



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**ESTUDIO QUÍMICO Y FARMACOLÓGICO
DE LA DECOCCIÓN DE *Melampodium divaricatum*
(Asteraceae)**

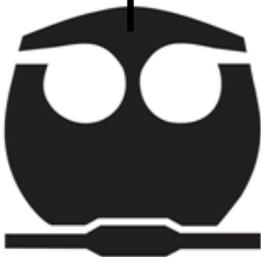
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA

SOFÍA PADILLA MAYNE



CIUDAD DE MÉXICO

2017



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Prof. José Fausto Rivero Cruz
VOCAL: Prof. Mabel Clara Fragoso Serrano
SECRETARIO: Prof. Ana Laura Martínez Martínez
1er. SUPLENTE: Prof. José Eduardo Roa Coria
2° SUPLENTE: Prof. Guadalupe Esther Ángeles López

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LABORATORIO 124 CONJUNTO E, FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM.

ASESOR DEL TEMA:

Dra. Ana Laura Martínez Martínez

SUSTENTANTE:

Sofía Padilla Mayne

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por el apoyo otorgado a través de la beca como ayudante de investigador del Sistema Nacional de Investigadores (SNI).

Al financiamiento otorgado a través de los proyectos DGAPA-UNAM 217516 y CONACyT 219765 a cargo de la Dra. Rachel Mata Essayag, que permitieron realizar este trabajo de investigación.

Contenido

ÍNDICE DE TABLAS.....	6
ÍNDICE DE FIGURAS.....	6
ABREVIATURAS.....	8
1. ANTECEDENTES.....	9
1.1 <i>Melampodium divaricatum</i> (L. C. Rich.) DC (Asteraceae).....	9
1.2 Dolor.....	11
1.3 Nocicepción.....	12
1.3.1 Nociceptores y su clasificación.....	12
1.3.2 Transmisión del estímulo nociceptivo.....	13
1.3.3 Epidemiología del dolor.....	15
1.3.4 Tratamiento del dolor.....	16
1.3.5 Analgésicos antiinflamatorios no esteroideos (AINEs).....	16
1.3.6 Mecanismo de acción de los AINEs.....	18
1.3.7 Efectos adversos de los AINEs.....	19
1.3.8 Analgésicos opioides.....	20
1.3.9 Mecanismo de acción de los opioides.....	20
1.3.10 Efectos adversos de los opioides.....	21
1.4 Evaluación experimental del dolor en animales.....	22
1.4.1 Modelo de la formalina.....	23
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	25
3. OBJETIVOS.....	26
3.1 Objetivo general.....	26
3.2 Objetivos particulares.....	26
4. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL.....	27
4.1 Material vegetal.....	27
4.2 Obtención del extracto acuoso de <i>M. divaricatum</i>	27
4.3 Análisis cromatográfico.....	27
4.4 Evaluación farmacológica.....	28
4.4.1 Fármacos de referencia.....	28
4.4.2 Animales de experimentación.....	28
4.4.3 Determinación de la toxicidad aguda.....	28
4.4.4 Inducción experimental del estado de hiperglucemia.....	29
4.4.5 Evaluación del efecto antinociceptivo y antineuropático de <i>M. divaricatum</i>	29
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	31
5.1 Determinación de la toxicidad aguda.....	31

5.2 Efecto antinociceptivo del extracto acuoso de <i>M. divaricatum</i>	31
5.3 Efecto antihiperalgésico del extracto acuoso de <i>M. divaricatum</i>	35
5.4 Análisis por HPLC de la decocción de la droga cruda.....	37
6. CONCLUSIONES.....	41
7. PERSPECTIVAS	41
8. BIBLIOGRAFÍA.....	42

ÍNDICE DE TABLAS

1. Principales sustancias químicas liberadas cuando existe un daño celular	15
2. Modelos experimentales para el estudio del dolor ¹	23
3. Toxicidad aguda producida por la decocción de <i>M. divaricatum</i>	32
4. Condiciones del sistema para analizar la decocción por HPLC.	37

ÍNDICE DE FIGURAS

1. <i>Melampodium divaricatum</i> (L.C. Rich) DC (Asteraceae).....	9
2. Distribución y localización de <i>Melampodium divaricatum</i> (L.C. Rich) DC.....	10
3. Derivados glicosilados del 2-hidroxitimol aislados de <i>M. divaricatum</i>	10
4. Derivado del <i>p</i> -cimeno aislado de <i>M. divaricatum</i>	11
5. “La columna rota” de Frida Khalo, 1944.....	12
6. Transmisión de la señal de un estímulo nocivo. Modificada de Raouf <i>et al.</i> 2010.....	14
7. Estructura química de algunos AINEs.....	17
8. Mecanismo de acción de los antiinflamatorios no esteroideos, (modificada de Huerta-Cruz, 2005).....	19
9. Mecanismo de acción de los analgésicos opioides.....	21
10. Curso temporal de la prueba de la formalina de la decocción de <i>M. divaricatum</i> en ratones normoglucémicos.....	33
11. Efecto antinociceptivo del extracto acuoso de <i>M. divaricatum</i> en la Fase 1 o neurogénica de la prueba de la formalina en ratones normoglucémicos.....	34
12. Efecto antinociceptivo del extracto acuoso de <i>M. divaricatum</i> en la Fase 2 o inflamatoria de la prueba de la formalina en ratones normoglucémicos.....	34
13. Curso temporal de la prueba de la formalina de la decocción de <i>M. divaricatum</i> en ratones normoglucémicos.....	36
14. Efecto antihiperalgésico del extracto acuoso de <i>M. divaricatum</i> en la Fase 1 o neurogénica de la prueba de la formalina en ratones hiperglucémicos.....	36
15. Efecto antihiperalgésico del extracto acuoso de <i>M. divaricatum</i> en la Fase 2 o inflamatoria de la prueba de la formalina en ratones hiperglucémicos.....	37
16. Perfil cromatográfico por HPLC de la decocción de las partes aéreas de <i>M. divaricatum</i>	38
17. Espectros en el UV de los compuestos 1 y 2, respectivamente, presentes en la decocción de <i>M. divaricatum</i>	39

18. Espectros en el UV de los compuestos 3 y 4, respectivamente, presentes en la decocción de <i>M. divaricatum</i>	40
---	----

ABREVIATURAS

2-Mebut	Ácido 2-metilbutírico
ABC	Área Bajo la Curva
AcOH	Ácido acético
ACN	Acetonitrilo
AINEs	Analgésicos antiinflamatorios no esteroideos
ANAEVA	Análisis de Varianza
Ang	Ácido angélico
cm	Centímetro
dL	Decilitro
DIC	Diclofenaco
EEM	Error Estándar de la Media
g	Gramo
GBP	Gabapentina
Hex	Hexano
Hz	Hertz
Ival	Ácido isovalérico
i.p.	Vía de administración intraperitoneal
kg	kilogramo
m	Metro
µL	Microlitros
mg	Miligramos
mL	Mililitros
mm	Milímetro
mM	Milimolar
min	Minutos
NA	Nicotinamida
NaCl	Cloruro de sodio
nm	Nanómetro
p.o.	Vía de administración esofágica
s	Segundos
s.s.	Solución salina
STZ	Estreptozotocina
VEH	Vehículo

1. ANTECEDENTES

1.1 *Melampodium divaricatum* (L. C. Rich.) DC (Asteraceae)

Melampodium divaricatum (L.C. Rich) DC es una hierba anual perteneciente a la familia Asteraceae que mide hasta 1.20 m de altura, con hojas opuestas y sésiles o con pecíolos alados y cortos, de 2 a 15 mm de largo, de forma ovada a rómbica o lanceolada, de 5 a 10 cm de largo por 1 a 6 cm de ancho. Las flores son liguladas de amarillo a amarillo-anaranjado, de 3.5 a 9 mm de largo (Figura 1) (CONABIO, *Melampodium divaricatum*, 2016-2017). La especie es designada popularmente con varios nombres entre los que destacan acahual amarillo (Morelos), ojo de perico y hierba aguada (Oaxaca), botón de oro (Honduras), margarita (Sinaloa), entre otros; y, se distribuye en la mayor parte del país y América Central (Figura 2) (CONABIO, *Melampodium divaricatum*, 2016-2017).



Figura 1. *Melampodium divaricatum* (L.C. Rich) DC (Asteraceae)

Dentro de la medicina tradicional, en Guatemala sus hojas son utilizadas para el tratamiento de dolores estomacales y toda la planta es utilizada contra la malaria (Girón, 1991). En México, la infusión de toda la planta administrada oralmente o como cataplasma sobre el pecho, se usa para el tratamiento de la embolia (Martínez Alfaro, 1984). Es también utilizada como un remedio para la disentería y como anticonvulsivante (Morton, 1981). Finalmente, también algunos autores reportan que no tiene actividad mutagénica (Nogueira *et al.*, 2006).



Figura 2. Distribución y localización de *Melampodium divaricatum*.

Desde el punto de vista químico, a partir de las partes aéreas de *M. divaricatum* se han aislado metabolitos secundarios pertenecientes a las categorías de sesquiterpenos y diterpenos, así como una variedad de derivados glicosilados del timol (Bohlmann & Le Van, 1977) (Hubert & Wiemer, 1985), cuyos azúcares presentes son la fucosa y la quinovosa (Figura 3) (Hüther, Passreiter, Wray, & Willuhn, 1999).

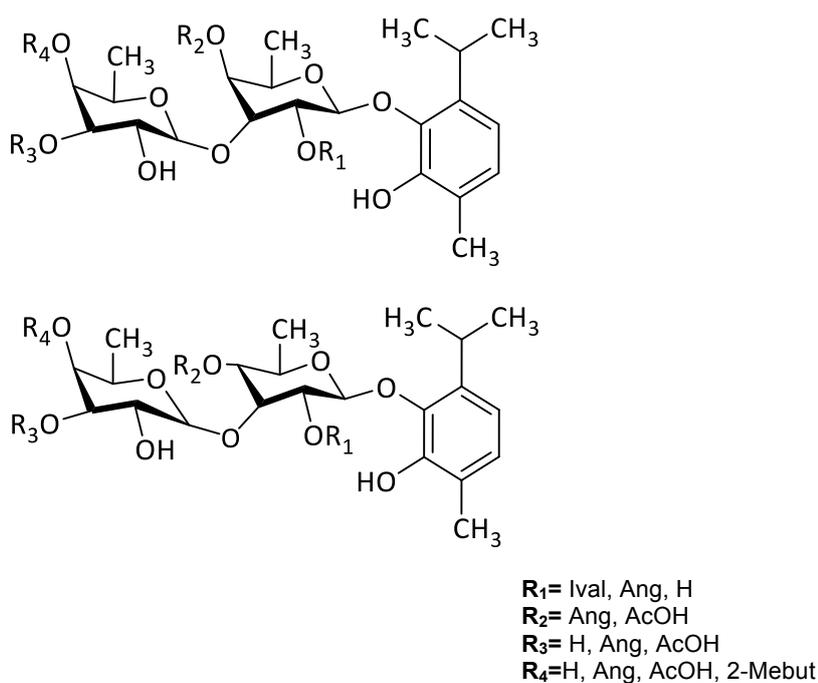


Figura 3. Derivados glicosilados del 2-hidroxitimol aislados de *M. divaricatum*.

