción involucra varias etapas (transducción, transmisión, percepción y modulación) que se desencadenan de forma consecutiva.

La **transducción** de un estímulo inicia con la conversión del estímulo nociceptivo (mecánico, térmico o químico) a un potencial de acción, a través de la activación de los nociceptores por la liberación de mediadores químicos que sensibilizan o activan a otros receptores presentes en los nociceptores. Luego, la **transmisión** se inicia, la cual involucra la conducción de los potenciales de acción desde la periferia al asta dorsal de la médula espinal a través de las fibras mielinizadas de conducción rápidas (A δ) y no mielinizadas de conducción lenta (C). Hay una participación importante de canales de sodio (Na⁺). Posteriormente, la **percepción del estímulo** se produce, ésta implica la llegada del impulso nervioso desde la médula espinal (donde se realiza la primera sinapsis neuronal) hasta la corteza somatosensorial en el cerebro a través de la vía espinotalámica, donde el cerebro hace conciencia y reconoce como doloroso al estímulo percibido. En esta etapa participa un componente sensitivo discriminativo (cómo, dónde, y cuánto me duele) y una respuesta afectiva emocional asociada. Finalmente, la **modulación** de la respuesta dolorosa se produce, que es la fase en la que se activa una vía analgésica descendente en la que participan diversos compuestos químicos que se encargan de “modular” o “inhibir” el paso de la señal dolorosa en la médula espinal a través de la liberación de serotonina (5-hidroxitriptamina o 5-HT), noradrenalina (NA) y/o los opioides endógenos (Torregrosa, 1994) (Figura 1).

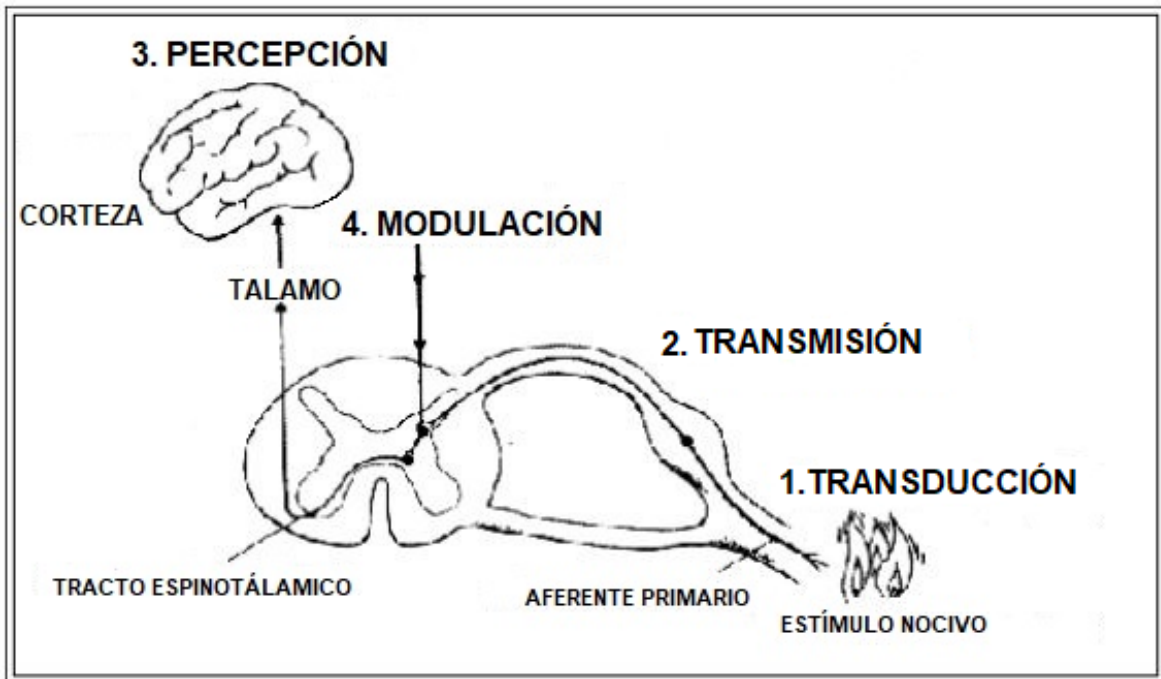


Figura 1. Representación esquemática de las etapas del proceso de nocicepción: transducción, transmisión, percepción y modulación. Modificada de Torregrosa, 1994

2.3 Fármacos utilizados para el tratamiento del dolor

Los fármacos utilizados para el tratamiento del dolor se denominan analgésicos y se clasifican en dos grupos principalmente: AINEs y analgésicos de tipo opioide.

2.3.1 Analgésicos antiinflamatorios no esteroideos (AINEs)

Los AINEs son un amplio grupo de fármacos de estructura química variada que son utilizados para el alivio del dolor leve o moderado. El fármaco prototipo de este grupo es el ácido acetil salicílico, comúnmente conocido como aspirina. Además de su efecto analgésico, éstos inducen un efecto antiinflamatorio y antipirético, pueden aliviar el dolor postoperatorio, odontológico y menstrual, así como el producido por cefaleas y migraña. Dado que estos fármacos pueden adquirirse sin receta médica, a menudo se utilizan para otros tipos de dolor y molestias leves. Sin embargo, su consumo por tiempo prolongado y/o en dosis altas puede llegar a producir efectos adversos severos como irritación gástrica, prolongación de hemorragias debido a su capacidad de inhibir la función de las plaquetas y alteración de la hemodinámica renal en un riñón alterado. El mecanismo de acción de los AINEs consiste en la inhibición de la enzima

ciclooxigenasa (COX) en sus dos isoformas: COX-1 y COX-2; y su consecuente disminución en la síntesis de prostaglandinas (PGs) y tromboxanos a partir del ácido araquidónico, sustrato natural de la COX (Figura 2). Las PGs son importantes mediadores del dolor y la inflamación, por lo que la disminución en su síntesis produce efecto analgésico y antiinflamatorio. Aunque ambas isoformas de la COX tienen un 60% de identidad y catalizan las mismas reacciones, tienen diferencia en su expresión, ya que COX-1 es constitutiva y se expresa en la mayoría de los tejidos. Mientras que la COX-2 se induce en las células inflamatorias cuando estas se activan. También se ha encontrado la expresión de una isoforma que se le llama COX-3, la cual parece ser una variante de la COX-1. En general, la mayoría de los AINES inhiben tanto a la COX-1 como a la COX-2; aún cuando existen fármacos más selectivos para la COX-2 que ya se utilizan en la clínica para una menor incidencia de efectos adversos (Rang y cols., 2008).

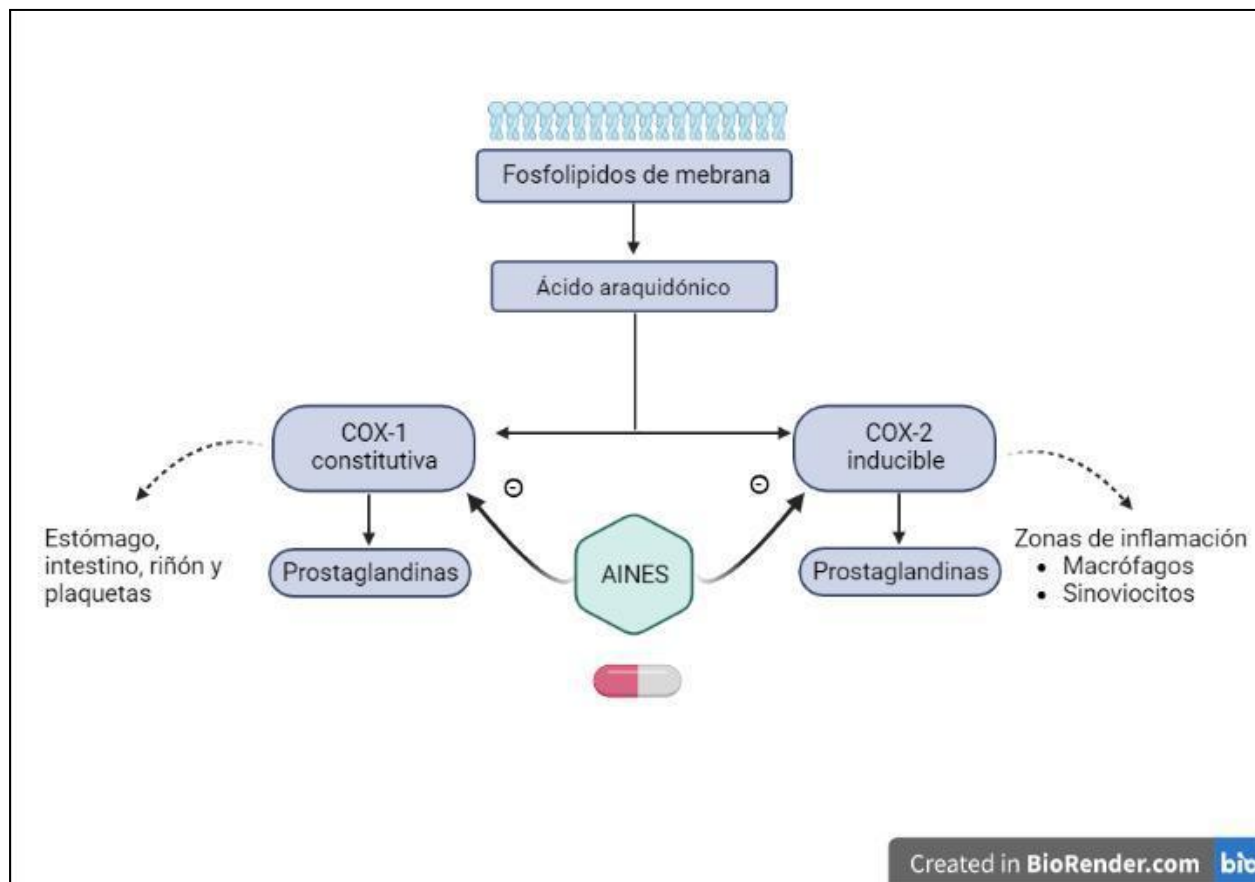


Figura 2. Mecanismo de acción de los AINES. Modificada de *Farmacología Humana 3a Edición*, hecha con *BioRender.com*

Generalmente los efectos adversos producidos por los AINEs están asociados con su capacidad para inhibir a la COX-1. Por ejemplo, pueden provocar alteraciones y lesiones gastrointestinales, ya que muchos de los mecanismos fisiológicos protectores de la mucosa gastroduodenal son dependientes de la síntesis de PGs y su alteración reduce la producción de moco citoprotector, la secreción de bicarbonato y el flujo sanguíneo a la mucosa, causando erosiones y úlceras. Estas lesiones pueden originar complicaciones graves, como perforaciones o hemorragias, debido a que alteran la agregación plaquetaria (dependiente de la síntesis de PGs). También pueden provocar alteraciones a nivel renal, ya que en pacientes donde la perfusión renal está comprometida, los AINEs pueden desencadenar diversas nefropatías de carácter agudo: síndrome nefrótico, nefritis intersticial aguda, necrosis tubular aguda, vasculitis o estados de hipoperfusión renal. La inhibición de la síntesis de PGs a nivel renal origina una disminución en la capacidad para diluir la orina, lo cual conduce a la retención de agua y en menor proporción a la retención de sodio. La principal preocupación sobre la función renal es que con el consumo prolongado y constante de AINEs se induce nefropatía intersticial crónica, que desemboca en una necrosis papilar e insuficiencia renal crónica. Otros de los efectos adversos que se pueden llegar a presentar con el uso prolongado de estos fármacos son fenómenos de hipersensibilidad y reacciones hematológicas, las cuales son menos frecuentes (Flores y cols., 1998).

A continuación se describe un poco más sobre los AINEs que se utilizaron como controles positivos en los experimentos de este estudio, tal como: el metamizol y el ketorolaco.

El **metamizol** es un profármaco que pertenece al grupo de los AINEs y fue sintetizado en 1920, su nombre químico es N-(2,3-dimetil-5-oxo-1-fenil-3-pirazolin-4-yl)-N metilamino metanosulfonato y es usado en la clínica como analgésico, antipirético y antiespasmódico, en administración oral o parenteral (Nikolova y cols., 2012). En 1977 se prohibió su venta en muchos países porque su uso se asoció a la aparición de agranulocitosis, también conocida como granulocitopenia. La agranulocitosis es una afección grave de la sangre que se produce cuando hay un número muy bajo de granulocitos (neutrófilos, eosinófilos y basófilos).

Los granulocitos son una parte importante del sistema inmunológico y ayudan a combatir las infecciones, por lo que una disminución de ellos disminuye la capacidad del organismo de combatir las infecciones. A pesar de esto, este fármaco se continúa utilizando en varios países como México y algunos países europeos como Bulgaria

Dado que el metamizol es un profármaco, después de su administración oral es metabolizado en el tracto gastrointestinal formando su metabolito activo mediante hidrólisis, el N-metil-4- aminoantipirina (MAA, el cual es rápida y completamente absorbido por vía oral. El volumen de distribución del MAA es de 0.61 L/kg y, éste como varios de sus metabolitos han sido detectados en el fluido cerebroespinal debido a su alta lipofilidad. En el hígado, el MAA forma otro metabolito activo que es la 4-amino-antipirina (AA); además, por la vía del citocromo P450 (CYP3A4), forma varios metabolitos inactivos como el 4-formil-aminoantipirina (FAA) (Figura 3). Los metabolitos activos MAA y AA se excretan por la orina y sus tiempos de vida media son de 2 a 3 h y de 4 a 5 h, respectivamente (Nikolova y cols., 2012)

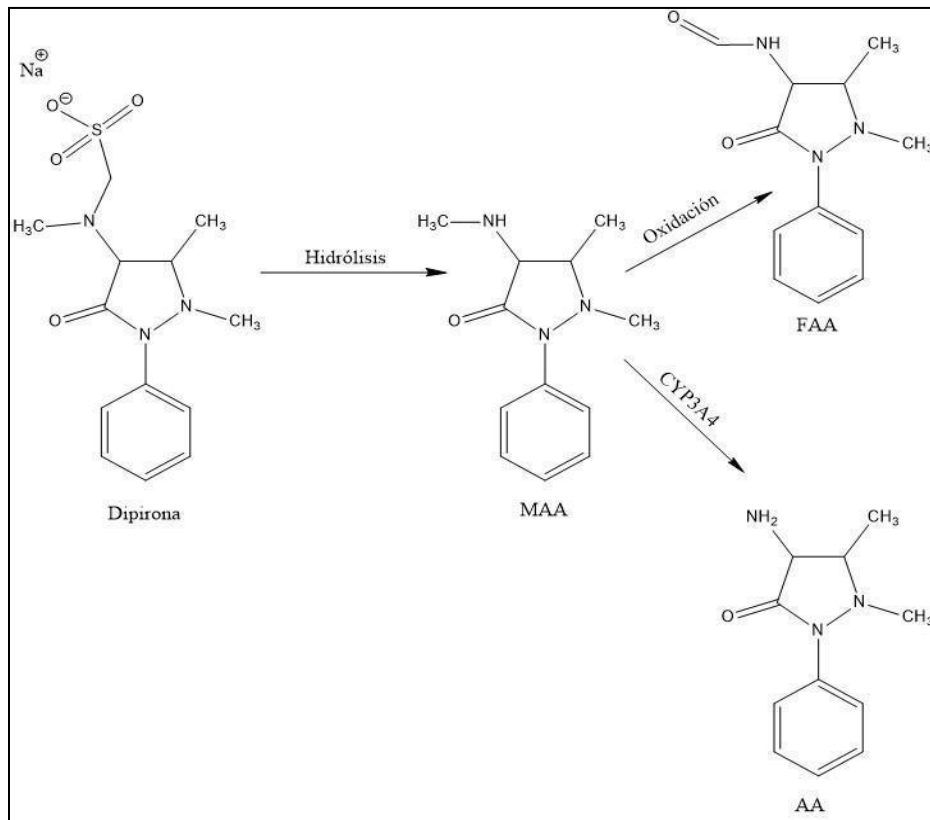


Figura 3. Estructura química de la dipirona o metamizol sódico y sus metabolitos. MAA: 4-metilaminoantipirina, AA: 4-aminoantipirina, FAA: 4-formolaminoantipirina.

