

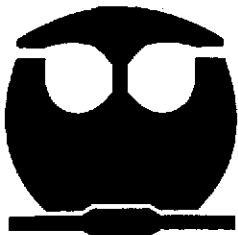


UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

"Evaluación de la toxicidad y efecto  
antinociceptivo de especies medicinales  
selectas de México".

**TESIS MANCOMUNADA**  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
**QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA**  
P R E S E N T A N :  
**ANGELES LOPEZ GUADALUPE ESTHER**  
**CASTAÑEDA CORRAL GABRIELA**



MEXICO, D.F.



EXAMENES PROFESIONALES  
FACULTAD DE QUIMICA

2006

0353025

2006



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Guadalupe Esther

Ángelo López

FECHA: 8/02/06

FIRMA: [Firma]

### JURADO ASIGNADO

- Presidente: Dra. Maria Isabel Aguilar Laurents  
Vocal: Dr. Andrés Navarrete Castro  
Secretario: Dra. Myrna Déciga Campos  
Primer suplente: Dr. José Fausto Rivero Cruz  
Segundo suplente: Dra. Maria Eva González Trujano

El presente trabajo se desarrolló en el laboratorio  
Número 124 del Departamento de Farmacia,  
Facultad de Química, UNAM.

Asesor:

[Firma]

Myrna Déciga Campos

Sustentantes:

[Firma]

Ángelo López Guadalupe Esther

Gabriela C.C.

Castañeda Corral Gabriela

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Castañeda Corral

Gabriela

FECHA: 8 de febrero del 2006

FIRMA: Gabriela C.C.

## **Sitio de realización de la tesis**

Laboratorio 124 del Departamento de Farmacia , Facultad de Química,  
Universidad Nacional Autónoma de México

## **Agradecimientos**

El trabajo experimental de esta tesis se realizó mediante el apoyo económico otorgado a través de los siguientes proyectos: DGAPA (Dirección General de Asuntos del Personal Académico) IN 212005 y SALUD-CONACYT (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología) No C01-018.

**Se agradece profundamente todo el apoyo brindado por la**

**Dra. Rachel Mata Essayag**

A las M. en C. Isabel Rivero Cruz y Laura Acevedo Arteaga, por las facilidades técnicas para el desarrollo del trabajo experimental.

## DEDICATORIA

**A mis Abuelitos Esther y Antonio**, que donde quiera que estén, seguramente están orgullosos de mí. A mi abuelita, especialmente le debo mucho de lo que soy ahora. Gracias.

**A mi Mamá**, por estar siempre conmigo, por ser mi mejor amiga y por apoyarme en todas mis decisiones (aunque en algunas no estuviera de acuerdo), económicamente, anímicamente, bueno en pocas palabras en todo. Se que siempre podré confiar en ella. Esta tesis es para ti. Muchas Gracias y Felicidades también.

**A mis Padrinos (Carlos y Malena)**, por ser como mis padres. Me enseñaron otro punto de vista de la vida, muy diferente al de mi casa. Gracias por iniciarme en la aventura de la lectura, una lección muy valiosa que espero continuar para toda la vida y gracias por permitirme ser su hija. Gracias Papás.

**A mi Papá**, por el apoyo brindado. Gracias por enseñarme a tener pasión por la historia de nuestro país (sobre todo la prehispánica) y gracias por estar conmigo en mi corazón. Muchas Gracias y felicidades también.

**A Carlos, Enrique y Julio**, mis primero y mejores amigos, mis confidentes. He aprendido mucho de ustedes, cada uno me ha enseñado importantes lecciones de vida, desde un sencillo problema de matemáticas, hasta como sonreírle a la vida. Gracias por ser mis hermanos, además de ser un ejemplo a seguir (si no los hubiera oído hablar tanto de la UNAM, seguramente no estaría aquí). Se que siempre podré contar con ustedes. Gracias.

**A Anita, Enrique de Jesús, Conchita, Bere, Carlitos y Normis** por brindarme momentos de felicidad, cuando muchas veces los necesitaba. Gracias.

**A mi Tío Adán**, por ser como mi abuelo, gracias por contarme esas deliciosas historias de tu vida y por aconsejarme siempre. Gracias

**A la UNAM**, gracias por darme los mejores momentos de mi vida, por permitirme hacer los mejores amigos que hasta la fecha tengo y por darme una oportunidad para realizar un sueño que he tenido desde los 5 años, ser Química.

**A Myrna**, por enseñarme a desenvolver en el área científica, la cual es difícil. Gracias por brindarme tu amistad, conocimientos y experiencia, sin la cual no hubiéramos podido realizar esta tesis.

**A Sergio y Osvaldo**, gracias por estos 6 años de amistad, por estar conmigo en las buenas y en las malas, (aunque suene trillado), por todas las travesuras, viajes, aventuras, vivencias y confidencias que hemos tenido, las cuales espero que no terminen. Saben que siempre podrán contar conmigo, siempre. Gracias por todo.

**A Gaby**, por aguantarme toda la carrera, imaginense, hasta en la tesis. Gracias por hacer divertido todo el trabajo.

**A Ale, Dianis, Jacque, Citta, Ivonne, Alex, Fernando (Fer), Martín, Pau, Alicia, Dulce, Sandra...** bueno a todos aquellos que siempre me hicieron reír, que siempre estuvieron ahí para compartir momentos inolvidables de la carrera. Gracias por enriquecer mi alma. Saben, los momentos que más extraño, son los de convivencia en la Facultad. Gracias por estar ahí.

**Al laboratorio 124**, conformado por: Dr. Fausto, Isabel, Blanca, Laura, Araceli, Diana, Mario, Toño, Sergio, Paco, Azalea, Nancy, Marcelino, Chavetti y Victor, gracias por integrarnos y hacer la estancia un lugar donde quieres trabajar. Espero llegar a conocerlos mejor en la Maestría.

**A la Dra. Rachel Mata**, gracias por darme la oportunidad de pertenecer a su laboratorio y por facilitarnos todo lo necesario para la realización de este trabajo.

**Guadalupe Esther Ángeles López**

## *Dedicatorias*

A dios, por darme la fortaleza para lograr este objetivo y por guiarme a lo largo de todo el camino.

A mi madre Ramona Corral, por apoyarme siempre en todas mis decisiones, por ser mi guía, mi amiga y mi todo en esta vida

A mi Hermano Luis M. y a mi sobrino, Luis Manuel por alegrar mis días con su cariño y sus bromas.

Muy especialmente a la Dra. Myrna Deciga Campos, por todas sus enseñanzas y consejos tanto a nivel académico como a nivel personal, ya que más que una asesora es una amiga incondicional.

A todos mis amigos que me acompañaron durante toda la carrera, ya que sin ellos, este tiempo no habría sido tan especial. Gracias a todos por los momentos que vivimos juntos.

A Lupita por ser una gran compañera y amiga y por estar a mi lado durante la realización de este trabajo.

A Ray por ser un gran amigo y apoyarme en los momentos mas difíciles de la vida. Gracias por brindarme tu amistad durante todos estos años.

*Gabriela Castañeda Corral*



## ÍNDICE

ÍNDICE	i
ÍNDICE DE TABLAS	iv
INDICE DE FIGURAS	v
ÍNDICE DE DIAGRAMAS	vi
ABREVIATURAS	vii
1. ANTECEDENTES	1
1.1 Dolor	2
1.1.1 Definición	2
1.1.2 Nocicepción	3
1.2 Transmisión del estímulo nociceptivo	4
1.2.1 Mediadores neuroquímicos	6
1.2.2 Etapas del proceso fisiológico del dolor	9
1.3 Modulación del estímulo nociceptivo	10
1.4 Terapéutica del dolor	13
1.4.1 Fármacos opioides	13
1.4.2 Fármacos Analgésicos Antiinflamatorios no esteroides (AINEs)	14
1.5 Plantas medicinales como alternativa terapéutica	15
1.6 Antecedentes sobre las plantas medicinales mexicanas objetos del presente estudio.	16
1.6.1 <i>Brickellia veronicaefolia</i> (Kunth) Gray.	16
1.6.2 <i>Exostema caribaeum</i> (Jacq.) Roem y Schult.	19
1.6.3 <i>Hintonia latiflora</i> (Sesse et Muciño ex. D.C.).	22





1.6.4 <i>Hintonia standleyana</i> Bullock.	25
1.6.5 <i>Ligusticum porteri</i> Cult et Rose.	27
1.7 Evaluación experimental del dolor en animales.	33
1.7.1 Prueba de estiramiento abdominal	34
1.7.2 Prueba de la placa caliente	34
1.8 Toxicidad	36
1.8.1 Estudios de toxicidad	36
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	39
3. HIPÓTESIS	41
4. OBJETIVOS	43
4.1 Objetivo general	44
4.2. Objetivos particulares	44
5. METODOLOGÍA	45
5.1 Material Vegetal	46
5.2 Material Biológico	47
5.3 Obtención de los extractos utilizados	47
5.4 Extractos y Fármacos	48
5.5 Evaluación biológica	49
5.5.1 Toxicidad aguda	49
5.5.2 Evaluación del efecto antinociceptivo	59
5.5.2.1 Prueba de estiramiento abdominal	59
5.5.2.2 Prueba de la placa caliente	61
5.6 Presentación de datos	64



---

5.6.1 Toxicidad aguda	64
5.6.2 Prueba de estiramiento abdominal	64
5.6.3 Prueba de la placa caliente	64
5.7 Análisis estadístico	65
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	66
7.1 Toxicidad aguda en ratón	67
7.2 Determinación del efecto antinociceptivo	82
8. CONCLUSIONES	94
9. SUGERENCIAS	96
10. BIBLIOGRAFIA	98
Anexo 1. Difusión de Resultados	108



## ÍNDICE DE TABLAS

1. Clasificación del dolor	2
2. Tipos de nociceptores y su mecanismo de acción	4
3. Mediadores neuroquímicos que participan en la activación de nociceptores	8
4. Metabolitos secundarios encontrados en la especie <i>Brickellia veronicaefolia</i>	18
5. Metabolitos secundarios encontrados en la especie <i>Exostema caribaeum</i>	20
6. Metabolitos secundarios encontrados en la especie <i>Hintonia latiflora</i>	23
7. Metabolitos secundarios encontrados en la especie <i>Hintonia standleyana</i>	26
8. Metabolitos secundarios encontrados en la especie <i>Ligusticum porteri</i>	29
9. Metabolitos secundarios encontrados en el género <i>Ligusticum</i>	31
10. Ventajas, desventajas y características de diversas pruebas experimentales	35
11. Pruebas para evaluar la toxicidad potencial de sustancias químicas para seres humanos	37
12. Plantas utilizadas en el presente estudio y parte utilizada para la elaboración del extracto	46
13. Dosis evaluadas en la fase 1 y 2 de la determinación de la toxicidad aguda	50
14. Tabla de observaciones realizadas durante la prueba de toxicidad	56
15. Determinación de $DL_{50}$ por el método de Lorke	68
16. Observaciones durante la prueba de toxicidad para <i>Brickellia veronicaefolia</i>	72



17. Observaciones durante la prueba de toxicidad para <i>Exostema caribaeum</i>	74
18. Observaciones durante la prueba de toxicidad para <i>Hintonia standleyana</i>	76
19. Observaciones durante la prueba de toxicidad para <i>Hintonia latiflora</i>	78
20. Observaciones durante la prueba de toxicidad para <i>Ligusticum porteri</i>	80

### ÍNDICE DE FIGURAS

1. Corte transversal de la médula espinal	6
2. Sistema de transmisión del dolor	10
3. Vía ascendente y descendente del dolor	12
4. Especies medicinales selectas de México	32
5. Evaluación biológica	63
6. Disminución del peso corporal generado por la administración del extracto de <i>Exostema caribaeum</i>	69
7. Efecto antinociceptivo de la dipirona en la prueba de estiramiento abdominal	83
8. Efecto antinociceptivo de la morfina en la prueba de la placa caliente	84
9. Efecto antinociceptivo del extracto CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH de <i>Brickellia veronicaefolia</i> en la prueba de estiramiento abdominal	86
10. Efecto antinociceptivo del extracto CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH de <i>Exostema caribaeum</i> en la prueba de estiramiento abdominal	87
11. Efecto antinociceptivo del extracto CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH de <i>Hintonia latiflora</i> en la prueba de estiramiento abdominal	89
12. Efecto antinociceptivo del extracto CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH de <i>Hintonia standleyana</i> en la prueba de estiramiento abdominal	90
13. Efecto antinociceptivo del extracto CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH de <i>Ligusticum porteri</i> en la prueba de estiramiento abdominal	91



### ÍNDICE DE DIAGRAMAS

1. Procedimiento general seguido para la evaluación de la toxicidad aguda 51
2. Procedimiento general para la evaluación del efecto antinociceptivo utilizando la prueba de estiramiento abdominal 60
3. Procedimiento general para la evaluación del efecto antinociceptivo utilizando la prueba de la placa caliente 62

**ABREVIATURAS**

5-HT	Serotonina
AAINE's	Analgésicos antiinflamatorios no esteroideos
ABC	Área bajo la curva.
AMP <sub>c</sub>	Adenosin monofosfato cíclico
ANOVA	Análisis de varianza
BK	Bradicidina
COX	Enzima Ciclooxigenasa
COX-1	Ciclooxigenasa, isoforma 1
COX-2	Ciclooxigenasa, isoforma 2
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	Diclorometano
DL <sub>50</sub>	Dosis letal media
e.e.	Error estándar
g	Gramos
GABA	Ácido gamma amino butírico
GC	Guanilato ciclasa
Gi	Proteína G inhibitoria
GMP <sub>c</sub>	Guanosin monofosfato cíclico.
h	horas
i.p	Via intraperitoneal
LC	Locus coeruleus
MeOH	Metanol
min	Minutos
NA	Noradrenalina
NO	Óxido Nítrico
NRM	Núcleo de rafé magnus
OMS	Organización Mundial de la Salud



PGE <sub>2</sub>	Prostaglandina E <sub>2</sub>
PGs	Prostaglandinas
PKC	Proteína cinasa C
p.o.	Per os (Vía oral)
seg	Segundos
SGPA	Sustancia Gris Periacueductal
SNC	Sistema Nervioso Central
SON	Sintasa de Óxido nítrico
SP	Sustancia P
u.a.	Unidades de área.



## 1. ANTECEDENTES





## 1.1 Dolor

### 1.1.1 Definición

El dolor es uno de los síntomas más frecuentes que se ha presentado a lo largo de la historia de la humanidad. Anteriormente se pensaba que éste era producto de la magia y la hechicería, pero ahora se sabe que se debe a una lesión que debe ser tratada o evitada. Por lo tanto, cumple una función protectora muy importante.

El dolor es una experiencia emocional y sensorial desagradable asociada con daño tisular real o potencial, y puede describirse en términos de ese daño (IASP, 1986). En la Tabla 1 se muestra una clasificación general del dolor, el cual puede ser agudo, crónico o neuropático.

Tabla 1. Clasificación del dolor (Aldrete, 2000).

DOLOR	DEFINICIÓN
Agudo	Es aquel que dura segundos, minutos o a lo sumo días, generalmente desaparece cuando la afección que lo origina llega a su periodo normal de remisión. Es provocado por estimulación nociva, por daño en estructuras somáticas o viscerales profundas y por funcionamiento anormal visceral o muscular.
Crónico	Es aquel que persiste un mes o más, se asocia con un proceso patológico. Puede ser provocado por un proceso patológico visceral o somático, por la disfunción prolongada del sistema nervioso central, periférico o ambos y por factores psicopatológicos o ambientales.
Neuropático	Es el resultado de múltiples tipos de disfunción del sistema nervioso. Se define como el dolor que se presenta en ausencia de daño tisular agudo concurrente o daño tisular no neural.



### 1.1.2 Nocicepción

La manifestación del dolor se debe a la presencia de mecanismos neurofisiológicos. Sin embargo, se acompaña de factores psicológicos, sociales y culturales, los cuales modifican el umbral del dolor ante la presencia de un mismo estímulo. Es por ello, que la evaluación del dolor se vuelve subjetiva.

Se ha denominado Nocicepción al proceso neurofisiológico por el cual se percibe dolor, en donde no intervienen los procesos emotivos. Para que se pueda percibir nocicepción se requiere de la presencia de un estímulo (nocivo), este puede ser de origen térmico, mecánico, eléctrico o químico (Yaksh, 1997). Estos estímulos nociceptivos llegan directamente a los receptores del dolor, los cuales se conocen como nociceptores y se localizan en la piel, los tejidos blandos y en el tejido subcutáneo.

Los receptores del dolor son selectivos, es decir, que aquellos que censan información química no podrán ser activados por un estímulo térmico. Debido a que tienen un umbral alto de estimulación y tienen la capacidad de codificar la intensidad del estímulo en una frecuencia de impulsos, solo son activados cuando se rebasa el umbral (Aldrete, 2000). En la Tabla 2 se muestran las características de cada tipo de nociceptores.



Tabla 2. Tipos de nociceptores y su mecanismo de acción (Basbaum *et al.*, 2000).

NOCICEPTORES	MECANISMO DE ACCIÓN
Térmicos	Son activados por temperaturas extremas ( $> 45^{\circ}\text{C}$ ó $< 5^{\circ}\text{C}$ ). Están constituidos por fibras A $\delta$ finamente mielinizadas y de pequeño diámetro que conducen las señales a unos 5–30 m/s; estas fibras se encuentran en piel, tejido celular subcutáneo, vísceras, músculos y otras estructuras profundas.
Mecánicos	Son activados por una presión intensa aplicada a la piel. Están constituidos por fibras A $\delta$ .
Polimodales	Son activados por estímulos mecánicos, químicos o térmicos (tanto fríos como calientes) de gran intensidad. Tienen fibras C no mielinizadas y de pequeño diámetro que conducen las señales lentamente, por lo general a velocidades inferiores a 1.0 m/s; estas fibras se encuentran en zonas pilosas.

## 1.2 Transmisión del estímulo nociceptivo

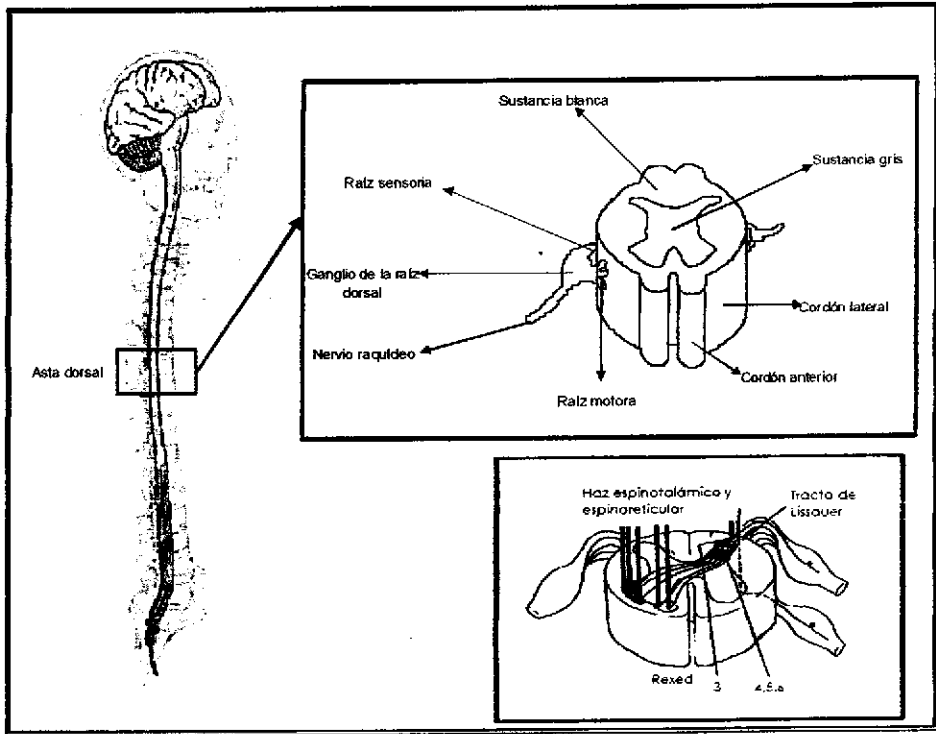
El dolor puede surgir a partir de la estimulación de los nociceptores en tres zonas principales del cuerpo: la piel, las estructuras músculo-esqueléticas y las vísceras. Estos estímulos dolorosos o nociceptivos se transmiten a lo largo de sus axones hacia el asta posterior de la médula espinal, en este sitio las fibras penetran por la división lateral de la raíz dorsal, luego se bifurcan y ascienden o descienden por el fascículo de Lissauer (Forth, 1995).

Cuando el estímulo llega a la médula espinal (Figura 1) hay sinapsis en una neurona de segundo orden, estas neuronas de relevo se concentran en una serie de haces localizados preferentemente en el cordón anterior y anterolateral de la sustancia blanca. Dependiendo del núcleo en donde terminan, estos haces se



denominan espino-reticular, espino-mesencefálico y espino-tálmico y transmiten la información a nivel supraespinal (Teixidor y Massó, 1997).

Las fibras nerviosas procedentes de las neuronas de la médula, agrupadas en los haces previamente mencionadas, tienen tres sitios principales de término: la formación reticular del bulbo, la formación reticular mesencefálica y el tálamo. Esta multiplicidad de conexiones tiene una repercusión especial. Por una parte, es capaz de involucrar un amplio número de núcleos, originando una constelación de procesos que acompañan a la percepción dolorosa; en el área afectiva, vegetativa y en la conducta consciente e inconsciente. Por otra parte, algunas de estas conexiones significan puntos en donde la aferencia nociceptiva estimula o provoca la reacción de los sistemas eferentes, de dirección descendente hacia la médula, responsables de controlar la entrada de impulsos nociceptivos en la propia asta posterior de la médula (Millan, 1999).



**Figura 1.** Corte transversal de la médula espinal, la cual esta constituida por sustancia blanca y gris. El estímulo nociceptivo va desde un nervio periférico hacia el ganglio de la raíz dorsal y de éste hacia la sustancia gris, en donde se encuentra el tracto espinoreticular y espinotalámico que transmiten la información por toda la médula espinal hacia el tálamo (Basbaum *et al*, 2000).

### 1.2.1 Mediadores neuroquímicos

En el proceso nociceptivo participan numerosos moduladores neuroquímicos (Tabla 3), que tienen un papel muy importante desde la periferia hasta Sistema Nervioso Central (SNC). Por ejemplo, cuando se detecta un estímulo nociceptivo, en



los nociceptores se liberan prostaglandinas (PGs), serotonina (5-HT) y bradicinina (BK) entre otros mediadores que participan en la generación de potenciales de acción en los nervios periféricos y sensibilizan a los nociceptores (Millan, 1999).