Schüngel y Passreiter (2002) reportaron también el aislamiento de compuestos derivados *p*-cimeno (Figura 4).

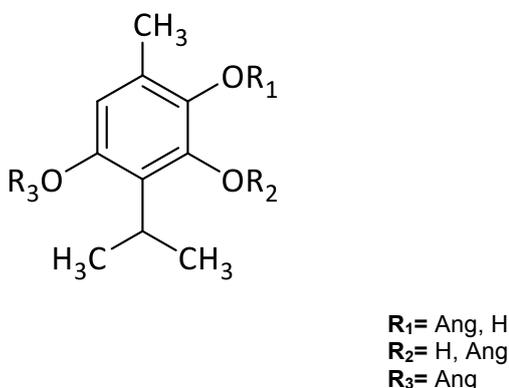


Figura 4. Derivados de *p*-cimeno aislado de *M. divaricatum*

1.2 Dolor

Definición

De acuerdo con la Asociación Internacional para el Estudio del Dolor (IASP, por sus siglas en inglés), el dolor se define como “una experiencia sensorial y emocional desagradable asociada a un daño tisular real o potencial que puede ser descrito en términos de la magnitud del daño” (Merskey & Bogduk, 1994) (Figura 5).

La capacidad para detectar estímulos dolorosos es esencial para la supervivencia y bienestar de los organismos. El dolor puede ser una sensación adaptativa, un sistema de alarma temprano que se dispara en situaciones de peligro para proteger al cuerpo del daño tisular. Debido a la generación de hipersensibilidad ante un estímulo normalmente inocuo (alodinia) o ante un estímulo nocivo (hiperalgesia), el dolor también puede ser una extensión del proceso curativo que ayuda a la reparación del tejido después de sufrir daño tisular. Por ejemplo, una quemadura produce sensibilización temporal del área dañada, consecuentemente estímulos normalmente inofensivos como el tacto ligero, se perciben como dolorosos, esto genera una conducta de protección contra este tipo de estímulos promoviendo el resguardo del área dañada hasta que se resuelva la lesión (Basbaum *et al*, 2009). Cuando la hipersensibilidad generada por una lesión tisular no se resuelve, el dolor

también puede ser mal adaptativo, reflejando una función patológica del sistema nervioso, en este caso el dolor sobrepasa su función y se transforma en una enfermedad (Scholz & Woolf, 2002; Woolf, 2004).

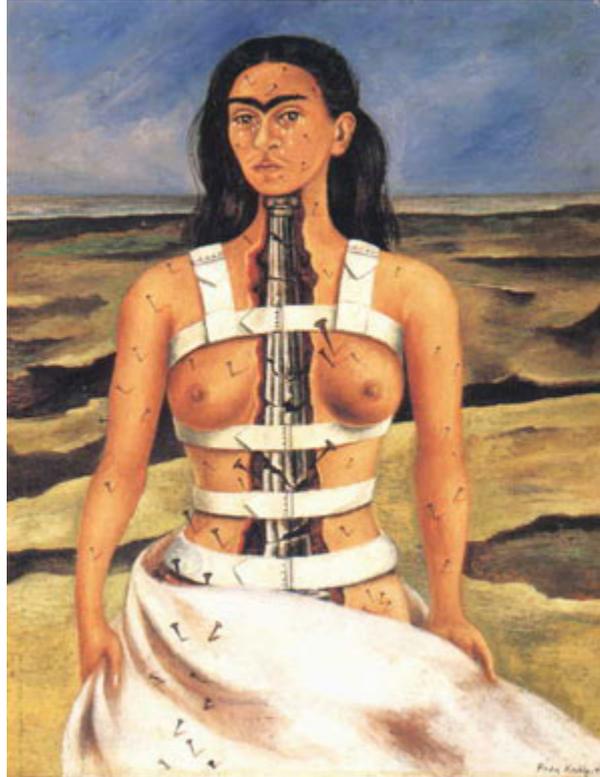


Figura 5. “La columna rota” de Frida Khalo, 1944. Óleo sobre lienzo, colección de Dolores Olmedo Patiño, Ciudad de México, México. Diversos especialistas de arte aseguran que este autorretrato refleja su “dolor físico y emocional”

1.3 Nocicepción

Existe una diferencia importante entre los términos nocicepción y dolor. La palabra nocicepción deriva de la raíz latina *nocere* que significa daño o lesión. La nocicepción se refiere al procesamiento de la información sensorial nociva llevado a cabo por el sistema nervioso central (SNC). Durante este proceso los estímulos térmicos, mecánicos o químicos intensos son detectados por una subpoblación de fibras nerviosas periféricas, llamadas nociceptores (Basbaum & Jessell, 2000).

1.3.1 Nociceptores y su clasificación

Los nociceptores son una clase especializada de fibras aferentes primarias que responden a estímulos nocivos intensos. Los nociceptores se encuentran extensamente distribuidos en la piel, mucosas, membranas, fascias profundas, tejido conectivo de órganos viscerales, ligamentos y cápsulas articulares, periostio, músculos, tendones y vasos arteriales (Basbaum & Jessell, 2000). De los cuerpos celulares de los nociceptores se origina un axón que se bifurca en ramas periféricas que inervan el órgano blanco y en ramas centrales que inervan la médula espinal para hacer sinapsis en neuronas nociceptivas de segundo orden (Woolf & Ma, 2007). Los nociceptores son activados sólo cuando la intensidad del estímulo alcanza un rango nocivo, sugiriendo que ellos poseen propiedades biofísicas y moleculares que los hacen capaces de detectar y responder selectivamente a estímulos potencialmente dañinos (Basbaum *et al*, 2009). Los nociceptores tienen esta capacidad de distinguir, ya que poseen un alto umbral de estimulación y la capacidad de relacionar de manera directa la frecuencia de la descarga con la intensidad del estímulo detectado (Bessou & Perl, 1969).

Se clasifican, a su vez, con base en la clasificación de la fibra nerviosa en la cual están localizados. Hay dos tipos de fibras nerviosas: (1) fibras C, de diámetro reducido y amielínicas, que conducen el impulso nervioso a poca velocidad (2 m/s) y, (2) fibras A δ de mayor diámetro, ligeramente mielinizadas que conducen impulsos nerviosos más rápido (20 m/s). Ambos tipos de fibras responden a estímulos térmicos, mecánicos y químicos (IASP, 2016).

1.3.2 Transmisión del estímulo nociceptivo

La nocicepción involucra la activación de los nociceptores y comprende los procesos de transducción, conducción, transmisión y percepción (Rang *et al*, 1994; Woolf, 2004; Kuner, 2010) (Figura 6):

1. La transducción es la conversión de los estímulos nocivos térmicos, químicos y mecánicos en actividad eléctrica por las terminales periféricas de los nociceptores.

2. La conducción es el paso de los potenciales de acción desde la terminal periférica a lo largo de los axones hasta la terminal central de los nociceptores ubicada en el asta dorsal de la médula espinal.

3. La transmisión es la transferencia sináptica de la información sensorial desde las fibras primarias a través de la asta dorsal de la médula espinal, hasta estructuras cerebrales involucradas en el procesamiento del aspecto sensorial, discriminativo, emocional y aversivo del dolor.

4. La percepción se refiere al proceso por el cual los procesos anteriores interactúan con la psique del individuo, para crear la experiencia emocional y; como tal subjetiva que se percibe como dolor.

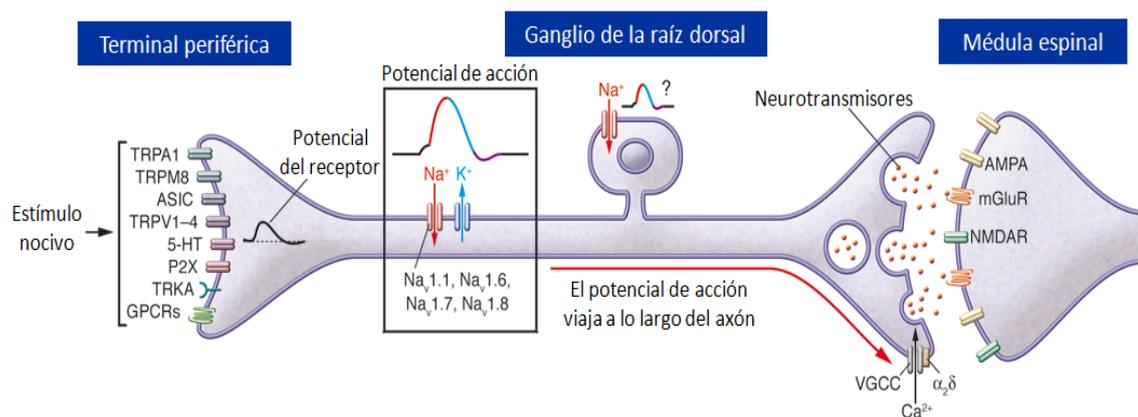


Figura 6. Transmisión del estímulo nocivo (modificado de Raouf *et al.*, 2010).

La transducción de la información de los nociceptores al SNC es modulada por varias sustancias químicas producidas o liberadas cuando hay daño celular (Tabla 1).

En resumen, una vez que los nociceptores son activados por cualquier tipo de estímulo, se genera un potencial de acción que viaja a través del nervio aferente hasta llegar a la médula espinal, donde se hace el relevo liberando neurotransmisores para que la señal llegue al tallo cerebral, tálamo, y otras estructuras subcorticales.