Como todos los AINEs, el principal mecanismo de acción del metamizol es la inhibición de la COX-1 y de la COX-2; y su consecuente disminución en la producción de prostaglandinas (PGs) a partir del ácido araquidónico, mediadores importantes que participan en el dolor y la inflamación. La inhibición de la COX deja más cantidad disponible del ácido araquidónico que a través de otras vías metabólicas, puede producir endocannabinoides, moléculas endógenas que producen un efecto antinociceptivo en la médula espinal. No se sabe con certeza si el metamizol actúa solo en el SNC, sólo en la periferia o en ambos. Existen evidencias de que en el efecto analgésico del metamizol están involucrados otros mecanismos como la participación de la vía del óxido nítrico, o la liberación de opioides endógenos (Nikolova y cols., 2012), lo cual explicaría su eficacia analgésica.

El **ketorolaco**, otro fármaco del grupo de los AINEs, contiene un carbono quiral y es comercializado como la mezcla racémica en forma de sal de trometamina (Figura 4). Éste se administra por vía oral, sublingual, intramuscular, intravenosa y como una solución oftálmica (Sinha y cols., 2009), es rápidamente absorbido alcanzando una biodisponibilidad del 90 al 100% por vía oral y de casi el 100% cuando se administra por vía intramuscular. Tiene una alta unión a proteínas plasmáticas (<99%) y un volumen de distribución de 0.1 a 0.3 L/kg, su principal vía metabólica es por hidroxilación y conjugación con el ácido glucurónico en el hígado. La depuración es menor a 30 mL/min y se elimina principalmente por vía renal con un tiempo de vida media de 4 a 6 h (Brocks y Jamali, 1992).

El ketorolaco es un fármaco útil en el manejo del dolor agudo moderado a severo. Las indicaciones aprobadas por la FDA para su uso son: artralgia, mialgia, dolor ocular y dolor postoperatorio (Zavaleta y cols., 2007).

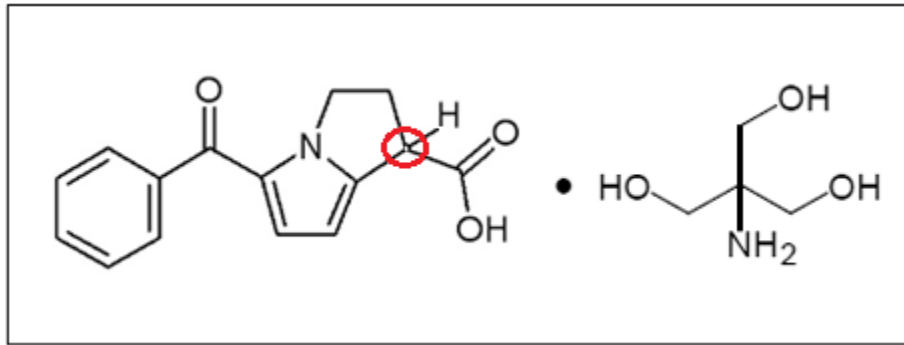


Figura 4. Estructura química del ketorolaco (sal de trometamina) mostrando en un círculo rojo la ubicación del carbono quiral del ketorolaco.

Entre los principales efectos adversos, al igual que otros AINEs, se producen a nivel gastrointestinal, renal y cardiovascular, aunque se ha demostrado una mayor incidencia de daño renal que con otros AINEs, por lo que este fármaco está contraindicado en pacientes con insuficiencia renal crónica (Mahmoodi y cols., StatPearls, 2022, <https://www.statpearls.com/ArticleLibrary/viewarticle/23880>).

2.3.2 Opioides

Otro grupo de fármacos útiles para el control del dolor son los opioides. El término “opioide” es usado para describir a los compuestos naturales, sintéticos y semisintéticos derivados del opio. Estos compuestos son alcaloides que provienen de la amapola (*Papaver somniferum*). El fármaco prototipo de este grupo es la morfina, pero también se encuentra el tramadol, la buprenorfina, la pentazocina, entre otros. Este grupo de fármacos solo producen efecto analgésico, no antiinflamatorio ni antipirético como los anteriores, aunque su ventaja radica en que son útiles en el tratamiento del dolor de alta intensidad. Los efectos farmacológicos de los opioides se deben a su unión selectiva a receptores de opioides que se encuentran en varios sitios del SNC, bloqueando así la transmisión del estímulo doloroso (Kerrigan y Goldberger, 2020).

Los principales receptores opioides localizados en el organismo son μ (mu), κ (kappa) y δ (delta). La activación de los receptores μ son responsables de la analgesia y la depresión a nivel espinal y supraespinal, así como de la depresión respiratoria, miosis, euforia, baja motilidad intestinal, hipotermia, bradicardia, tolerancia y dependencia física. La activación de los receptores κ son responsables de la analgesia

espinal, sedación, miosis, diuresis, insuficiencia respiratoria y depresión. Por último, los receptores δ son responsables de la analgesia espinal, disforia, delirios, alucinaciones, problemas respiratorios y estimulación vasomotora (Kerrigan y Goldberger, 2020).

La morfina, el principal alcaloide del opio (Figura 5), recibió su nombre en honor al dios del sueño, *Morfeo*. Es un fármaco utilizado en varios modelos de dolor como control positivo debido a su gran eficacia en el alivio del dolor intenso, por lo que en este trabajo también se usó como control positivo en el modelo de placa caliente o “hot-plate”. La morfina es el precursor de varios compuestos semisintéticos de tipo opioide que se absorbe rápidamente después de la administración parenteral (intramuscular, subcutánea e intravenosa) pero cuando se administra por vía oral sufre metabolismo del primer paso disminuyendo su biodisponibilidad al 38%. Tiene un volumen de distribución de 2.5 L/kg y una moderada unión a proteínas plasmáticas (35%). Su metabolismo en el hígado forma dos metabolitos activos (morfina-3-glucurónido y morfina-6-glucurónido) (Figura 5). Su excreción es principalmente por vía renal con un tiempo de vida media de eliminación de 1.3 a 6.7 h (Kerrigan y Goldberger, 2020).

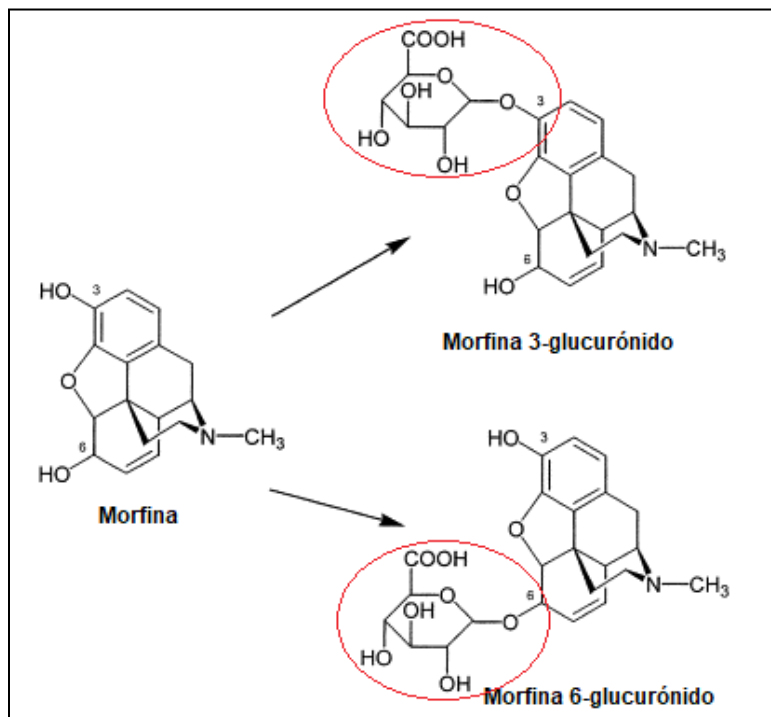


Figura 5. Estructura química de la morfina y sus metabolitos activos.

Actúa como un agonista completo de los receptores μ y un agonista parcial de los receptores κ y δ . Se utiliza en la clínica como analgésico, sobre todo para tratar a pacientes con cáncer, sedación preoperatoria y en obstetricia (Kerrigan y Goldberger, 2020). Sin embargo, su administración produce muchos efectos adversos que limitan de manera importante su uso, tales como: depresión respiratoria por disminuir la respuesta del centro respiratorio del cerebro a los niveles de dióxido de carbono, también induce vasodilatación periférica promoviendo la hipotensión debido a la liberación de histamina y produce constipación por disminución de la motilidad intestinal, entre otros efectos.

Finalmente, la loperamida es un fármaco opioide que fue sintetizado en 1967, diseñado para producir un efecto antidiarreico (Awouters y cols., 1993), su mecanismo de acción consiste en la unión a receptores opiáceos μ de la pared intestinal, inhibiendo la secreción de acetilcolina y prostaglandinas de las neuronas mientéricas y reduciendo el peristaltismo propulsivo. Adicionalmente, la loperamida reduce el volumen fecal, incrementa la viscosidad y la densidad de las heces, y disminuye la secreción de fluidos y de electrolitos aumentando la absorción de agua (Loperamida-Vademécum, 2018). La loperamida es el fármaco prototipo clásicamente utilizado como control positivo para comparar la motilidad intestinal, la cual puede ser asociada a un efecto de constipación o en su caso al efecto antidiarreico de otros tratamientos.

Debido a su alto metabolismo del primer paso, la biodisponibilidad oral de loperamida es del 0.3%, por lo que prácticamente no se absorbe e induce un efecto local a nivel intestinal. La pequeña porción que se llega a absorber se metaboliza en el hígado por la CYP450. El 33% del fármaco se excreta sin cambios a través de las heces y un 2% en la orina. El tiempo de vida media es de 10 h. Dado que prácticamente no se absorbe casi no induce efectos adversos. Sin embargo, se han reportado distensión y/o dolor abdominal, somnolencia, mareos, constipación, xerostomía, náuseas y vómitos (Vademécum Académico de Medicamentos, 2015).

Debido a que los analgésicos de tipo AINE y opioide inducen una amplia gama de efectos adversos, ello limita importantemente su uso a nivel clínico. Muchas veces

se recomienda el uso de las plantas medicinales como tratamiento alternativo o complementario para tratar de evitar los efectos adversos.

2.4 Plantas medicinales para el tratamiento del dolor

A lo largo de la vida, el ser humano ha aprendido a sobrevivir y a beneficiarse del entorno que lo rodea, incluso muchos de nuestros antepasados utilizaron las plantas para poder aliviar o curar alguno de sus dolores o malestares físicos. Este conocimiento se transmite de generación en generación y se le reconoce como parte de la “medicina tradicional”. Por lo tanto, la medicina tradicional es la suma de los conocimientos, capacidades y prácticas basadas en las teorías, creencias y experiencias propias de diferentes culturas; sean explicables o no, utilizadas para mantener la salud y prevenir, diagnosticar, mejorar o tratar enfermedades físicas y mentales (2014 -2023 Estrategia de La OMS Sobre Medicina Tradicional). En ese sentido, México es el quinto país con más biodiversidad en el mundo (Llorente y Ocegueda, 2008), lo que nos lleva a tener una extensa lista de plantas utilizadas en la medicina tradicional. De acuerdo con la Secretaría de Salud, el 90% de la población mexicana ha utilizado alguna de las 4,500 plantas medicinales de México por lo menos una vez en su vida (Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, 2021).

La medicina tradicional sigue siendo subestimada hoy en día, aunque se practique en todo el mundo y su uso vaya en aumento. Es por eso que varios grupos de investigadores se dedican a corroborar a través de estudios preclínicos los efectos farmacológicos y/o terapéuticos que se les atribuyen a varias plantas medicinales con la intención de asegurar su eficacia y seguridad. Además de tratar de identificar y/o aislar al o los principios activos responsables de su efecto farmacológico. A continuación se mencionan algunos antecedentes que se tienen sobre la *Loeselia mexicana*, una especie endémica de México utilizada en la medicina tradicional mexicana para el alivio del dolor.

2.4.1 *Loeselia mexicana*

2.4.1.1 Distribución y hábitat

La *Loeselia mexicana* (*L. mexicana*) (Lam.) Brandegeee, pertenece a la familia Polemoniaceae, es una planta endémica de México, comúnmente conocida como: espinosilla, hierba de la virgen, chuparrosa, gallina ciega, mirto rojo, mirto silvestre, cuachile, huicicila, guachichile o huichichila (Rzędowski y Rzędowski, 1995; Nash, 1979). Ésta tiene una amplia distribución en nuestro país y habita en una gran variedad de climas y ecosistemas, por lo que se puede encontrar en prácticamente todos los estados de México.

2.4.1.2 Descripción

La *Loeselia mexicana* es un arbusto de 1 o 2 m de altura con la base leñosa y con tallos erectos ramificados desde la base, tiene hojas de 4 a 6 cm de largo y de 1.5 a 2 cm de ancho, rígidas y ásperas al tacto, son densamente pubescentes, ovadas a lanceoladas y de margen aserrado. Los tallos terminan en espinas y flores que crecen de manera solitaria o agrupadas en las axilas de las hojas. Las flores son rojas (aunque muy raramente pueden ser amarillenta, rosada o blanca) con cinco lóbulos anchos. Los estilos sobrepasan la corona (Figura 6) (Rzędowski y Rzędowski, 1995). Hay ejemplares que florecen todo el año, aunque es más común verlos en flor del final de la estación lluviosa (septiembre-octubre) hasta el final de la estación seca (marzo-abril).