Cuando el estímulo llega a la médula espinal se libera principalmente la sustancia P (SP), quien hace sinapsis en la neurona de segundo orden (Millan, 1999).

Particularmente, las PGs y el óxido nítrico (NO) tienen una participación muy importante en la transmisión del dolor. Cuando se percibe el estímulo nociceptivo, se libera ácido araquidónico de las membranas celulares, a partir de éste se biosintetizan las PGs a través de una enzima conocida como ciclooxigenasa (COX), de la cual se conocen dos isoformas, la COX-1 y la COX-2 (Vane, 1971).

El NO es un radical gaseoso que se produce en diferentes tipos de células, funciona en la señalización molecular y contribuye a una gran variedad de funciones biológicas, dentro de las cuales se encuentra la transmisión sináptica en el SNC y periférico (Luo y Cizkova, 2000; Meller y Gebhart, 1993). El NO tiene una participación dual en el proceso nociceptivo, ya que por una parte a nivel periférico estimula la generación de GMP cíclico (GMPc), el cual se ha demostrado que genera analgesia. Y por otra parte, se ha demostrado que el mismo NO participa en la generación de dolor en el SNC (Soares, 2000).



Tabla 3. Mediadores neuroquímicos que participan en la activación de nociceptores.

MEDIADORES NEUROQUÍMICOS	PARTICIPACIÓN EN LA NOCICEPCIÓN
Bradicina (BK)	Es un derivado de la cascada de la coagulación. Su liberación produce incremento en la permeabilidad vascular, vasodilatación y activa nociceptores. Incrementa la liberación de ácido araquidónico y a partir de éste se sintetizan prostaglandinas que participan en la nocicepción (Dray y Perkins, 1993; Millan, 1999).
Prostaglandinas (PGs)	Pueden producir dolor por: 1) Activación de fibras aferentes nociceptivas produciendo dolor local, 2) Por los estímulos químicos o físicos, que sensibilizan a los nociceptores, 3) Por la liberación sustancia P. (Son incapaces de producir dolor por ellas mismas) (Ferreira y Nakamura 1979; Nicol <i>et al.</i> , 1992).
Serotonina (5-HT)	Actúa en los receptores 5-HT <sub>2</sub> , que están acoplados a proteínas G, ocasionando el cierre de canales de K <sup>+</sup> , activando las neuronas sensoriales (Forzard, 1984; Taiwo <i>et al.</i> , 1992).
Óxido nítrico (NO)	El NO regula la actividad de la ciclooxigenasa-2 (COX-2). La activación de la guanilato ciclasa ocasiona el aumento de la producción de GMP cíclico y subsecuentemente la activación de canales de potasio y proteínas cinasas para generar analgesia (Salvemini <i>et al.</i> , 1993; Ferreira <i>et al.</i> , 1991).
Protones (H <sup>+</sup> )	Activan a los nociceptores y los sensibilizan a estímulos mecánicos (Steen <i>et al.</i> , 1992).
Canales de Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> y Ca <sup>++</sup>	El daño local en los axones ocasionan que se incremente la conductancia de Na <sup>+</sup> y Ca <sup>++</sup> , los canales de K <sup>+</sup> se cierran, contribuyendo a la excitabilidad neuronal y a la producción de hiperalgesia (Devor <i>et al.</i> , 1993; Weinreich y Wonderlin 1987; Dolphin, 1990).
Sustancia P (SP)	Se encuentra en neuronas primarias no mielinizadas y sus terminales. Al liberarse tiene efectos algogénicos y vasodilatadores. Sus efectos son: vasodilatación, estimulación del músculo liso intestinal, estimulación de la secreción salival y diuresis (Aldrete, 2000).

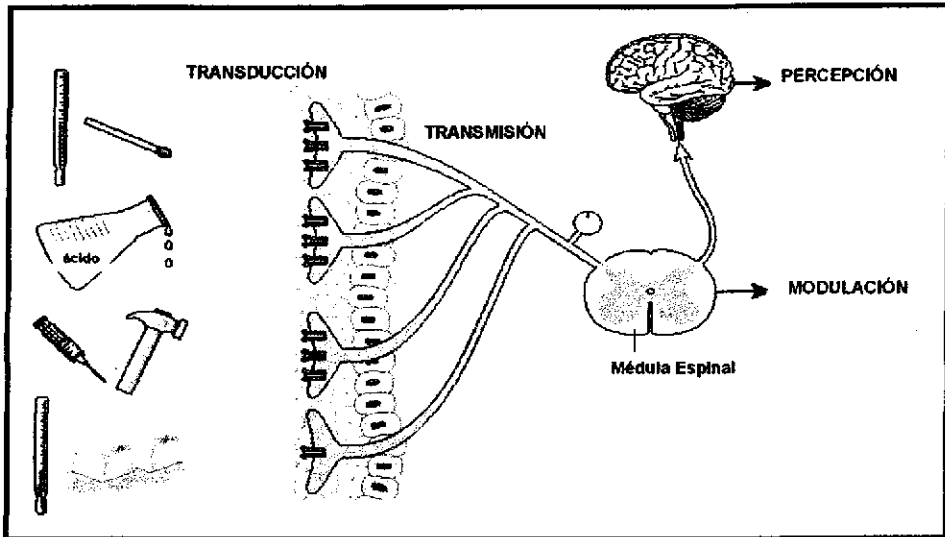


### 1.2.2 Etapas del proceso fisiológico del dolor

Una vez que un estímulo nociceptivo ya sea de naturaleza química, térmica o mecánica se presenta en las terminales periféricas, comienza el proceso fisiológico del dolor, el cual está constituido por cuatro etapas: transducción, transmisión, modulación y percepción (Figura 2).

El proceso de **transducción** se refiere a la transformación del estímulo nocivo (térmico, mecánico o químico) periférico a un estímulo eléctrico que se propaga hasta la médula espinal, lo que se conoce como **transmisión**. Una vez que el impulso llega a la médula espinal se da un proceso de **modulación**, en donde se liberan sustancias endógenas, como los opioides, que controlan la transmisión del impulso nocivo, si el estímulo es muy fuerte y es capaz de superar un umbral, entonces se envía al SNC. Ya en el cerebro se presenta el proceso de **percepción**, en donde los tres primeros componentes interactúan con una serie de otros fenómenos individuales, para crear la experiencia subjetiva y emocional denominada dolor (Basbaum, 2000; Millan 1999). Este proceso es conocido como **VÍA ASCENDENTE DEL DOLOR** (Figura 3).





**Figura 2.** Sistema de transmisión del dolor: Transducción, el estímulo doloroso (térmico, mecánico o químico) es transformado en potenciales de acción en las terminales de fibras aferentes periféricas; Transmisión, los potenciales de acción viajan a través de la aferente primaria hasta llegar a la médula espinal; Modulación, en la médula espinal se forman sinápsis con neuronas que suben a centros superiores; Percepción, integración de la señal nociceptiva en la corteza somatosensorial (Wolf y Salter, 2000).

### 1.3 Modulación del estímulo nociceptivo

La información nociceptiva puede ser modulada endógenamente a diferentes niveles. El mecanismo principal de modulación es a nivel supraespinal, en éste se activan sistemas que se dirigen hacia la médula espinal para contrarrestar la información de la periferia (Teixidor y Massó, 1997).



A nivel supraespinal la sustancia gris periacueductal (SGPA), el núcleo de rafé magnus (NRM) y el locus coeruleus (LC) modulan la transmisión nociceptiva a nivel espinal (Forth y Martín, 1995). Estos sistemas están interconectados entre sí, permitiendo que la activación de uno genere actividad en otro.

La SGPA está constituida principalmente por receptores opioides y una red GABAérgica que es tónicamente activa (Benhbehani, 1995). Existen tres familias de péptidos opioides endógenos: encefalinas, dinorfinas y  $\beta$ -endorfinas que actúan en receptores específicos opioides  $\mu$ ,  $\delta$  y  $\kappa$  (Gavariaux-Ruff y Kieffer, 1999). En la SGPA abundan los receptores de tipo  $\mu$ , cuando éstos son activados por los opioides endógenos o exógenos se inhibe al sistema GABAérgico y se activan las células de apagado "off-cells" localizadas en el NRM, las cuales producen analgesia. Estas células de apagado permanecían inactivas por la actividad inhibitoria GABAérgica (Roering *et al.*, 1988).

En el NRM existen tres tipos de células: células de encendido (on-cells), células de apagado (off-cells) y células neutrales (neutral-cells) que se proyectan hacia el trigémino y médula espinal a lo largo del funículo dorsolateral. Las neuronas "off-cells" tienen una influencia inhibitoria tónica sobre las aferentes nociceptivas de la médula espinal, mientras que las "on-cells" facilitan la respuesta de estas aferencias al estímulo nocivo y las "neutral-cells" no experimentan cambios. Cuando las células de apagado son activadas hay liberación de 5-HT, la cual actúa en los receptores 5-HT<sub>1B</sub> y 5-HT<sub>3</sub> ocasionando la disminución de la excitabilidad de las fibras aferentes (Fields *et al.*, 1991).



El LC es un sistema que se activa cuando la noradrenalina (NA) ocupa los receptores adrenérgicos  $\alpha_2$ . Este sistema se proyecta hacia la médula espinal para bloquear la información nociceptiva, debido a la actividad presináptica. Se genera un incremento en el umbral de la actividad de las fibras C e hiperpolarización de fibras aferentes primarias, que trae como consecuencia una disminución de la liberación de SP (Nance y Sawynok, 1987; Besson, 1997). Este proceso es conocido como **VÍA DESCENDENTE DEL DOLOR** (Figura 3).

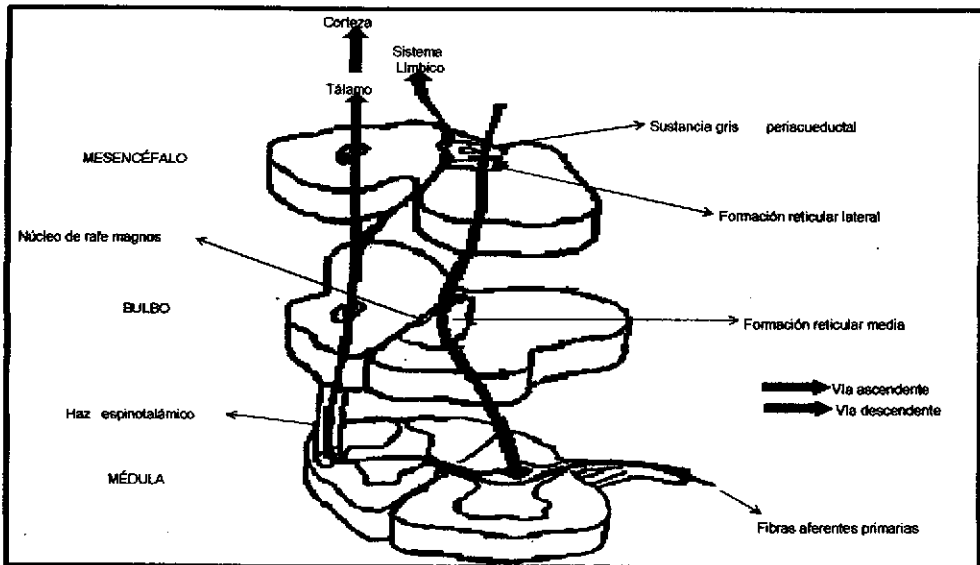


Figura 3. Vía ascendente y descendente del dolor (Basbaum, 2000).



## 1.4 Terapéutica del dolor

### 1.4.1 Fármacos opiáceos

Este grupo de fármacos constituye una gran herramienta en la actualidad para el tratamiento del dolor. De todos los analgésicos éstos presentan el rango de eficiencia más amplio, proporcionando el método más seguro para conseguir un alivio rápido del dolor de intensidad moderada a severa. El efecto analgésico de los opiáceos se produce a través de su acción sobre el SNC. La morfina por ejemplo actúa en los receptores  $\mu$ , estos receptores están acoplados a una proteína G inhibitoria ( $G_i$ ) que al activarse genera una disminución de la actividad adenilato ciclasa, así como de las concentraciones intracelulares de AMP cíclico (AMPc) y un aumento de las concentraciones de GMPc (Minneman e Iversen, 1976). Behbehani, Jiang y Chandler en 1990 demostraron que al activarse los receptores  $\mu$  se genera una hiperpolarización de las neuronas, esto trae como consecuencia una disminución de la liberación de neurotransmisores como la SP a nivel espinal.

Los efectos secundarios relacionados con la dosis (sedación, depresión respiratoria, prurito y estreñimiento) son similares en los diferentes tipos de opiáceos. Éstos fármacos pueden clasificarse en débiles o menores, como la codeína, hidrocodeína y tramadol y opioides mayores como la morfina, el butorfanol y el fentanil.



#### 1.4.2 Fármacos Analgésicos-Antiinflamatorios no Esteroideos (AINEs)

Los AINEs son una familia de fármacos que se han clasificado en el mismo grupo por compartir efectos similares; antipiréticos, antiinflamatorios y analgésicos. Estos fármacos se utilizan ampliamente en el tratamiento del dolor agudo, son de fácil acceso y generalmente no requieren de vigilancia médica.

Todos los AINEs comparten un mecanismo de acción, inhibición de la COX y por lo tanto la inhibición de la producción de PGs (Vane, 1971). Algunos AINEs pueden presentar mecanismos de acción adicionales; por ejemplo, el diclofenaco puede aumentar la síntesis de  $\beta$ -endorfinas, activando así un mecanismo opioide (Sacerdote *et al.*, 1985), el paracetamol incrementa la concentraciones de 5-HT a nivel central activando el sistema serotoninérgico y opioide (Pini *et al.*, 1996 y 1997), el diclofenaco (Tonussi y Ferreira, 1994), la dipirona (Lorenzetti y Ferreira, 1985) y el ketorolaco (Granados-Soto *et al.*, 1995) estimulan la producción de NO a nivel periférico, previniendo la sensibilización del nociceptor y aumentando las concentraciones de GMPc que están correlacionadas con un aumento de analgesia. Por otra parte, el paracetamol y el ibuprofeno evitan la síntesis de NO a nivel espinal, lo que ocasiona que disminuya la propagación del efecto nociceptivo (Björkman *et al.*, 1994; Björkman, 1995).



### 1.5 Plantas medicinales como alternativa terapéutica

El uso de las plantas con fines curativos se ha practicado ampliamente en la mayoría de las culturas primitivas en todo el mundo, de tal forma que todos los pueblos han tenido y tienen información sobre las propiedades medicinales de un gran número de plantas propias de su medio. Estos conocimientos generales se han adquirido, acumulado y transmitido de generación en generación hasta la actualidad (Alarcón, 1980).

En México, se ha documentado el uso de las plantas medicinales para el tratamiento de algunas enfermedades en algunos códices, el más antiguo, es la recopilación de Fray Bernardino de Sahagún y Martín de la Cruz, conocido como *Códice Cruz-Badiano* (Dibble y Anderson, 1950; Ortiz de Montellano, 1975; De la Cruz, 1991). También se ha documentado ampliamente el empleo de plantas medicinales en publicaciones etnobotánicas de algunos grupos multidisciplinarios (Alcorn, 1984; Browner, 1985; Linares y Bye, 1987; Heinrich, 1989; Aguilar *et al.*, 1994; Argueta, 1994).

Debido a que México es un país con una extraordinaria biodiversidad, un gran segmento de la población recurre al empleo de plantas medicinales para solucionar problemas de salud. Se ha informado que cerca de 5,000 (Bye, 1993) a 7000 (Lozoya, 1993) especies de plantas se usan en México como medicina tradicional. Particularmente, el Instituto Nacional Indigenista ha reportado cerca de 3,000 plantas



medicinales utilizadas en las prácticas médicas alternativas (tanto tradicionales como complementarias).

### **1.6 Antecedentes sobre las plantas medicinales mexicanas objetos del presente estudio.**

Una de las alternativas terapéuticas para el tratamiento del dolor es el empleo de plantas medicinales, a las cuales se les ha atribuido actividad analgésica. A continuación se describen aspectos botánicos, etnobotánicos y químicos y farmacológicos algunas especies que se utilizan comúnmente en México para el tratamiento del dolor.

#### 1.6.1 *Brickellia veronicaefolia* (Kunth) Gray.

##### Clasificación taxonómica

<b>Reino:</b>	Plantae
<b>Phylum:</b>	Anthophyta
<b>Clase:</b>	Dicótiledoneae
<b>Orden:</b>	Asterales
<b>Familia:</b>	Asteraceae
<b>Género:</b>	<i>Brickellia</i>
<b>Especie:</b>	<i>veronicaefolia</i>

##### Nombre común

Gobernadora de Puebla, mejorana, orégano de cerro, pexton, peistón, pestón, y hierba del perro (Argueta, 1994).



### Descripción

Planta de aproximadamente 80 cm con hojas opuestas, crenadas, ligeramente vellosas, de 4 a 6 cm de largo por 7 a 16 de ancho. Flores de cabezuela color rosa (Figura 4). La parte que se utiliza de la planta generalmente son las hojas, las cuales tienen un sabor amargo y picante (Argueta *et al.*, 1994).

Se localiza generalmente en casi todo el país, principalmente en Durango, Guerrero, Michoacán y Oaxaca.

### Composición química

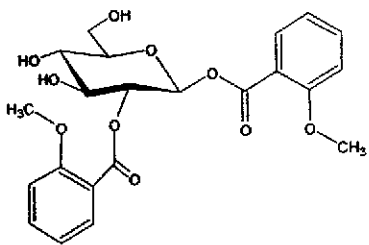
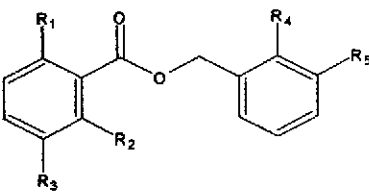
A partir del género *Brickellia* se han aislado diversos metabolitos secundarios como los que se enuncian a continuación: 5,7,3'-trihidroxi-3,6,4'- trimetoxiflavona, Ácido 3 $\alpha$ -angeloiloxi-2 $\alpha$ -hidroxy-13,14Z-dehidrocátivico, 6-metoxikaemferol 3-O- $\beta$ -D-robinobiosido y Xantomicrol (Pérez *et al.*, 2004; Meckes *et al.*, 2002; Rosler *et al.*, 1984).

Particularmente, de la especie *Brickellia veronicaefolia* se han aislado resinas ácidas, aceite esencial, eupatopextina y taninos (Martínez, 1989). Estudios fitoquímicos previos han revelado la presencia de 6 metoxiflavonoides y diterpenos tipo labdano, recientemente se han encontrado también tres nuevos derivados del ácido benzoico (Tabla 4) (Rivero-Cruz *et al.*, 2005).





Tabla 4. Metabolitos secundarios encontrados en la especie *Brickellia veronicaefolia* (Rivero-Cruz et al., 2005).

NOMBRE QUÍMICO	ESTRUCTURA QUÍMICA				
1,2-bis-O-(2-metoxibenzoil)-β-d-glucopiranosido					
					
	R1	R2	R3	R4	R5
3 - (β-glucopiranosiloxi) bencil 2, 6 - dimetoxibenzoato	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	H	H	β-D-glucosiloxi
3 - hidroxibencil 2, 6 - dimetoxibenzoato	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	H	H	OH
2 - metoxibencil 2 - hidroxibenzoato	OH	H	H	OCH <sub>3</sub>	H
Bencil 2, 6 - dimetoxibenzoato	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	H	H	H
3-metoxibencil 2 -hidroxi - 6 - metoxibenzoato	OH	OCH <sub>3</sub>	H	H	OCH <sub>3</sub>
Bencil 2 - hidroxi - 6 - metoxibenzoato	OH	OCH <sub>3</sub>	H	H	H
Bencil 2, 3, 6 - trimetoxibenzoato	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	H	H
Bencil 2 - hidroxi - 3, 6 - dimetoxibenzoato	OH	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	H	H
3 - metoxibencil 2, 6 - dimetoxibenzoato	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	H	H	OCH <sub>3</sub>



### Usos comunes

*Brickellia veronicaefolia* se usa en la medicina tradicional como infusión para el tratamiento de gastralgia y dispepsia atónica, para dolor epigástrico, apéndice y cólicos agudos, así como en forma de fomentos para calmar dolores artríticos (Martínez, 1989).

### 1.6.2 *Exostema caribaeum* (Jacq.) Roem y Schult.

#### Clasificación taxonómica

<b>Reino:</b>	Plantae
<b>Phylum:</b>	Magnoliophyta
<b>Clase:</b>	Magnoliopsida
<b>Orden:</b>	Rubiales
<b>Familia:</b>	Rubiaceae
<b>Género:</b>	<i>Exostema</i>
<b>Especie:</b>	<i>caribaeum</i>

#### Nombre común

Copalche, copalchi, jocotillo de cerro, palo santo, falsa quina, zalacche

#### Descripción

Árbol con ramas horizontales que aproximadamente mide entre 10 y 15 m de alto. Corteza escamosa café con manchas blanquecinas, fisuras longitudinales profundas y anchas de color negro, tronco todo cubierto de escamas, con apariencia de troncos viejos. Hojas pecioladas, ovaladas de 5 a 11 cm de largo. Flores solitarias de corola



blanca (Figura 4). Fruto capsular ovalado elíptico de 1 a 1.5 cm de largo, de color café oscuro lustroso (Anaya, 1991). Se localiza generalmente en Bahamas, México, India occidental y Costa Rica.

### Composición química

Algunos de los compuestos aislados han sido 4-fenilcumarinas, tres óxido cumarinas (Tabla 5) y un glucósido (Mata *et al.*, 1987; Mata *et al.*, 1988).

### Usos comunes

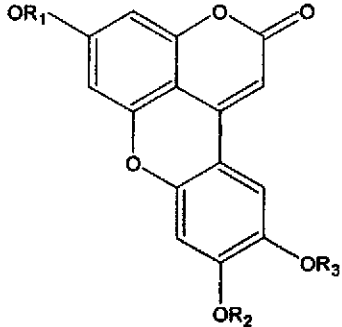
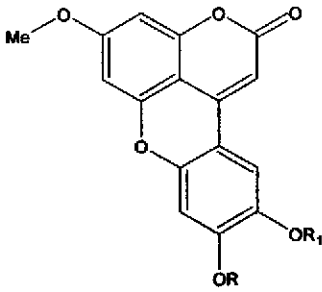
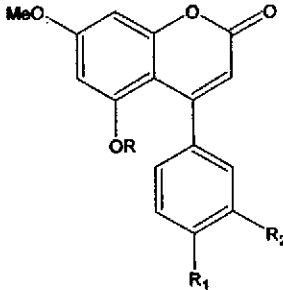
Los usos en medicina tradicional son contra el paludismo y el dengue, anemia, diarrea, hemorroides, dolor epigástrico y como estimulante del apetito.