Tabla 1. Principales sustancias químicas liberadas cuando existe un daño celular

SUSTANCIA	FUENTE
Potasio	Células dañadas
Serotonina	Plaquetas
Bradicinina	Plasma
Histamina	Mastocitos
Prostaglandinas	Células dañadas
Leucotrienos	Células dañadas
Sustancia P	Nervios periféricos aferentes

1.3.3 Epidemiología del dolor

El dolor es considerado uno de los principales problemas clínicos, sociales y económicos alrededor del mundo. Se estima que alrededor del 55.7 % de los adultos en Estados Unidos de América (aproximadamente 126 millones de personas), han reportado tener algún nivel de dolor. De ellos, 11.2% (25.3 millones de adultos) ha experimentado dolor crónico (Nahin, 2015).

El dolor limita el estado funcional e impacta negativamente la calidad de vida de quienes lo padecen, afectando el desempeño laboral y social. El tratamiento médico para combatir el dolor resulta costoso y complica la atención médica de otros padecimientos. El costo médico debido al dolor oscila entre 261 y 300 mil millones de dólares; se estima que el valor de la pérdida productiva es de entre 560 y 635 millones de dólares (Gaskin & Richard, 2011).

Actualmente existen diferentes tratamientos para el dolor; sin embargo, éstos no resultan eficaces en algunas condiciones de dolor y en algunos casos su eficacia está asociada a la elevada incidencia de efectos adversos. De acuerdo con este panorama, es importante realizar un esfuerzo para la búsqueda de nuevos fármacos de origen natural y sintético para el tratamiento del dolor.

1.3.4 Tratamiento del dolor

Existen diferentes terapias de gran uso para aliviar el dolor entre ellos se encuentran, el tratamiento quirúrgico, la estimulación eléctrica y el tratamiento farmacológico (Drucker & Anías, 2005).

El tratamiento farmacológico es la estrategia terapéutica más utilizada para el tratamiento del dolor, e involucra el uso de fármacos que tienen la capacidad de aliviar el dolor sin alterar otro tipo de sensaciones, estos fármacos se denominan analgésicos.

El tipo de analgésico empleado dependerá del origen, intensidad y evolución del dolor (Lim, 1967). Existen dos grupos importantes de analgésicos: los opioides que se usan generalmente para el tratamiento del dolor intenso y crónico y los analgésicos antiinflamatorios no esteroideos (AINES) que son de gran utilidad en la clínica (Kuhar & Pasternak, 1984). Además, existe otro grupo de fármacos, los antiinflamatorios esteroideos, los cuales son prescritos frecuentemente para el tratamiento de enfermedades inflamatorias y autoinmunes. En la clínica del dolor, también es común el empleo de fármacos con acciones distintas a la analgésica como coadyuvantes en el tratamiento del mismo como las benzodiazepinas, los psicoestimulantes, los antihistamínicos, los anticonvulsivantes, los antiarrítmicos, los anestésicos y los antidepresivos tricíclicos (Ashburn & Staats, 1999).

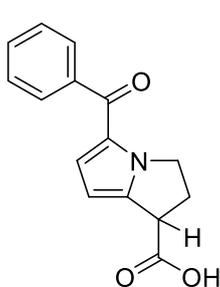
1.3.5 Analgésicos antiinflamatorios no esteroideos (AINEs)

Los AINEs son los fármacos más prescritos y más utilizados en el manejo del dolor, especialmente en el dolor asociado a condiciones inflamatorias (Burian & Geisslinger, 2005). También son efectivos en el tratamiento del dolor leve-moderado (Hardman *et al.*, 2001) de origen somático y en enfermedades como la artritis reumatoide (Furst & Munster, 2001).

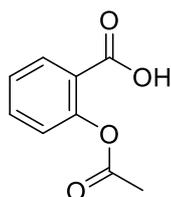
Este tipo de fármacos incluye a diversos compuestos que casi nunca presentan una relación química, pero comparten algunas propiedades terapéuticas como la actividad antipirética, analgésica y antiinflamatoria y un perfil cualitativamente similar

de efectos adversos. El fármaco prototipo es el ácido acetilsalicílico (aspirina), que no ha demostrado tolerancia y tiene un efecto analgésico, por lo que, aunque se incremente la dosis por encima de la DE_{50} , no se obtiene mayor analgesia y sí se potencian sus efectos tóxicos.

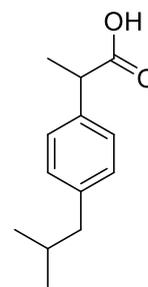
Los AINES son en su mayoría ácidos orgánicos (Figura 7) que se absorben rápida y completamente desde el tracto gastrointestinal, la presencia de comida tiende a retrasar su absorción. La mayoría de los AINEs se unen a proteínas (95-99%), principalmente a la albúmina; son biotransformados por metabolismo hepático mediante las enzimas CYP3A o CYP2C y son eliminados principalmente por el riñón, aunque también se excretan por la bilis (Insel, 1996; Furst & Munster, 2001).



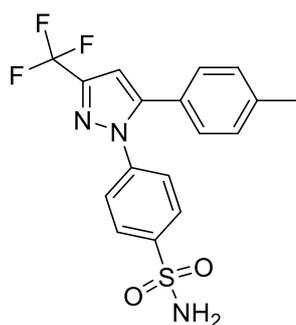
Ketorolaco



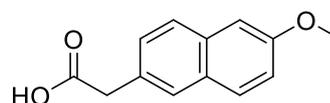
Ácido acetilsalicílico



Ibuprofeno



Celecoxib



Naproxeno

Figura 7. Estructura química de algunos AINEs.

1.3.6 Mecanismo de acción de los AINEs

Los principales efectos terapéuticos de los AINEs se deben a su capacidad para inhibir de manera no selectiva a la enzima ciclooxigenasa (COX); existen al menos dos isoenzimas de la COX: la COX-1 se expresa de manera constitutiva en la mayoría de las células y es la principal fuente (pero no exclusiva) de PGs (prostaglandinas) para las funciones fisiológicas, tales como la citoprotección gástrica y renal, y hemostasis. Por el contrario, la COX-2 es inducida por estímulos inflamatorios, tales como citocinas, tensión de cizallamiento y promotores de tumores, y es la fuente más importante para la síntesis de PGs que contribuyen al dolor y la inflamación. La inhibición de la COX-2 media en gran parte, las acciones terapéuticas de los AINEs, mientras que la inhibición simultánea de la COX-1 explica en gran medida, pero no exclusivamente, los efectos adversos no deseados en el tracto gastro intestinal que complican la terapia crónica con AINEs (Grosser *et al.*, 2011) (Figura 8).

Los AINEs también poseen mecanismos de acción independientes de la inhibición de ambas isoformas de COX, tales como la interferencia con factores de transcripción (Tegeder *et al.*, 2001), modulación de varios canales iónicos (Lee *et al.*, 2003), activación de la vía L-arginina-ON-GMPc (Déciga & López, 2004), activación de la transmisión serotoninérgica (Pini, Sandrini, & Vitale, 1996), activación de la transmisión adrenérgica (Miranda *et al.*, 2001), activación de la transmisión opioidérgica (Tortorici & Vanegas, 1994) y disminución de citocinas (Berg *et al.*, 1999), entre otros mecanismos. Es importante destacar que no todos los AINES actúan a través de todos los mecanismos mencionados anteriormente.

Con el fin de tener AINEs con un menor potencial ulcerogénico se diseñaron fármacos con mayor selectividad por COX-2 y prácticamente sin efectos sobre COX-1, tales como rofecoxib, celecoxib, valdecoxib, etoricoxib y lumiracoxib conocidos como coxibs. En general estos fármacos poseen efectos antiinflamatorios similares a los de los AINEs típicos, pero con menor irritación de la mucosa gástrica (Vane & Warner, 2000).

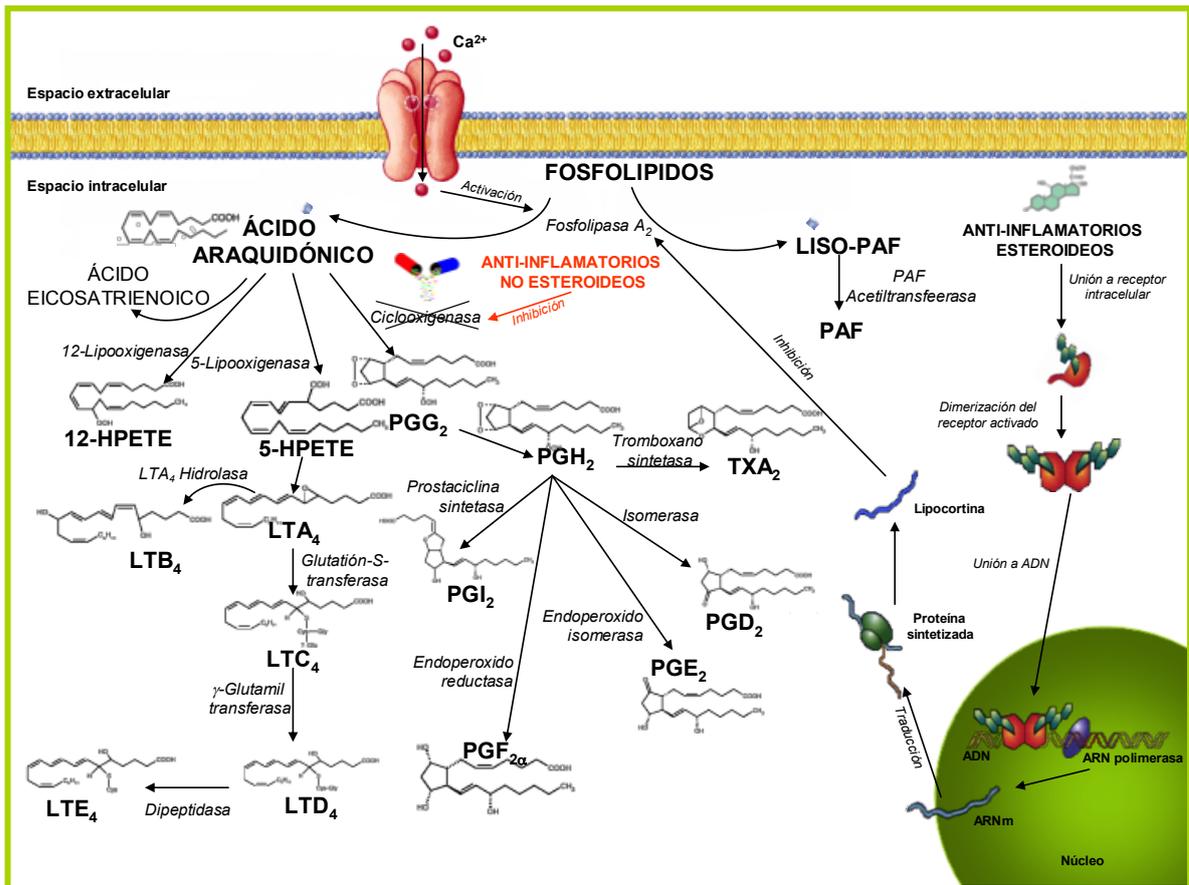


Figura 8. Mecanismo de acción de los antiinflamatorios no esteroideos, (modificada de Huerta-Cruz, 2005).