2.4.1.3 Usos medicinales

En la medicina tradicional, la infusión de *L. mexicana* se emplea para combatir la fiebre puerperal, la disentería, la bronquitis, el dolor e inflamación del estómago, la tifoidea, dolor de cabeza, entre muchos otros (Rzedowski y Rzedowski, 2001). Además, los curanderos la utilizan para hacer limpias.

En la publicación “Plantas medicinales de la farmacia viviente del CEFOFOR: usos terapéuticos tradicionales y dosificación” se menciona que la dosis que debe tomarse de *L. mexicana* es de cinco gramos en un litro de agua y se debe tomar una taza en ayunas y otra después de cada comida durante 15 días (Plantas medicinales de

la farmacia viviente del CEFOFOR: Usos terapéuticos tradicionales y dosificación, 2010) A partir del extracto metanólico de esta especie se ha aislado la dafnoretina, una cumarina con efecto ansiolítico (Herrera-Ruiz y cols., 2011). También se han identificado la escopoletina y la umbeliferona, las cuales tienen actividad antifúngica y ansiolítica (Navarro-García y cols., 2011; Pérez-Ortega y cols., 2016).

Otros de los metabolitos que se han encontrado en esta planta son: quercetina (Ventura-Martinez y cols., 2021;Guangyao Ye y cols., 2021), miricetina (Hagenacker y cols., 2010; Tong y cols., 2009) y kaempferol (Martinez- Gonzales y cols., 2017; Shiquan-Chang y cols., 2022), sin embargo, aún no se han realizado estudios directamente con estos metabolitos dentro de *L. mexicana* (Smith y cols., 1977), pero sí como parte de otras especies (Martínez y cols. 2011).



Figura 6. *Loeselia mexicana* (Lam.) Brandege (Polemoniaceae), comúnmente conocida como "espinosilla".

Obtenidas de: https://www.naturalista.mx/taxa/146622-Loeselia-mexicana/browse_photos

Esta planta originaria de México, de uso muy antiguo y bastante frecuente en la actualidad, ha sido muy poco estudiada desde el punto de vista farmacológico o químico. Solo existen algunos estudios preclínicos de sus efectos como espasmolítico (Rojas y cols., 1999), antidiarreico (Pérez y cols., 2005), antifúngico (Navarro-García y cols., 2011) y ansiolítico (Herrera-Ruiz y cols., 2011). Por lo que en el presente trabajo

decidimos estudiar su posible efecto antinociceptivo en diversos modelos experimentales de dolor y en la evaluación de la prueba de carbón activado, ya que el efecto antinociceptivo podría estar asociado con cambios en la motilidad intestinal asociado con un efecto espasmolítico o de disminución de la motilidad (constipación) como parte del efecto adverso en la acción de tipo opioide de algunos analgésicos.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El dolor es una experiencia sensorial y emocional desagradable que es considerado un mecanismo de defensa ya que tiene la función de detectar o localizar los procesos que dañan los tejidos de un organismo. El cual es también considerado un fenómeno subjetivo que puede estar o no vinculado a una lesión o patología, pero que es uno de los principales motivos de asistencia médica en el mundo.

El dolor abdominal y muscular es uno de los síntomas que acompaña a varias alteraciones patológicas en el tracto gastrointestinal y en la musculatura esquelética, respectivamente. El incremento en la motilidad intestinal puede ser uno de los efectos que acompañan al dolor o que pueden generarse como acción espasmogénica, así como también pueden ser parte de los efectos adversos en el mecanismo opioide de algunos analgésicos. En ese sentido, uno de los grupos farmacológicos más recetados para el alivio del dolor de tipo abdominal es el metamizol, fármaco que pertenece al grupo de los AINEs y que alivia también los espasmos intestinales y la inflamación. Sin embargo, debido a los efectos adversos que suelen provocar este grupo de fármacos, un gran porcentaje de la población opta por la medicina tradicional, es decir lo natural, con la idea de que es inofensivo, efectivo, tiene un menor costo, es asequible y se tiene el conocimiento empírico de que funciona.

Dentro de la medicina tradicional se conoce a la *Loeselia mexicana* (espinosilla), que por conocimientos empíricos se usa como una infusión para aliviar el dolor de estómago (espasmolítico) y también para la diarrea. Sin embargo, aún no se cuenta con estudios científicos suficientes que lo avalen, por lo que en este trabajo de investigación se desea corroborar su efecto de tipo analgésico mediante diferentes modelos de dolor y una prueba para la evaluación de la motilidad intestinal.

4. HIPÓTESIS

Si en la medicina tradicional la *Loeselia mexicana* (espinosilla) es utilizada como infusión para el alivio del dolor abdominal, la administración de su extracto acuoso producirá un efecto antinociceptivo en diversos modelos de dolor en ratones incluyendo un modelo de dolor visceral.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Determinar y evaluar el efecto antinociceptivo de *Loeselia mexicana* (espinosilla) en diferentes modelos de dolor en ratones.

5.2 Objetivos particulares

- Elaborar la curva dosis respuesta (CDR) del efecto antinociceptivo del extracto acuoso de *Loeselia mexicana* en un modelo de dolor visceral en ratones.
- Calcular la dosis efectiva 50 (DE50) del efecto antinociceptivo del extracto acuoso de *Loeselia mexicana* a partir de su CDR en un modelo de dolor visceral en ratones.
- Determinar el efecto de la dosis más alta del extracto acuoso de *Loeselia mexicana* sobre la motilidad intestinal en ratones.
- Evaluar el efecto antinociceptivo de la dosis más alta del extracto acuoso de *Loeselia mexicana* en el modelo de la formalina en ratones.
- Robustecer el efecto antinociceptivo de la dosis más alta del extracto acuoso de *Loeselia mexicana* en el modelo de placa caliente en ratones.

6. METODOLOGÍA

6.1 Material vegetal

La planta se compró en el mercado de Sonora de la Ciudad de México el 2 de marzo de 2019 y fue identificada por el Dr. Sol Cristians Niizawa. Una muestra de la planta se depositó en la colección etnobotánica del Jardín Botánico del Instituto de Biología de la UNAM con el número de voucher 3377.

6.1.1 Obtención del extracto

El extracto acuoso de *Loeselia mexicana* fue obtenido por la Dra. Guadalupe Esther Ángeles López del Laboratorio de Desarrollo de Medicamentos del Departamento de Farmacología de la Facultad de Medicina de la UNAM. El extracto se preparó utilizando las partes aéreas de la planta secas y pulverizadas. 180 g de este material se infusionó con 5.4 L de agua. La infusión se filtró y se liofilizó obteniendo 9.8 g del extracto seco que corresponde al 5.47% de rendimiento.

6.2 Animales de experimentación

Para este trabajo de investigación se utilizaron ratones macho de la estirpe CD1 de 25-30 g de peso corporal obtenidos del bioterio central de la Facultad de Medicina de la UNAM. Los animales se mantuvieron en un cuarto con condiciones controladas de temperatura y humedad relativa ($21 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 33 %), además de un ciclo de luz-oscuridad de 12 horas. El alimento se les retiró a los animales 12 horas antes del experimento y se les mantuvo con libre acceso de agua. El uso de los animales se llevó a cabo bajo la supervisión de un protocolo aprobado por la comisión de Ética Animal de la Facultad de Medicina de la UNAM (FM/DI/054/2018) y de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 sobre las especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio, así como con las normas internacionales correspondientes.

6.3 Reactivos

Metamizol sódico (AMSA, México), ketorolaco (CAYMAN, USA), loperamida (SIGMA, Italia), Morfina (PISA, México), ácido acético y formalina (MEYER, México). Para inducir conductas nociceptivas en los diferentes modelos de dolor se prepararon las siguientes soluciones: una solución de ácido acético al 1% con solución salina isotónica (SSI, 0.9% NaCl) y una solución al 5% de formalina. El metamizol, el ketorolaco, la loperamida y el extracto acuoso de espinosilla (EAE) se diluyeron en SSI hasta obtener las concentraciones adecuadas para su administración. Dado que el metamizol es un compuesto susceptible a la temperatura y fotosensible se mantuvo en refrigeración y frascos ámbar para su protección.

6.4 Determinación del efecto antinociceptivo del EAE en un modelo de dolor visceral

Para evaluar el efecto antinociceptivo del EAE en un modelo de dolor tipo abdominal se utilizó la prueba de estiramiento abdominal o *writhing test*, el cual consiste en determinar el número de estiramientos abdominales inducidos en el ratón mediante la administración intraperitoneal (i.p.) de ácido acético al 1% (Siegmund y cols., 1957; Gawade, 2012). Los estiramientos abdominales consisten en la contracción de los músculos abdominales, el arqueamiento de la espalda hasta que el abdomen del ratón toca el piso de la caja de acrílico, y la extensión de las extremidades posteriores, como se muestra en la figura 7.



Figura 7. Representación de las características que debe presentar un estiramiento abdominal (arqueamiento de espalda, arrastre del abdomen y el estiramiento de las extremidades traseras).

Para la determinación del efecto antinociceptivo del EAE en este modelo experimental se utilizaron 36 ratones macho divididos en 6 grupos (n=6) a los cuales se les administraron los siguientes tratamientos: Grupo 1: vehículo (SSI 0.9%); grupo 2 a 5: EAE (100, 148, 218.8 y 316 mg/kg), respectivamente; y grupo 6: metamizol sódico como control positivo (100 mg/Kg). Todos los tratamientos se administraron por vía intragástrica 30 min antes de la administración i.p. de ácido acético al 1% (0.3 mL/ratón). Una vez administrado el ácido acético se cuantifica el número de estiramientos abdominales que éste produce durante 20 min en intervalos de 5 min (Figura 8). Una reducción en el número de estiramientos con los tratamientos fue indicativo del efecto analgésico.

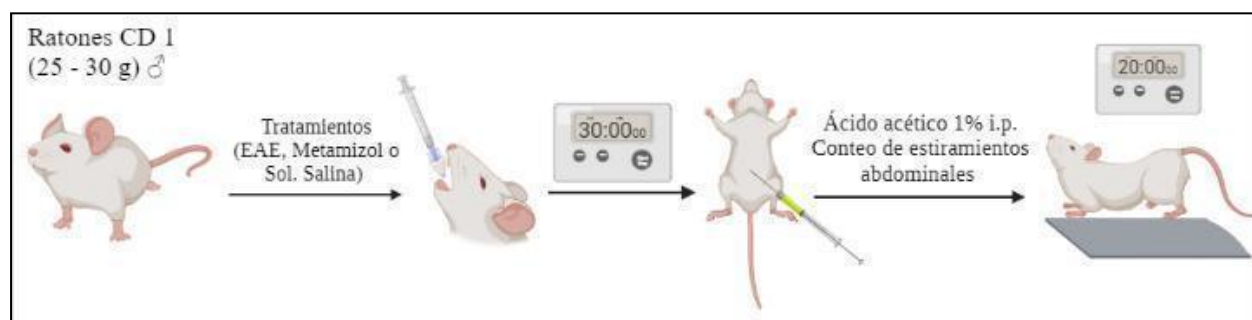


Figura 8. Diseño experimental para la determinación del efecto antinociceptivo de *Loeselia mexicana* en el modelo de dolor abdominal.

6.5 Determinación del efecto del EAE sobre la motilidad intestinal en ratones

Para evaluar el efecto del EAE sobre la motilidad intestinal se empleó el método de Arbós y cols. (1993) en ratones, el cual consistió en administrar el tratamiento con EAE o el fármaco de referencia y 15 minutos se administró carbón activado al 5% por vía intragástrica preparado en una suspensión acuosa de goma arábiga al 10%, posteriormente se aplicó la eutanasia a los animales y se extrajo su intestino delgado, desde el píloro hasta el ciego, se midió el recorrido que realizó el carbón activado en el intestino (Figura 9). Un menor recorrido de carbón activado fue indicativo de efecto de constipación o reducción de la motilidad intestinal.

Para determinar el efecto del EAE en la motilidad intestinal se utilizaron 18 ratones machos, divididos en 3 grupos a los que se les administró vehículo (SSI 0.9%),

EAE (316 mg/Kg) o loperamida como control positivo (5 mg/Kg). Todos los tratamientos se administraron por vía intragástrica y 15 minutos después de la administración del tratamiento correspondiente, se les administró carbón activado. A los 20 minutos de la administración del carbón activado se realizó la eutanasia a todos los animales mediante dislocación cervical y se procedió a disecar cuidadosamente el intestino delgado, desde el píloro hasta el ciego y se midió el recorrido del carbón activado con una cinta métrica (Figura 10) para obtener la distancia recorrida mediante el registro en cm desde el píloro hasta la parte delantera del carbón (A), y la longitud total del intestino delgado (B). La motilidad intestinal de cada ratón se calculó como porcentaje empleando la siguiente fórmula (Zavala-Flores y cols., 20013):

$$\% \text{ de Motilidad intestinal} = \frac{A}{B} \times 100$$

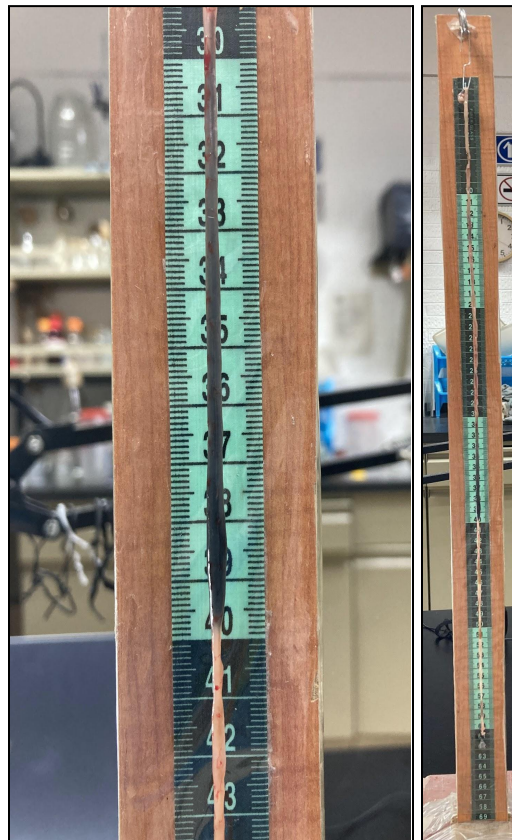


Figura 9. Medición del recorrido del carbón activado por el intestino delgado, del píloro hasta el ciego. La medición se realizaba con ayuda de una cinta métrica de 70 cm.