**Tabla 5.** Metabolitos secundarios encontrados en la especie *Exostema caribaeum*.

NOMBRE Y ESTRUCTURA QUÍMICA	
<p><math>R_1 = \beta\text{-D-Gal}, R_2 = R_3 = \text{H}</math></p>	<p><math>R_1 = R_2 = R_3 = \text{H}</math></p>
5-O- $\beta$ -D-galactosil-7-metoxi-3',4'-dihidroxi-4-fenilcumarina	7,4', 5' - trihidroxi - 4 - fenil - 5,2'-óxido-cumarina



Tabla 5. Continuación.

NOMBRE Y ESTRUCTURA QUÍMICA			
 <p style="text-align: center;"><math>R_1=R_2=Me, R_3=H</math></p> <p style="text-align: center;">7,4'-dimetoxi-5'-hidroxi-4-fenil-5,2'-óxido-cumarina</p>		 <p style="text-align: center;"><math>R=R_1=H</math></p> <p style="text-align: center;">4'-5'-dihidroxi-7-metoxi-4-fenil-5,2'-óxido-cumarina</p>	
			
	R	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
	R	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
5,7,4'-trimetoxi-4-fenilcumarina	CH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	H
5,3'-dihidroxi-7,4'-dimetoxi-4-fenilcumarina	H	OCH <sub>3</sub>	OH
5-O-β-D-galactopiranosil-7,4'-dimetoxi-4-fenilcumarina	β-D-galactopiranosil	OCH <sub>3</sub>	H
5-O-β-d-glucopiranosil-3',4'-dihidroxi-7-metoxi-4-fenilcumarina	β-D-glucopiranosil	OH	OH
5-O-(6'-acetil)-β-D galactopiranosil -3',4'-dihidroxi-7-metoxi-4-fenilcumarina	6'-acetil-β-D-galactopiranosil	OH	OH



### 1.6.3 *Hintonia latiflora* (Sesse et Muciño ex. D.C.).

#### Clasificación taxonómica

<b>Reino:</b>	Plantae
<b>Phylum:</b>	Anthophyta
<b>Clase:</b>	Eudicotyledones
<b>Orden:</b>	Ninguno
<b>Familia:</b>	Rubiaceae
<b>Género:</b>	<i>Hintonia</i>
<b>Especie:</b>	<i>latiflora</i>

#### Nombre común

Quina blanca, caobilla, solimán prieto, falsa quina, cascarillo o cascarilla.

#### Descripción

Árbol de 8 m de alto con una superficie externa escamosa y en ocasiones con corcho en las partes de tronco viejo. La superficie interna es lisa, en ocasiones con manchas alargadas de color blanco y de color café (Figura 4). Tiene un sabor amargo. Pertenece a un grupo de plantas al cual se le denomina complejo "Copalchi". Se localiza principalmente en Chihuahua, Durango, Jalisco y Michoacán.

#### Composición química

Se han realizado estudios en donde se ha encontrado que contiene fenilcumarinas, una oxidocumarina, neoflavonoides, aceites fijos, caucho, resinas, materia colorante, taninos y principios amargos. Recientemente se ha encontrado



que contiene también curcubitacinas, como 3-O- $\beta$ -D-glucopiranosil-23,24-dihidrocurcubitacina F (Tabla 6) (Mata y Camacho, 1990; Mata y Cervera, 1992).

### Usos comunes

En la medicina tradicional es utilizada en el tratamiento de fiebre, diabetes, malaria, dengue, como eupéptico, estimulante, purgante, para dolor epigástrico, antibilioso, diurético, y usado externamente contra afecciones dérmicas. El extracto metanólico-acuoso se utiliza como un agente fitoantidiabético para diabetes tipo II (Korec, 2000; Pinto, 1997).

Tabla 6. Metabolitos secundarios encontrados en la especie *Hintonia latiflora* (Camacho, 1990).

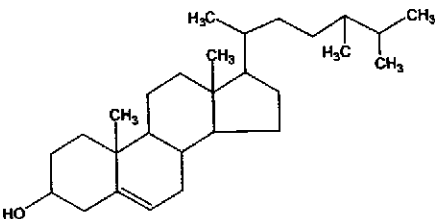
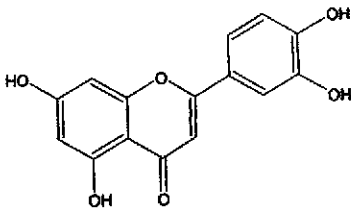
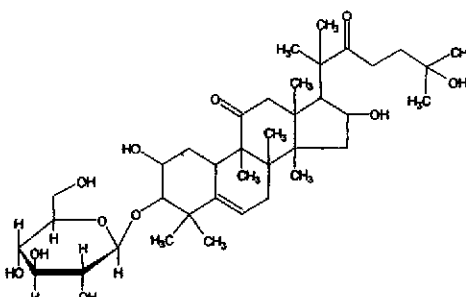
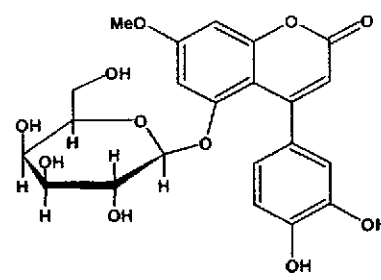
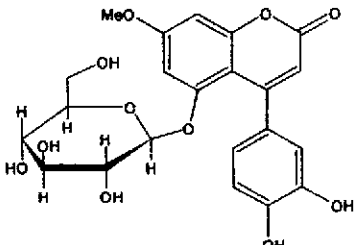
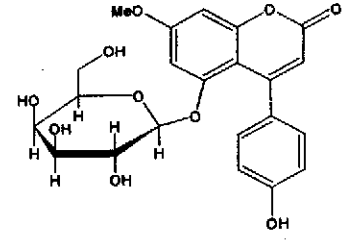
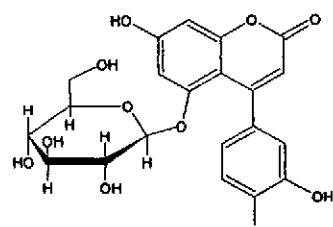
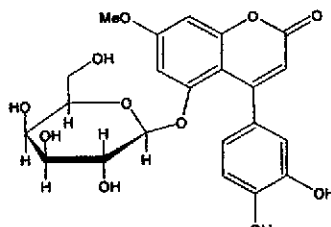
NOMBRE Y ESTRUCTURA QUÍMICA	
 <p><math>\beta</math>-sitoesterol</p>	 <p>7-metil-leuteolina</p>



Tabla 6. Continuación.

<b>NOMBRE Y ESTRUCTURA QUÍMICA</b>	
	
<p><b>3-O-β-D-glucopiranosil-23,24-dihidrocurcubitacina F</b></p>	<p><b>5-O-β-D-galactopiranosil-3',4'-dihidroxi-7-metoxi-4-fenilcumarina</b></p>
	
<p><b>5-O-β-D-glucopiranosil-3'-4'-dihidroxi-7-metoxi-4-fenilcumarina</b></p>	<p><b>5-O-β-D-galactopiranosil-4'-hidroxi-7-metoxi-4-fenilcumarina</b></p>
	
<p><b>5-O-β-D-glucopiranosil-7,4',3'-trihidroxi-4-fenilcumarina</b></p>	<p><b>5-O-(6''-acetil-β-D-galactopiranosil)-3'-4'-dihidroxi-7-metoxi-4-fenilcumarina</b></p>



#### 1.6.4 *Hintonia standleyana* Bullock.

##### Clasificación taxonómica

<b>Reino:</b>	Plantae
<b>Phylum:</b>	Anthophyta
<b>Clase:</b>	Eudicotyledones
<b>Orden:</b>	Ninguno
<b>Familia:</b>	Rubiaceae
<b>Género:</b>	<i>Hintonia</i>
<b>Especie:</b>	<i>standleyana</i>

##### Nombre común

Copalchi blanco, copalchi, copalche, cascarilla, palo de miztle y quina blanca.

##### Descripción

Arbusto o árbol de hojas pecioladas, de 3 a 12 cm, ovaladas, de base cordiforme, superficie plateada, principalmente en el envés; fruto capsular trilobado. Flores en racimos axilares muy pequeños (Figura 4). La planta se encuentra distribuida de Colima a Tamaulipas y en Veracruz, Yucatán y Chiapas.

##### Composición química

De esta especie vegetal se han aislado algunos metabolitos como: 5-O- $\beta$ -D-glucopiranosil-7-metoxi-3',4'-dihidroxi-4-fenilcumarina, 3-O- $\beta$ -D-glucopiranosil-23,24-dihidrocurcubitacina F, y 5-O-[ $\beta$ -D-apiofuranosil-(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-glucopiranosil]-7-metoxi-3',4'-dihidroxi-4-fenilcumarina (Tabla 7) (Guerrero - Analco *et al.*, 2005). Tanto el



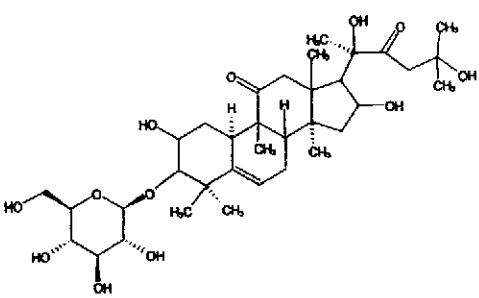
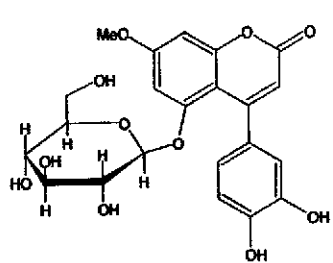
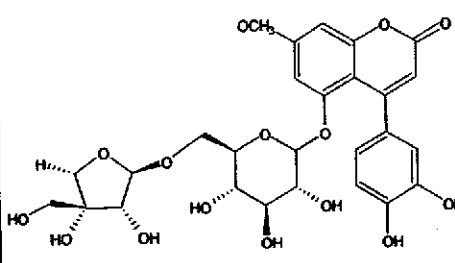


primer como el tercer compuesto también se han encontrado en le especie *Hintonia latiflora*.

Usos comunes

En la medicina tradicional se utiliza como tratamiento contra el paludismo, en casos de indigestión e intestinos irritables, la parte utilizada es la corteza.

**Tabla 7.** Metabolitos secundarios encontrados en la especie *Hintonia standleyana* (Guerrero-Analco et al., 2005).

NOMBRE Y ESTRUCTURA QUÍMICA	
 <p>3-O-β-D-glucopiranosil-23,24- dihidrocurcubitacina F</p>	
 <p>5-O-β-D-glucopiranosil-7-metoxi-3',4'-dihidroxi-4-fenilcumarina</p>	 <p>5-O-[β-D-apiofuranosil-(1→6)-β-D-glucopiranosil]-7-metoxi-3',4'-dihidroxi-4-fenilcumarina.</p>



### 1.6.5 *Ligusticum porteri* Cult et Rose.

#### Clasificación taxonómica

<b>Reino:</b>	Plantae
<b>Phylum:</b>	Anthophyta
<b>Clase:</b>	Eudicotyledones
<b>Orden:</b>	Ninguno
<b>Familia:</b>	Umbelliferae
<b>Género:</b>	<i>Ligusticum</i>
<b>Especie:</b>	<i>porteri</i>

#### Nombre común

Chuchupate, Guariaca, Washía (Tarahumara), Hierba del cochino y Raíz del cochino.

#### Descripción

Herbácea de hasta 1 metro de alto, con tallos lisos, color café. Hojas palmaticompuestas, con peciolo largos y envainantes. Inflorescencia compuesta de 7 a 11 umbelas; flores actinomorfas. Semilla ovoide, con rayas longitudinales a manera de costillas más claras, color café. Raíz pivotante gruesa, de 1 a 4 cm de diámetro, posee un olor a umbelífera fuerte y un jugo blanco opaco (Figura 4). Se localiza principalmente en Chihuahua y Durango.



### Composición química

En el género *Ligusticum* se han aislado algunos ftálicos (Tabla 8). Algunos de estos ftálicos son las sustancias responsables del sabor y olor característico de ciertas plantas comestibles de esta familia, como el apio, y tales sustancias se utilizan como odorizantes y saborizantes en la industria farmacéutica (Reza, 1991). Sin embargo, todavía no está completamente claro que tanto, los ftálicos son responsables de la actividad farmacológica atribuida a las plantas que los contienen, aunque se ha encontrado que algunos ftálicos tienen actividad anticolinérgica y sedante (Reza, 1987).

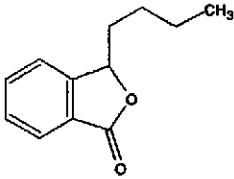
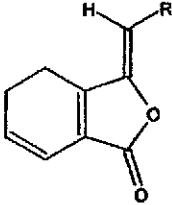
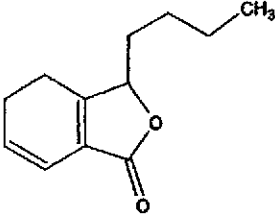
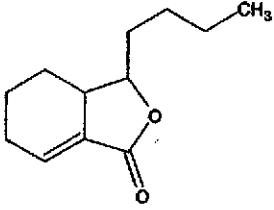
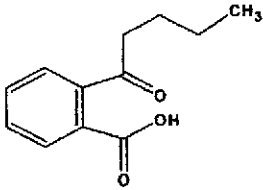
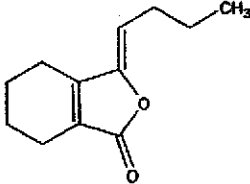
### Usos comunes

En la medicina tradicional se utiliza la raíz para el tratamiento de dolores de cabeza, epigástrico, cólicos, enfermedades gastrointestinales, infecciones de la piel, úlceras, diarrea, bronquitis, neumonía, problemas de circulación, tuberculosis, resfriados, tos, diabetes, y mareos. Para el tratamiento de dolor de pulmones y tos, se recomienda tomar una taza de té en la mañana y al medio día.

Además, su decocción se usa tanto en té como en baño para curar los dolores de cabeza, para bajar la fiebre, quitar la tos y la neumonía. De igual manera para el dolor de garganta se utiliza tanto en forma de té como de extracto alcohólico.



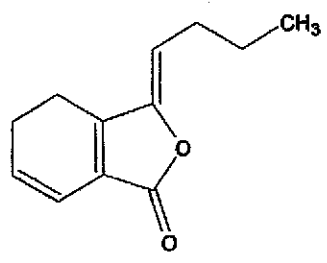
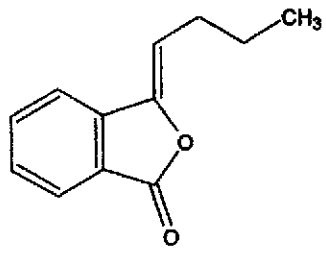
Tabla 8. Metabolitos secundarios encontrados en el género *Ligusticum* (Delgado, 1996; Delgado *et al.*, 1992).

NOMBRE Y ESTRUCTURA QUÍMICA	
 <p>3-butilftálico</p>	 <p>n-propil ligustilido</p>
 <p>3-butil-4,5-dihidroftálico</p>	 <p>Neocnidilido</p>
 <p>Ácido n-valerofenon-o-carboxílico</p>	 <p>Anhídrido sedanónico</p>



Particularmente, de la especie *Ligusticum porteri* se han aislado metabolitos tales como Z- ligustilido y Z-Butilidenftálido (Tabla 9).

Tabla 9. Metabolitos secundarios de *Ligusticum porteri* (Delgado et al., 1992; Figueroa, 1997).

NOMBRE Y ESTRUCTURA QUÍMICA	
 <p>Z- Ligustilido</p>	 <p>Z-Butilidenftálido</p>



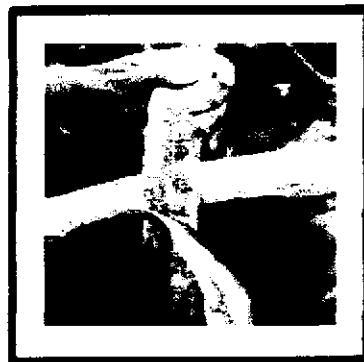
*Brikellia veronicaefolia*



*Exostema caribaeum*



*Hintonia latiflora*



*Hintonia standleyana*



*Ligusticum porteri*

Figura 4.- Especies medicinales selectas de México utilizadas en el presente estudio.



### 1.7 Evaluación experimental del dolor en animales.

La inducción de un proceso nociceptivo en animales requiere de un estímulo conocido, manipulado y controlado por el investigador en condiciones de laboratorio. El uso de los procedimientos de inducción de dolor permite, entre otras cosas, evaluar en condiciones controladas la eficacia y potencia de los tratamientos, analizar cuáles son los mecanismos fisiológicos involucrados en el proceso de nocicepción así como evaluar los complejos sistemas que lo controlan (Maixner, 2001).

Los estudios de laboratorio aportan ciertas ventajas a los realizados en la clínica. El experimentador ejerce un control riguroso sobre los parámetros a evaluar, como la naturaleza del dolor, la intensidad, duración, frecuencia y localización del estímulo, lo que capacita para atribuirle en principio, las respuestas del sujeto de manipulación experimental (Kapelashnik, 1990; Maixner, 2001).

El dolor en los animales puede ser estimado solamente por el examen de sus reacciones. Un estímulo nocivo puede ser definido por su naturaleza física, su sitio de aplicación y por lo que ha ocurrido previamente en el tejido en ese sitio. Por ejemplo, una estimulación eléctrica permite diferenciar entre las fibras nerviosas primarias aferentes y las fibras A $\delta$  y C (Lima, 2003). El calor estimula selectivamente los termorreceptores y nociceptores. Los modelos experimentales que emplean estímulos químicos son, indudablemente, los más similares al dolor clínicamente agudo ya que en este se liberan mediadores inflamatorios (Le Bars *et al.*, 2001).





Existen varias pruebas experimentales para la evaluación de nocicepción (Tabla 4). En las pruebas de dolor físico, las reacciones son evocadas por estímulos térmicos (pruebas del golpe de cola (*tail-flick test*) y de la placa-caliente (*hot-plate test*). La prueba del dolor tónico con la utilización de agentes algogénicos intradérmicos (*formalin test*), agentes algogénicos intraperitoneales tales como el ácido acético o acetilcolina (*writhing test*) (Le Bars *et al.*, 2001).

#### 1.7.1 Prueba de estiramiento abdominal

Esta prueba consiste en administrar al animal por vía intraperitoneal una sustancia algésica como ácido acético o acetilcolina, generando una irritación severa de las membranas, provocando comportamientos muy estereotipados como contracciones abdominales, movimientos del cuerpo entero (particularmente de las patas traseras), torcimiento de los músculos dorso-abdominales, y una reducción de la actividad motora. Estos comportamientos son considerados como reflejos y una evidencia de dolor visceral (Koster *et al.*, 1959)

#### 1.7.2 Prueba de la placa caliente

Esta prueba consiste en colocar al animal en una placa caliente que tiene una temperatura que puede variar entre 45 y 56 °C. La rata o ratón ante el estímulo térmico pueden generar varios tipos de conductas, tales como sacudida o lamida de



la pata, micción o salto; el tiempo transcurrido entre la colocación del ratón en la placa y que presente alguna de estas conductas se denomina latencia de respuesta (Woolfe y MacDonald, 1944; Eddy y Leimbach, 1953).

**Tabla 10.** Ventajas, desventajas y características de diversas pruebas experimentales (Wilson y Mogil, 2001).

PRUEBA	VENTAJAS	DESVENTAJAS	COMENTARIOS
<b>ESTÍMULO MECÁNICO</b>			
Presión sobre la pata (Randall-Sellito)	Aplicación precisa del estímulo (pata derecha vs pata izquierda)	Requiere entrenamiento	El umbral de vocalización puede no reflejar con precisión el umbral nociceptivo
Filamentos de Von Frey	No requiere entrenamiento	Respuesta inestable, laborioso y consume mucho tiempo	Los filamentos se deben de calibrar periódicamente. Sensible a la colocación precisa del filamento
<b>ESTÍMULO TÉRMICO</b>			
Placa caliente (Hot plate)	Simplicidad	Puede desarrollar hiperalgesia Entrenamiento previo	El lamido, levantamiento y sacudida de pata así como el salto son las conductas a observar
Retiro de la pata (Hargreaves)	No se requiere de entrenamiento. Aplicación precisa del estímulo (pata derecha vs pata izquierda)	Respuesta inestable Laborioso Consume tiempo	Sensible a la temperatura ambiental
Retiro de la cola (Tail flick)	Respuesta estable Simplicidad	Requiere entrenamiento	Sensible al lugar y temperatura ambiental. La pigmentación de la cola afecta la absorción del calor
<b>ESTÍMULO QUÍMICO</b>			
Estiramiento abdominal (writhing)	Sensible a los analgésicos débiles	Sensible (a no analgésicos) Alta variabilidad	Los estiramientos tienen algún grado de subjetividad
Fornalina	Sensible a analgésicos opiáceos y no opiáceos	Laborioso y consume mucho tiempo	Sensible a la habituación y a la temperatura ambiental



## 1.8 Toxicidad

### 1.8.1 Estudios de toxicidad

Los estudios de toxicidad, son de gran importancia no solo para el desarrollo de nuevos fármacos sino también para la mayor parte de las sustancias químicas industriales (pesticidas, agroquímicos, cosméticos, plásticos, etc.) y productos alimenticios. El objetivo de los estudios toxicológicos es "evaluar el riesgo o peligro potencial que un agente químico o físico puede ocasionar sobre la salud humana cuando es objeto de exposiciones agudas o crónicas".

Podría definirse la toxicidad como "el estudio cualitativo y cuantitativo de los efectos deletéreos ocasionados por agentes químicos o físicos sobre la estructura y función de los sistemas vivos y la aplicación de estos estudios para la evaluación de la seguridad y la prevención de daños al hombre y a las formas de vida útiles". El término cualitativo se refiere al tipo de órgano diana afectado, en comparación con otras sustancias conocidas, mientras que el término cuantitativo se refiere a la relación dosis-respuesta (Ecobichon, 1997).