1.3.7 Efectos adversos de los AINEs

Los AINEs presentan varios efectos adversos, el más frecuente es la inducción de úlceras gástricas o intestinales, que a veces se acompañan de anemia por la pérdida hemática resultante y de síntomas como anorexia, náuseas, dispepsia, dolor abdominal y diarrea. Otros efectos adversos incluyen el bloqueo de la agregación plaquetaria, la prolongación de la gestación o del trabajo de parto espontáneo, cambios en la función renal (de importancia en pacientes con insuficiencia cardíaca congestiva o nefropatías crónicas) y reacciones de hipersensibilidad (Burke *et al.*, 2005; Grosser *et al.*, 2011).

Aunque los inhibidores selectivos de la COX-2 no afectan el tiempo de sangrado, la inhibición selectiva de la COX-2 induce un desbalance entre la producción del antitrombótico PGI₂ y el protrombótico TXA₂, lo que desencadena problemas cardiovasculares de tipo trombótico (Lizárraga *et al.*, 2002).

1.3.8 Analgésicos opioides

Los analgésicos opioides son fármacos agonistas con actividad parecida a la morfina (Gutstein & Akil, 2005). También son conocidos como analgésicos narcóticos y son los analgésicos más potentes. Estos fármacos reducen el dolor sin producir inconciencia, pero producen una sensación de relajación y sueño, y a dosis elevadas coma y/o la muerte; su uso prolongado conduce a tolerancia y algunas veces a una dependencia física. Generalmente son considerados fármacos de elección para tratar el dolor de intensidad media o alta, tanto agudo como crónico, oncológico y no oncológico (Gutstein & Akil, 2001).

La mayoría de los opioides se absorben con facilidad en el tubo digestivo y los opioides más lipófilos se absorben con facilidad a través de las mucosas nasal y bucal (Weinberg *et al.*, 1988). También se absorben con facilidad después de la administración subcutánea o intramuscular, y se unen a proteínas plasmáticas con afinidad variable y se distribuyen en concentración elevada en cerebro, hígado, riñón, bazo y pulmones. Son biotransformados por metabolismo hepático antes de ser excretados por riñón (Hardman *et al.*, 2001).

1.3.9 Mecanismo de acción de los opioides

Los opioides ejercen su acción mediante la activación de los receptores μ (μ), delta (δ) y kappa (κ) y diferentes subtipos para cada clase, localizados en el SNC y SNP (Gutstein & Akil, 2005). Los receptores opioides están acoplados a proteínas G sensibles a la toxina de la tosferina, produciendo un efecto de inhibición de la enzima adenilato ciclasa (Herz, 1993), activación de las corrientes de K^+ operadas por receptores y suprimen las corrientes de Ca^{2+} de compuerta de voltaje (Figura 9) (Duggan & North, 1983). La hiperpolarización del potencial de membrana por activación de corrientes de K^+ y la limitación de la entrada de Ca^{2+} por supresión de las corrientes del mismo, son los mecanismos que explican el bloqueo de la descarga de neurotransmisores como glutamato y sustancia P, la reducción de la excitabilidad de la membrana neuronal y la inhibición de la transmisión del dolor en diversas vías neuronales (Gutstein & Akil, 2005). Los analgésicos opioides inhiben la transmisión del dolor a nivel espinal y supraespinal.

La analgesia a nivel supraespinal, así como las propiedades euforizantes, la depresión respiratoria y la dependencia física de la morfina y algunos otros opioides son consecuencia de su unión a los receptores μ . La activación de los receptores κ induce analgesia a nivel espinal, miosis y sedación, mientras que la activación de los receptores δ está relacionada con los efectos disfóricos, alucinógenos y a una estimulación cardíaca producidos por los analgésicos opioides (Sato & Minami, 1995).

1.3.10 Efectos adversos de los opioides

Aunque los opioides son fármacos analgésicos eficaces, producen diversos efectos adversos entre ellos depresión respiratoria, sedación, euforia, miosis, náusea, vómito, mareos, embotamiento, disforia, prurito, estreñimiento, incremento de la presión en las vías biliares, retención urinaria e hipotensión; en algunos pacientes se presenta delirio. Además, su uso resulta problemático debido a su elevado potencial de abuso, relacionado con su efecto reforzante en el SNC y su uso crónico genera tolerancia analgésica y finalmente dependencia física y psicológica (Way *et al.*, 2001).

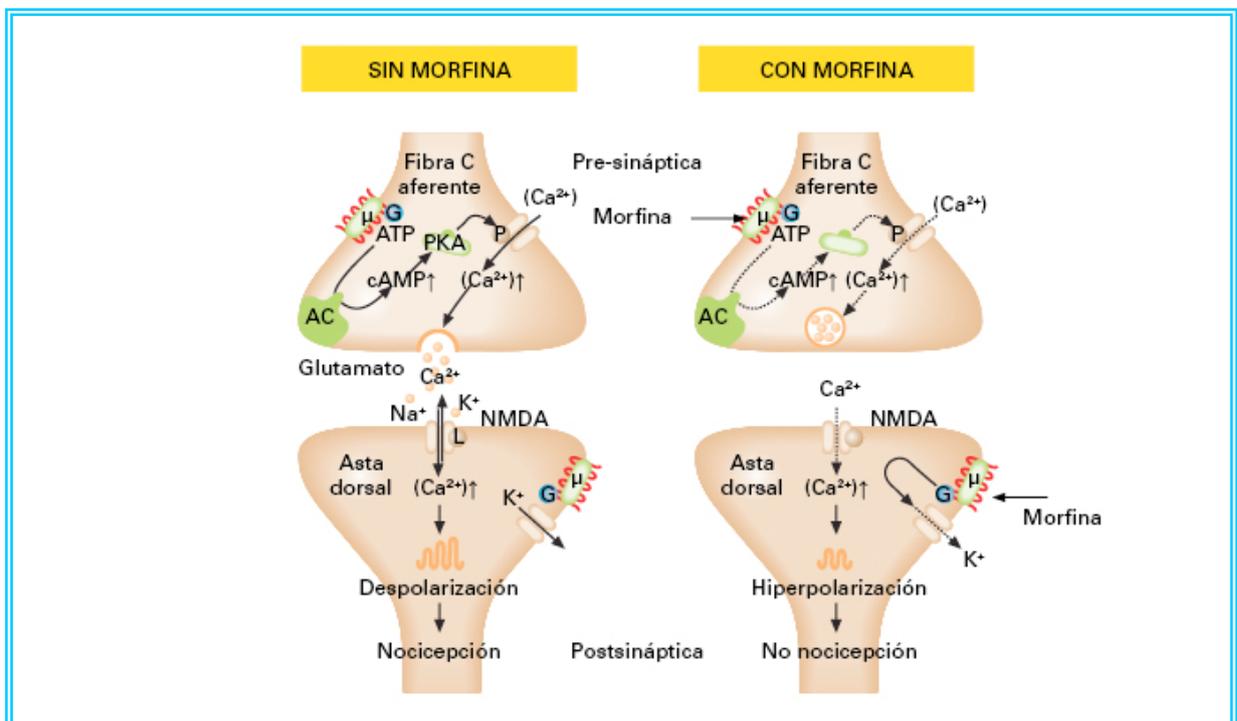


Figura 9. Mecanismo de acción de los analgésicos opioides. Modificada de Grünenthal Group.

1.4 Evaluación experimental del dolor en animales

Los primeros modelos animales de nocicepción fueron reportados a finales del siglo XIX y han sido un punto de partida importante para el conocimiento de los procesos involucrados en el dolor (Gregory *et al.*, 2013). Desde entonces se han desarrollado un gran número de modelos animales para establecer los mecanismos involucrados en el dolor generado en diferentes estados de la enfermedad. Los modelos animales de nocicepción tienen dos componentes importantes: el método para inducir la nocicepción y la medición subsecuente del mismo. Los modelos más apropiados, ya sea por la generación de una lesión, por la aplicación de agentes químicos, térmicos o físicos deberán reproducir una nocicepción que comparta los mecanismos de condiciones clínicas específicas. Del mismo modo, la medición de las conductas nociceptivas deberá detectar no sólo la respuesta dolorosa, sino también deberá hacerlo de manera consistente con la experiencia clínica. La medición de conductas reflexivas como el umbral de retiro a los estímulos nocivos se ha utilizado por mucho tiempo para explorar a los mecanismos del dolor. Este tipo de modelos han demostrado ser útiles para el avance en la comprensión de las bases fisiológicas de la nocicepción, permitiendo la identificación de neurotransmisores, receptores, mensajeros intracelulares y genes implicados en el dolor. Además, en las últimas décadas, la acción farmacológica (la eficacia, la potencia y la duración de la acción) de numerosos analgésicos que reducen las respuestas sensoriales reflejadas en modelos de nocicepción aguda y crónica en roedores ha demostrado una consistente coherencia con la analgesia producida en humanos (Gregory *et al.*, 2013).

En la tabla 2 se enlistan algunos de los modelos experimentales para el estudio del dolor en animales.

Tabla 2. Modelos experimentales para el estudio del dolor¹.

Método para inducir la nocicepción/daño	Modelo experimental	Especie utilizada	Validación farmacológica	Enfermedad asociada
Eléctrico	Estimulación eléctrica de la pata/cola	Ratón/ Rata	Opioides	Dolor agudo
Térmico	Hot plate/ tail flick	Ratón/ Rata	Opioides	Dolor agudo
Mecánico	Randall-Selitto	Ratón/ Rata	Opioides/AINEs	Dolor agudo
	Compresión del ganglio de la raíz dorsal	Rata	Ninguno	Dolor lumbar crónico
Químico	Formalina/ carragenina	Ratón/ Rata	Opioides/AINEs/ Coxibs	Dolor inflamatorio
	Artritis inducida por colágeno	Ratón/ rata	AINEs/coxibs	Artritis reumatoide
	Osteoartritis inducida por iodocetato monosodico	Ratón/ rata	Ninguno	Osteoartritis
	Depleción de catecolaminas inducida por reserpina	Rata	Gabapentina/ Antidepresivos	Fibromialgia
Quirúrgico	Ligadura del nervio ciático	Ratón/ rata	Anticonvulsivantes/Antidepresivos	Dolor neuropático

¹Adaptada de Le Bars *et al.*, 2001 y Whitside *et al.*, 2013

1.4.1 Modelo de la formalina

El modelo de la formalina es una prueba basada en el uso de un estímulo de larga duración (dolor tónico), que involucra el uso de un agente irritante, un agente químico algogénico como estímulo nociceptivo. Brevemente, este modelo consiste en la administración subcutánea de formalina (solución acuosa de formaldehído, generalmente al 2%), en la parte dorsal de la extremidad posterior del animal (Le Bars *et al.*, 2001). El parámetro medido es el tiempo invertido en lamer o morder la extremidad administrada con formalina por unidad de tiempo (Wheeler-Aceto & Cowan, 1991). Es un modelo útil ya que involucra mecanismos de inflamación neurogénica y nocicepción central.