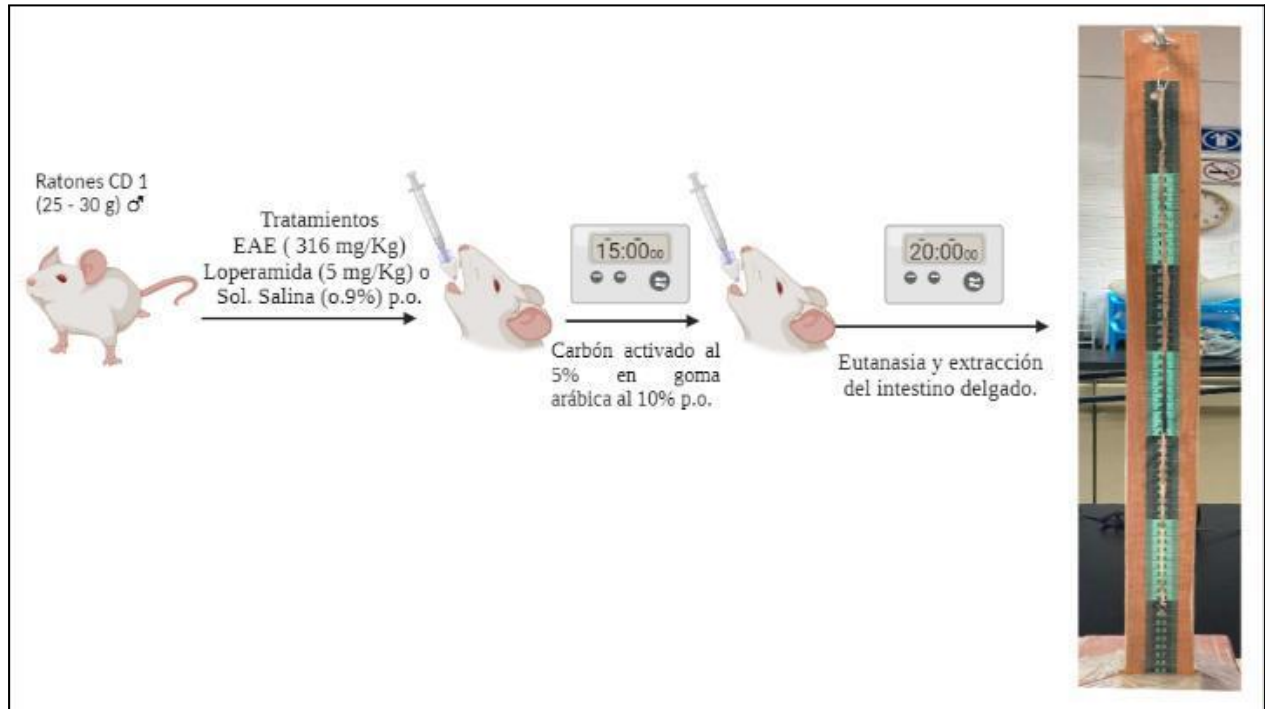


Figura 10. Diseño experimental para la determinación del efecto del EAE sobre la motilidad intestinal en el modelo de carbón activado.

6.6 Determinación del efecto antinociceptivo del EAE en el modelo de formalina

Para conocer si el efecto antinociceptivo del EAE aplica en dolor nociceptivo, se utilizó la prueba de formalina, propuesto por Dubuisson y Dennis en 1977. En éste, el dolor se induce con la administración intraplantar de 20 μ L de formalina al 3% en la pata trasera derecha del ratón. Posteriormente, el ratón se coloca dentro de un cilindro de acrílico transparente con espejos colocados en la parte posterior para observar el comportamiento desde diferente ángulo. El número de levantamientos y sacudidas de la pata administrada se cuantifica durante 60 s cada 5 min por 30 minutos (Figura 11). La inyección intraplantar de formalina produce una respuesta dolorosa bifásica, la cual se compone de una fase temprana (primera fase, de 0 a 5 min) y una fase tardía (segunda fase, de 10 a 15 min) (Tjølsen y cols., 1992).

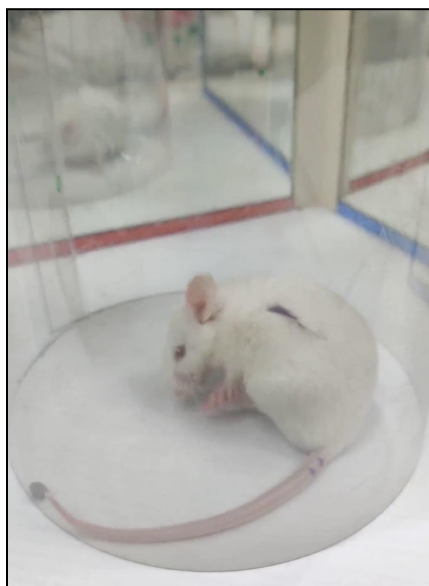


Figura 11. Levantamientos y lamidas de la extremidad posterior derecha después de la administración intraplantar de formalina al 3%.

Para determinar el efecto antinociceptivo del EAE en la prueba de formalina se utilizaron 18 ratones divididos en 3 grupos ($n=6$) a los cuales se les administraron los siguientes tratamientos: Grupo 1: vehículo (SSI 0.9%, p.o); grupo 2: EAE (316 mg/Kg, p.o.) y grupo 3: ketorolaco, como control positivo (5 mg/kg, i.p.) 20 minutos antes de la inyección de la formalina (Figura 12). Previo a la determinación del efecto antinociceptivo de los tratamientos, los ratones se dejan habituar dentro del cilindro y posteriormente se da la administración del tratamiento correspondiente. Una vez que se administra la formalina en la pata trasera derecha del ratón, éste se coloca en el cilindro y se inicia el conteo de las sacudidas o levantamientos de la extremidad administrada.

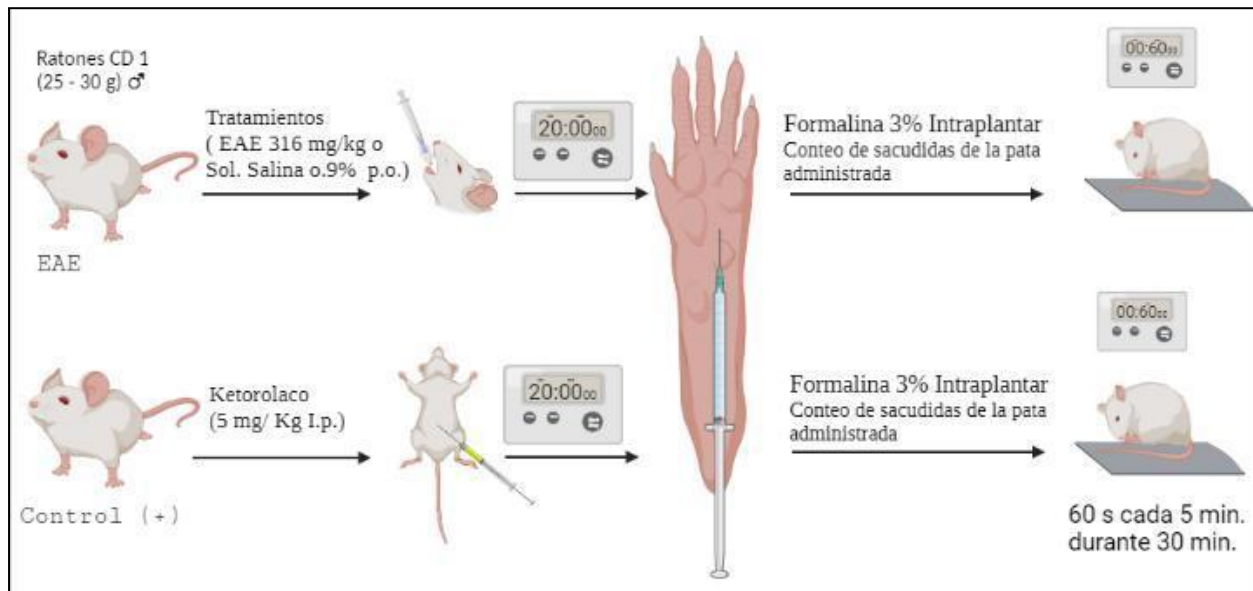


Figura 12. Diseño experimental para la determinación del efecto antinociceptivo de *Loeselia mexicana* en el modelo de formalina.

6.7 Determinación del efecto antinociceptivo del EAE en la placa caliente

Para evaluar el efecto antinociceptivo del EAE en un modelo de dolor agudo e intenso se eligió el modelo de placa caliente o “hot plate” propuesto por Eddy y Leimbach (1953). En éste, el estímulo doloroso es inducido por calor y consiste en colocar al ratón dentro de un cilindro transparente que está encima de una placa caliente (55°C), así el ratón queda directamente tocando la placa. Una vez colocado el ratón se inicia el conteo en segundos como latencia a la conducta dolorosa, tal como brincar, lamer o retirar de la placa caliente alguna de sus extremidades traseras o delanteras. Esta prueba tiene un tiempo de corte de 20 segundos para evitar dañar el tejido de las patas de los animales (Figura 13).

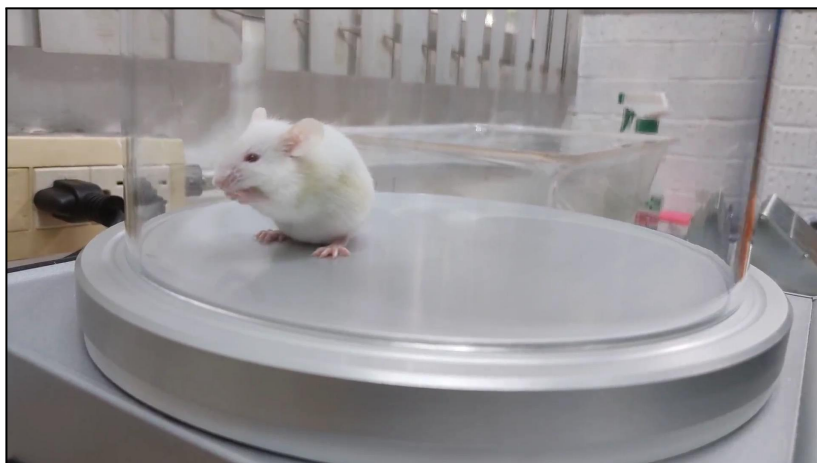


Figura 13. Levantamiento de ambas extremidades delanteras después de colocar al ratón en la placa caliente con un tiempo de corte de 20 s.

En este modelo de dolor se utilizaron 18 ratones macho, divididos en 3 grupos (n=6), a los cuales se les administraron los siguientes tratamientos: Grupo 1 vehículo (SSI 0.9%, p.o); grupo 2 EAE (316 mg/Kg, p.o.) y, grupo 3 morfina, como control positivo (10 mg/Kg, i.p.) (Figura 14). Un día antes del experimento se coloca a los animales en el cilindro transparente durante 30 minutos para disminuir las conductas exploratorias de los animales en el día del experimento. El día del experimento se vuelve a habituar a los ratones dentro del cilindro hasta que el ratón esté tranquilo. Posteriormente, los animales se retiran del cilindro y se les administra el tratamiento correspondiente. Treinta minutos después se inicia la prueba colocando al ratón en la placa caliente que estará precalentada a 55°C y se registrará el tiempo que tarda el animal en producir la respuesta dolorosa, sin olvidar que la prueba tiene un tiempo de corte de 20 segundos, entonces se hacen lecturas de la conducta cada 30 minutos durante 2 horas.

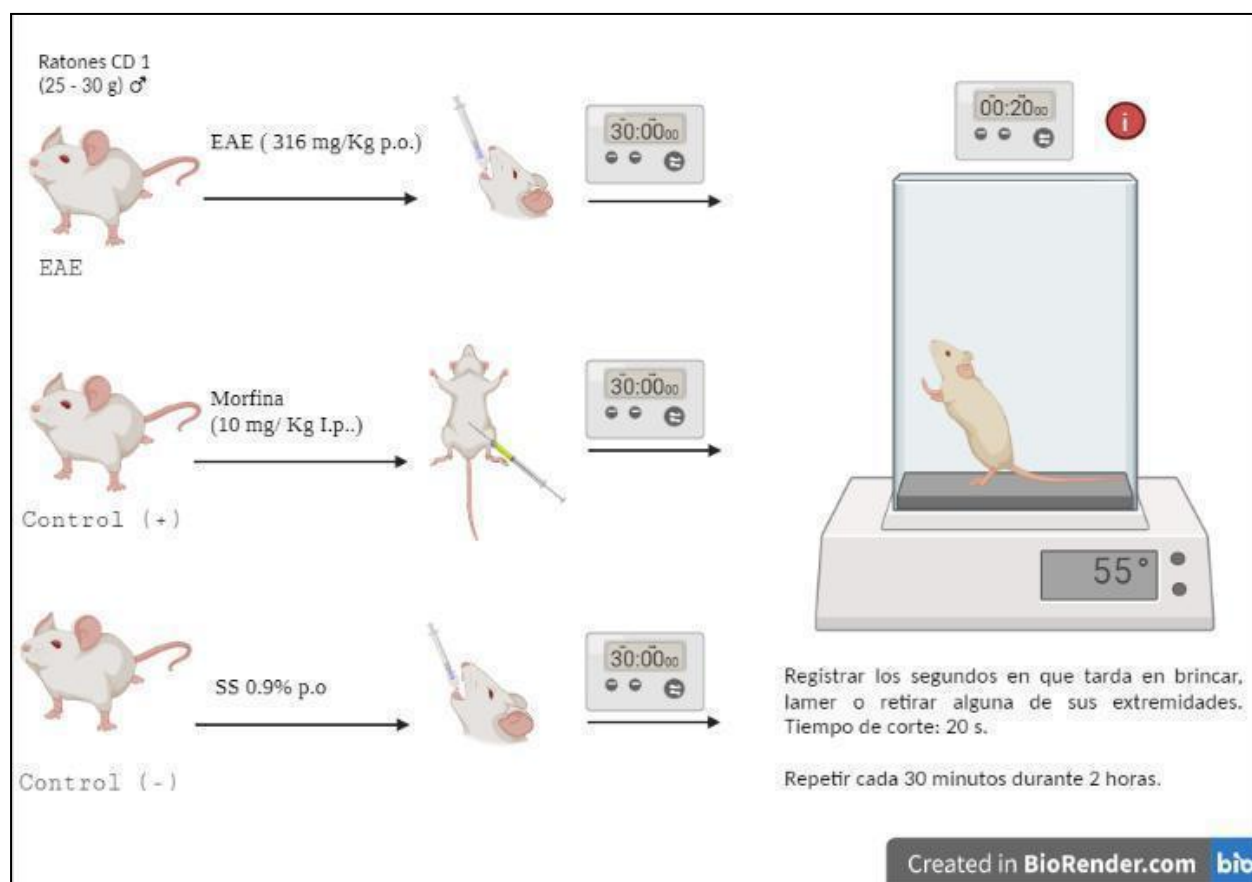


Figura 14. Diseño experimental para la determinación del efecto antinociceptivo de EAE en el modelo de placa caliente.