Las regulaciones modernas establecen que, previo a la comercialización de cualquier sustancia, esta debe estar sujeta a pruebas de laboratorio para determinar sus propiedades físicas, químicas y toxicológicas con la finalidad de contar con información referente a su peligrosidad. Para ello, se han elegido pruebas específicas, y diseñado protocolos para su realización, de manera que se generen



datos pertinentes, confiables, reproducibles, precisos y que tengan un significado estadístico y biológico (Ecobichon, 1997). En la Tabla 11 se muestran algunas de las pruebas de toxicidad que se pueden realizar a una sustancia.

La evaluación de la toxicidad potencial de las sustancias para los seres humanos se realiza a partir de datos generados en animales de laboratorio expuestos en condiciones controladas, por lo anterior, se tienen que hacer extrapolaciones y partir de supuestos que no necesariamente reflejan la realidad, como es el que la sensibilidad a las sustancias es igual entre ellos y que la forma en que afectan las sustancias a los animales es igual a como afectarían a los seres humanos.

**Tabla 11.** Pruebas para evaluar la toxicidad potencial de sustancias químicas para seres humanos (Barlow, 2002).

CATEGORÍA	PRUEBAS
Agudas	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Toxicidad aguda oral en ratas y ratones</li> <li>▪ Toxicidad aguda dérmica</li> <li>▪ Toxicidad aguda inhalatoria en rata y ratón</li> <li>▪ Irritación primaria en ojos de conejo</li> <li>▪ Irritación primaria dérmica</li> <li>▪ Sensibilidad dérmica</li> <li>▪ Neurotoxicidad aguda retardada en gallina</li> </ul>
Crónicas	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Alimentación crónica en dos especies roedor y no roedores</li> <li>▪ Carcinogenicidad en dos especies, rata y ratón de preferencia</li> <li>• Teratogenicidad en dos especies</li> <li>▪ Reproducción, dos generaciones</li> <li>▪ Mutagenicidad</li> <li>▪ Mutaciones génicas</li> <li>▪ Aberraciones cromosómicas</li> <li>• Otros efectos genotóxicos</li> </ul>
Subcrónicas	Alimentación por 90 días en roedores y no roedores
Especiales	Metabolismo general



Particularmente, la toxicidad aguda tiene por objeto determinar los efectos de una dosis única y muy elevada de una sustancia. Usualmente, el punto final del estudio es la muerte del animal y la toxicidad aguda se expresa como dosis letal 50 ( $DL_{50}$ ), que representa la dosis de la sustancia que produce la muerte en el 50% de los animales (Tallarida, 1979).

Uno de los métodos más sencillos para determinar la toxicidad de una sustancia es el método de Lorke (1983). En este método se ha establecido un protocolo en donde se administra una sustancia en dosis de 10, 100 y 1000 mg/kg y se observa la letalidad y reacciones adversas en los animales de experimentación por un periodo de 14 días. Después de este periodo se realiza una segunda fase dependiendo del número de muertes que se observaron en la primera.



## **2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**



En México las plantas medicinales son ampliamente utilizadas por una gran mayoría de la población para aliviar sus enfermedades. Por tal motivo un volumen importante de estas plantas se comercializa indiscriminadamente. Aún más, el consumo de estas plantas se realiza sin regulación alguna. A pesar del uso importante de las plantas medicinales en México, éstas no han sido analizadas desde el punto de vista químico, farmacológico o toxicológico, motivo por el cual resulta imposible regular el uso de las plantas medicinales en México

La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha establecido lineamientos para documentar y regular científicamente el uso de las plantas medicinales. Para ello es necesario generar esta información científica requerida para elaborar monografías que sienten las bases para el uso racional de las especies más utilizadas en la mediana población.

*Brickellia veronicaefolia*, *Exostema caribaeum*, *Hintonia latiflora*, *Hintonia standleyana* y *Ligusticum porteri* son plantas que se utilizan frecuentemente en las prácticas médicas alternativas (tanto tradicionales como complementarias) como agentes analgésicos. A pesar de su uso para aliviar el dolor, no hay evidencias científicas que demuestren el efecto analgésico e inocuidad de las mismas.

El presente proyecto tiene la finalidad de proporcionar de manera preliminar la toxicidad aguda y el efecto analgésico de cinco especies ampliamente utilizadas en la medicina popular de México.

La información generada en el presente proyecto servirá para corroborar, documentar y establecer de manera preliminar la inocuidad de estas plantas.



### **3. HIPÓTESIS**





El uso popular de las especies *Exostema caribaeum*, *Hintonia latiflora*, *Hintonia Standleyana*, *Brickellia veronicaefolia* y *Ligusticum porteri*, como agentes analgésicos en conjunto con los resultados de ensayos farmacológicos de nocicepción y toxicidad aguda permitirán corroborar la eficacia e inocuidad de las especies.



## 4. OBJETIVOS



#### 4.1 Objetivo general

Determinar la toxicidad aguda de los extractos  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -MeOH (1:1) de *Brickellia veronicaefolia*, *Exostema caribaeum*, *Hintonia latiflora*, *Hintonia standleyana* y *Ligusticum porteri*, así como su posible efecto antinociceptivo en un modelo de nocicepción químico (estiramiento abdominal) y uno térmico (placa caliente). Utilizando como especie biológica al ratón.

#### 4.2 Objetivos particulares

1. Evaluar la toxicidad aguda en ratón de los extractos  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -MeOH (1:1) de *Brickellia veronicaefolia*, *Exostema caribaeum*, *Hintonia latiflora*, *Hintonia standleyana* y *Ligusticum porteri* utilizando el método de Lorke.
2. Evaluar el efecto antinociceptivo de los extractos crudos  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -MeOH (1:1) de *Brickellia veronicaefolia*, *Exostema caribaeum*, *Hintonia latiflora*, *Hintonia standleyana* y *Ligusticum porteri* en las pruebas nociceptivas de estiramiento abdominal y la placa caliente.



## 5. METODOLOGÍA



## 5.1 Material vegetal

En la Tabla 12 se enlistan las plantas medicinales mexicanas utilizadas en el presente estudio, el lugar de colecta y la parte utilizada para la elaboración del extracto.

Tabla 12. Especies vegetales utilizadas en el presente estudio y parte utilizada para la elaboración del extracto.

ESPECIE VEGETAL	PARTE UTILIZADA	LUGAR DE COLECTA	REGISTRO HERBARIO
<i>Brickellia veronicaefolia</i>	Aérea	Municipio de la soledad Aculco, Estado de México. Diciembre 2000.	Herbario Nacional MEXU. No. Voucher: BRC-1M
<i>Exostema caribaeum</i>	Corteza	Atenango del Río, Estado de Guerrero	Herbario Nacional MEXU. No. Voucher: 1167098. Clasificado por: Marcela Ramos.
<i>Hintonia latiflora</i>	Corteza	Temalac, Municipio de Atenango del Río, Estado de Guerrero. Enero 2003.	Herbario Nacional MEXU. No. Voucher: 33436. Clasificado por: Robert Bye
<i>Hintonia standleyana</i>	Corteza	Temalac, Municipio de Atenango del Río, Estado de Guerrero. Enero 2003.	Herbario Nacional MEXU. No. Voucher: 824. Clasificado por: Paul Hersh
<i>Ligusticum porteri</i>	Corteza	Chihuahua, Chihuahua. Junio del 2003.	Herbario Nacional MEXU. No. Voucher: 33435. Clasificado por: Robert Bye



## 5.2 Material biológico

Se utilizaron ratones macho de la cepa ICR (25-30g), obtenidos de Harlan México A.C. Los animales se mantuvieron bajo las siguientes condiciones ambientales:  $21 \pm 2^\circ\text{C}$ , 70-80% de humedad relativa y un ciclo de 12 h luz/ oscuridad.

Todos los animales tuvieron un periodo de adaptación en el área de experimentación de 5 días previo a la realización del experimento. Permanecieron sin alimento y con libre acceso al agua 15 h antes de cada evaluación.

Todos los experimentos se realizaron bajo los lineamientos establecido por el "Comité de Investigación y Ética de la Asociación Internacional para el estudio del Dolor" (Covino *et al.*, 1980), los "Lineamientos y Estándares Éticos para la Investigación del Dolor Experimental en Animales" (Zimmermann, 1983) y de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana (NOM 062-ZOO-1999). Todos los animales fueron sacrificados en una cámara de  $\text{CO}_2$  después de las evaluaciones.

## 5.3 Obtención de los extractos utilizados

El proceso de desecación del material vegetal se realizó a temperatura ambiente y se fragmentaron en un molino mecánico de cuchillas (Wiley). Posteriormente, se llevó a cabo la obtención de los extractos por el método de maceración, utilizando



una mezcla de diclorometano-metanol 1:1 ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  - MeOH), cada uno de los extractos se concentró al vacío hasta sequedad.

#### 5.4 Extractos y Fármacos

Todos los extractos  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -MeOH (1:1) de las diferentes especies vegetales, se suspendieron en el vehículo, el cual estuvo constituido por Tween 80 al 0.2 % en solución salina fisiológica (0.9 %).

Los fármacos de referencia como la dipirona (Neomelubrina, obtenida de laboratorios Aventis Pharma) y la morfina (obtenida de Laboratorios Pisa) se disolvieron en este mismo vehículo.

La solución de ácido acético se preparó con solución fisiológica (0.9%) al 0.6%.

Todos los extractos y fármacos fueron suspendidos (extractos) o disueltos (fármacos de referencia) el mismo día de la evaluación.

#### Dosis

Las dosis que se evaluaron fueron de 75, 150, 300 y 600 mg/kg para los extractos por vía oral (p.o.); 25, 50 y 100 mg/kg (p.o.) para la dipirona y 1.25, 2.5 y 5 mg/kg para la morfina por vía intraperitoneal (p.i.).



### Vías de administración

Para la administración oral se utilizó un volumen de 0.2 mL por cada 10 g de peso corporal y para la administración intraperitoneal se utilizó un volumen de 0.1 mL por cada 10 g de peso corporal (Figura 5).

## **5.5 Evaluación biológica**

### **5.5.1 Toxicidad aguda**

Para determinar la  $DL_{50}$  se utilizó el método de Lorke (1983), el cual consta de dos fases de evaluación; en la primera fase los extractos se administraron por vía oral a las dosis de 10, 100 y 1000 mg/kg, dependiendo del número de muertes se seleccionaron las dosis para la segunda fase de acuerdo a la Tabla 12. Por ejemplo, si en la fase 1 se mueren 2 de 3 animales (2/3) en la dosis de 1000 mg/kg, entonces se seleccionan las dosis de 200, 400, 800 y 1600 mg/kg.

Antes de la administración de los extractos los animales fueron observados cuidadosamente para conocer su conducta normal. Para cada dosis se utilizaron tres animales, con un grupo control al cual solo se le administró el vehículo. El parámetro determinado fue cuantal, ya que se cuenta el número de muertes por cada dosis.





Tabla 13. Dosis evaluadas en la fase 1 y 2 de la determinación de la toxicidad aguda (Lorke, 1983).

DOSIS (mg/kg) RESULTADOS DE LA FASE 1			DOSIS ELEGIDAS PARA LA SEGUNDA FASE DE EVALUACIÓN			
10	100	1000				
0/3	0/3	0/3		1600	2900	5000
0/3	0/3	1/3	600	1000	1600	2900
0/3	0/3	2/3	200	400	800	1600
0/3	0/3	3/3	140	225	370	600
0/3*	1/3	3/3	50	100	200	400
0/3	2/3	3/3	20	40	80	160
0/3	3/3	3/3	15	25	40	60
1/3	3/3	3/3	5	10	20	40
2/3	3/3	3/3	2	4	8	16
3/3	3/3	3/3	1	2	4	8

\* Número de animales muertos / Número de animales usados.

Después de la administración, los ratones fueron observados durante la primera hora (ver método de observación) solo para las dosis de 10, 100 y 1000 mg/kg. Durante 14 días se registro su peso corporal con la finalidad de seguir observando a los ratones y determinar si incrementaban o disminuían su peso corporal.

A todos los animales se les realizó una necropsia, con la finalidad de examinar de manera macroscópica la morfología general de los órganos como corazón, intestino, hígado, pulmón y riñón. En el Diagrama 1 se muestra el procedimiento general de la evaluación de toxicidad aguda.

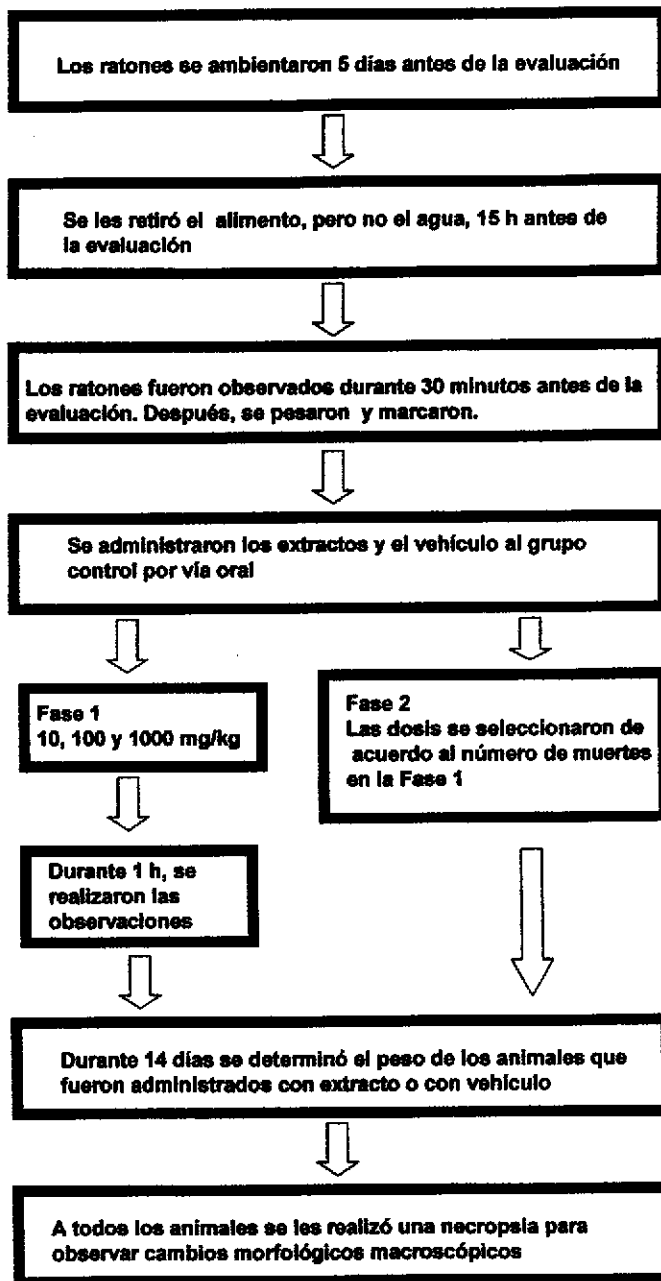


Diagrama 1. Procedimiento general seguido para la evaluación de la toxicidad aguda.



### Observaciones realizadas durante la evaluación de toxicidad

Después de la administración oral de 10, 100 y 1000 mg/kg de los extractos en la prueba de toxicidad aguda, los animales se observaron cuidadosamente y se realizaron las anotaciones correspondientes en una tabla (Tabla 14) en la cual se detallan los efectos que fueron observados, siempre comparando con los ratones a los cuales se les administró vehículo. A continuación se detalla como se realizaron las observaciones para el llenado de la tabla (Samuelson, 1991).

#### Efectos evaluados:

**Tono muscular:** Para evaluar el tono muscular del ratón, se sujetó de la cola y se dejó caer desde una altura de 30 cm, se observó si el ratón presentaba una caída frontal o caudal así como la presencia de flexión corporal al caer. *(Si el animal no presentaba una caída frontal, sin flexión corporal significó pérdida del tono muscular.)*

**Fuerza muscular:** Para evaluar la fuerza muscular se colocó al ratón en una cuerda (sujeta por dos extremos) y se determinó el tiempo de sujeción de la cuerda. *(Si el animal no podía sujetarse o presentaba una caída menor a 30 seg, se consideró que había perdido fuerza muscular).*

**Conducta social:** Como parte de su conducta se observó si el ratón mostraba agresividad, temor, agrupamiento y facilidad de manejo. *(Una conducta positiva se*



*registró con respecto a la conducta que presentaron antes de la administración del extracto y comparado con la administración del vehículo).*

**Ojos:** Se observó si el ratón presentaba opacidad, disminución o aumento del diámetro pupilar o desviación del globo ocular. *(Una conducta positiva se registró con respecto a la observación que se realizó antes de la administración del extracto y comparado con la administración del vehículo).*

**Excreción y o secreción:** Se observó si los animales aumentaban el lagrimeo, salivación, defecación y micción. *(La presencia de lagrimeo o salivación así como el aumento o disminución de defecación y/o micción se registró como positiva con respecto a la conducta que presentaron antes de la administración del extracto y comparado con la administración del vehículo).*

**General:** Se observó si existía presencia de piloerección, retorcimiento y cianosis. *(Una conducta positiva se registró con respecto a la observación que se realizó antes de la administración del extracto y comparado con la administración del vehículo)*

Para evaluar la frecuencia respiratoria, se observó cautelosamente como respiraba el animal, en este sentido, se prestó atención a los movimientos generados en los costados para inhalar o exhalar. *(La respuesta simplemente se determinó como normal o aumento de la contracción de los costados como una respuesta positiva).*

La frecuencia cardíaca no se determinó cuantitativamente. Sin embargo, al mismo tiempo que se observó la frecuencia respiratoria se observó si existía un cambio en el animal que mostrara un cambio en la frecuencia cardíaca, como contracciones o



movimientos que mostraran aceleración cardíaca. Si se presentaba alguna de estas conductas, entonces se colocaba un dedo en la zona donde se localiza el corazón para sentir su pulso. *(Un aumento o disminución de la frecuencia cardíaca se percibió comparando con respecto al control).*

Temperatura corporal. No se determinó cuantitativamente, se observó de manera cualitativa. Al pasar al ratón de una caja a otra y al determinar la sensibilidad en la cola del ratón se percibió la temperatura del animal a través del tacto. *(Un aumento o disminución de la temperatura corporal se percibió comparando con respecto al control).*

**Conducta:** Se determinaron parámetros como depresión, catatonía, flacidez, pasividad, estereotipia (conductas repetidas como caminar en círculo) y vocalización. *(Una conducta positiva se registró con respecto a la observación que se realizó antes de la administración del extracto y comparado con la administración del vehículo).*

**Excitación del SNC:** Aquí se observó cómo reaccionaba el ratón a una respuesta de alarma (dejar caer unas llaves muy cerca del animal), arqueado de la cola, temblor, sacudidas, brincos, hiperestesia y excitación motora al manejo. *(Una conducta positiva se registró con respecto a la observación que se realizó antes de la administración del extracto y comparado con la administración del vehículo).*

**Coordinación motora:** Se observó si el animal presentaba una marcha tambaleante, marcha anormal, aumento de la base de sustentación, marcha en círculo, parálisis. *(Una conducta positiva se registró con respecto a la observación que se realizó antes de la administración del extracto y comparado con la administración del vehículo).*



**Convulsiones:** Se observó si el animal presentaba convulsiones clónicas, tónicas o clónico-tónicas. (*Una conducta positiva se registró con respecto a la observación que se realizó antes de la administración del extracto y comparado con la administración del vehículo*).

**Sensibilidad:** Se utilizó una pinza para presionar la base de la cola del ratón aproximadamente a un centímetro de donde ésta empieza. Se determinó la latencia a la cual el ratón intenta retirar la pinza que le causa nocicepción. (*Se registro el incremento o disminución de la latencia en la cual el ratón intentó desprenderse de la pinza. El tiempo de corte fue de 60 segundos, es decir, que si el animal no se retira en este tiempo se le retiró el estímulo mecánico ejercido por la pinza*).



Tabla 14. Tabla de observaciones realizadas durante la prueba de toxicidad.

Extracto: Administración:  
 Especie: Vehículo:  
 Fecha: Superviso:  
 Realizó e interpretó:

EFECTO	VEHICULO				DOSIS								
					10			100			1000		
	1	2	3	4	1	2	3	1	2	3	1	2	3
<i>Tono muscular</i>													
<i>Fuerza muscular</i>													
<b>Conducta social</b>													
<i>Agresividad</i>													
<i>Temor</i>													
<i>Agrupamiento</i>													
<i>Facilidad de manejo</i>													
<b>Ojos</b>													
<i>Opacidad</i>													
<i>Disminución o aumento del diámetro pupilar</i>													
<i>Desviación del globo ocular</i>													
<b>Excreción y/o secreción</b>													
<i>Lagrimo</i>													
<i>Salivación</i>													
<i>Defecación</i>													
<i>Micción</i>													
<b>General</b>													
<i>Piloerección</i>													
<i>Retorcimiento</i>													
<i>Cianosis</i>													
<i>Frecuencia respiratoria</i>													
<i>Frecuencia cardíaca</i>													
<i>Temperatura corporal</i>													



Tabla 14. Continuación.

Extracto: Administración:  
 Especie: Vehículo:  
 Fecha: Superviso:  
 Realizó e interpretó:

EFECTO	VEHICULO				DOSIS								
					10			100			1000		
	1	2	3	4	1	2	3	1	2	3	1	2	3
<b>Conducta</b>													
Depresión													
Catatónia													
Flacidez													
Pasividad													
Esterotipia													
Vocalización													
<b>Excitación del SNC</b>													
Respuesta de alarma													
Arqueo de la cola													
Temblores													
Sacudidas													
Hiperestesia													
Excitación motora al manejo													
<b>Coordinación motora</b>													
Marcha tambaleante													
Marcha anormal													
Aumento de la base de la sustentación													
Marcha en círculo													
Parálisis													
<b>Convulsiones</b>													
Clónicas													
Tónicas													
Clónico-tónicas													
Sensibilidad (seg)													





### Determinación de la DL<sub>50</sub>

La DL<sub>50</sub> se determinó calculando la media geométrica de las dosis en donde los animales presentaron muerte (Lorke, 1983). La fórmula empleada fue la siguiente:

$$GM_{\bar{y}} = \sqrt[n]{Y_1 \times Y_2 \times Y_3 \dots Y_n}$$

GM = Media geométrica

Y<sub>1...n</sub> = Dosis utilizadas

n = Número de dosis utilizadas

Ejemplo: Suponiendo que en la evaluación de un extracto se utilizaron las dosis de 1600, 2900 y 5000 mg/kg en la segunda fase. Y que murieron 2 animales en la dosis de 2900 mg/kg, entonces, para determinar la media geométrica se utiliza una dosis previa en donde no hubo muertes y la siguiente dosis que continúa a la cual murieron los animales. Así, la DL<sub>50</sub> = 2852 mg/kg, como se observa a continuación:

$$GM = \sqrt[3]{(1600)(2900)(5000)}$$

GM del extracto = 2852

DL<sub>50</sub> = 2852 mg/kg



## 5.5.2 Evaluación del efecto antinociceptivo

La evaluación del efecto antinociceptivo de los extractos  $\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{-MeOH}$  (1:1) de las especies vegetales ya mencionadas se llevo a cabo mediante la utilización de dos pruebas de nocicepción, una por estimulación química (estiramiento abdominal inducido por ácido acético i.p.) y otra por estimulación térmica (la placa caliente), los cuales se explican a continuación.