En la rata y el ratón, la administración intraplantar de formalina produce una respuesta conductual bifásica. Esta respuesta consiste de una fase inicial o primera fase que empieza inmediatamente después de la inyección de la formalina y dura entre 3-5 min, seguida de una fase quiescente, una segunda fase que se produce entre 20-30 min después de la de la solución algogénica administrada. La intensidad de estas conductas depende de la concentración de formalina administrada (Rosland *et al.*, 1990). La concentración de formalina al 2% permite observar las dos fases características de la prueba y no genera ulceración.

La primera fase o fase neurogénica de la prueba de la formalina se debe esencialmente a la estimulación química directa de los nociceptores. La formalina induce la activación directa de los canales TRPA1 y TRPV1, así como también fibras aferentes, principalmente de tipo C (McNamara *et al.*, 2007). La segunda fase o fase inflamatoria involucra la liberación local de mediadores inflamatorios como bradicinina y prostaglandinas (Shibata *et al.*, 1989), y sensibilización central mediada por los receptores de glutamato y sustancia P (Sawynok & Liu, 2004).

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El estudio de las plantas medicinales condujo al descubrimiento de fármacos analgésicos prototipo como la morfina y la aspirina, ambos de gran utilidad y aplicación en la terapéutica desde su descubrimiento y hasta la fecha. A pesar de la existencia de estos y otros analgésicos, se sabe que no todos son eficaces para aliviar algunos tipos de dolor o bien su eficacia está asociada con la presencia de efectos adversos. Es por este hecho que el aislamiento y la caracterización farmacológica de nuevos compuestos activos o la búsqueda de tratamientos alternativos a partir de fuentes naturales para el tratamiento del dolor está plenamente justificado para aliviar el dolor.

En este contexto, la especie *Melampodium divaricatum*, planta utilizada en la medicina tradicional para aliviar el dolor y la inflamación, fue seleccionada para realizar el estudio químico y farmacológico que valida su uso en la medicina tradicional.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Establecer la inocuidad y eficacia preclínica de la decocción obtenida a partir de las partes aéreas de la especie medicinal *M. divaricatum* con la finalidad de generar la información científica necesaria que valide su uso contra el dolor en la medicina tradicional.

3.2 Objetivos particulares

Para el cumplimiento de este objetivo general, se formulan los siguientes objetivos específicos:

- Realizar la preparación del extracto acuoso de la planta objeto de estudio mediante la técnica de decocción.
- Establecer de manera preliminar la inocuidad de *M. divaricatum* mediante la evaluación de su toxicidad aguda en ratones de acuerdo al método de Lorke.
- Determinar la eficacia preclínica de la especie mediante la evaluación del potencial antinociceptivo y antihiperalgésico de la decocción de *M. divaricatum* utilizando el modelo de la formalina y de hiperalgesia en ratones diabéticos.
- Obtener un perfil cromatográfico del extracto acuoso mediante la técnica de cromatografía de líquidos de alta eficiencia con el propósito de establecer la complejidad del preparado tradicional.

4. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

4.1 Material vegetal

Las partes aéreas de la especie vegetal *Melampodium divaricatum* (L.C. Rich) DC., fueron colectadas por el Dr. José Alberto Calderón Pardo en la Colonia Ampliación Chapultepec en el Municipio de Cuernavaca, estado de Morelos, en agosto del 2015. Una muestra de referencia se depositó en el Herbario Nacional (MEXU) con el número de voucher 1465411. La identificación de la especie fue establecida por el M. en C. Rafael Torres Colín.

4.2 Obtención del extracto acuoso de *M. divaricatum*

El extracto acuoso de la planta se preparó mediante la técnica de decocción a partir de 10 g de material vegetal seco y molido y 1 L de agua hirviendo; el extracto resultante se dejó reposar durante 30 min. Al término del periodo de extracción, el extracto acuoso se filtró y concentró a sequedad, obteniéndose 7 g de extracto seco.

4.3 Análisis cromatográfico

La cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC) se realizó en un equipo marca Waters® (MA, USA), equipado con un detector de UV con arreglo de fotodiodos (PDA) modelo 996 (Waters). El control del equipo, la adquisición de los datos y el procesamiento de los mismos se efectuaron utilizando el software Empower versión 2.0 (Waters), en una columna LiChrospher® 100 RP-18 (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) de 4 mm de diámetro interno x 250 mm de longitud y con un tamaño de partícula de 5 µm; con un gradiente de elución formado por una mezcla binaria de ACN y H₂O_d e inyectando un volumen de muestra de 20 µL.

4.4 Evaluación farmacológica

4.4.1 Fármacos de referencia

La estreptozotocina (STZ), la nicotinamida (NA), el diclofenaco (DIC), la gabapentina (GBP) y, el formaldehído, fueron adquiridos en Sigma-Aldrich, México. Todos los fármacos se prepararon el día del experimento y fueron administrados por vía esofágica (p.o.) en un volumen de 0.2 mL/10 g de peso corporal de los ratones por medio de una cánula gástrica rígida para animales de laboratorio.

4.4.2 Animales de experimentación

Todos los experimentos fueron realizados utilizando ratones macho ICR de 25-30 g de peso corporal, obtenidos del Centro UNAM-ENVIGO (ENVIGO RMS, S.A. de C.V.). Los animales fueron mantenidos a temperatura controlada de $25^{\circ} \pm 2^{\circ}$ C con ciclo de luz/oscuridad de 12 horas y libre acceso al alimento y agua (*ad libitum*). Todos los estudios se realizaron de acuerdo a los principios y recomendaciones de la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999), Especificaciones Técnicas para la Producción, Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio y en armonía con las reglas internacionales sobre el cuidado y uso de animales de laboratorio. Los protocolos para evaluar el efecto antinociceptivo y antihiperálgico de *M. divaricatum* fueron realizados bajo los Estándares Éticos que delimitan las Guías Internacionales para la Investigación Experimental del Dolor en Animales (Zimmermann, 1983) y aprobados por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Facultad de Química UNAM (FQ/CICUAL/132/16, FQ/CICUAL/235/17, FQ/CICUAL/233/17). Además de realizarse todos los esfuerzos por minimizar el número de animales usados, así como su sufrimiento. Cada animal fue usado una sola vez y al finalizar el experimento fueron sacrificados en una cámara de CO₂.

4.4.3 Determinación de la toxicidad aguda

La toxicidad aguda de los extractos de *M. divaricatum* se determinó mediante el cálculo de la dosis letal media (DL₅₀) empleando el método de Lorke (1983) en

ratones. Para ello, los animales fueron administrados con los extractos de *M. divaricatum* en dos fases: en la primera fase los ratones se administraron con las dosis de 10, 100 y 1000 mg/kg, p.o.; en la segunda fase, los animales fueron administrados con las dosis de 1600, 2900 y 5000 mg/kg; y el grupo control recibió el vehículo (NaCl 0.9%), p.o. En ambas fases los animales se mantuvieron en observación y su peso corporal fue registrado por 14 días consecutivos. Después de este periodo de tiempo, el efecto tóxico o el daño macroscópico inducido en pulmones, corazón, estómago, hígado e intestinos fue evaluado mediante la disección de los tejidos al término del ensayo. La DL₅₀ fue calculada como la media geométrica utilizando la siguiente fórmula:

$$DL_{50} = \sqrt{(a)(b)}$$

Donde **a** es igual a la dosis más baja que induce muerte en al menos un ratón y **b** la dosis más alta en la que no se produce ninguna muerte.

4.4.4 Inducción experimental del estado de hiperglucemia

Los animales fueron administrados vía intraperitoneal (i.p.) con 50 mg/kg de NA disuelta en NaCl 0.9%, 15 minutos después recibieron una dosis única de 130 mg/kg, i.p. de STZ en una solución amortiguadora de citrato 0.1 M (pH 4.5). Los grupos control fueron administrados con los vehículos utilizados. En seguida los animales tuvieron libre acceso al alimento y al agua (Ovalle-Magallanes *et al.*, 2015). Después de siete días de la inducción, los niveles de glucosa en sangre fueron cuantificados utilizando un glucómetro comercial (One Touch Ultra 2, Johnson & Johnson, CA, USA). Los ratones con niveles de glucosa \geq 200 mg/dL fueron considerados como hiperglucémicos y se incluyeron en el estudio.

4.4.5 Evaluación del efecto antinociceptivo y antineuropático de *M. divaricatum*

4.4.5.1 Nocicepción inducida por formalina en ratones

Todos los ratones fueron ambientados en cámaras individuales de Plexiglass (14 x 14 x 14 cm) durante 30 min. Posteriormente los animales fueron administrados con el extracto acuoso de *M. divaricatum* (31.6, 100, y 316 mg/kg) o diclofenaco (31.6

mg/kg) por vía oral. Para inducir la nocicepción, los animales fueron administrados con 30 μ L de una solución de formalina al 2% en la superficie dorsal de la extremidad posterior derecha. Posterior a la administración de la formalina, el tiempo transcurrido entre la administración de la sustancia algogénica y la aparición de una conducta de tipo dolorosa como levantar, lamer y/o morder la extremidad administrada con formalina fue registrado en dos fases: Primera fase: 0-10 min y Segunda fase: 11-30 min.