6.8 Análisis estadístico de datos

Los porcentajes de antinocicepción de cada tratamiento se calcularon utilizando la siguiente fórmula:

$$\%Antinocicepción = \left[\frac{(\# \text{ Estiramientos de VEH} - \# \text{ Estiramientos Tx})}{\# \text{ Estiramientos VEH}} \right] * 100$$

Los cursos temporales de cada tratamiento se construyeron graficando la media de 6 animales \pm error estándar (EE). Para determinar si existe diferencia estadística entre los diferentes tratamientos, los datos se analizaron mediante el programa estadístico de Graphpad Prism versión 5.0 con un análisis de varianza (ANADEVA) de una vía o dos vías y pruebas post hoc de Tukey o Dunnett, para la comparación entre tratamientos; o bien, una t de Student para la comparación de sólo dos tratamientos. La diferencia estadística se consideró para una $P < 0.05$.

En la prueba de motilidad intestinal, los datos se analizaron mediante ANADEVA seguida por una prueba de Dunnett. Un valor de $P < 0.05$ fue considerado para la diferencia estadísticamente significativa.

7. RESULTADOS

7.1 Efecto antinociceptivo del extracto acuoso de *Loeselia mexicana* o “espinosilla” (EAE) en el modelo de *writhing*

En el modelo experimental de estiramiento abdominal o *writhing test*, el ácido acético al 1% indujo un promedio de 3.0 ± 0.52 estiramientos en los ratones a partir de los primeros 5 min de administración, el cual se fue incrementando en las mediciones subsecuentes. De manera que, el número máximo de estiramientos que produjo el ácido acético en el grupo con vehículo (VEH, control negativo) fue de 26.2 ± 1.4 a los 15 min. La respuesta nociceptiva se mantuvo prácticamente sin cambios hasta los 20 min, que fue la última lectura, con un promedio de 24.7 ± 0.7 contracciones en el grupo VEH.

Por otro lado, la administración oral de 100 mg/kg de metamizol sódico (MET, control positivo), disminuyó significativamente el número de estiramientos inducidos por el ácido acético 1% en comparación con el grupo con VEH. Esta diferencia fue evidente a partir de los 10 min de registro y se mantuvo a los 15 y 20 min (9.7 ± 2.2 vs 22.7 ± 3.3 , 13.5 ± 1.1 vs 26.2 ± 1.4 y 12.7 ± 0.8 vs 24.7 ± 0.7 , respectivamente) (Figura 15).

La administración de EAE indujo una disminución gradual de manera dosis-dependiente en el número de estiramientos inducidos por ácido acético 1% en comparación con el grupo VEH. Esta disminución fue significativa a los 10 min, con la dosis de 218.8 y 316 mg/kg (10.2 ± 3.4 y 6.3 ± 3.1 vs 22.7 ± 3.3 , respectivamente), a los 15 min con las dosis de 148, 218.8 y 316 mg/kg (15.8 ± 1.9 , 11.0 ± 2.5 y 6.5 ± 3.0 vs 26.2 ± 1.4 , respectivamente) y, a los 20 min con las dosis de 148, 218.8 y 316 mg/kg (16.8 ± 1.5 , 14.3 ± 2.3 y 5.5 ± 2.8 vs 24.7 ± 0.7 , respectivamente). Con el propósito de no saturar la gráfica de los cursos temporales (Figura 15), no se indican con asteriscos las diferencias estadísticas que se mencionaron en los párrafos anteriores, pero todas ellas cumplen con una $P < 0.05$ para ANADEVIA de dos vías seguida por una prueba *post hoc* de Dunnett en comparación con el grupo VEH.

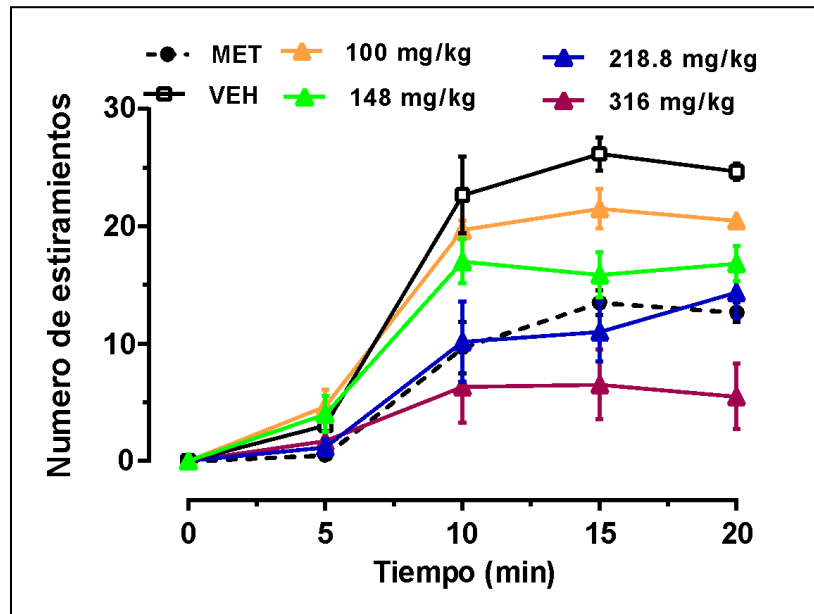


Figura 15. Cursos temporales del número de estiramientos abdominales inducidos por ácido acético al 1% en ratones en ausencia (VEH) y en presencia de metamizol sódico (MET, 100 mg/kg) y diferentes dosis del extracto acuoso de *Loeselia mexicana* o “espinosilla”. Cada punto representa el promedio del número de estiramientos de 6 animales para cada tiempo \pm EE.

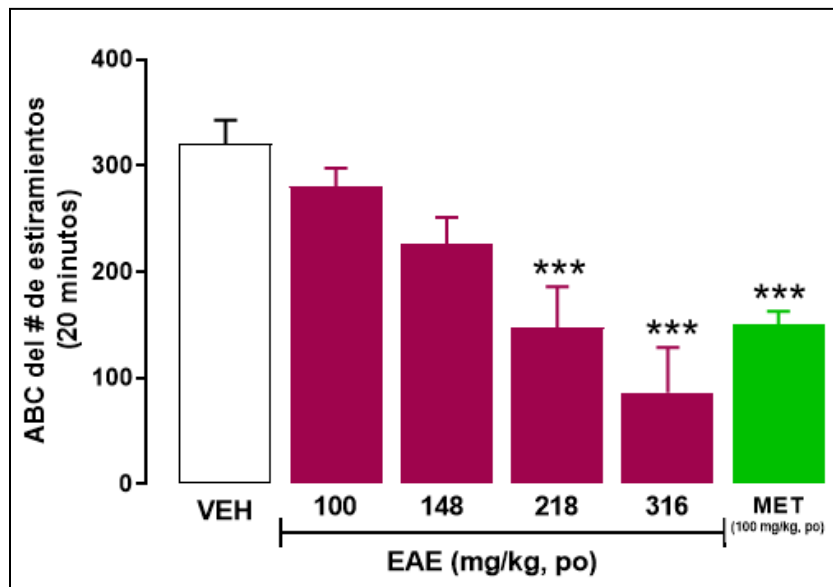


Figura 16. ABC del número de estiramientos abdominales inducidos por ácido acético en ratones en ausencia (VEH) y en presencia de diferentes dosis del EAE y de MET (100 mg/kg) obtenidos durante 20 minutos. Cada barra representa el promedio de las ABC \pm EE de 6 animales. *** $P < 0.0001$ vs VEH, ANADEVIA de una vía seguido de una prueba de Dunnett.

Para el análisis global del efecto de los diferentes tratamientos sobre los estiramientos inducidos con el ácido acético al 1% se obtuvieron las áreas bajo la curva (ABC) de sus respectivos cursos temporales. De esta manera, en la figura 16, se puede observar que solo con las dosis de 218 y 316 mg/kg del EAE, así como con el MET, alcanzan una disminución significativa de los estiramientos abdominales en comparación con el VEH (147.5 ± 38.5 , 86.25 ± 42.14 y 150.0 ± 12.45 vs 320.83 ± 22.1 ua, respectivamente. $P < 0.05$, ANADEVa de una vía seguido por una prueba *post hoc* de Dunnett).

7.1.1 Curva dosis respuesta (CDR) del efecto antinociceptivo inducido por el EAE en el modelo de writhing

La CDR del porcentaje del efecto antinociceptivo del EAE se construyó con base al ABC del grupo VEH, con respecto a las ABC de las diferentes dosis del EAE. En el análisis de la CDR del EAE se obtuvo un efecto máximo ($E_{m\acute{a}x}$) de $73.1 \pm 13.1\%$, el cual se alcanzó con la dosis de 316 mg/kg, y la dosis efectiva 50 (DE_{50}) calculada fue de 208.9 ± 20.2 mg/kg. El efecto antinociceptivo del EAE fue significativo solo con las dosis de 218 y 316 en comparación con el VEH (54.0 ± 12.0 y 73.1 ± 13.1 vs $4.2 \pm 6.7\%$, respectivamente. $P < 0.05$, ANADEVa de una vía seguido por una prueba *post hoc* de Dunnett). También el grupo administrado con MET (100 mg/kg) mostró un efecto antinociceptivo significativo en relación al grupo VEH (53.3 ± 3.9 vs $4.2 \pm 6.7\%$, respectivamente. $P < 0.05$, t de student de dos colas para muestras no pareadas (Figura 17), pero no cuando se comparó con el $E_{m\acute{a}x}$ del EAE (53.3 ± 3.9 vs 73.1 ± 13.1 , respectivamente) (Fig. 18).

A partir de estos resultados, se seleccionó la dosis más alta del EAE (316 mg/kg) para evaluar su efecto sobre la motilidad intestinal y su efecto antinociceptivo en otros dos modelos de dolor en ratones.

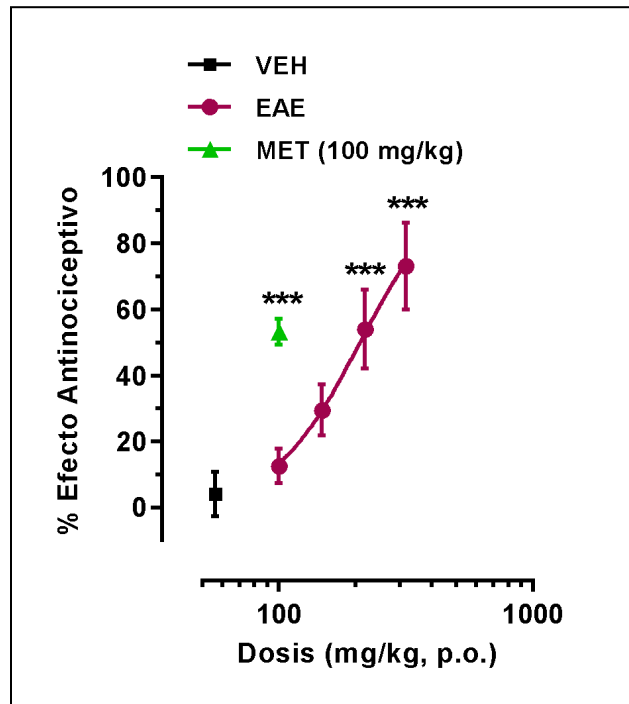


Figura 17. Curva dosis respuesta del efecto antinociceptivo del extracto acuoso de espinosilla (EAE). También se muestra el efecto del VEH y del metamizol (MET, 100 mg/kg). Todos los tratamientos fueron administrados por vía oral (p.o.). Cada punto representa el promedio \pm EEM del efecto antinociceptivo de 5 a 6 animales. *** $P < 0.0001$ vs VEH, ANADEVa de una vía seguido de una prueba de Dunnett.

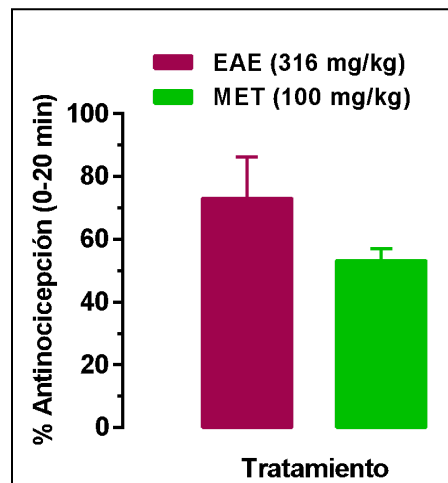


Figura 18. Porcentaje del efecto antinociceptivo de la dosis más alta de EAE (316 mg/kg) y del MET (100 mg/kg) utilizado como control positivo. Cada barra representa la media \pm EEM de 6 animales.

7.2 Efecto del EAE en el modelo de motilidad intestinal en ratones

En la figura 19 se muestra que la dosis de 316 mg/kg del EAE no alteró significativamente el porcentaje de motilidad intestinal en comparación al VEH (58.2 ± 4.7 vs $72.7 \pm 6.1\%$, respectivamente). Mientras que la loperamida (LOP, 5 mg/kg, p.o.) utilizada en este modelo como control positivo sí indujo una disminución significativa en la motilidad intestinal en los ratones en comparación con el VEH (23.2 ± 2.0 vs $72.7 \pm 6.1\%$, respectivamente. $P < 0.0001$, ANADEVa de una vía seguido por una prueba post hoc de Dunnett).