### 5.5.2.1. Prueba de Estiramiento abdominal

Esta prueba de nocicepción se realizó utilizando como sustancia algésica el ácido acético al 0.6 % intraperitoneal. La dipirona (25, 50 y 100 mg/kg p.o.) se administró 15 min antes de la sustancia algésica, el vehículo y los extractos de *Brickellia veronicaefolia* y *Exostema caribaeum* (150, 300 y 600 mg/kg p.o.), así como los de *Hintonia standleyana*, *Hintonia latiflora* y *Ligusticum porteri* (75, 150, 300 y 600 mg/kg p.o.) se administraron 30 min antes del estímulo algésico. Inmediatamente después de la administración del ácido acético, se contó el número de estiramientos presentados por cada ratón, a intervalos de 5 min por un periodo de media hora (Figura 5). En el Diagrama 2 se muestra el procedimiento realizado.

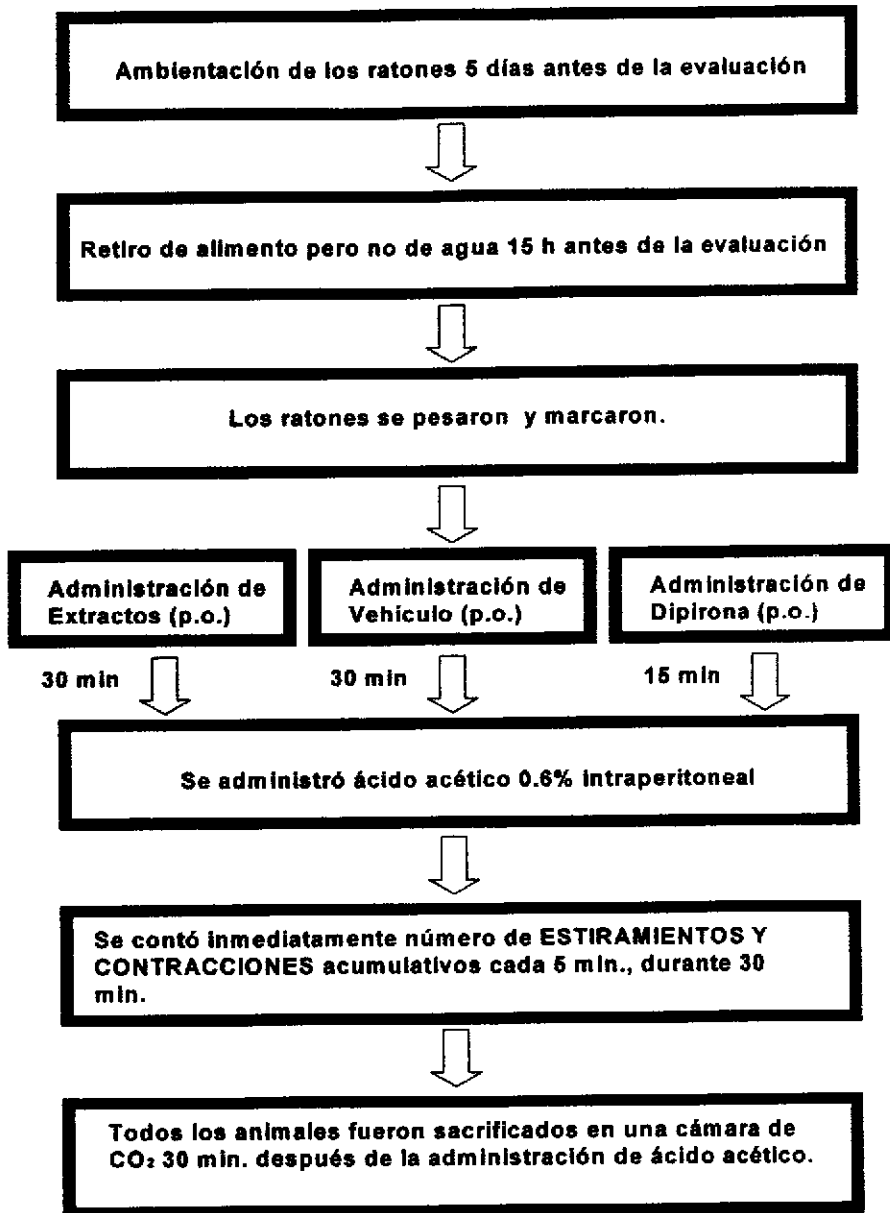


Diagrama 2. Procedimiento general para la evaluación del efecto antinociceptivo utilizando la prueba de estiramiento abdominal.



### 5.5.2.2. Prueba de la placa caliente

Se utilizó una placa caliente (Modelo 7250, Ugo Basile, Italia) con una temperatura constante de  $55.3 \pm 0.1$  °C. Los animales se colocaron en un cilindro de acrílico sobre la superficie caliente, esto genera que el ratón salte de la placa; el tiempo transcurrido entre la colocación del ratón en la placa y el que salta se denomina latencia de respuesta (Figura 5). El tiempo de corte fue de 30 seg, es decir, si los ratones no presentaban el salto antes de 30 seg, se retira de la placa para evitarle una lesión.

En esta prueba de nocicepción se administró la morfina (1.25, 2.5 y 5 mg/kg i.p.) 10 min antes de colocar al ratón en la placa. El vehículo y los extractos de *Brikellia veronicaefolia*, *Exostema caribaeum*, *Hintonia standleyana*, *Hintonia latiflora* y *Ligusticum porteri* (150, 300 y 600 mg/kg p.o.) se administraron 30 min antes del estímulo algésico. En el Diagrama 3 se muestra el procedimiento realizado. La latencia de respuesta se registra 30, 60, 90 y 120 min después de la administración.

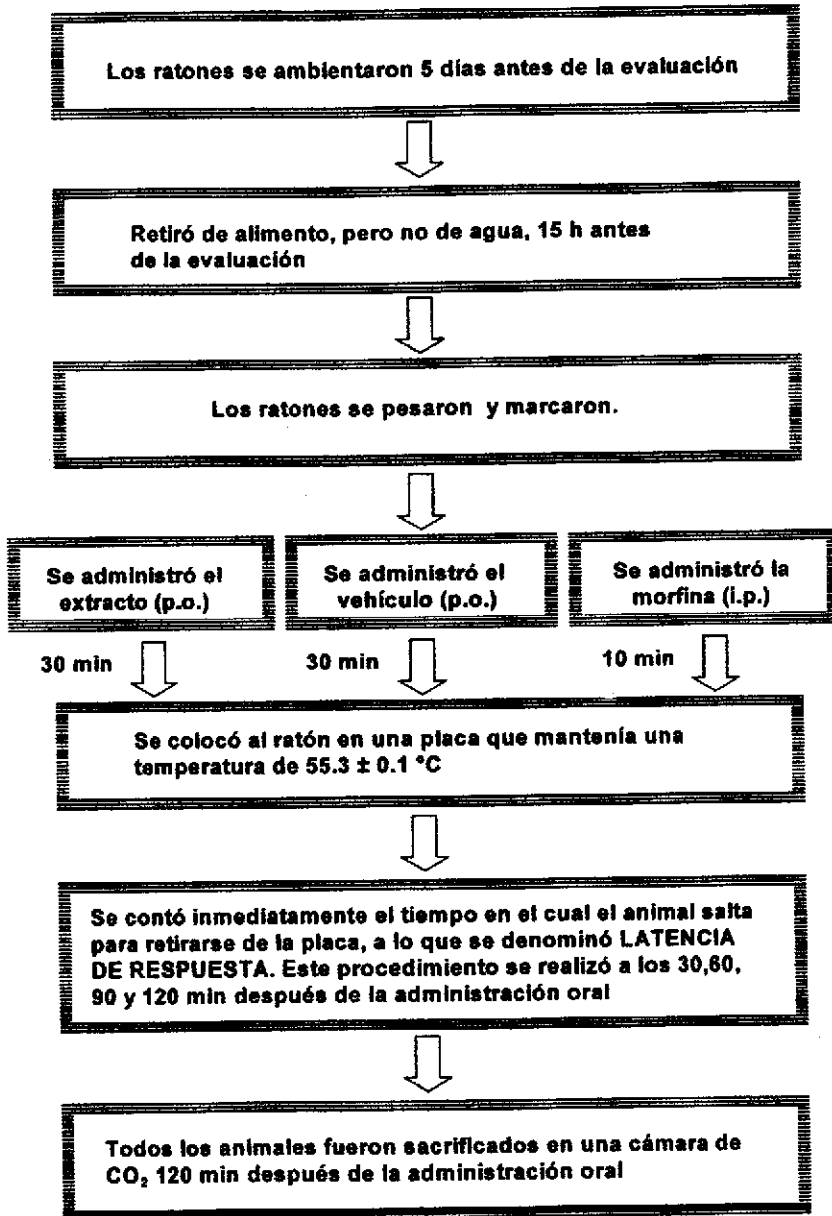
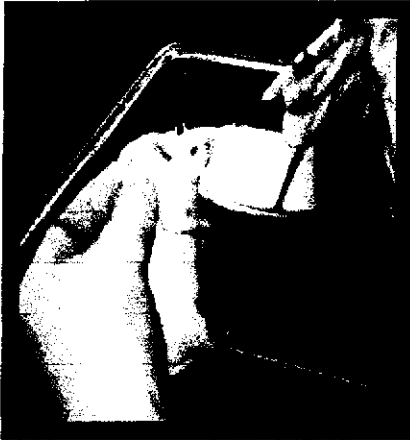


Diagrama 3. Procedimiento general para la evaluación del efecto antinociceptivo utilizando la prueba de la placa caliente.



**A**



*Administración oral de los extractos, el vehículo, la dipirona y la morfina*

**B**



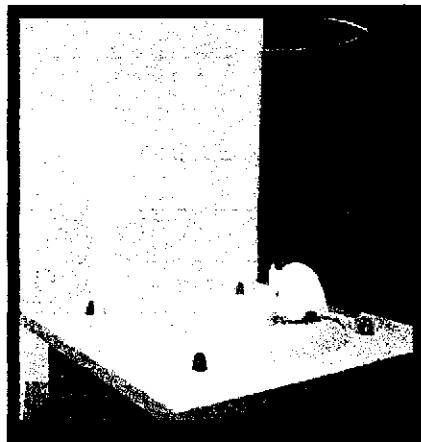
*Administración intraperitoneal de ácido acético 0.6 %*

**C**



*Estiramiento abdominal después de la administración de ácido acético 0.6%*

**D**



*Ratón en la placa caliente ( $55.3 \pm 0.1$  °C)*

**Figura 5.** Evaluación biológica; vías de administración y pruebas de nocicepción. En el panel A se muestra la vía de administración oral, en el panel B la vía de administración intraperitoneal. En el panel C se muestra a un ratón con estiramiento abdominal después de la administración de ácido acético y en el panel D se muestra un ratón sobre la placa caliente.



## 5.6 Presentación de datos

### 5.6.1 Toxicidad aguda

Las observaciones realizadas se presentan utilizando la Tabla 14 para cada una de las especies vegetales evaluadas, la  $DL_{50}$  se calculó de acuerdo al método de Lorke (1983), utilizando la media geométrica.

### 5.6.2 Prueba de estiramiento abdominal

En el modelo de estiramiento abdominal, el efecto antinociceptivo se representa por medio de barras que expresan el número total de estiramientos que presentaron los ratones en un periodo de 30 minutos. Cada barra representa el promedio de 6 animales  $\pm$  el error estándar (e.e.).

### 5.6.3 Prueba de placa caliente

En el modelo de la placa caliente los datos se presentan como área bajo la curva (ABC), la cual se obtuvo a partir de un curso temporal (latencia de respuesta Vs tiempo). El ABC de este curso temporal se determinó por el método de los trapecios y representa el efecto antinociceptivo total generado por el fármaco o



extracto, se expresa como unidades de área (u.a.). Cada valor representa el promedio de 6 animales  $\pm$  el error estándar.

### **5.7 Análisis estadístico**

Los datos obtenidos en las dos pruebas de nocicepción se presentan como el promedio  $\pm$  el e.e. de 6 animales. Para indicar una diferencia estadística significativa se utilizó un análisis de varianza (ANOVA de una variable), seguido de Dunnet, utilizando un criterio de significancia estadística de  $P < 0.05$  (\*).





## **7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**



## 7.1 Toxicidad aguda en ratón

El primer paso de un estudio de toxicidad es la determinación de una dosis letal media (Van den Heuvel *et al.*, 1990). En el presente trabajo se seleccionó el método de Lorke (1983) para determinar la toxicidad aguda, debido a que se requieren pocos animales, no se requiere de una vía de administración en particular y se pueden evaluar cualquier tipo de sustancia, es fácil de llevar a cabo y es barato en comparación con los modelos *in vitro* (Eisenbrand *et al.*, 2002).

En la Tabla 15 se muestran los resultados obtenidos de toxicidad aguda de los extractos CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH (1:1) de *Hintonia standleyana*, *Hintonia latiflora*, *Brickellia veronicaefolia*, *Exostema caribaeum* y *Ligusticum porteri*. En esta tabla se puede apreciar el número de animales muertos en las fases evaluadas y la DL<sub>50</sub>.

Los resultados obtenidos muestran que durante la primera fase de evaluación los extractos que producen muerte después de su administración, son *Ligusticum porteri* y *Exostema caribaeum*, mientras que los extractos restantes no producen la muerte de los animales en la primera fase.

En la segunda fase de evaluación se observa que el único extracto que no produce muerte en los animales de prueba es el extracto de *Hintonia standleyana*, mientras que el resto de los extractos sí causan muerte en esta fase de evaluación. Con base en estos resultados se puede decir que *Hintonia standleyana* es un extracto seguro hasta la dosis de 5000 mg/kg.



Tabla 15. Determinación de DL<sub>50</sub> por el método de Lorke.

EXTRACTO	FASE 1 DOSIS (mg/kg)			FASE 2 DOSIS (mg/kg)			DL <sub>50</sub> <sup>**</sup> (mg/kg)	
	10	100	1000	1600	2500	5000		
<i>Hintonia standleyana</i>	0/3*	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	ND	
<i>Hintonia latiflora</i>	0/3	0/3	0/3	0/3	2/3	3/3	2852	
<i>Brickellia veronicaefolia</i>	0/3	0/3	0/3	0/3	1/3	3/3	2852	
EXTRACTO	FASE 1 DOSIS (mg/kg)			FASE 2 DOSIS (mg/kg)				DL <sub>50</sub> <sup>**</sup> (mg/kg)
	10	100	1000	200	400	800	1600	
<i>Ligusticum porteri</i>	0/3	0/3	2/3	0/3	0/3	0/3	1/3	1085
<i>Exostema caribaeum</i>	0/3	0/3	2/3	0/3	1/3	2/3	3/3	700

\* Número de animales muertos / Número de animales usados

\*\* La DL<sub>50</sub> se determinó por medio de la media geométrica

En la segunda fase del experimento, la administración de *Exostema caribaeum* (800 y 1600 mg/kg), ocasionó que los animales murieran al segundo o tercer día. Esta especie fue la única que ocasionó la disminución del peso corporal de los animales como se muestra en la Figura 6.

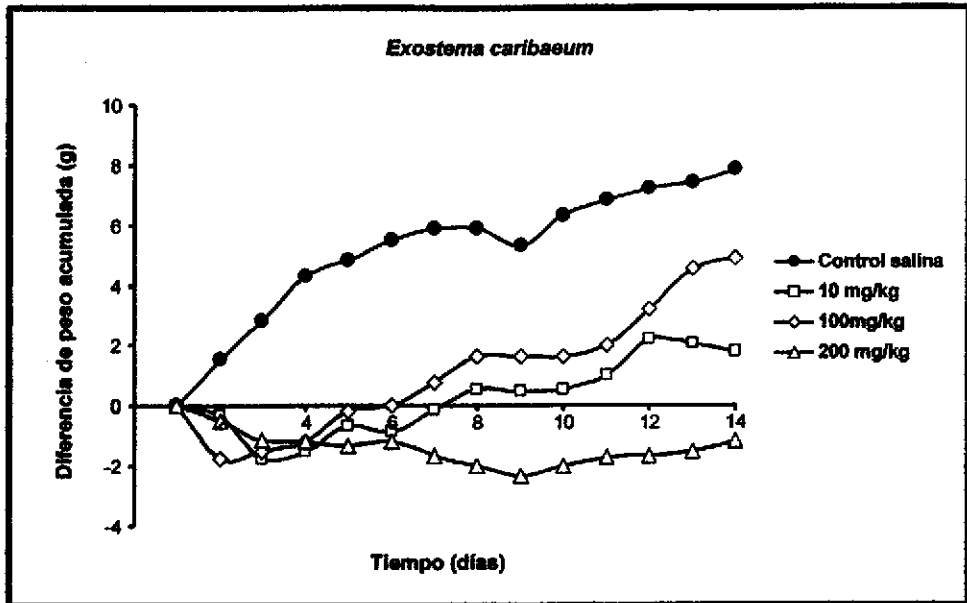


Figura 6. Gráfica de disminución de peso corporal por la administración del extracto de *Exostema caribaeum*. Cada punto representa el promedio de 3 animales.

El orden descendente de toxicidad de los extractos evaluados es: *Brickellia veronicaefolia* y *Hintonia latiflora* ( $DL_{50} = 2858$  mg/kg), *Ligusticum porteri* ( $DL_{50} = 1085$  mg/kg) y *Exostema caribaeum* ( $DL_{50} = 700$  mg/kg).

Como parte del estudio de toxicidad se observaron algunos parámetros cualitativos fisiológicos y conductuales. Los cuales se consideran importantes porque reflejan de manera general los efectos que produce el extracto dentro del organismo del animal. No existe documentado un método específico para evaluar estas observaciones, pero se considera necesario que se tomen en cuenta para determinar efectos conductuales, motores y del SNC (Schlede *et al.*, 1992; Samuelson, 1991).



En las Tablas 16-20 se muestran las observaciones realizadas durante la primera hora después de la administración del extracto. Dentro de las observaciones realizadas destacan algunos efectos importantes. En el caso de *Exostema caribaeum*, el extracto más tóxico, se observaron cambios conductuales y fisiológicos, los ratones disminuyeron su tono y fuerza muscular comparado con el vehículo, también incrementaron su conducta de agrupamiento, disminuyeron el diámetro pupilar, mostraron piloerección y cianosis. Una de las observaciones más relevantes, fue el aumento de la contracción de sus costados, lo que hace referencia a cambios en su frecuencia respiratoria y cardíaca, al sentir el pulso, éstos animales mostraron un aumento de pulsaciones. La disminución de la temperatura corporal, presencia de depresión, flacidez, pasividad, temblor y aumento de la base de sustentación fueron algunas otras observaciones detectadas con respecto a su conducta antes de ser administrados y con respecto a los ratones a los cuales solo se les administró el vehículo (Tabla 17).

La administración tanto de *Hintonia standleyana* como de *Hintonia latiflora* generó que los ratones incrementaran la micción y defecación (heces acuosas), hubo un incremento de pasividad a la dosis de 1000 mg/kg en ambos casos (Tabla 18 y 19). Sin embargo, un aumento de sensibilidad y temperatura corporal sólo se observó en los ratones con la administración de *Hintonia standleyana* (Tabla 18).

La administración de *Ligusticum porteri* ocasionó que los animales no mostraran el agrupamiento normal que presentaron los ratones a los cuales se les administró el vehículo. Los animales con el extracto, incrementaron la micción y defecación (heces



duros), tenían una conducta de estereotipia identificada como saltos a la dosis de 1000 mg/kg. Estos animales también incrementaron su respuesta de alarma, sacudidas, excitación motora al manejo y su actividad ya que se encontraban muy activos (Tabla 20).

A todos los animales que fueron administrados con el vehículo y los diferentes extractos se les realizó una necropsia, ya sea que el animal haya muerto por la administración del extracto o bien después de los 14 días de observación. El cadáver fue observado de manera macroscópica en órganos como hígado, riñón, corazón y pulmones. En todos los animales evaluados con extracto no se observaron cambios con respecto a los animales a los cuales sólo se les administró el vehículo.

Es importante mencionar que este es el primer estudio en donde se muestra la toxicidad aguda de los extractos de *Brickellia veronicaefolia*, *Exostema caribaeum*, *Hintonia standleyana*, *Hintonia latiflora* y *Ligusticum porteri*. Resulta muy interesante que se continúe con las evaluaciones de toxicidad de las diferentes especies vegetales, por lo cual, sería conveniente evaluar toxicidad crónica, *sobre todo en el caso de Exostema caribaeum y Ligusticum porteri*.



Tabla 16. Tabla de observaciones durante la prueba de toxicidad para *Brickellia veronicaefolia*.

Extracto: *Brickellia veronicaefolia* Administración: Oral  
 Especie: Ratón ICR Vehículo: Tween 2% en salina  
 Fecha: 20/09/04 Superviso: Dra. Myrna Déciga Campos  
 Realizó e interpretó: Guadalupe E Ángeles López

EFECTO	VEHICULO				DOSIS								
					10			100			1000		
	1	2	3	4	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Tono muscular	Calda frontal sin flexión corporal				Calda Frontal sin flexión corporal								
Fuerza muscular	25-30 seg				29	30	27	20	22	28	27	28	31
<i>Conducta social</i>													
Agresividad	No				No			No			No		
Temor	No				No			No			No		
Agrupamiento	Poco				Poco			Poco			Poco		
Facilidad de manejo	Si				Si			Si			Si		
<i>Ojos</i>													
Opacidad	No				No			No			No		
Disminución o aumento del diámetro pupilar	No				No			No			No		
Desviación del globo ocular	No				No			No			No		
<i>Excreción y/o secreción</i>													
Lagrimeo	No				No			No			No		
Salivación	No				No			No			No		
Defecación	No				No			No			No		
Micción	No				No			No			No		
<i>General</i>													
Piloerección	No				No			No			No		
Retorcimiento	No				No			No			No		
Cianosis	No				No			No			No		
Frecuencia respiratoria	Sin contracción en los costados				Sin contracción en los costados			Sin contracción en los costados			Sin contracción en los costados		
Frecuencia cardiaca	El animal se encontró relajado, sin movimientos que indicaran un aumento o disminución de su frecuencia cardiaca				En todas las dosis el animal se encontró relajado, sin movimientos que indicaran un aumento o disminución de su frecuencia cardiaca								
Temperatura corporal	Sin aumento o disminución				Sin aumento o disminución			Sin aumento o disminución			Sin aumento o disminución		



Tabla 16. Continuación.