4.4.5.2 Hiperalgnesia inducida por formalina en ratones hiperglucémicos

Los ratones se ambientaron en cámaras individuales de Plexiglass (14 x 14 x 14 cm) durante 30 minutos. Posteriormente los animales fueron administrados con el extracto acuoso de *M divaricatum* (31.6, 100, y 316 mg/kg) o GBP (31.6 mg/kg) por vía oral. Para inducir la hiperalgnesia química en ratones hiperglucémicos, los animales fueron administrados con 40 μ L de formalina al 1% en la superficie dorsal de la extremidad posterior derecha. Posterior a la administración de la formalina, el tiempo transcurrido entre la administración de la sustancia algogénica y la aparición de una conducta de tipo dolorosa como levantar, lamer y/o morder la extremidad administrada con formalina fue registrado en dos fases: Primera fase: 0-10 min y Segunda fase: 11-30 min.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La presentación de los resultados, así como la discusión de los mismos, se realizará en tres partes. En la primera se presenta la determinación de la toxicidad aguda para confirmar la seguridad del extracto acuoso de *M. divaricatum*; en la segunda parte se abordará todo lo correspondiente al estudio farmacológico del extracto acuoso; y en la tercera parte, se discutirán los resultados, hasta el momento, de los estudios fitoquímicos realizados a la especie medicinal.

5.1 Determinación de la toxicidad aguda

La determinación de la toxicidad aguda es una prueba de seguridad en la que se administra a los animales una única dosis del extracto o compuesto analizado. El objetivo consiste en determinar el rango entre la dosis que no causa ningún efecto adverso y la dosis que supone una amenaza para la vida (OMS, 2002).

En la tabla 3 se muestran los resultados obtenidos en el ensayo, los cuales permitieron estimar que la DL_{50} del extracto acuoso fue mayor a 5000 mg/kg (5 g/kg), ya que a las dosis evaluadas no se observaron cambios conductuales relacionados a efectos tóxicos agudos, daño macroscópico a tejidos o muertes. La seguridad demostrada para el extracto acuoso de *M. divaricatum* dio pie a la elección del rango de dosis utilizadas en los experimentos farmacológicos para la determinación de los efectos antinociceptivo y antineuropático en la prueba de la formalina.

5.2 Efecto antinociceptivo del extracto acuoso de *M. divaricatum*

Con base en los resultados obtenidos en el ensayo de toxicidad aguda se procedió a realizar la evaluación preclínica de la decocción de *M. divaricatum* en la prueba de la formalina en ratones normoglucémicos. Durante la prueba se observó la disminución de la respuesta evaluada, en este caso el tiempo que el ratón invierte en lamerse la extremidad administrada con formalina, a las tres dosis ensayadas (31.6, 100 y 316.2 mg/kg) en comparación con los ratones tratados con VEH (Figura 10).

Tabla 3. Toxicidad aguda producida por la decocción de *M. divaricatum*.

Primera Fase			Segunda Fase		
Dosis (mg/kg)	Animales muertos/Animales ensayados	Daño macroscópico en tejidos	Dosis (mg/kg)	Animales muertos/Animales ensayados	Daño macroscópico en tejidos
VEH	0/3	No se observó	VEH	0/3	No se observó
10	0/3	No se observó	1600	0/3	No se observó
100	0/3	No se observó	2900	0/3	No se observó
1000	0/3	No se observó	5000	0/3	No se observó

Los ratones que recibieron las dosis de 100 y 316.2 mg/kg de la decocción de *M. divaricatum* muestran una disminución significativa en la respuesta al estímulo químico durante la primera fase de la prueba, en comparación con el vehículo (VEH) y con el fármaco de referencia, diclofenaco (DIC) (Figura 11). Estos resultados sugieren que el efecto antinociceptivo producido por la decocción de *M. divaricatum* podría ser mediado por la modulación de la actividad de las fibras sensoriales, principalmente de tipo C, las cuales se ha reportado, son activadas directamente por la presencia de formalina a través de la activación de los canales iónicos TRPA1 y TRPV1 (McNamara *et al.*, 2007)

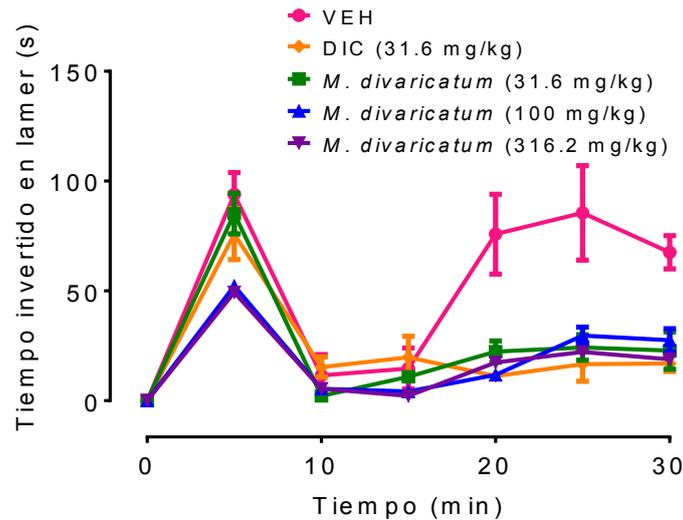


Figura 10. Curso temporal (0-30 min) del efecto antinociceptivo de la decocción de *M. divaricatum* en la prueba de la formalina en ratones normoglucémicos. Cada punto representa el promedio del tiempo invertido en lamer \pm EEM de los animales de cada grupo ($n=6$).

En la segunda fase o fase inflamatoria, se observó que los ratones pretratados con la decocción a las tres dosis ensayadas, presentan una disminución significativa de la respuesta inducida formalina, comparable a la respuesta antinociceptiva producida por DIC (Figura 12). El efecto antinociceptivo inducido por la decocción de *M. divaricatum* no presenta una respuesta dosis-dependiente, pues se observa una disminución de la respuesta nociceptiva similar en las tres dosis ensayadas. Los resultados observados durante la segunda fase de la prueba de la formalina sugieren el efecto antinociceptivo producido por la decocción está relacionado probablemente con un efecto antiinflamatorio que previene la sensibilización central de las fibras sensoriales primarias. Existe evidencia que indica que la segunda fase de la prueba de la formalina es producida por la liberación local de mediadores inflamatorios como bradicinina y prostaglandinas (Shibata *et al.*, 1989). Además, se ha observado que durante la segunda fase se produce sensibilización central mediada por la activación de los receptores de glutamato y sustancia P (Sawynok & Liu, 2004).

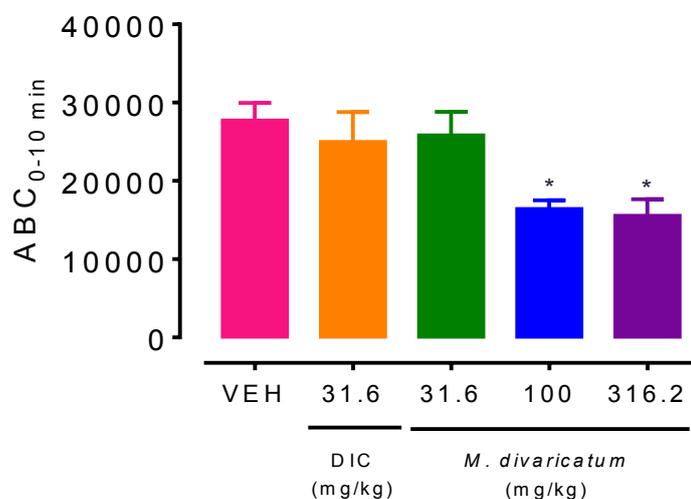


Figura 11. Efecto antinociceptivo de la decocción de *M. divaricatum* en la primera fase o neurogénica de la prueba de la formalina en ratones normoglucémicos. Cada barra representa el promedio del área bajo la curva \pm EEM de los animales de cada grupo ($n=6$). ANADEV, *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$ y * $p < 0.05$.

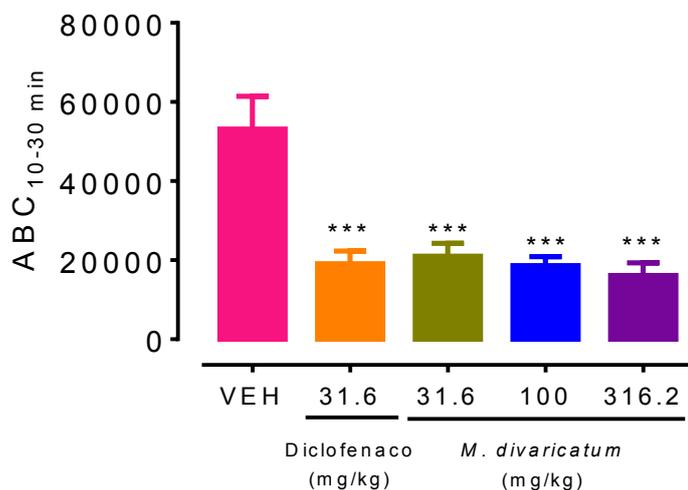


Figura 12. Efecto antinociceptivo de la decocción de *M. divaricatum* en la segunda fase o inflamatoria de la prueba de la formalina en ratones normoglucémicos. Cada barra representa el promedio del área bajo la curva \pm EEM de los animales de cada grupo ($n=6$). ANADEV, *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$ y * $p < 0.05$.

5.3 Efecto antihiperalgésico del extracto acuoso de *M. divaricatum*

El dolor neuropático es el resultado de una lesión o disfunción del SNC o del SNP. Este tipo de dolor se caracteriza por la presencia de dolor espontáneo, hiperalgesia y alodinia (Woolf, 2004). Algunos ejemplos de dolor neuropático son: la neuropatía diabética, polineuropatía por SIDA, neuralgia post-herpética, radiculopatía lumbar (Koltzenburg & Scadding, 2001).

La neuropatía diabética es una de las complicaciones a largo plazo más frecuentes de la diabetes, se estima que alrededor del 50 % o más de los pacientes diabéticos la padece (Sundara Rajan *et al.*, 2013). Esta complicación produce anomalías sensoriales, incluyendo parestesia, hiperalgesia y entumecimiento (Peltier *et al.*, 2014). De acuerdo a esto, el siguiente paso en esta investigación fue determinar el posible potencial de la decocción de *M. divaricatum* como agente antihiperalgésico para el tratamiento de la neuropatía diabética.

Después de dos semanas de la inducción de hiperglucemia con NA/STZ, los ratones desarrollan hiperalgesia química y térmica (Lee-Kubli *et al.*, 2014). La administración de formalina al 1% en ratones hiperglucémicos produce un incremento de la respuesta nociceptiva en comparación con ratones normoglucémicos, demostrando una reducción del umbral nociceptivo a estímulos químicos (Martínez *et al.*, 2017). La administración oral de la decocción de *M. divaricatum* en ratones hiperglucémicos-hiperalgésicos, reduce el tiempo invertido en lamer en ambas fases de la prueba de la formalina (Figura 13). Durante la primera fase de la prueba de la formalina, la decocción de *M. divaricatum* redujo de manera significativa y dosis-dependiente la hiperalgesia producida por la presencia del estímulo químico, este efecto fue equiparable al producido por el fármaco de referencia gabapentina (Figura 14). Además, la decocción redujo la hiperalgesia a las tres dosis ensayadas durante la segunda fase de la prueba (Figura 15). Estos resultados sugieren el potencial antihiperalgésico de la decocción de *M. divaricatum* para el tratamiento de la neuropatía diabética.