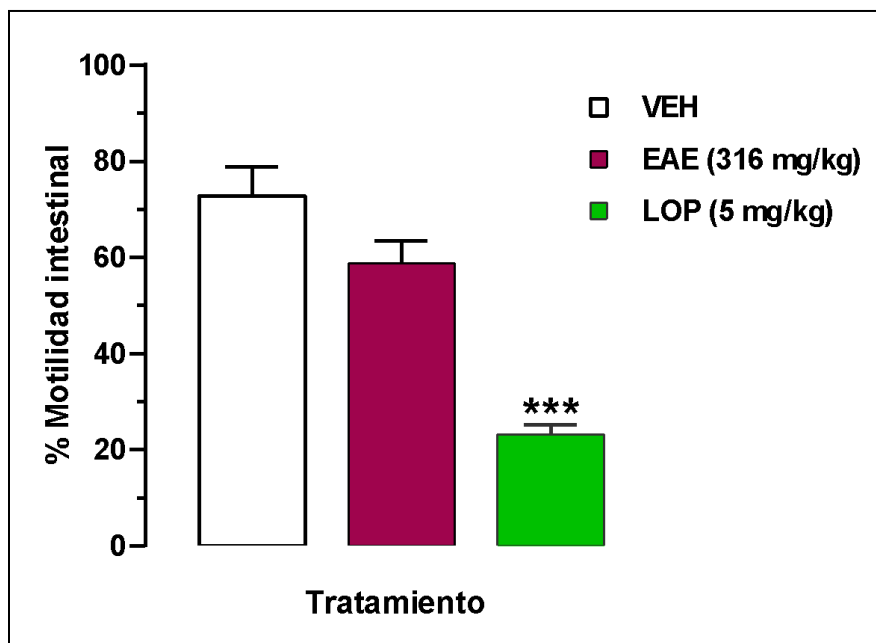


Figura 19. Porcentaje de la motilidad intestinal en ratones con la administración de VEH, del EAE y de LOP utilizada como control positivo. Cada barra representa la media \pm EE de 6 ratones. *** $P < 0.0001$ vs VEH, ANADEVa de una vía seguida por una prueba de Dunnett.

7.3 Efecto antinociceptivo del EAE en la prueba de la formalina en ratones

Como es bien sabido, la prueba de la formalina se distingue por dos fases, la fase neurogénica y la fase inflamatoria. La fase neurogénica se presenta de 0 a 10 min, mientras que la inflamatoria se presenta a partir de los 10 min. En el curso temporal del número de sacudidas inducidas por la formalina en este trabajo se realizaron registros del número de sacudidas en los diferentes grupos experimentales cada 5 min durante

30 min (Figura 20). Como se puede observar, la administración intraplantar de formalina al 3% (VEH) indujo un promedio de 26.2 ± 1.6 sacudidas a partir de su administración, conducta que disminuye a los 5 y 10 min (3.7 ± 1.1) y se incrementa gradualmente hasta alcanzar un número máximo de sacudidas de 11.2 ± 3.0 a los 25 min. La administración oral de ketorolaco (5.0 mg/kg) 30 min antes de la administración de formalina disminuyó el número de sacudidas inducidas por la formalina, solo a los 15 y 25 min de registro en comparación con el grupo VEH (3.3 ± 1.2 vs 9.3 ± 1.1 y 5.8 ± 0.7 vs 11.2 ± 3.0 , respectivamente). Mientras que el EAE disminuyó significativamente esta conducta en los animales a los 15, 20, 25 y 30 min en comparación con el VEH (3.8 ± 0.5 vs 9.3 ± 1.1 , 4.5 ± 0.9 vs 9.7 ± 2.6 , 4.5 ± 1.1 vs 11.2 ± 3.0 y 3.2 ± 0.7 vs 10.3 ± 1 , respectivamente). En todos los casos $P < 0.05$ vs VEH, ANADEVa de dos vías seguida de una prueba de Dunnett (Fig. 20).

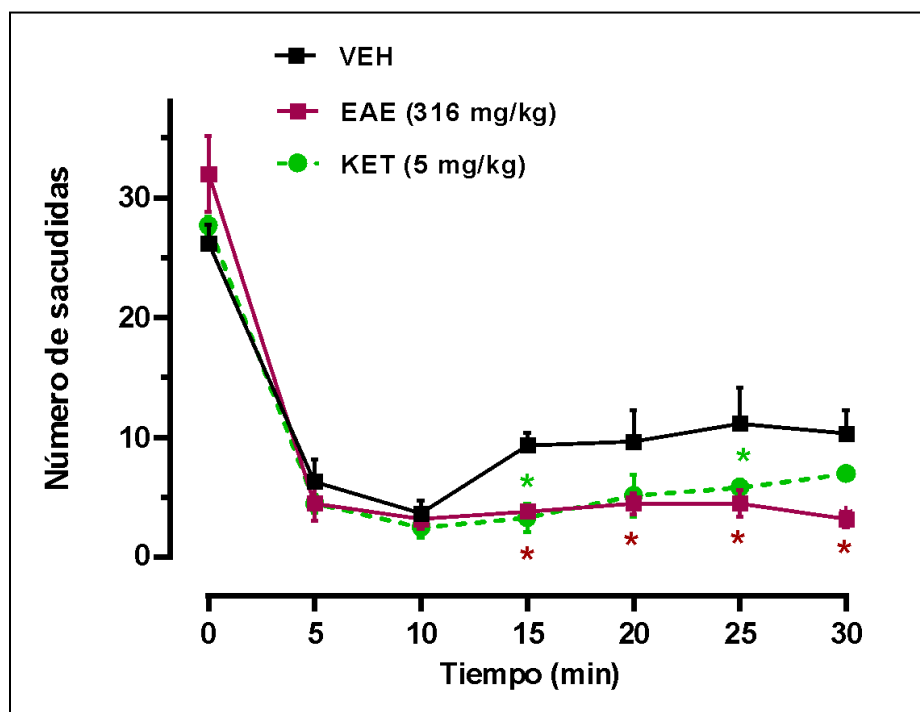


Figura 20. Curso temporal del número de sacudidas de la pata del ratón inducidas por la administración intraplantar de formalina al 3% en presencia del VEH, el EAE y ketorolaco (KET), 5 mg/kg, p.o.), utilizado como control positivo. Cada punto representa el promedio \pm EEM de 6 animales. * $P < 0.05$, ANADEVa de dos vías, post-hoc Dunnett vs VEH.

En la figura 21 se muestra el análisis del ABC de cada fase de la prueba de la formalina. Como se puede observar, en la fase neurogénica (Fig. 21A) ni el EAE ni el

ketorolaco (KET) alteraron significativamente la conducta nociceptiva inducida por la formalina en comparación con el VEH (110.4±13.7 y 97.9±4.3 vs 106.3±10.8 ua, respectivamente). Mientras que en la fase inflamatoria, tanto el EAE como el KET disminuyeron significativamente las sacudidas inducidas por la formalina en comparación con el grupo VEH (80.0±8.1 y 94.2±9.3 vs 185.8±23.4 ua, respectivamente. $P < 0.05$ vs VEH, ANADEVa de una vía seguido por una prueba de Dunnett).

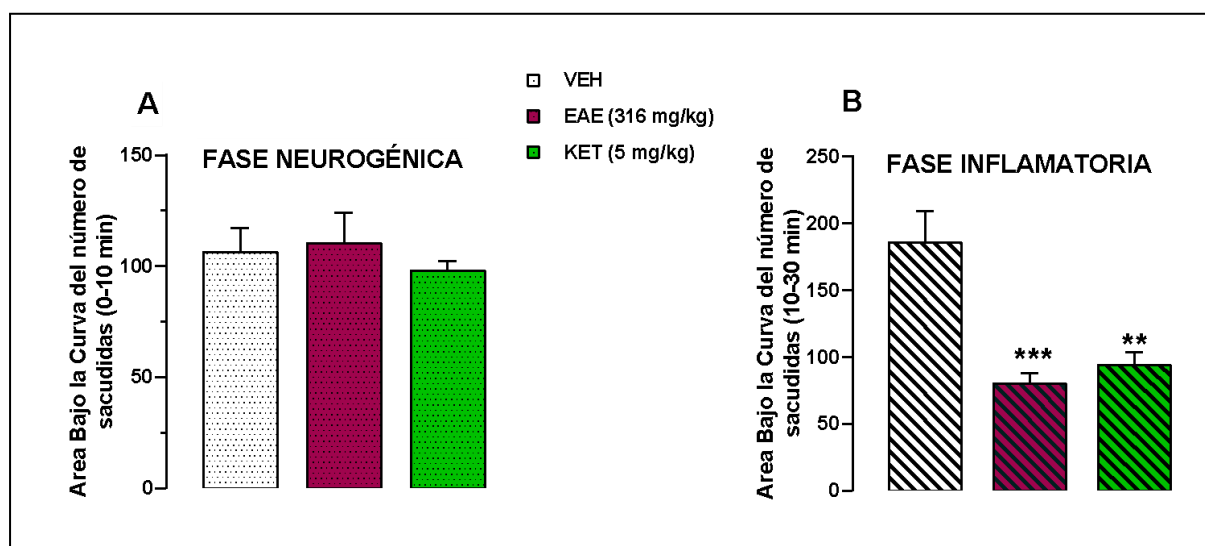


Figura 21. ABC del número total de sacudidas de la pata derecha trasera del ratón durante la fase neurogénica (A) y la fase inflamatoria (B) en ausencia (VEH) y en presencia del EAE y KET utilizado como control positivo. Cada barra representa la media \pm EE de 6 ratones. ** $P < 0.001$ y *** $P < 0.0001$ vs VEH, ANADEVa de una vía seguido por una prueba de Dunnett.

7.4 Efecto antinociceptivo del EAE en el modelo de placa caliente en ratones

En el modelo experimental de placa caliente o *hot-plate* los animales con la administración del VEH mostraron una latencia al estímulo térmico de 5.8 ± 0.5 s a los 30 min de evaluación, recordemos que el tiempo de corte para esta prueba es de 20 s. Como se puede observar en la figura 22, la morfina (un fármaco usado en esta prueba como control positivo) incrementó significativamente el tiempo de latencia en la placa caliente a partir de los 30 min de su administración y ese efecto perduró a los 60, 90 y

120 min en comparación con el VEH (14.8 ± 1.7 vs 5.8 ± 0.5 s, $19.5 \pm 9.0 \pm 0.8$ s, 18.9 ± 0.5 vs 8.7 ± 0.6 s 19.0 ± 0.8 vs 9.8 ± 0.8 s, respectivamente. $P < 0.05$, ANADEVAs de dos vías seguido de una prueba de Dunnett). Por otro lado, también el EAE incrementó significativamente el tiempo de latencia de los animales en la placa caliente, pero solo a los 60, 90 y 120 min en comparación con el VEH (14.2 ± 2.0 vs 9.0 ± 0.8 s, 13.2 ± 2.2 vs 8.7 ± 0.6 s y 13.4 ± 1.7 vs 9.8 ± 0.8 s, respectivamente. $P < 0.05$, ANADEVAs de dos vías seguido de una prueba de Dunnett).

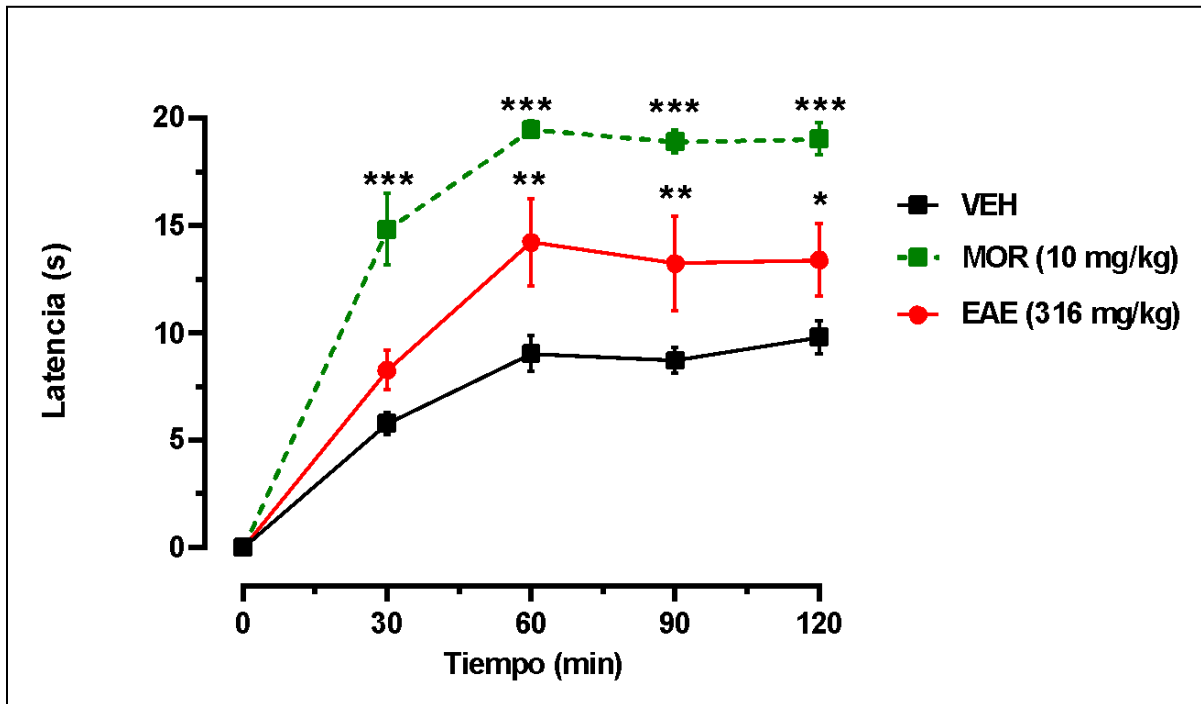


Figura 22. Curso temporal de la latencia (s) de ratones sobre la placa después de la administración de VEH, el EAE (316 mg/kg, p.o.) o morfina (MOR, 10 mg/kg, i.p.), utilizado como control positivo. Cada punto representa el promedio \pm EEM de 6 animales. * $P < 0.05$, ** $P < 0.001$ y $P < 0.0001$ vs VEH. ANADEVAs de dos vías seguido de una prueba de Dunnett.

Al analizar el ABC de los cursos temporales de cada tratamiento, se observa que tanto el EAE como de la morfina aumentaron significativamente la latencia de los animales sobre la placa caliente en comparación con el VEH ($1,273.3 \pm 158.3$ y $1,883.6 \pm 50.5$ vs 852.8 ± 46.8 ua, respectivamente. $P < 0.05$, ANADEVAs una vía seguido por una Dunnett) (Figura 23).