Extracto: Brickellia veronicaefolia Administración: Oral  
 Especie: Ratón ICR Vehículo: Tween 2% en salina  
 Fecha: 20/09/04 Superviso: Dra. Myrna Déciga Campos  
 Realizó e interpretó: Guadalupe E Angeles López

EFECTO	VEHICULO				DOSIS								
					10			100			1000		
	1	2	3	4	1	2	3	1	2	3	1	2	3
<i>Conducta</i>													
<i>Depresión</i>	No				No			No			No		
<i>Catatonia</i>	No				No			No			No		
<i>Flacidez</i>	No				No			No			No		
<i>Pasividad</i>	No				No			No			No		
<i>Esterotipia</i>	No				No			No			No		
<i>Vocalización</i>	No				No			No			No		
<i>Excitación del SNC</i>													
<i>Respuesta de alarma</i>	Con respuesta				Con respuesta			Con respuesta			Con respuesta		
<i>Arqueo de la cola</i>	No				No			No			No		
<i>Temblo</i>	No				No			No			No		
<i>Sacudidas</i>	No				No			No			No		
<i>Hiperestesia</i>	No				No			No			No		
<i>Excitación motora al manejo</i>	No				No			No			No		
<i>Coordinación motora</i>													
<i>Marcha tambaleante</i>	No				No			No			No		
<i>Marcha anormal</i>	No				No			No			No		
<i>Aumento de la base de la sustentación</i>	No				No			No			No		
<i>Marcha en círculo</i>	No				No			No			No		
<i>Parálisis</i>	No				No			No			No		
<i>Convulsiones</i>													
<i>Clónicas</i>	No				No			No			No		
<i>Tónicas</i>	No				No			No			No		
<i>Clónico-tónicas</i>	No				No			No			No		
<i>Sensibilidad (seg)</i>	15				19	25	17	38	27	44	60	58	60





Tabla 17. Tabla de observaciones durante la prueba de toxicidad para *Exostema caribaeum*.

Extracto: *Exostema caribaeum* Administración: Oral  
 Especie: Ratón ICR Vehículo: Tween 2% en salina  
 Fecha: 21/09/04 Superviso: Dra. Myrna Déciga Campos  
 Realizó e interpretó: Gabriela Castañeda Corral

EFECTO	VEHICULO				DOSIS											
					10			100			1000					
	1	2	3	4	1	2	3	1	2	3	1	2	3			
<i>Tono muscular</i>	Calda frontal sin flexión corporal				Calda frontal sin flexión corporal			Calda frontal y caudal con flexión corporal			Calda frontal y caudal con flexión corporal					
<i>Fuerza muscular</i>	25-30 seg				27	26	27	29	33	31	20	22	20			
<i>Conducta social</i>																
<i>Agresividad</i>	No				No			No			No					
<i>Temor</i>	No				No			No			No					
<i>Agrupamiento</i>	Poco				Regular			Mucho			Mucho					
<i>Facilidad de manejo</i>	Si				Si			Si			Si					
<i>Ojos</i>																
<i>Opacidad</i>	No				No			No			No					
<i>Disminución o aumento del diámetro pupilar</i>	No				No			Si			Si					
<i>Desviación del globo ocular</i>	No				No			No			No					
<i>Excreción y/o secreción</i>																
<i>Lagrimo</i>	No				No			No			No					
<i>Salivación</i>	No				No			No			No					
<i>Defecación</i>	No				No			No			No					
<i>Micción</i>	No				No			No			No					
<i>General</i>																
<i>Piloerección</i>	No				Si			Si			Si					
<i>Retorcimiento</i>	No				No			No			No					
<i>Cianosis</i>	No				Si			Si			Si					
<i>Frecuencia respiratoria</i>	Sin contracción en los costados				Contracción en los costados			Contracción en los costados			Contracción en los costados					
<i>Frecuencia cardíaca</i>	El animal se encontró relajado, sin movimientos que indicaran un aumento o disminución de su frecuencia cardíaca				En todas las dosis el animal presentó un incremento de movimiento en sus costados, al tocar el pulso este se encontraba aumentado											
<i>Temperatura corporal</i>	Sin aumento o disminución				Disminución			Disminución			Disminución					



Tabla 17. Continuación.

Extracto: Exostema caribaeum

Administración: Oral

Especie: Ratón ICR

Vehículo: Tween 2% en salina

Fecha: 21/09/04

Superviso: Dra. Myrna Déciga Campos

Realizó e interpretó: Gabriela Castañeda Corral

EFECTO	VEHICULO				DOSIS								
					10			100			1000		
	1	2	3	4	1	2	3	1	2	3	1	2	3
<i>Conducta</i>													
<i>Depresión</i>	No				No			Si			Si		
<i>Catónia</i>	No				No			No			No		
<i>Flacidez</i>	No				Si			Si			Si		
<i>Pasividad</i>	No				Si			Si			Si		
<i>Esterotipia</i>	No				No			No			No		
<i>Vocalización</i>	No				No			No			No		
<i>Excitación del SNC</i>													
<i>Respuesta de alarma</i>	Con respuesta				Poca respuesta			Poca respuesta			Poca respuesta		
<i>Arqueo de la cola</i>	No				No			No			No		
<i>Temblo</i>	No				No			Si			Si		
<i>Sacudidas</i>	No				No			No			No		
<i>Hiperestesia</i>	No				No			No			No		
<i>Excitación motora al manejo</i>	No				No			No			No		
<i>Coordinación motora</i>													
<i>Marcha tambaleante</i>	No				No			No			No		
<i>Marcha anormal</i>	No				No			No			No		
<i>Aumento de la base de la sustentación</i>	No				No			Si			Si		
<i>Marcha en círculo</i>	No				No			No			No		
<i>Parálisis</i>	No				No			No			No		
<i>Convulsiones</i>													
<i>Clónicas</i>	No				No			No			No		
<i>Tónicas</i>	No				No			No			No		
<i>Clónico-tónicas</i>	No				No			No			No		
<i>Sensibilidad (seg)</i>	15				9	11	12	33	35	47	60	58	60



Tabla 18. Tabla de observaciones durante la prueba de toxicidad para *Hintonia standleyana*.

Extracto: *Hintonia standleyana*

Administración: Oral

Especie: Ratón ICR

Vehículo: Tween 2% en salina

Fecha: 22/09/04

Superviso: Dra. Myrna Déciga Campos

Realizó e interpretó: Guadalupe E Ángeles López

EFECTO	DOSIS												
	VEHICULO				10			100			1000		
	1	2	3	4	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Tono muscular	Caída frontal sin flexión corporal				Caída Frontal sin flexión corporal								
Fuerza muscular	25-30 seg				27	27	30	32	28	27	29	25	27
<i>Conducta social</i>													
Agresividad	No				No			No			No		
Temor	No				No			No			No		
Agрупamiento	Poco				Poco			Poco			Poco		
Facilidad de manejo	Si				Si			Si			Si		
<i>Ojos</i>													
Opacidad	No				No			No			No		
Disminución o aumento del diámetro pupilar	No				No			No			No		
Desviación del globo ocular	No				No			No			No		
<i>Excreción y/o secreción</i>													
Lagrimo	No				No			No			No		
Salivación	No				No			No			No		
Defecación	No				No			Si			Si		
Micción	No				No			Si			Si		
<i>General</i>													
Piloerección	No				No			No			No		
Retorcimiento	No				No			No			No		
Cianosis	No				No			No			No		
Frecuencia respiratoria	Sin contracción en los costados				Sin contracción en los costados			Sin contracción en los costados			Sin contracción en los costados		
Frecuencia cardiaca	El animal se encontró relajado, sin movimientos que indicaran un aumento o disminución de su frecuencia cardiaca				En todas las dosis el animal se encontró relajado, sin movimientos que indicaran un aumento o disminución de su frecuencia cardiaca								
Temperatura corporal	Sin aumento o disminución				Sin aumento o disminución			Disminución			Disminución		



Tabla 18. Continuación.

Extracto: *Hintonia standleyana*

Administración: Oral

Especie: Ratón ICR

Vehículo: Tween 2% en salina

Fecha: 22/09/04

Superviso: Dra. Myrna Déciga Campos

Realizó e interpretó: Guadalupe E Ángeles López

EFECTO	VEHICULO				DOSIS									
					10			100			1000			
	1	2	3	4	1	2	3	1	2	3	1	2	3	
<i>Conducta</i>														
<i>Depresión</i>	No				No			No			No			
<i>Catátónia</i>	No				No			No			No			
<i>Flacidez</i>	No				No			No			No			
<i>Pasividad</i>	No				No			No			Si			
<i>Esterotipia</i>	No				No			No			No			
<i>Vocalización</i>	No				No			No			No			
<i>Excitación del SNC</i>														
<i>Respuesta de alarma</i>	Con respuesta				Con respuesta			Con respuesta			Con respuesta			
<i>Arqueo de la cola</i>	No				No			No			No			
<i>Temblores</i>	No				No			No			No			
<i>Sacudidas</i>	No				No			No			No			
<i>Hiperestesia</i>	No				No			No			No			
<i>Excitación motora al manejo</i>	No				No			No			No			
<i>Coordinación motora</i>														
<i>Marcha tambaleante</i>	No				No			No			No			
<i>Marcha anormal</i>	No				No			No			No			
<i>Aumento de la base de la sustentación</i>	No				No			No			No			
<i>Marcha en círculo</i>	No				No			No			No			
<i>Parálisis</i>	No				No			No			No			
<i>Convulsiones</i>														
<i>Clónicas</i>	No				No			No			No			
<i>Tónicas</i>	No				No			No			No			
<i>Clónico-tónicas</i>	No				No			No			No			
<i>Sensibilidad (seg)</i>	15				18	12	21	54	60	60	60	60	60	60



**Tabla 19.** Tabla de observaciones durante la prueba de toxicidad para *Hintonia latiflora*.

Extracto: *Hintonia latiflora*

Administración: Oral

Especie: Ratón ICR

Vehículo: Tween 2% en salina

Fecha: 23/09/04

Superviso: Dra. Myrna Déciga Campos

Realizó e interpretó: Gabriela Castañeda Corral

EFECTO	VEHICULO				DOSIS											
					10			100			1000					
	1	2	3	4	1	2	3	1	2	3	1	2	3			
Tono muscular	Caída frontal sin flexión corporal				Calda Frontal sin flexión corporal											
Fuerza muscular	25-30 seg				29	35	31	27	22	31	30	34	33			
<i>Conducta social</i>																
Agresividad	No				No			No			No					
Temor	No				No			No			No					
Agupamiento	Poco				Poco			Poco			Poco					
Facilidad de manejo	Si				Si			Si			Si					
<i>Ojos</i>																
Opacidad	No				No			No			No					
Disminución o aumento del diámetro pupilar	No				No			No			No					
Desviación del globo ocular	No				No			No			No					
<i>Excreción y/o secreción</i>																
Lagrimeo	No				No			No			No					
Salivación	No				No			No			No					
Defecación	No				Si			Si			Si					
Micción	No				Si			Si			Si					
<i>General</i>																
Piloerección	No				No			No			No					
Retorcimiento	No				No			No			No					
Cianosis	No				No			No			No					
Frecuencia respiratoria	Sin contracción en los costados				Sin contracción en los costados			Sin contracción en los costados			Sin contracción en los costados					
Frecuencia cardiaca	El animal se encontró relajado, sin movimientos que indicaran un aumento o disminución de su frecuencia cardiaca				En todas las dosis el animal se encontró relajado, sin movimientos que indicaran un aumento o disminución de su frecuencia cardiaca											
Temperatura corporal	Sin aumento o disminución				Sin aumento o disminución			Sin aumento o disminución			Sin aumento o disminución					



Tabla 19. Continuación.

Extracto: Hintonia latiflora

Administración: Oral

Especie: Ratón ICR

Vehículo: Tween 2% en salina

Fecha: 23/09/04

Supervisor: Dra. Myrna Déciga Campos

Realizó e interpretó: Gabriela Castañeda Corral

EFECTO	VEHICULO				DOSIS								
					10			100			1000		
	1	2	3	4	1	2	3	1	2	3	1	2	3
<i>Conducta</i>													
<i>Depresión</i>	No				No			No			No		
<i>Catónia</i>	No				No			No			No		
<i>Flacidez</i>	No				No			No			No		
<i>Pasividad</i>	No				No			No			Si		
<i>Esterotipia</i>	No				No			No			No		
<i>Vocalización</i>	No				No			No			No		
<i>Excitación del SNC</i>													
<i>Respuesta de alarma</i>	Con respuesta				Con respuesta			Con respuesta			Con respuesta		
<i>Arqueo de la cola</i>	No				No			No			No		
<i>Temblores</i>	No				No			No			No		
<i>Sacudidas</i>	No				No			No			No		
<i>Hiperestesia</i>	No				No			No			No		
<i>Excitación motora al manejo</i>	No				No			No			No		
<i>Coordinación motora</i>													
<i>Marcha tambaleante</i>	No				No			No			No		
<i>Marcha anormal</i>	No				No			No			No		
<i>Aumento de la base de la sustentación</i>	No				No			No			No		
<i>Marcha en círculo</i>	No				No			No			No		
<i>Parálisis</i>	No				No			No			No		
<i>Convulsiones</i>													
<i>Clónicas</i>	No				No			No			No		
<i>Tónicas</i>	No				No			No			No		
<i>Clónico-tónicas</i>	No				No			No			No		
<i>Sensibilidad (seg)</i>	15				12	7	14	32	45	24	35	29	42



Tabla 20. Tabla de observaciones durante la prueba de toxicidad para *Ligusticum porteri*.

Extracto: *Ligusticum porteri*

Administración: Oral

Especie: Ratón ICR

Vehículo: Tween 2% en salina

Fecha: 24/09/04

Superviso: Dra. Myrna Déciga Campos

Realizó e interpretó: Guadalupe E Ángeles López

EFECTO	VEHICULO				DOSIS								
					10			100			1000		
	1	2	3	4	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Tono muscular	Caída frontal sin flexión corporal				Caída Frontal sin flexión corporal								
Fuerza muscular	25-30 seg				32	29	30	29	31	27	26	22	29
<i>Conducta social</i>													
Agresividad	No				No			No			No		
Temor	No				No			No			No		
Agrupamiento	Poco				Ninguno			Ninguno			Ninguno		
Facilidad de manejo	Si				No			No			No		
<i>Ojos</i>													
Opacidad	No				No			No			No		
Disminución o aumento del diámetro pupilar	No				No			No			No		
Desviación del globo ocular	No				No			No			No		
<i>Excreción y/o secreción</i>													
Lagrimo	No				No			No			No		
Salivación	No				No			No			No		
Defecación	No				Si			Si			Si		
Micción	No				Si			Si			Si		
<i>General</i>													
Piloerección	No				No			No			No		
Retorcimiento	No				No			No			No		
Cianosis	No				No			No			No		
Frecuencia respiratoria	Sin contracción en los costados				Sin contracción en los costados			Sin contracción en los costados			Sin contracción en los costados		
Frecuencia cardiaca	El animal se encontró relajado, sin movimientos que indicaran un aumento o disminución de su frecuencia cardiaca				En todas las dosis el animal se encontró relajado, sin movimientos que indicaran un aumento o disminución de su frecuencia cardiaca								
Temperatura corporal	Sin aumento o disminución				Sin aumento o disminución			Sin aumento o disminución			Sin aumento o disminución		



Tabla 20. Continuación.

Extracto: Ligusticum porteri

Especie: Ratón ICR

Fecha: 24/09/04

Realizó e interpretó: Guadalupe E Angeles López

Administración: Oral

Vehículo: Tween 2% en salina

Superviso: Dra. Myrna Déciga Campos

EFECTO	VEHICULO				DOSIS								
					10			100			1000		
	1	2	3	4	1	2	3	1	2	3	1	2	3
<i>Conducta</i>													
<i>Depresión</i>	No				No			No			No		
<i>Catatónia</i>	No				No			No			No		
<i>Flacidez</i>	No				No			No			No		
<i>Pasividad</i>	No				No			No			No		
<i>Esterotipia</i>	No				No			No			Saltos		
<i>Vocalización</i>	No				No			No			No		
<i>Excitación del SNC</i>													
<i>Respuesta de alarma</i>	Con respuesta				Aumento en la respuesta			Aumento en la respuesta			Aumento en la respuesta		
<i>Arqueo de la cola</i>	No				No			No			No		
<i>Temblores</i>	No				No			No			No		
<i>Secudidas</i>	No				No			No			Si		
<i>Hiperestesia</i>	No				No			No			No		
<i>Excitación motora al manejo</i>	No				Si			Si			Si		
<i>Coordinación motora</i>													
<i>Marcha tambaleante</i>	No				No			No			No		
<i>Marcha anormal</i>	No				No			No			Aumento de movimiento		
<i>Aumento de la base de la sustentación</i>	No				No			No			No		
<i>Marcha en círculo</i>	No				No			No			No		
<i>Parálisis</i>	No				No			No			No		
<i>Convulsiones</i>													
<i>Clónicas</i>	No				No			No			No		
<i>Tónicas</i>	No				No			No			No		
<i>Clónico-tónicas</i>	No				No			No			No		
<i>Sensibilidad (seg)</i>	15				34	36	38	32	58	46	60	60	60



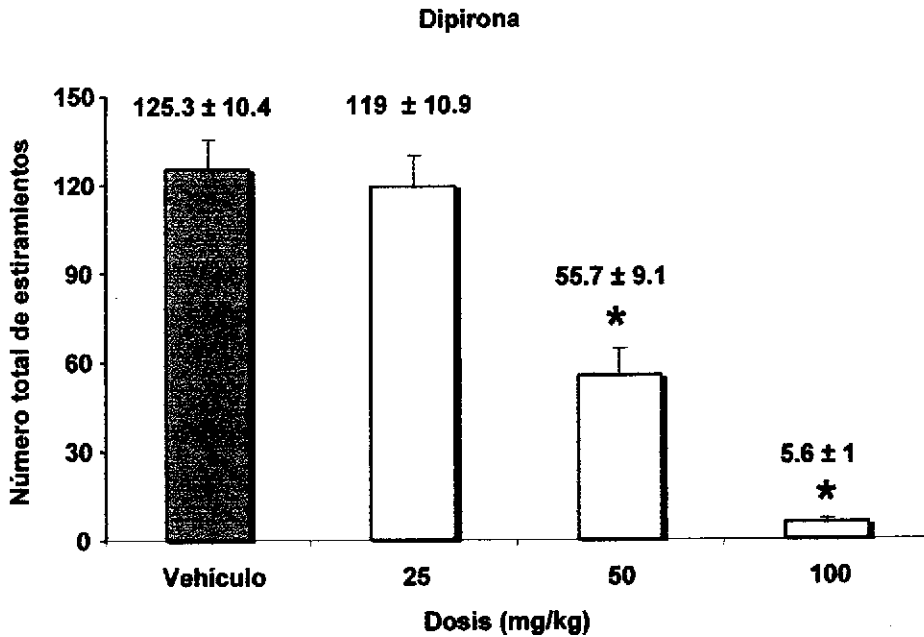


## 7.2. Determinación del efecto Antinociceptivo

En el presente trabajo se evaluó el efecto antinociceptivo que pudieran presentar algunos extractos utilizados en la medicina tradicional para el tratamiento del dolor. Se utilizaron dos pruebas de nocicepción; una en donde se genera nocicepción mediante un estímulo químico que semeja a un dolor de tipo inflamatorio y otra en donde se representa un dolor de tipo agudo y central mediante la estimulación térmica.

En la prueba de estiramiento abdominal se genera un dolor de tipo inflamatorio, los mediadores liberados como PGs, 5-HT y BK participan en la transmisión del dolor y en el proceso inflamatorio (Millan, 1999). Aunque se ha estipulado que el dolor que se genera en esta prueba nociceptiva es periférico, se ha establecido que las fibras que inervan el peritoneo y los órganos viscerales llegan a la médula espinal, de tal manera que la percepción del dolor es central. Así, la nocicepción generada por la administración de una sustancia algésica en el peritoneo genera un dolor de tipo local, por la irritación que genera esta sustancia algésica, pero también tiene un componente central (Cervero, 1994).

La administración intraperitoneal de una sustancia algésica como el ácido acético genera estiramientos en el ratón. La administración de un AINE como la Dipirona (25-100 mg/kg p.o.) ocasiona una disminución del número de estiramientos y contracciones en el ratón (Figura 7).

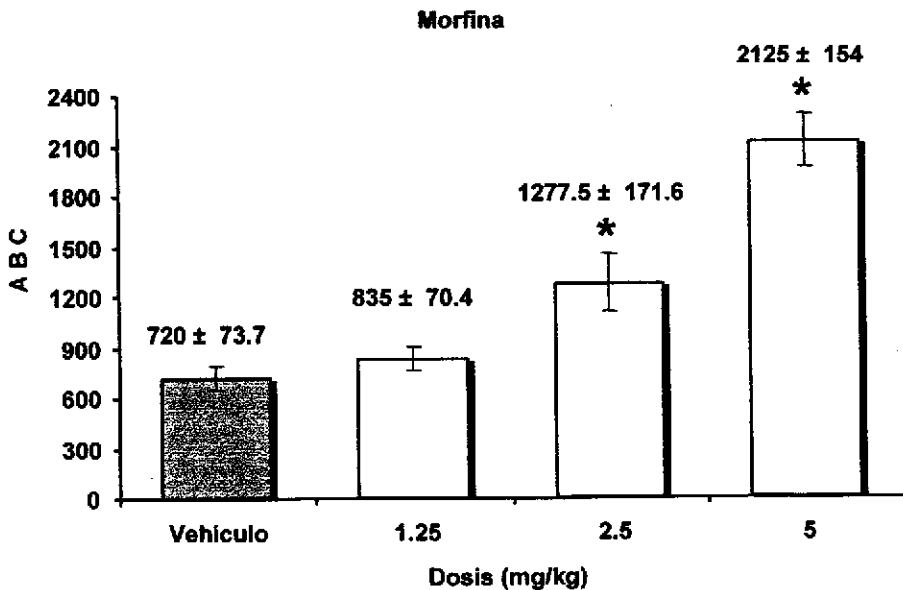


**Figura 7.** Efecto Antinociceptivo de la dipirona en la prueba de estiramiento abdominal. La dipirona se administró (p.o.) 15 min antes de la administración de ácido acético (0.6 % i.p.). Cada barra representa el promedio de 6 animales  $\pm$  e.e., en la parte superior de cada barra se muestra el número de estiramientos generados durante 30 minutos. La diferencia estadística es con respecto a la administración del vehículo. ANOVA de una variable seguida de Dunnet,  $P < 0.05$ .