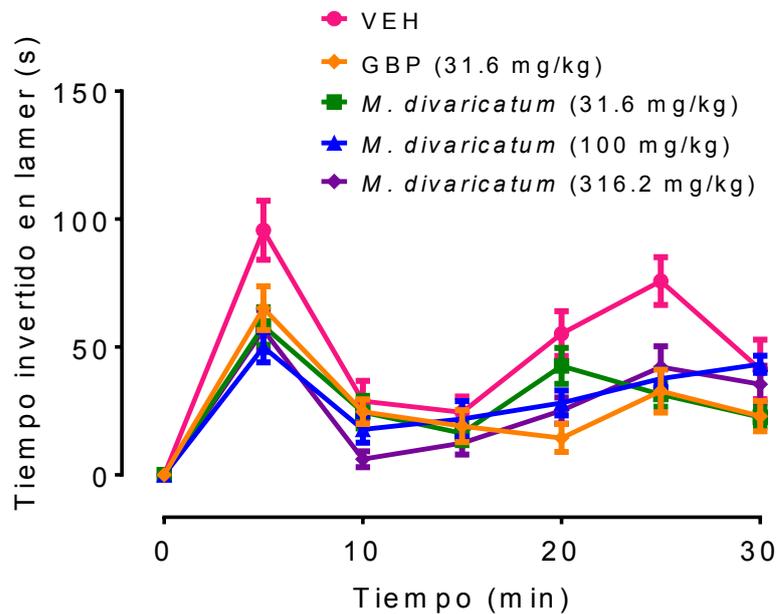


Figura 13. Curso temporal de la prueba de la formalina de la decocción de *M. divaricatum* en ratones hiperglucémicos.

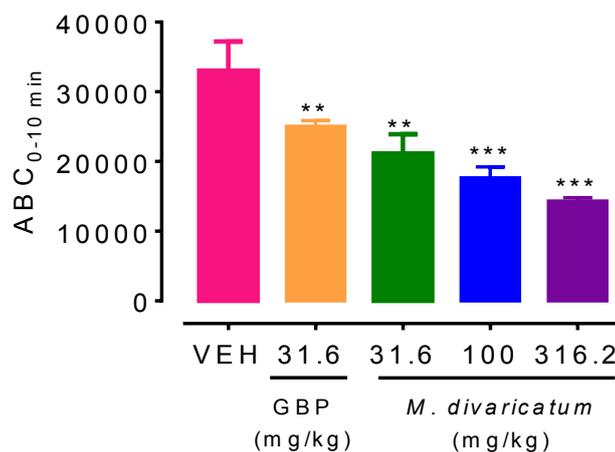


Figura 14. Efecto antihiperalgésico del extracto acuoso de *M. divaricatum* en la primera fase o neurogénica de la prueba de la formalina en ratones hiperglucémicos. Cada barra representa el promedio del área bajo la curva \pm EEM de los animales de cada grupo ($n=6$). ANADEVIA, *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$ y * $p < 0.05$.

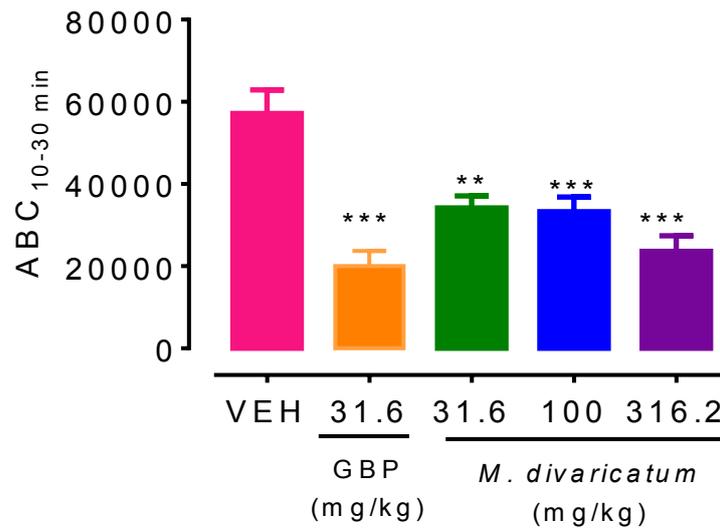


Figura 15. Efecto antihiperalgésico del extracto acuoso de *M. divaricatum* en la segunda fase o inflamatoria de la prueba de la formalina en ratones hiperglucémicos. Cada barra representa el promedio del área bajo la curva \pm EEM de los animales de cada grupo ($n=6$). ANADEVIA, *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$ y * $p < 0.05$.

5.4 Análisis por HPLC de la decocción de la droga cruda

Debido a que se evaluó el efecto farmacológico de la decocción de *M. divaricatum in vivo*, se generó y analizó por HPLC su perfil cromatográfico (Figura 11), utilizando un detector de UV. Las condiciones del sistema se muestran en la tabla 4.

Tabla 4. Condiciones del sistema para analizar la decocción por HPLC.

Columna	LiChrospher® 100 RP-18; 5 μ m (250 x 4)
Fase móvil	ACN y H ₂ O _d acidificada con AcOH al 0.3%
	Gradiente: 0 – 8 min, (20:80); 8 – 25 min, (20:80 – 50:50); 25 - 45 min, (50:50); 45 – 55 min (50:50 – 20:80)
Velocidad de flujo	0.4 mL/min
Volumen de inyección	20 μ L
Longitud de onda	327 nm

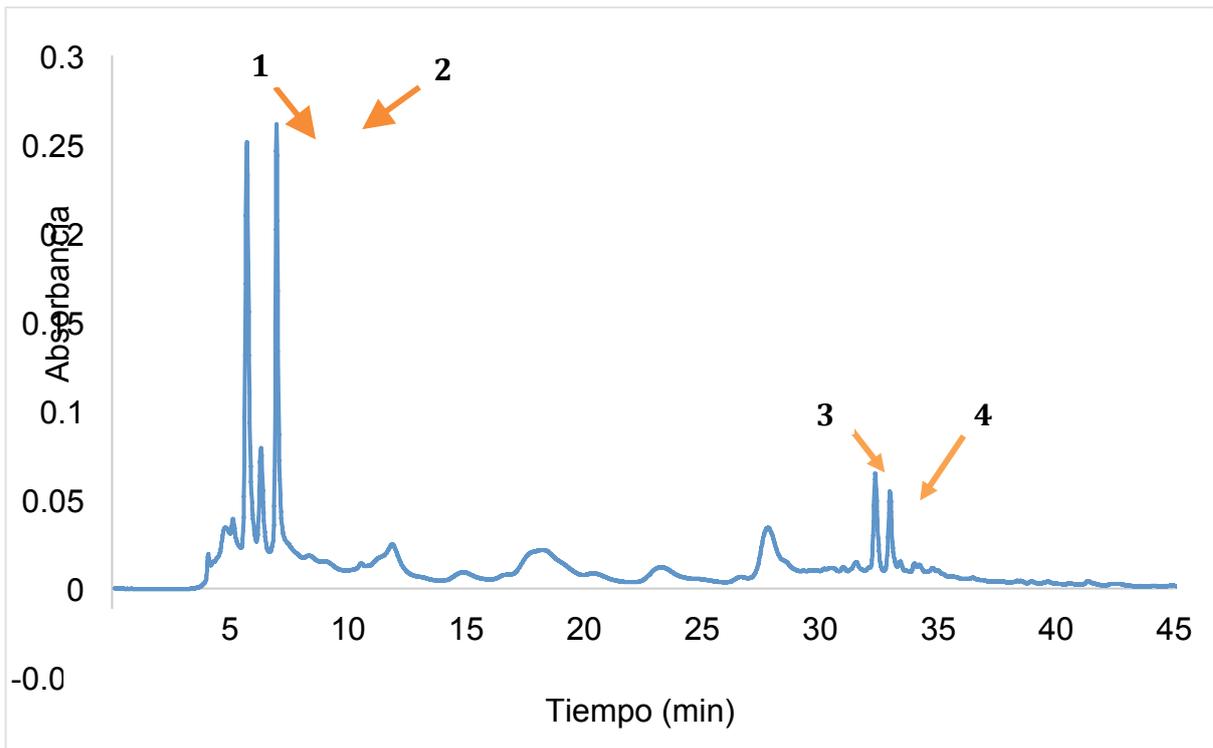


Figura 16. Perfil cromatográfico por HPLC de la decocción de las partes aéreas de *M. divaricatum*, $\lambda = 327$ nm.

En el perfil cromatográfico se observan cuatro picos mayoritarios, los cuales denominamos con los números del 1 – 4. Este análisis nos permite inferir que la decocción no es tan compleja químicamente y, con base en lo reportado en la literatura consultada y analizando las longitudes de onda de máxima absorción (Figura 17 y Figura 18) de los cuatros compuestos, se puede sugerir que son compuestos fenólicos (Luo *et al.*, 2002; Hernández, M., 2014).

Cabe destacar que falta realizar un estudio fitoquímico más riguroso en el cual se realicen procesos de reparto con otros disolventes orgánicos para identificar y caracterizar a los metabolitos característicos de la especie.