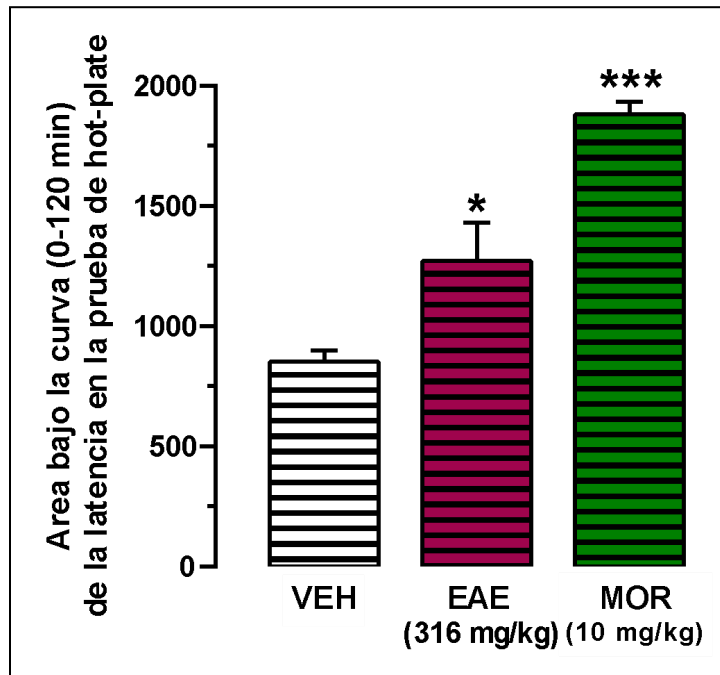


Figura 23. ABC de los cursos temporales del efecto del VEH, el EAE o MOR sobre la latencia de los animales sobre la placa caliente. Cada barra representa la media \pm EE de 6 ratones. * $P < 0.05$ y *** $P < 0.0001$ vs VEH, ANADEVIA de una vía seguida por una prueba de Dunnett.

8. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En este trabajo se evaluó el efecto antinociceptivo de *Loeselia mexicana* en diferentes modelos de dolor en ratones, utilizando como controles positivos fármacos de tipo opioide y AINEs, los cuales son utilizados en la clínica para el tratamiento del dolor.

La *Loeselia mexicana* es una planta comúnmente conocida como “espinosilla” que pertenece a la familia Polemoniaceae. Esta planta es ampliamente utilizada en la medicina tradicional en las fiebres puerperales, contra la disentería, la tifoidea, la bronquitis y para el alivio de dolor e inflamación abdominal, así como para el dolor de cabeza (Rzedowski y Rzedowski, 2001). Además, se utiliza en la medicina tradicional mexicana para hacer “limpias”, por lo que se dice que es útil para curar el “espanto” o el “susto”. En ese sentido, existe un estudio preclínico en el que se demostró que esta especie tiene actividad ansiolítica (Herrera-Ruíz y cols., 2011). También se ha demostrado su actividad antifúngica, antidiarréica y espasmolítica (Navarro-García y cols., 2011; Pérez y cols., 20025; Rojas y cols., 1999). Sin embargo, hasta el momento no se cuenta con evidencia científica que sustente su uso en el tratamiento del dolor.

Los resultados de este trabajo demostraron que el extracto acuoso de *Loeselia mexicana* induce un efecto antinociceptivo en un modelo de estiramiento abdominal (*writhing test*), el cual simula un dolor de tipo abdominal debido a los estiramientos abdominales inducidos por la administración de un compuesto irritante (ácido acético al 1%) que activa a los nociceptores viscerales causando una conducta típica que consiste en el arqueado del lomo de los animales, el arrastre del abdomen y el estiramiento de las extremidades traseras de los ratones (Gawade, 2012). Este dolor se asemeja al dolor abdominal que refieren los pacientes en la clínica, siendo una de las principales causas de asistencia médica. Cualquier estímulo que excite las fibras nerviosas de tipo C para el dolor en regiones difusas de las vísceras puede suscitar un dolor visceral (Guyton y Hall, 2011).

La prueba de estiramiento abdominal o *writhing test* es inducida con ácido acético al 1% administrado por vía intraperitoneal en ratones. Las señales transmitidas al SNC en respuesta al dolor provocado por la irritación provoca la liberación de mediadores como las PGs que contribuyen a incrementar la sensibilidad de los nociceptores (Gawade, 2012). Además, el ácido acético diluido actúa a nivel de canales ASIC (del inglés Acid Sensing Ion Channel) de los nociceptores. Estos canales son

activados por protones extracelulares (H^+) y son permeables a cationes, principalmente Na^+ y Ca^{2+} . Tras su activación, una corriente interna despolariza la membrana celular activando los canales de Ca^{2+} y Na^+ dependientes de voltaje y contribuyendo a la activación del receptor NMDA en la terminal sináptica a través de la liberación del bloqueo del receptor por el Mg^{2+} . Esto favorece la activación de los receptores NMDA por el glutamato, un neurotransmisor excitatorio que participa en la transmisión del dolor (Wemmie y cols., 2013).

También se produce la activación de receptores TRPV-1, los cuales son canales catiónicos, no selectivos, permeables a Ca^{2+} y poco sensibles al potencial de membrana. La activación de estos receptores en neuronas sensitivas genera señales que llegan a la corteza somatosensorial del SNC, donde se perciben como dolorosas. Además de provocar la liberación periférica de sustancias proinflamatorias que sensibilizan a otras neuronas a estímulos subsecuentes (Loipa y cols., 2015).

En el análisis del efecto antinociceptivo del EAE obtenido en el presente trabajo se determinó que la dosis más alta (316 mg/kg) del extracto indujo un efecto antinociceptivo mayor (73%) que el metamizol (53%), un analgésico utilizado en la clínica para el tratamiento del dolor visceral. A partir del análisis sobre el efecto antinociceptivo producido por diferentes dosis del EAE, las cuales se seleccionaron en base a un incremento logarítmico de aproximadamente 0.17, en el modelo de dolor abdominal, se seleccionó la dosis de 316 mg/kg para los experimentos posteriores, ya que, si se hubiera utilizado una dosis más alta, se correría el riesgo de interferir con la determinación del efecto analgésico. Dado que se ha reportado que el extracto de *Loeselia mexicana* contiene un metabolito llamado dafnoretina, el cual tiene actividad sedante. (Navarro y cols., 2007).

La disminución del número de estiramientos abdominales inducidos por el EAE fue interpretado como efecto antinociceptivo, sin embargo, dado la naturaleza del modelo de estiramiento abdominal en el que una disminución en los estiramientos pudiera deberse tanto a un efecto sobre la vía de la nocicepción como a un efecto local sobre la motilidad intestinal, es por eso que se decidió probar el efecto del extracto sobre la motilidad intestinal de los ratones utilizando un modelo *in vivo* que consiste en la administración de carbón activado por vía intragástrica y la posterior determinación de su desplazamiento en el intestino del ratón (Than y cols., 1989; Arbos y cols., 1993).

El desplazamiento del carbón activado es reflejo del tránsito gastrointestinal y es uno de los modelos utilizados para determinar alteraciones en la motilidad intestinal inducidas por diversos tratamientos. En este, la disminución en la motilidad intestinal inducida por los tratamientos es considerado un efecto espasmolítico (Than y cols., 1989; Arbos y cols., 1993).

Los resultados de estos experimentos muestran que el EAE no alteró significativamente el porcentaje de motilidad intestinal en comparación al VEH. Mientras que la LOP, utilizada en este modelo como control positivo, sí indujo una disminución significativa en la motilidad intestinal en los ratones en comparación con el VEH, sugiriendo que el EAE no induce un efecto espasmolítico.

La LOP es utilizada como control positivo en este modelo, ya que por ser un opioide actúa sobre los receptores μ de la pared intestinal inhibiendo la secreción de acetilcolina y PGs de las neuronas mientéricas, disminuyendo así el peristaltismo y la secreción de líquidos, lo que da como resultado un tiempo de tránsito gastrointestinal más prolongado y una mayor absorción de líquidos y electrolitos del tracto gastrointestinal, por lo que es utilizado en la clínica para el tratamiento de la diarrea (Baker, 2007).

La ausencia de efecto del EAE sobre la motilidad intestinal de los ratones observada en este estudio no coincide con un estudio realizado en el 2005 por Pérez y cols. en donde estudiaron las propiedades antidiarreicas de varios extractos de *Loeselia mexicana*. En ese estudio, los autores determinaron que una dosis de 50 mg/kg del extracto acuoso de esta especie produce un moderado efecto antidiarreico (del 34%) sobre la diarrea inducida con aceite de ricino en ratones de laboratorio en comparación con el difenoxilato (98%). El motivo por el que en nuestro estudio la dosis de 316 mg/kg del EAE no mostrará un efecto antidiarreico podría deberse a la diferencia en el modelo utilizado, ya que en realidad en el modelo del carbón activado, que es el que utilizamos en nuestro estudio, no se induce diarrea, lo que se evalúa es una alteración en la motilidad intestinal; mientras que, en el modelo con el aceite de ricino sí producen diarrea en los animales, caracterizada por una muy frecuente deposición de las heces de los animales con consistencia líquida. Además, las dosis utilizadas en ambos estudios fueron muy diferentes. Estos resultados junto con los obtenidos en el modelo

de estiramiento abdominal sugieren que el EAE actúa en algún lugar de la vía del dolor y no sobre la inhibición local de los espasmos intestinales.

El efecto del EAE se reforzó mediante su evaluación en otros modelos de dolor en roedores, como el de la formalina y el de placa caliente.

El modelo de la formalina es un modelo de dolor inflamatorio que consiste en administrar una solución de formalina en la superficie plantar de una de las patas traseras del ratón y en la respuesta dolorosa que se desencadena por la administración de esta sustancia irritante, que típicamente se expresa como lamidas y/o sacudidas de la pata administrada. Como es bien sabido, en este modelo se induce una respuesta dolorosa bifásica que se compone de una fase neurogénica (primera fase), la cual se presenta de 0 a 5 min después de la administración de la formalina, y una fase inflamatoria (segunda fase) que comienza de 10 a 15 min después de la administración de la formalina y dura de 30 a 50 minutos (Tjølsen y cols., 1992). Generalmente se ha considerado que la primera fase se debe a la activación directa de los nociceptores periféricos, mientras que la segunda es consecuencia de una respuesta inflamatoria con la sensibilización de las neuronas nociceptivas de la médula espinal. Entre las sustancias más importantes que participan en la inflamación están las prostaglandinas, las cuales se sintetizan principalmente por la enzima COX. Las PGs son importantes mediadores del dolor y la inflamación, por lo que la disminución en su síntesis va a producir un efecto analgésico y antiinflamatorio (Rang y cols., 2008).

Los resultados obtenidos en este estudio utilizando el modelo de la formalina muestran que el EAE produce un efecto antinociceptivo prácticamente de la misma intensidad que el ketorolaco utilizado como control positivo en este modelo de dolor inflamatorio. El ketorolaco, como se mencionó previamente, es un fármaco que pertenece a la familia de los AINEs y evita la producción de PGs y tromboxanos, debido a la inhibición de la enzima (COX). Las PGs son mediadores inflamatorios importantes que participan en la fase inflamatoria del modelo de la formalina más que en la fase neurogénica, por lo que se justifica el hecho de que el ketorolaco haya mostrado un efecto antinociceptivo solo en la fase inflamatoria de esta prueba. Incluso, el EAE mostró prácticamente el mismo perfil de efecto antinociceptivo que el ketorolaco en esta prueba de dolor, ya que en la fase neurogénica no mostró efecto antinociceptivo pero sí

en la fase inflamatoria. Esto podría sugerir que parte del mecanismo por el que el EAE produce su efecto antinociceptivo pudiera ser por inhibición de síntesis de PGs, como los AINEs.

Finalmente, en este trabajo también se determinó el efecto antinociceptivo del EAE en la prueba de placa caliente o *hot-plate*. Este modelo experimental en el que se emplea un estímulo térmico de alta intensidad para inducir dolor en los roedores se utiliza para detectar moléculas con efecto analgésico que actúan a nivel supraespinal (Sánchez y cols., 2019), ya que la respuesta de los animales ante el estímulo térmico se transmite rápidamente desde la periferia hasta la médula espinal a través de la activación de los nociceptores tipo A δ desencadenando una respuesta refleja de retiro prácticamente inmediata (Guyton y Hall, 2011).

Los resultados de este estudio mostraron que el EAE también indujo un efecto antinociceptivo en esta prueba, sobre todo a los 60, 90 y 120 min después de su administración. Mientras que la morfina, fármaco utilizado como control positivo en esta prueba, indujo un efecto antinociceptivo desde la media hora de su administración. Como es bien sabido, la morfina es un fármaco opioide que actúa como un agonista de los receptores μ , κ y δ (Kerrigan y Goldberger, 2020) e interrumpe la transmisión de la señal dolorosa a nivel del SNC en la médula espinal aumentando el umbral al dolor a nivel central. El hecho de que el EAE produjera un efecto antinociceptivo en este modelo sugiere que parte de su mecanismo de acción involucra componentes químicos que actúan a nivel central, pudiendo estimular la liberación de opioides endógenos; o bien, activando directamente a los receptores a opioides centrales, como lo hacen algunos otros extractos de plantas medicinales como *Celosia cristata*, *Salvia divinorum*, *Hofmeisteria schaffneri* y *Mansoa alliacea* entre otros; y/o metabolitos derivados de ellos (Islam y cols., 2016; Tlacomulco-Flores y cols., 2020; Ángeles-López y cols., 2010; Valle-Dorado y cols., 2022). Contrario a lo esperado, el EAE no produjo efectos sobre la fase neurogénica de la prueba de formalina ya que, aunque es una fase que involucra una respuesta refleja inmediata, se requiere que los componentes químicos del extracto ya se encuentren distribuidos a nivel central; y al parecer la absorción y/o distribución de estos componentes activos tardan más de 20 min, que es el tiempo en el que realizamos la prueba de la formalina.

Diversos compuestos químicos como alcaloides, taninos, saponinas, flavonas, glucósidos y sesquiterpenlactonas han sido identificados en esta especie vegetal, por lo que resulta difícil saber cuál de ellos es el responsable de su efecto antinociceptivo. Es evidente que se deben realizar más estudios para tratar de identificar a las moléculas responsables de este efecto (Pérez y cols., 2005).

9. CONCLUSIONES

Estos resultados proporcionan evidencia científica de que la *Loeselia mexicana* (espinosilla) puede ser útil para el alivio del dolor abdominal, aunque su efecto parece no tener relación con alguna alteración sobre la motilidad intestinal. Esta especie vegetal también produjo efectos antinociceptivos en otros modelos de dolor además del visceral.

Esto sustenta el uso de esta planta en la medicina tradicional para el alivio de diferentes tipos de dolor, no sólo el abdominal.

10. PERSPECTIVAS

- De acuerdo con los resultados de este proyecto se propone continuar con los estudios para determinar el mecanismo de acción del extracto acuoso de *Loeselia mexicana* para producir sus efectos antinociceptivos.
- Así como su evaluación en otros modelos para corroborar otros usos que se le da en la medicina tradicional.
- Identificar y aislar a él o a los metabolitos de *Loeselia mexicana* responsables de su efecto antinociceptivo y ubicar nuevas moléculas como origen de fármacos para uso clínico.