En la prueba de la placa caliente se estimulan las fibras sensoriales que llegan directamente a la médula espinal, es por ello que se ha establecido que esta prueba nociceptiva es excelente para evaluar los efectos centrales de dolor y analgesia. En este sentido no todos los analgésicos son capaces de incrementar la latencia de respuesta en la prueba de la placa caliente, generalmente solo fármacos tan potentes como la morfina pueden presentar una respuesta positiva de analgesia en esta prueba (Vermeirsch y Meert, 2004).



Cuando se somete un ratón a un estímulo térmico, este presenta una conducta de escape que se manifiesta mediante un salto. La latencia de respuesta al estímulo térmico se considera como nocicepción. Un fármaco opioide como la morfina ocasiona que la latencia de respuesta se incremente, en la Figura 8 se muestra el efecto antinociceptivo que genera la morfina (i.p.) en esta prueba de nocicepción. A una dosis de 5 mg/kg, la morfina es capaz de aumentar tres veces la latencia de respuesta y por consiguiente el ABC (2125 u.a) con respecto a la administración del vehículo (720 u.a).



**Figura 8.** Efecto antinociceptivo de la administración de morfina en la prueba de la placa caliente. La morfina se administró (i.p.) 10 min antes de colocar al ratón sobre la placa caliente. Cada barra representa el promedio de 6 animales  $\pm$  e.e. La diferencia estadística es con respecto a la administración del vehículo. ANOVA de una variable seguida de Dunnet,  $P < 0.05$ .



La administración del extracto  $\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{-MeOH}$  (1:1) de *Brickellia veronicaefolia* (150, 300 y 600 mg/kg p.o.) en la prueba de estiramiento abdominal, disminuye el número de estiramientos con respecto al vehículo. Sin embargo, no existe diferencia estadística entre las dosis del extracto evaluadas (ANOVA de una variable seguida de Dunnet,  $P < 0.05$ ), (Figura 9, A). En este sentido *Brickellia veronicaefolia* sí genera antinocicepción en este modelo por lo cual sería interesante evaluar el efecto antinociceptivo de algunos metabolitos presentes en esta especie vegetal. En la prueba de la placa caliente la administración del extracto de esta especie incrementa el ABC en todas las dosis evaluadas, lo cual sugiere que este extracto también tiene efecto antinociceptivo en esta prueba de nocicepción (Figura 9, B).

La administración del extracto  $\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{-MeOH}$  (1:1) de *Exostema caribaeum* (150, 300 y 600 mg/kg p.o.) no disminuyó el número de estiramientos generados por la administración de ácido acético con respecto al vehículo (Figura 10, A). La administración de este extracto tampoco incrementó la latencia de repuesta en la prueba de la placa caliente (Figura 10, B). Estos resultados sugieren que el extracto de *Exostema caribaeum* no tiene efecto antinociceptivo.



*Brickellia veronicaefolia*

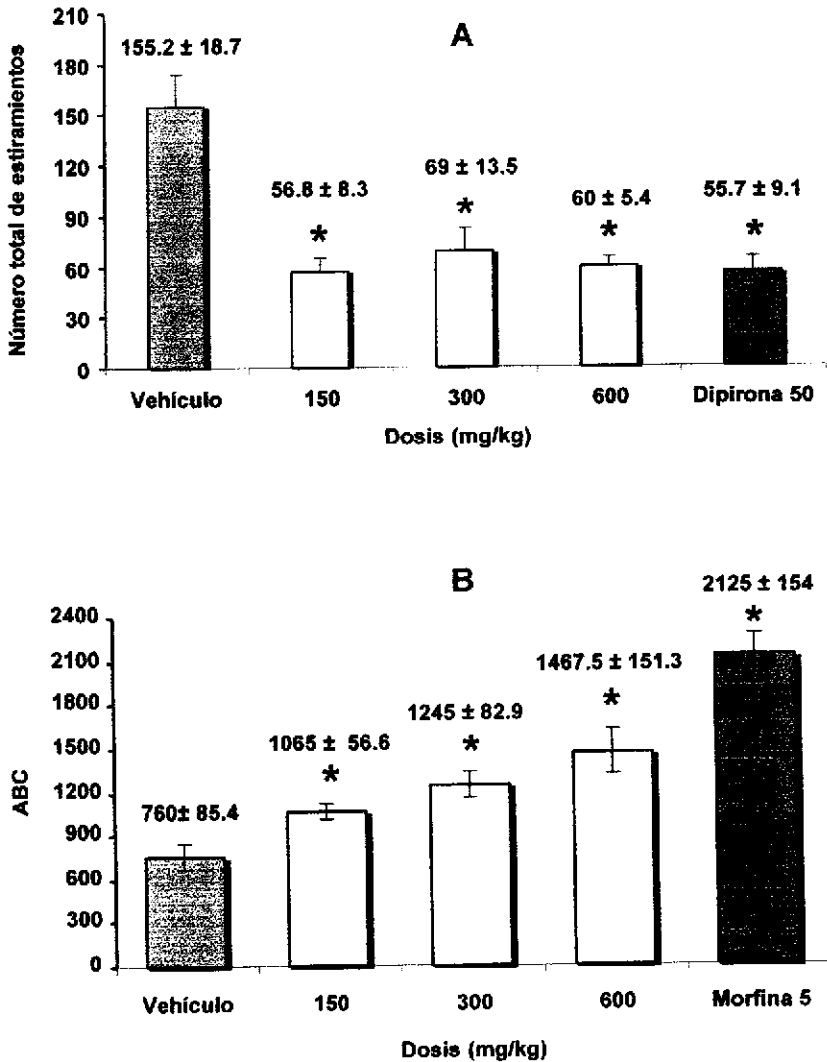
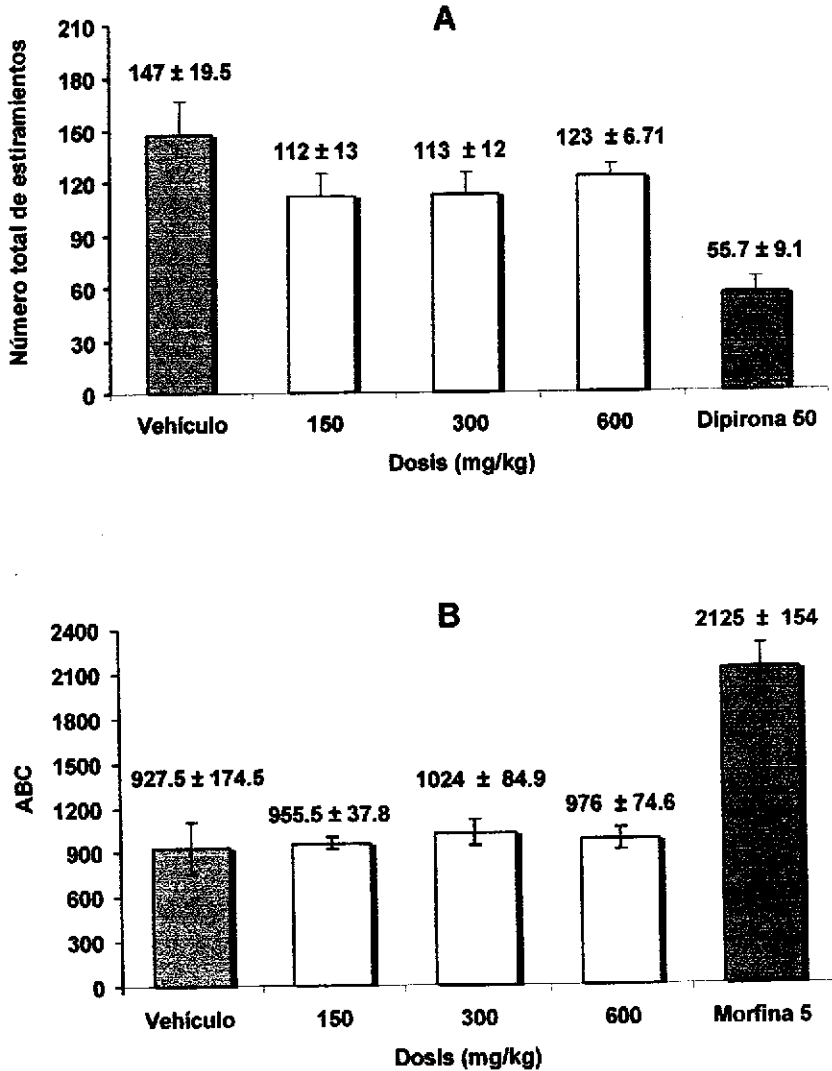


Figura 9. Efecto antinociceptivo del extracto CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH de *Brickellia veronicaefolia* en la prueba de estiramiento abdominal (A) y placa caliente (B). El extracto se administró (p.o.) 30 min antes de la administración de ácido acético (0.6 % i.p.). Cada barra representa el promedio de 6 animales ± e.e., en la parte superior de cada barra se muestra el número de estiramientos generados durante 30 minutos en el panel A y el valor de ABC en el panel B. La diferencia estadística es con respecto a la administración del vehículo. ANOVA de una variable seguida de Dunnet, P<0.05.



*Exostema caribaeum*



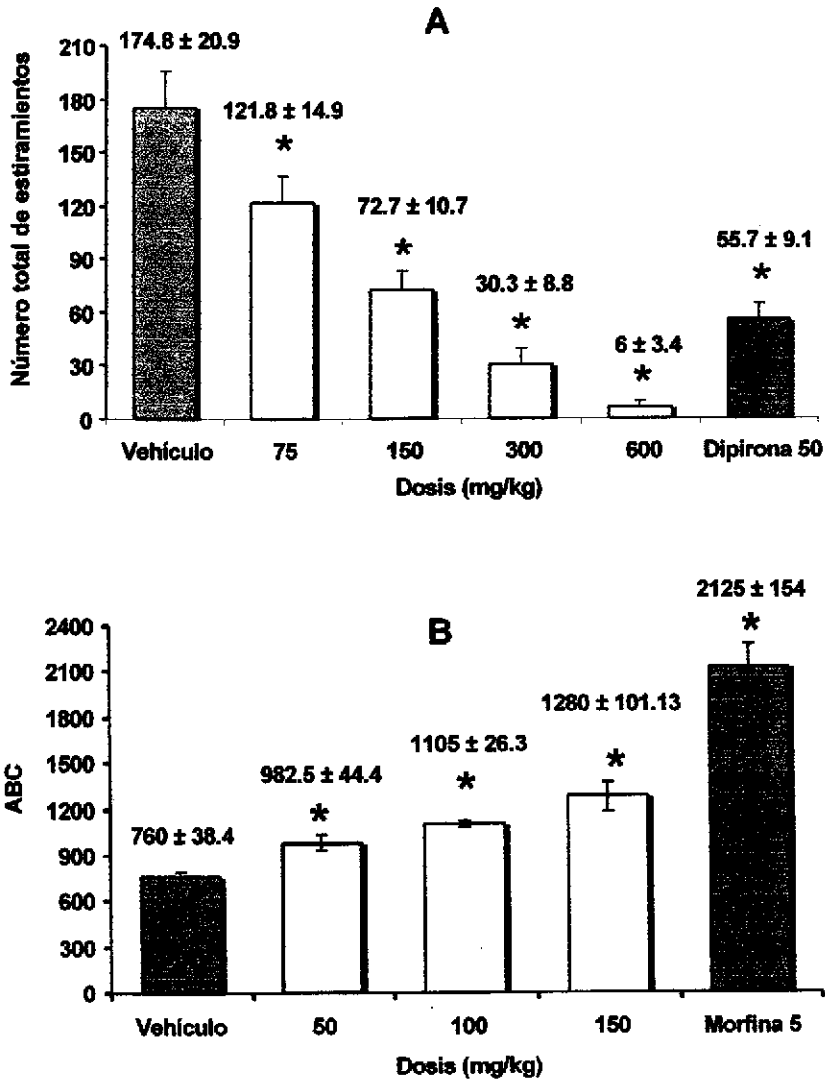
**Figura 10.** Evaluación del efecto antinociceptivo del extracto  $\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{-MeOH}$  de *Exostema caribaeum* estiramiento abdominal (A) y placa caliente (B). El extracto se administró (p.o.) 30 min antes de la administración de ácido acético (0.6 % i.p.). Cada barra representa el promedio de 6 animales  $\pm$  e.e., en la parte superior de cada barra se muestra el número de estiramientos generados durante 30 minutos en el panel A y el valor de ABC en el panel B. La diferencia estadística es con respecto a la administración del vehículo. ANOVA de una variable seguida de Dunnet,  $P < 0.05$ .



La administración del extracto  $\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{-MeOH}$  (1:1) de *Hintonia latiflora* (75, 150, 300 y 600 mg/kg p.o.) disminuye el número de estiramientos generados por la administración de ácido acético. La dosis de 600 mg/kg bloquea casi totalmente el número de estiramientos (Figura 11,A). En el modelo de la placa caliente la administración del extracto (50, 100 y 150 mg/kg p.o.) aumenta el ABC, observándose un efecto mayor (1280 u.a.) A la dosis de 150 mg/Kg(Figura 11,B).

La administración del extracto  $\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{-MeOH}$  (1:1) de *Hintonia standleyana* (75, 150, 300 y 600 mg/kg p.o.) disminuye el número de estiramientos generados por la administración de ácido acético con respecto a la administración del vehículo (Figura 12, A), esta disminución es estadísticamente significativa con respecto al control. En el modelo de la placa caliente la administración del extracto (150, 300 y 600 mg/kg p.o.) aumenta el ABC a todas las dosis evaluadas con respecto al grupo control, obteniéndose un mayor incremento a la dosis de 600 mg/kg (Figura 12, B).

La administración del extracto de *Ligusticum porteri* (75, 150 y 300 mg/kg p.o.) en la prueba de estiramiento abdominal, presenta una disminución del número de estiramientos (Figura 13, A). El extracto de *Ligusticum porteri* aumenta el ABC a todas las dosis evaluadas (75, 150 y 300 mg/kg) con respecto al grupo al cual solo se le administró el vehículo, observándose un mayor incremento (1315 u.a.) a la dosis de 300 mg/kg (Figura 13, B).

*Hintonia latiflora*

**Figura 11.** Evaluación del efecto antinociceptivo del extracto  $\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{-MeOH}$  de *Hintonia latiflora* en la estiramiento abdominal (A) y placa caliente (B). El extracto se administró (p.o.) 30 min antes de la administración de ácido acético (0.6 % i.p.). Cada barra representa el promedio de 6 animales  $\pm$  e.e., en la parte superior de cada barra se muestra el número de estiramientos generados durante 30 minutos en el panel A y el valor de ABC en el panel B. La diferencia estadística es con respecto a la administración del vehículo. ANOVA de una variable seguida de Dunnet,  $P < 0.05$ .





*Hintonia standleyana*

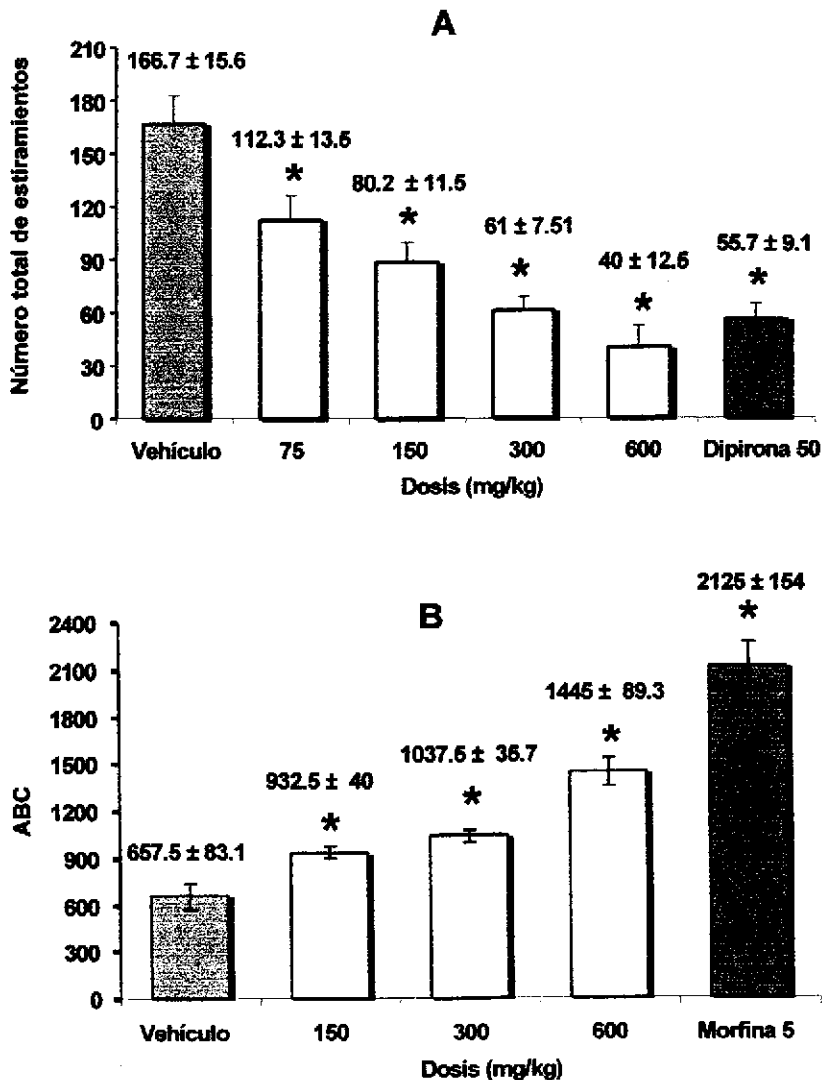


Figura 12. Evaluación del efecto antinociceptivo del extracto  $\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{-MeOH}$  de *Hintonia standleyana* en la estimulación abdominal (A) y placa caliente (B). El extracto se administró (p.o.) 30 min antes de la administración de ácido acético (0.6 % i.p.). Cada barra representa el promedio de 6 animales  $\pm$  e.e., en la parte superior de cada barra se muestra el número de estiramientos generados durante 30 minutos en el panel A y el valor de ABC en el panel B. La diferencia estadística es con respecto a la administración del vehículo. ANOVA de una variable seguida de Dunnet,  $P < 0.05$ .



*Ligusticum porteri*

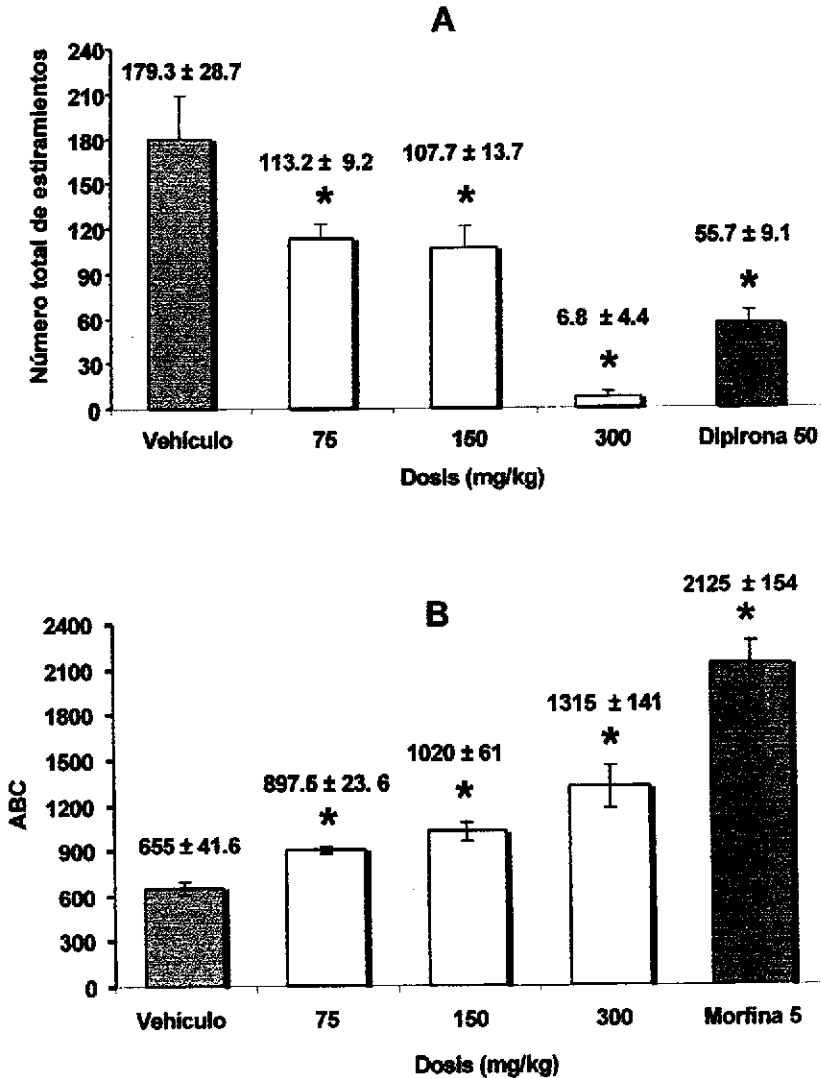


Figura 13. Evaluación del efecto antinociceptivo del extracto CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH de *Ligusticum porteri* en la estiramiento abdominal (A) y placa caliente (B). El extracto se administró (p.o.) 30 min antes de la administración de ácido acético (0.6 % i.p.). Cada barra representa el promedio de 6 animales ± e.e., en la parte superior de cada barra se muestra el número de estiramientos generados durante 30 minutos en el panel A y el valor de ABC en el panel B. La diferencia estadística es con respecto a la administración del vehículo. ANOVA de una variable seguida de Dunnet, P<0.05.



En el presente trabajo, se determinó que los extractos crudos  $\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{-MeOH}$  (1:1) de *Brickellia veroniacaefolia*, *Hintonia standleyana*, *Hintonia latiflora* y *Ligusticum porteri* generan un efecto antinociceptivo, en la prueba de estiramiento abdominal y en la prueba de la placa caliente. El hecho de que estos extractos hayan generado nocicepción en dos pruebas nociceptivas hace suponer que las especies vegetales de las cuales se obtuvo el extracto pueden ser fuente de metabolitos con actividad analgésica-antiinflamatoria.

Para el tratamiento del dolor se han clasificado a los analgésicos en dos grandes grupos los AAINE's y los opioides. Los AAINE's, son un grupo de fármacos con actividad analgésica-antiinflamatoria, se ha demostrado que AAINE's como el ketorolaco y la dipirona generan un efecto antinociceptivo en la prueba de estiramiento abdominal (Taylor *et al.*, 1998; Jett *et al.*, 1999). Sin embargo, el mismo ketorolaco no tiene efecto antinociceptivo en la prueba de la placa caliente, se ha propuesto que esto se debe a la incapacidad de activar una vía serotoninérgica en este modelo de dolor (Vitale *et al.*, 1994). En tanto que, la dipirona sí genera un efecto antinociceptivo en la prueba de la placa caliente (Beirith *et al.*, 1998).

Con base en estos datos no se puede establecer que la prueba de inducción de contracciones y estiramientos es únicamente útil para fármacos de tipo AAINE y que la prueba de nocicepción térmica es útil solo para compuestos de tipo opioide. Lo que sí se puede establecer es que no todos los fármacos de tipo AAINE pueden tener efecto antinociceptivo en la prueba de la placa caliente. En el caso de los



opioides es bien conocido que actúan en ambos modelos de dolor (Cervero, 1994; Vermeirsch y Meert, 2004).

Por lo anterior, podría suponerse que metabolitos presentes en las especies de *Brickellia veronicaefolia*, *Hintonia standleyana*, *Hintonia latiflora* y *Ligusticum porteri*, pudieran tener mecanismos de acción semejantes a los AAINE's o a los opioides, ya que el efecto antinociceptivo se presentó en ambas pruebas de dolor.

En el caso de *Exostema caribaeum*, se determinó que no tiene efecto antinociceptivo, ya que el extracto obtenido de esta planta no generó antinocicepción en ninguna de las pruebas.



## 8. CONCLUSIONES



Los datos obtenidos en el presente trabajo sugieren que:

1. El orden descendente de toxicidad aguda para las plantas evaluadas es el siguiente: *Hintonia standleyana*, *Hintonia latiflora*, *Brickellia veronicaefolia*, *Ligusticum porteri* y *Exostema caribaeum*.
2. *Exostema caribaeum* es una especie tóxica.
3. *Brickellia veronicaefolia*, *Hintonia latiflora*, *Hintonia standleyana* y *Ligusticum porteri* tienen efecto antinociceptivo en una prueba de dolor inflamatorio (estiramiento abdominal) y en una prueba de dolor agudo (placa caliente).
4. *Exostema caribaeum* no tiene efecto antinociceptivo.



## 9. SUGERENCIAS



1. Realizar pruebas de toxicidad crónica para confirmar la toxicidad de la especie *Exostema caribaeum*.
2. De acuerdo a las observaciones realizadas para *Ligusticum porteri*, realizar un perfil neurofarmacológico de esta especie vegetal. Con la finalidad de determinar si tiene algún efecto farmacológico a nivel de Sistema Nervioso Central.
3. Realizar un estudio químico biodirigido de *Brickellia veronicaefolia*, *Hintonia latiflora*, *Hintonia standleyana* y *Ligusticum porteri*, ya que éstas presentan un efecto antinociceptivo. Con la finalidad de encontrar los metabolitos que puedan ser los responsables de este efecto farmacológico.





## 10. BIBLIOGRAFÍA



- Aguilar CA, Chino JR, Jaquez PS y López ME. 1994. Herbario Medicinal del Instituto Mexicano del Seguro Social. Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), México.
- Alarcón GH. 1980. Etnobotánica Mexicana. Plantas populares utilizadas para el tratamiento de las parasitosis gastrointestinales. Tesis de Licenciatura de la Facultad de Biología, UNAM. México.
- Alcorn JB. 1984. Huastec Mayan Ethnobotany. University Texas Press, Austin, TX.
- Aldrete JA. 2000. Manual Clínico del Dolor. Tomo I. Ciencia y Cultura Latinoamérica. JGH editores. México. 1-30.
- Anaya M. 1991. Estudio Etnobotánico del complejo Quina en México. Tesis de Licenciatura de la Facultad de Biología, UNAM. México.
- Argueta A. 1994. Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana. Instituto Nacional Indigenista. 3 vols. México.
- Barlow SM, Greig JB, Bridges JW, Carere A, Carpy AJM, Galli CL, Kleiner J, Knudsen I, Koe" ter HBW, Levy LS, Madsen C, Mayer S, Narbonne JF, Pfannkuch F, Prodanchuk MG, Smith MR y Steinberg P. 2002. Hazard identification by methods of animal-based toxicology. *Food Chem Toxicol.* 40: 145-191.
- Basbaum AI, Jessell MT, y Kandel ER. 2000. Principios de Neurociencia. 4a Edición. Mc Graw Hill Interamericana. España. Capítulo 24, 472-491.
- Behbehani MM, Jiang M y Chandler SD. 1990. The effect of [Met]enkephalin on the periaqueductal gray neurons of the rat : an in vitro study. *J Neuroscience.* 38: 373-380.
- Behbehani MM. 1995. Functional characteristics of the midbrain periaqueductal gray. *Prog Neurobiol.* 46: 575-605.
- Beirith A, Santos AR, Rodrigues AL, Creczynski-Pasa TB y Calixto JB. 1998. Spinal and supraspinal antinociceptive action of dipyrone in formalin, capsaicin



- and glutamate tests. Study of the mechanism of action. *Eur J Pharmacol.* 345: 233-245.
- Besson JM. 1997. La complexité des aspects physiopharmacologiques de la douleur agents. *Adv in Cancer Res.* 35: 269-332.
  - Björkman R, Hallman KM, Hedner J y Henning M. 1994. Acetaminophen blocks spinal hyperalgesia induced by NMDA and substance P. *Pain.* 57: 259-264.
  - Björkman R. 1995. Central antinociceptivo effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs and paracetamol. *Acta Anaesth Scand Suppl.* 103:39-40.
  - Browner CH. 1985. Plants used for reproductive health in Oaxaca, Mexico. *Economic Botany.* 39: 482-504.
  - Bye R. 1993. The role of humans in the diversification of plants in Mexico. In: Ramamorthy, T.P., Bye, R., Lot, A., Fa, J. (Eds.), *Biological Diversity of Mexico, Origins and Distribution.* Oxford University Press, London, p. 707.
  - Camacho MR. 1990. Nuevos metabolitos secundarios de *Hintonia latiflora* (Sesse et Muciño ex. D.C.) y aislamiento de compuestos bioactivos del *Teloxys graveolens* (Wild) W.A. Weber. Tesis de Maestría en Ciencias Químicas. Facultad de Química, UNAM.
  - Cervero F. 1994. Sensory Inervation of the viscera: peripheral basis of viscera pain. *Physiol rev.* 74: 95-129.
  - Covino BG, Dubner R, Gybels J, Kosterlitz HW, Liebeskind JC, Sternbach RA, Vyclicky L, Yamamura H y Zimmermann M. 1980. Ethical standards for investigations of experimental pain in animals. *Pain.* 9: 141-143.
  - De la Cruz M. 1991. *Libellus de Medicinalibus Indorum Herbis.* Fondo de Cultura Económica: Instituto Mexicano de Seguro Social, México.
  - Delgado G, Reza-Garduño, RG, Ríos MY, Del Río F. 1992. Phthalides and monoterpenes of the hexane extracto f the roots of *Ligusticum porteri*. *Planta med.* 58: 570-571.
  - Delgado G. 1996. Natural products from some medicinal plants. Bioactivity. *R. Latinoamericana de Química.* 24: 37-43.



- Devor M, Gorvin-Lippmann R y Angelides K. 1993. Na<sup>+</sup> channel immunolocalization in peripheral mammalian axons and changes following nerve injury and neuroma formation. *Acta Anaesth. Scand. Suppl.* 13: 1976-1992.
- Dibble C y Anderson A. 1950-1969. Codice Florentino. 12 vols. The School of American Research and The University of Utah, Santa Fe.
- Dolphin A. 1990. G protein modulation of calcium currents in neurons. *Annus Rev Physiol.* 52: 243-255.
- Dray A y Perkins M. 1993. Bradykinin and inflammatory pain. *T Neuroscience.* 16: 99-104.
- Ecobichon EJ. 1997. The basis of toxicity testing. Second edition. CRC-Press. 49-65.
- Eddy D y Leimbach D. 1953. Synthetic analgesic.II. Dithienylbutenyl and Dithienylbutylamines. *J Pharmacol Exp Ther.* 107: 385-393.
- Eisenbrand G y Pool-Zobel B. 2002. Methods of in vitro toxicology. *Food Chem Toxicol.* 40: 193-236.
- Ferreira SH y Nakamura M. 1979. Prostaglandin Hyperalgesia: the peripheral effect for the analgesic action of opioid-antagonists. *Prostaglandins.* 18: 201-208.
- Ferreira SH, Duarte IDG y Lorenzetti BB. 1991. The molecular mechanism of action of peripheral morphine analgesia: stimulation of the cGMP system via nitric oxide release. *Eur J Pharmacol.* 201: 121-122.
- Fields HL, Heinricher MM y Manson P. 1991. Neurotransmitters in nociceptive modulatory circuits. *Annu Rev Neurosci.* 14: 219-245.
- Figueroa-González R. 1997. Derivatización Química del Z-Ligustilido un metabolito bioactivo de *L. porteri* para su evaluación biológica. Tesis de Licenciatura de la Facultad de Química, UNAM.
- Forth W, Martin E y Meter K. 1995. Dolor en: El alivio del Dolor. Hoechst, México, 1-20.



- Forzard JR. 1984. Neuronal 5-HT receptors in the periphery. *Neuropharmacol.* 23: 1473-1479.
- Gavariaux-Ruff C y Kieffer B. 1999. Opioids receptors: gene structure and function. En: opioids in pain control. Christoph Stein, Cambridge University Press.
- Granados-Soto V, Flores-Murrieta F, Castañeda-Hernández G y López-Muñoz F.J. 1995. Evidence for the involvement of the nitric oxide-cGMP pathway in the antinociception of morphine in the formalin test. *Eur J Pharmacol.* 340: 177-180.
- Guerrero-Analco JA, Hersch-Martinez P, Pedraza-Chaverri J, Navarrete A y Mata R. 2005. Antihyperglycemic Effect of Constituents from *Hintonia standleyana* in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Planta Med.* 340: 177-180.
- Heinrich M. 1989. Ethnobotanik der Tieflandmixe (Oaxaca, Mexico) und phytochemische Untersuchung von *Capraria biflora* L. (Scrophulariaceae). *Dissertationes Botanicae* No.144. Cramer, Berlin und Stuttgart.
- IASP. 1986. Pain terms a current list with definitions and notes on usage. *Pain* Supl. 3, s 215-221.
- Jett MF, Ramesha CS, Brown CD, Chiu S, Emmett C, Voronin T, Sun T, O'Yang C, Hunter JC, Eglen RM y Johnson RM. 1999. Characterization of the analgesic and anti-inflammatory activities of ketorolac and its enantiomers in the rat. *J Pharmacol Exp Ther.* 288: 1288-97
- Kapelashnik JM. 1990. Evaluating the efficacy of EMCA in alleviating pain associated with lumbar puncture comparison of open and double-blind protocol in children. *Pain.* 42: 31-4.
- Korec R. 2000. Effects of their neoflavonoid Coutareagenin, one of the antidiabetic active substances of *hintonia latiflora*, on Strptocin-induce diabetes mellitus in rats. *Arzneim-Forsch/Drug Res.* 50: 122-128.
- Koster R, Anderson M y De Beer EJ. 1959. Acetic acid for analgesic screening. *Federation Proceedings.* 18: 412.



- Le Bars D, Gozariu M y Cadden S W. 2001. Acute pain measurement in animals. Part I. *Ann Fr Anesth Reanim.* 20:347-65.
- Le Bars D.,Gozariu M., Cadden S.W. 2001. Critical analysis of animal models of acute pain. Part II. *Ann Fr Anesth Reanim.*20(5):452-70.
- Lima M, Aldana L, Casanova-Sotolongo P, Casanova-Carrillo P y Casanova C. 2003. Inducción y medición del dolor experimental. *Rev Cubana Med Milit.* 32:49-56.
- Linares E y Bye RA. 1987. A study of four medicinal plant complexes of Mexico and adjacent United States. *J of Ethnopharmacol* 19, 153–183.
- Lorenzetti BB y Ferreira FH. 1985. Mode of analgesic action of dipyrone: direct antagonism of inflammatory hyperalgesia. *Eur J Pharmacol.* 114: 375-381.
- Lorke D. 1983. A New Approach to Practical Acute Toxicity Testing. *Archives Toxicol.* 54: 275-287.
- Lou ZD y Cizkova D. 2000. The role of nitric oxide in nociception. *Curr Rev Pain.* 4, 459-466.
- Lozoya X. 1993, Función de las plantas medicinales en la medicina del siglo XXI: Secretaria de Salud, edición conmemorativa. México.255-270.
- Maixner W. 2001. Relationship between pain sensitivity and resting arterial blood pre-ssure in patients with painful tem-poromandibular disorders. *Clin Pharmacol Ther.* 70: 287-291.
- Martínez M. 1989. Las Plantas Medicinales de México. 6ª edición. Ediciones botas. México, 249-250.
- Mata R y Camacho MR. 1992. A phenylstyrene from *Hintonia latiflora*. *Phytochem.* 31, 3199-3201.
- Mata R y Cervera E. 1990. Secondary metabolites from *Hintonia latiflora*. *Phytochem.* 29: 2037-2040.
- Mata R, Calzada F, Garcia MR y Reguero MT. 1987. Chemical Studies on Mexican Plants used in Treadicional Medicina, III: New 4-phenyl coumarins from *Exostema caribaeum*. *J. Nat. Prod.* 50: 866-871.



- Mata R, Calzada F y García MR. 1988. Chemical Studies on Mexican Plants used in Traditional Medicine, VI. Additional New 4-Phenylcoumarins from *Exostema caribaeum*. *J. Nat. Prod.* 51: 851-856.
- Meckes M, Roman-Ramos T, Pérez S, Calzada F y Ponce-Monter H. 2002. Effects of a labdano diterpene isolated from *Brickellia paniculata* on intracellular  $Ca^{2+}$  deposit of guinea-pig ileal longitudinal muscle. *Planta Med.* 68: 601-604.
- Meller PF y Gebhart GF. 1993. Nitric Oxide (NO) and nociceptive processing in the spinal cord. *Pain.* 52: 127-136.
- Millan MJ. 1999. The induction of pain: an integrative review. *Prog Neurobiol.* 57: 1-169.
- Minnerman KP y Iversen LL. 1976. Enkephalin and opiate narcotics increase cyclic GMP accumulation in slice of the rat neostriatum. *Nature.* 262: 313-314.
- Nance P y Sawynok J. 1987. Substance P-induced long-term blockade of spinal adrenergic analgesia: reversal by morphine and naloxone. *J Pharmacol Exp Ther.* 240: 972-977.
- Nicol G, Klingberg D y Vasko M. 1992. Prostaglandin  $E_2$  increases calcium conductance and stimulates release of substance P in avian sensory neurons. *J Neuroscience.* 12: 1917-1927.
- Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999). 1999. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. Secretaría de Salud. México.
- Ortiz de Montellano B. 1975. Empirical Aztec medicine. *Science.* 188: 215-220.
- Pérez MR, Vargas R, Martínez FJ y Córdova RI. 2004. Antioxidant and free radical scavenging activities of 5,7,3'-trihydroxy-3,6,4'-trimethoxyflavone from *Brickellia veronicaefolia*. *Phytother Res.* 18: 428-430.



- Pini LA, Sandrini M y Vitale G. 1996. The antinociceptive action of paracetamol is associated with changes in the serotonergic system in the rat brain. *Eur J Pharmacol.* 308: 31-40.
- Pini LA, Vitalea G, Ottani A y Sandrini M. 1997. Naloxone-reversible antinociception by paracetamol in the rat. *J Pharmacol Exp Ther.* 260: 934-940.
- Pinto A. 1997. Experimental animal studies on the hypoglycemic effects of a Copalchi extrac. *Arzneim-Forsch/Drug Res.* 47: 829-833.
- Reza G. 1987. Aislamiento y caracterización de los ftálidos de *Ligusticum porteri* C y R (UMBELLIFERAE). Tesis de Licenciatura de la Facultad de Química, UNAM. México.
- Reza G. 1991. Ftálidos de la familia Umbelliferae. Tesis de Maestría de la facultad de Química, UNAM. México.
- Rivero-Cruz B, Rojas MA, Rodríguez-Sotres R, Cerda-García-Rojas CM y Mata R. 2005. Smooth muscle relaxant action of benzil benzootes and salicylic acid derivatives from *Brickellia veronicaefolia* on isolated guinea-pig illeum. *Plan Med.* 71: 320-325.
- Roering SC, Fujimoto JM y Tseng LF. 1988. Comparisons of Descending pain inhibitory pathways activated by  $\beta$ -endomorphine as characterized by supraspinal and spinal antinociceptive interactions in mice. *J Pharmacol Exp Ther.* 247: 1107-1113.
- Rosler KH, Goodwin RS, Mabry TJ, Varma SD y Norris J. 1984. Flavonoids with anti-cataract activity from *Brickellia arguta*. *J Nat Prod.* 47: 316-319.
- Sacerdote P, Monza G, Alberto M y Peneira AE. 1985. Diclofenac and piroprofen modify the  $\beta$ -endorphine concentration at the hypothalamus and the pituitary. *Pharmacol Res Commun.* 8 : 17-21.





- Salvemini D, Misko TP, Masferrer JL, Seibert K, Currie MG y Needleman P. 1993. Nitric oxide activates cyclooxygenase enzymes. *Proc Natl Acad Sci. USA.* 90: 7240-7244.
- Samuelson G. 1991. Assays for pharmacological activity: non-specific assays. En: *Methods in Plant Biochemistry. Volume 6. Assay for bioactivity.* Academic Press Limited, EUA: 261-280.
- Schlede E, Mischke U, Roll R y Kayser D. 1992. A national validation study of the acute-toxic-class methods- an alternative to the LD<sub>50</sub> test. *Arch Toxicol.* 66: 455-470.
- Soares AC, Leite R, Tatsuo M y Duarte I. 2000. Activation of ATP-sensitive k<sup>+</sup> channels: mechanism of peripheral antinociceptive action of the nitric oxide donor, sodium nitroprusiate. *Eur J Pharmacol.* 400: 67-71.
- Steen K, Reeh P, Anton F y Handwerker H. 1992. Protons selectively induce lasting excitation and sensitization to mechanical stimuli of nociceptors in rat skin, *in vivo.* *J Neurosci.* 12: 86-95.
- Taiwo YO, Heller P y Levine JD. 1992. Mediation of serotonin hyperalgesia by the AMPc second messenger system. *Neurosci.* 48: 479-483.
- Tallarida RJ y Leonard SJ. 1979. The dose-response relation in pharmacology. Springer-Verlag. New York, U.S.A. 1-48
- Taylor J, Mellstrom B, Feraud I y Naranjo JR. 1998. Metamizol potentiates morphine effects on visceral pain and evoked c-Fos immunoreactivity in spinal cord. *Eur J Pharmacol.* 35: 39-47.
- Teixidor J y Massó J. 1997. Dolor: Bases Fisiopatológicas y tratamiento del paciente con dolor. En: *Medicina Interna.* Masson, 91-101.
- Tonussi RC y Ferreira SH. 1994. Mechanims of diclofenac antinociception: direct blockade of inflammatory sensitization. *Eur J Pharmacol.* 251:173-179.



- Van den Heuvel MJ, Clark DG, Fielder RJ, Koundakjian PP, Oliver GJ, Pelling D, Tomlinson NJ y Walker AP. 1990. The international validation of a fixed-dose procedure as an alternative to the classical LD<sub>50</sub> test. *Food Chem Toxicol.* 28: 469-482.
- Vane J. 1971. Inhibitions of prostaglandins synthesis as a mechanisms of action for the aspirin-like drugs. *Nature.* 231: 232-235.
- Vermeirsch H y Meert TF. 2004. Morphine-induced analgesia in the hot-plate test: comparison between NMRI(nu/nu) and NMRI mice. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 94: 59-64.
- Vitale G, Sandrini M y Pini LA. 1994. Lack of activity of ketorolac in hot-plate test and serotonin binding capacity of brain membranes in rats. *Agents Actions.* 41: 184-187.
- Weinreich D y Wonderlin W. 1987. Inhibition of calcium-dependent spike after hyperpolarization increases excitability of rabbit visceral sensory neurons. *J Physiol.* 394: 415-427.
- Wilson SG y Mogil JS. 2001. Measuring pain in the (Knockout) mouse: big challenges in a small mammal. *Behav Brain Res.* 125: 65-73.
- Woolf CJ y Salter MW. 2000. Neuronal Plasticity: Increasing the Gain in Pain. *Science.* 288: 1765-1768.
- Woolfe G y MacDonald AD. 1944. The evaluation of the analgesic action of pethidine hydrochloride (DEMEROL). *J Pharmacol Exp Ther.* 80: 300-307.
- Yaksh TL. 1997. Biologic foundations; an introductory perspective on the study of nociception and its modulation. *Anesthesia.* Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia USA, 471-482.
- Zimmermann M. 1983. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain.* 16, 109-110.

## **Anexo I. Difusión de resultados.**

**Parte de los resultados del presente trabajo se presentaron en los siguientes congresos:**

**Investigation of *ligusticum portery* extrac for antinociceptive activity in mice.**  
*49<sup>th</sup> annual meeting of the Western Pharmacology Society y XXIX Congreso Nacional de Farmacología. Enero 29 a Febrero 2 de 2006. Vallarta, Jalisco. México.*

**Study on the antinociceptive activity and acute toxicity of *exostema caribaeum*.**

*49<sup>th</sup> annual meeting of the Western Pharmacology Society y XXIX Congreso Nacional de Farmacología. Enero 29 a Febrero 2 de 2006. Vallarta, Jalisco. México.*

**Efecto antinociceptivo preliminar de *Hintonia standleyana*.**

*XIV Congreso Italo-Latinoamericano de Etnomedicina "Gonzálo Aguirre Beltrán". Septiembre 25-29 de 2005. Distrito Federal, México.*

**Toxicidad aguda de nueve plantas medicinales mexicanas selectas.**

*XIV Congreso Italo-Latinoamericano de Etnomedicina "Gonzálo Aguirre Beltrán". Septiembre 25-29 de 2005. Distrito Federal, México.*

**Efecto antinociceptivo preliminar de especies selectas de la flora medicinal mexicana.**

*2ª Reunión Nacional de Química de productos Naturales. Mayo 25-28 de 2005. Morelos, México.*