11. REFERENCIAS

- Ángeles-López, G., Pérez-Vásquez, A., Hernández-Luis, F., Déciga-Campos, M., Bye, R., Linares, E., & Mata, R. (2010). Antinociceptive effect of extracts and compounds from *Hofmeisteria schaffneri*. *J Ethnopharmacol*, 131(2): 425–432. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2010.07.009>
- Arbos, J., Cegrí, A., Lopez-Soriano, F.R.J., Argiles, J.M. (1993). A simple method for determining the rate of gastrointestinal transit in the rat. *Arch Intern Physiol Bioch Biophys*, 101:113-115.
- Awouters, F., Megens, A., Verlinden, M. et al. (1993). Loperamide. *Digest Dis Sci* 38, 977–995. <https://doi.org/10.1007/BF01295711>
- Baker, D.E. (2007). Loperamide: a pharmacological review. *Rev Gastroenterol Disord*, 7 (Suppl 3):S11-8. PMID: 18192961.
- Brocks, D. R., Jamali, F. (1992). Clinical pharmacokinetics of ketorolac tromethamine. *Clin Pharmacokinet*, 23(6): 415–427. <https://doi.org/10.2165/00003088-199223060-00003>
- Cervero, F., Laird, J.M.A. (1999). Visceral pain. *Lancet*, 353(9170): 2145-2148.
- Chang, S., Li, X., Zheng, Y., Shi, H., Zhang, D., Jing, B., Chen, Z., Qian, G., & Zhao, G. (2022). Kaempferol exerts a neuroprotective effect to reduce neuropathic pain through TLR4/NF-κB signaling pathway. *Phytotherapy research : PTR*, 36(4), 1678–1691. <https://doi.org/10.1002/ptr.7396>
- Dagnino Sepúlveda, J. (2018). Definiciones y clasificaciones del dolor. *ARS MÉDICA Rev Cienc Méd*, 23(3): 4-5. <https://doi.org/10.11565/arsmed.v23i3.1034>.
- Departamento de farmacología e instituto de neurociencias. (2017). Estudios experimentales en dolor agudo e inflamatorio: el modelo de la administración intraplantar de formalina en el ratón. <http://pre.esteve.org/wp-content/uploads/2017/12/Estudios-experimentales.pdf>
- Díaz Puebla, F. (2005). Tipos de dolor y escala terapéutica de la O.M.S.: Dolor iatrogénico. *Oncología (Barcelona)*, 28(3), 33-37. Recuperado en 02 de octubre de 2022, de http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0378-48352005000300006&Ing=es&lng=es.
- Dubuisson D, Dennis SG. The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats. *Pain*. 1977;4:161-74
- Eddy, NB; Leimbach, D. (1953). "Synthetic analgesics. II. Dithienylethene- and dithienylbutylamines". *J Pharmacol Exp Ther*. 107 (3): 385–393. PMID 13035677.

- Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional. 2014-2023
https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/95008/9789243506098_spa.pdf
- Flórez, J.: FARMACOLOGÍA HUMANA. 3º edic. Editorial Masson-Salvat Medicina– 1998.
- Gawade, S. P. (2012). Acetic acid induced painful endogenous infliction in writhing test on mice. J Pharmacol Pharmacother, 3(4), 348. <https://doi.org/10.4103/0976-500X.103699>
- Grundy, L., Erickson, A., & Brierley, S. M. (2019). Visceral Pain. Ann Rev Physiol, 81(1), 261–284. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-020518-114525>
- Hagenacker, T., Hillebrand, I., Wissmann, A., Büsselberg, D., & Schäfers, M. (2010). Anti-allodynic effect of the flavonoid myricetin in a rat model of neuropathic pain: Involvement of p38 and protein kinase C mediated modulation of Ca²⁺ channels. European journal of pain (London, England), 14(10), 992–998. <https://doi.org/10.1016/j.ejpain.2010.04.005>
- Hall, J.E. Guyton y Hall. Tratado de fisiología médica. 12da ed. Elsevier Health Sciences; 2011.
- Herrera-Ruiz, M., González-Carranza, A., Zamilpa, A., Jiménez-Ferrer, E., Huerta-Reyes, M., Navarro-García, V. M. (2011). The standardized extract of *Loeselia mexicana* possesses anxiolytic activity through the γ -amino butyric acid mechanism. J Ethnopharmacol, 138(2), 261–267. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2011.09.010>
- IASP Subcommittee on Taxonomy. Pain terms: a list with definitions and notes on usage. Recommended by the IASP Subcommittee on Taxonomy. Pain. 1979;6(3):249-52.
- Islam, S., Shajib, M. S., Ahmed, T. (2016). Antinociceptive effect of methanol extract of *Celosia cristata* Linn. in mice. BMC Complement Altern Med, 16(1), 400. <https://doi.org/10.1186/s12906-016-1393-5>
- Kansal, A., Hughes, J. (2016). Visceral pain. Anaesth Intensive Care Med, 17(11), 543-547. <https://doi.org/10.1016/j.mpaic.2016.08.013>
- Kerrigan, S., Goldberger, B.A. (2020). Opioids. In: Levine, B.S., Kerrigan, S. (eds) Principles of Forensic Toxicology. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-030-42917-1_22
- Li, Y., Yao, J., Han, C., Yang, J., Chaudhry, M., Wang, S., Liu, H., & Yin, Y. (2016). Quercetin, Inflammation and Immunity. Nutrients, 8(3), 167. <https://doi.org/10.3390/nu8030167>
- Loipa, D., Martínez, G., Damián, M., Cárdenas, S., Suria, D., García, V. (2015). Transient receptor potential ion channels and their leading role in analgesic therapy. Rev Cubana Invest Biom, 34(3), 278–288. <http://scielo.sld.cu/pdf/ibi/v34n3/ibi08315.pdf>

- Loperamida. (2005, Junio). Loperamida Tabletas Antidiarrheal. Obtenido de http://www.facmed.unam.mx/bmnd/gi_2k8/prods/PRODS/112.HTM
- Loperamida: Antidiarreicos y electrolitos orales | Vademécum Académico de Medicamentos | Access Medicina | McGraw Hill Medical. (2015). Mhmedical.com. <https://accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?bookid=1552&ionid=90372398>
- Loperamida. (2018, 02 02). Vademecum.es. Retrieved November 20, 2022, from <https://www.vademecum.es/principios-activos-loperamida-a07da03>
- Llorente-Bousquets, J., Ocegueda, S. (2008). Estado del conocimiento de la biota, en Capital natural de México, vol. I: Conocimiento actual de la biodiversidad. Conabio, México, pp. 283-322. <https://www.biodiversidad.gob.mx/pais/quees.html>
- Martínez-González, C. L., Martínez, L., Martínez-Ortiz, E. J., González-Trujano, M. E., Déciga-Campos, M., Ventura-Martínez, R., & Díaz-Reval, I. (2017). Moringa oleifera, a species with potential analgesic and anti-inflammatory activities. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, 87, 482–488. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.12.107>
- Mahmoodi AN, Kim PY. Ketorolac. [Updated 2022 Apr 9]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK545172/>
- Mujumdar, A. M., Upadhye, A. S., Misar, A. V. (2000). Studies on antidiarrhoeal activity of *Jatropha curcus* root extract in albino mice. *J Ethnopharmacol*, 70(2), 183-187.
- Nash, D. L. (1979). Polemoniaceae. En: Sosa, V. (ed.). Flora de Veracruz. Fascículo 7. Instituto de Ecología. Xalapa, Veracruz, México. <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/polemoniaceae/loeselia-mexicana/fichas/ficha.htm>
- Navarro-García, V. M., Rojas, G., Avilés, M., Fuentes, M., Zepeda, G. (2011). In vitro antifungal activity of coumarin extracted from *Loeselia mexicana* Brand. *Mycoses*, 54(5), e569–e571. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0507.2010.01993.x>
- Nikolova, I., Tencheva, J., Voinikov, J., Petkova, V., Benbasat, N., Danchev, N. (2012) Metamizole: A Review Profile of a Well-Known “Forgotten” Drug. Part I: Pharmaceutical and Nonclinical Profile, *Biotechnol Biotechnol Equip*, 26:6, 3329-3337, DOI: 10.5504/BBEQ.2012.0089
- Pedrajas Navas, J., Molino González, Á.M. (2008). Bases neuromédicas del dolor. *Clínica y Salud*, 19(3), 277-293. http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1130-52742008000300002&lng=es&tlng=es.
- Pérez, G. S., Pérez, G. C., Zavala, M. A. (2005). A study of the antidiarrheal properties of *Loeselia mexicana* on mice and rats. *Phytomedicine*, 12(9), 670–674. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2004.01.01>

- Plantas medicinales de la farmacia viviente del CEFOFOR: Usos terapéuticos tradicionales y dosificación. (2010). Comisión Nacional Forestal | Gobierno | gov.mx. Retrieved julio 20, 2022, from https://www.conafor.gob.mx/biblioteca/plantas_medicinales_de_la_farmacia_viviente-conafor.pdf
- Rang, H. P., Dale, M. M. (2008). Farmacología (Sexta Edición ed.). Elsevier. Cap, 14, 575-584.
- Rojas, A., Bah, M., Rojas, J. I., Serrano, V., Pacheco, S. (1999). Spasmolytic activity of some plants used by the Otomi Indians of Querétaro (México) for the treatment of gastrointestinal disorders. *Phytomedicine*, 6(5), 367–371. [https://doi.org/10.1016/S0944-7113\(99\)80061-0](https://doi.org/10.1016/S0944-7113(99)80061-0)
- Rzedowski, & Calderón De Rzedowski, G. (1995). FLORA DEL BAJÍO Y DE REGIONES ADYACENTES POLEMONIACEAE*. Fascículo 33. Instituto de Ecología-Centro Regional del Bajío. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Pátzcuaro, Michoacán, México.<http://inecolbajio.inecol.mx/floradelbajio/documentos/fasciculos/ordinarios/Polemoniaceae%2033.pdf>
- Rzedowski, G. C. de y J. Rzedowski, 2001. Flora fanerogámica del Valle de México. 2a ed. Instituto de Ecología y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Pátzcuaro, Michoacán, México.
- Sánchez-Gavidia, J., Plante-Medina, C., Lujan-Carpio, E., Salazar-Granara, A. (2019). Efecto antinociceptivo y antiinflamatorio de la metformina en modelos experimentales en ratón. *Horiz Med*, 19(3), 49–57. <https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.24265/horizmed.2019.v19n3.08>
- Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (2021). Plantas medicinales de México. <https://www.gob.mx/semarnat/articulos/plantas-medicinales-de-mexico?idiom=es>
- Siegmund, E., Cadmus, R., Lu, G. (1957). A method for evaluating both non-narcotic and narcotic analgesics. *Proc Soc Exp Biol Med*. 95 (4), 729-731.
- Sinha, V.R., Kumar, R.V. Singh, G. (2009) Ketorolac tromethamine formulations: an overview, *Expert Opin Drug Deliv*, 6:9, 961-975, DOI: 10.1517/17425240903116006
- Smith, D.M., Glennie, C.W., Harborne, J.B., Williams, C.A. (1977). Flavonoid diversification in the polemoniaceae. *Bioche Syst Ecol*, 5(2), 107–115. [https://doi.org/10.1016/0305-1978\(77\)90038-2](https://doi.org/10.1016/0305-1978(77)90038-2)
- Than, A., Kulkarni, H.J., Hmone, W. Tha, S.J., (1989). Anti-diarrhoeal efficacy of some Burmese indigenous drug formulations in experimental diarrhoeal test models. *Int J Crude Drug Res*. 27:195-200
- 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 salvinorins in

- experimental pain models in mice. *J Ethnopharmacol*, 248, 112276. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2019.112276>
- Tjølsen, A., Berge, O. G., Hunskaar, S., Rosland, J. H., Hole, K. (1992). The formalin test: an evaluation of the method. *Pain*, 51(1), 5–17. [https://doi.org/10.1016/0304-3959\(92\)90003-T](https://doi.org/10.1016/0304-3959(92)90003-T)
- Torregrosa, S. (1994). *Boletín Dolor. Mecanismos y vías del dolor*. Retrieved 11-07, 22, from <http://publicacionesmedicina.uc.cl/Boletin/dolor/MecanismosVias.html>
- Tong, Y., Zhou, X. M., Wang, S. J., Yang, Y., & Cao, Y. L. (2009). Analgesic activity of myricetin isolated from *Myrica rubra* Sieb. et Zucc. leaves. *Archives of pharmacal research*, 32(4), 527–533. <https://doi.org/10.1007/s12272-009-1408-6>
- Toso, R. E., Skliar, M., Verna, E. (2017). Modelo experimental para evaluar el tránsito gastrointestinal en ratones. *Ciencia Veterinaria*, 4(1), 44-48. Recuperado a partir de <https://cerac.unlpam.edu.ar/index.php/veterinaria/article/view/1967>
- Ventura-Martínez, R., Déciga-Campos, M., Bustamante-Marquina, A., Ángeles-López, G. E., Aviles-Herrera, J., González-Trujano, M. E., & Navarrete-Vázquez, G. (2021). Quercetin decreases the antinociceptive effect of diclofenac in an arthritic gout-pain model in rats. *The Journal of pharmacy and pharmacology*, 73(10), 1310–1318. <https://doi.org/10.1093/jpp/rgab093>
- Valle-Dorado, M. G., Hernández-León, A., Nani-Vázquez, A., Ángeles-López, G. E., González-Trujano, M. E., Ventura-Martínez, R. (2022). Antinociceptive effect of *Mansoa alliacea* polar extracts involves opioid receptors and nitric oxide in experimental nociception in mice. *Biomed Pharmacother* 152, 113253. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.113253>
- Wemmie, J.A., Taugher, R.J., Kreple, C.J. (2013). Acid-sensing ion channels in pain and disease. *Nat Rev. Neurosci*, 14(7), 461–471. <https://doi.org/10.1038/nrn3529>
- Ye, G., Lin, C., Zhang, Y., Ma, Z., Chen, Y., Kong, L., Yuan, L., & Ma, T. (2021). Quercetin Alleviates Neuropathic Pain in the Rat CCI Model by Mediating AMPK/MAPK Pathway. *Journal of pain research*, 14, 1289–1301. <https://doi.org/10.2147/JPR.S298727>
- Zavala-Flores, Ernesto, Goicochea-Lugo, Sergio, Agurto-Muñoz, Thalia, Adrianzen-Rodríguez, Sandra, Coronel-Bustamante, Gianmarco, & Salazar-Granara, Alberto. (2013). Dosis-respuesta sobre la motilidad intestinal y el sistema nervioso de la interacción entre *Jatropha curcas* L. y metoclopramide. *Acta Médica Peruana*, 30(3), 120-127. Recuperado en 18 de enero de 2023, de http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1728-59172013000300004&lng=es&tlng=es.
- Zavaleta M, Rosete A, Jiménez TN, et al. (2007). Ketorolaco. *Med Sur*; 14(1):14-20. <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=12472>