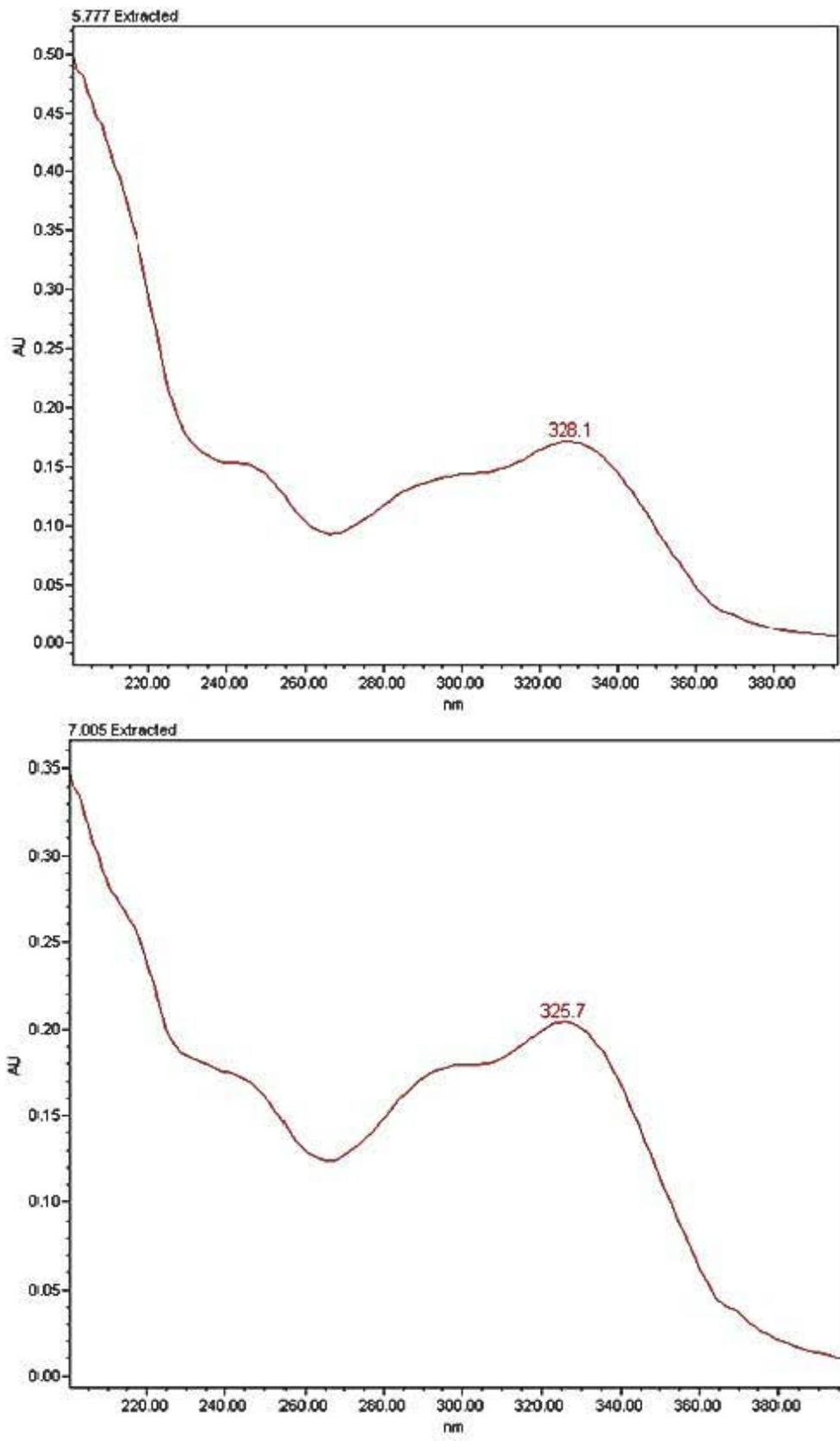


Figura 17. Espectro de UV de los compuestos 1 y 2, respectivamente, presentes en la decocción de *M. divaricatum*.

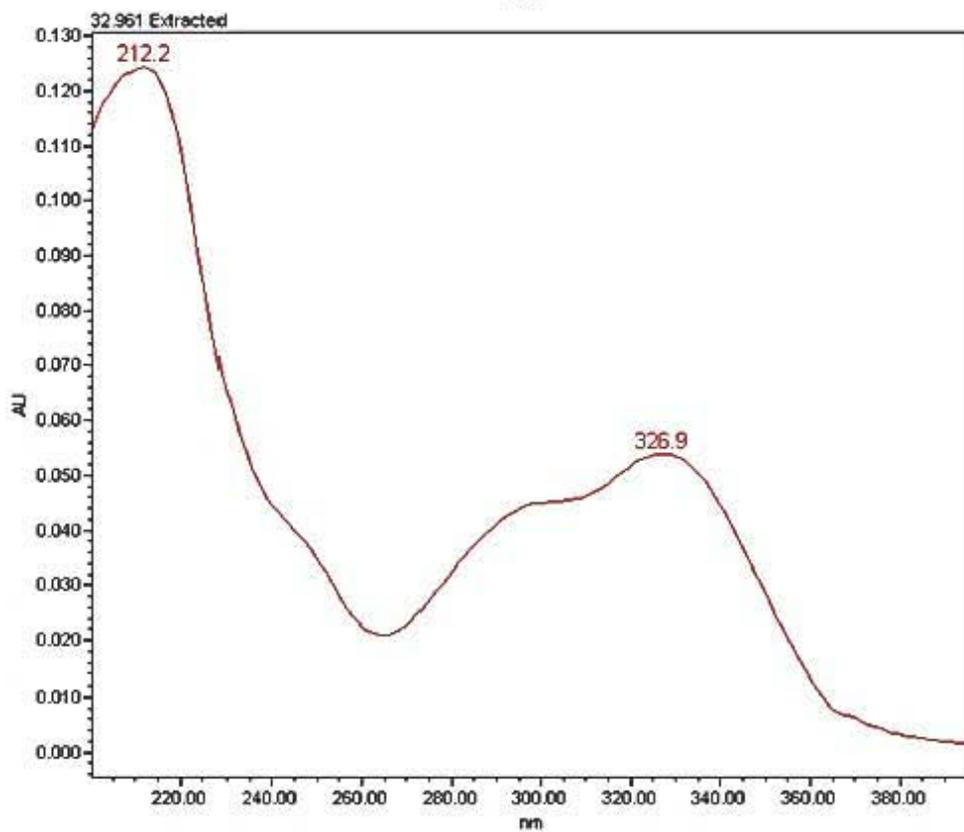
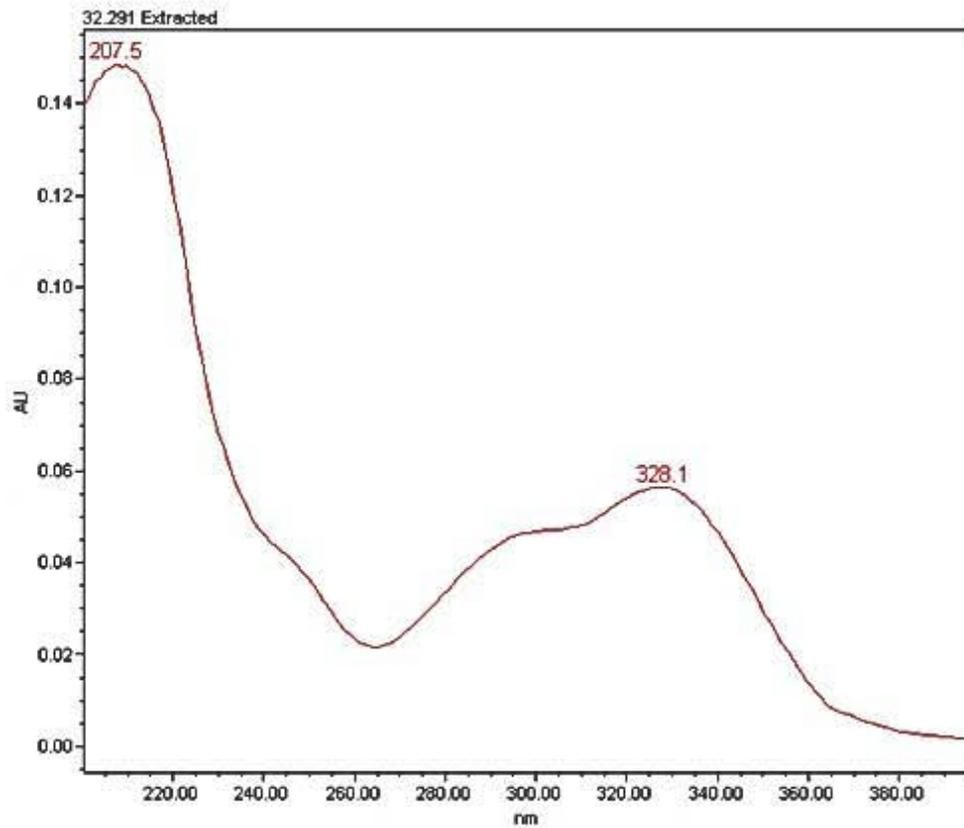


Figura 18. Espectro de UV de los compuestos 3 y 4, respectivamente, presentes en la decocción de *M. divaricatum*.

6. CONCLUSIONES

- ❖ La falta de toxicidad del preparado tradicional de la especie medicinal *Melampodium divaricatum* en roedores, es un indicador preliminar de la inocuidad preclínica de la especie; sin embargo, es necesario realizar un número de experimentos para comprobar su inocuidad.
- ❖ La decocción de *M. divaricatum* demostró ser eficaz como agente antinociceptivo en ratones mediante la prueba de la formalina. El efecto fue mejor en la fase inflamatoria, por lo que es altamente probable que la especie sea eficaz para tratar los dolores abdominales.
- ❖ El análisis preliminar cromatográfico que se realizó de la decocción permite inferir que el preparado tradicional no es de naturaleza química tan compleja y que es factible aislar los principios activos presentes en la misma.

7. PERSPECTIVAS

- ❖ Realizar el estudio fitoquímico de la decocción de *M. divaricatum*.
- ❖ Completar los estudios de toxicidad preclínica.
- ❖ Evaluar el efecto antinociceptivo y antihiperalgésico de los metabolitos secundarios presentes en la decocción de *M. divaricatum*.
- ❖ Evaluar el posible mecanismo de acción antinociceptivo/antihiperalgésico de los metabolitos secundarios presentes en la decocción de *M. divaricatum*.

8. BIBLIOGRAFÍA

- AnimalResearch.Info.* (2017). Obtenido de <http://www.animalresearch.info/es/desarrollo-farmacologico/seguridad-y-analisis/>
- Ashburn, M. A., & Staats, P. S. (1999). Management of chronic pain. *The Lancet*, 139-154.
- Basbaum, A. I., & Jessell, T. M. (2000). The perception of pain. En E. R. Kandel, J. H. Schwartz, & T. M. Jessell, *Principles of Neuroscience* (págs. 472-491). Nueva York: McGraw-Hill.
- Basbaum, A. I., Bautista, D. M., Scherrer, G., & Julius, D. (2009). Cellular and molecular mechanisms of pain. *Cell*, 267-284.
- Berg, J., Fellier, H., Christoph, T., Graup, J., & Stimmeder, C. (1999). The analgesic NSAID lornoxicam inhibits cyclooxygenase (COX)-1/2, inducible nitric oxide synthase (iNOS), and the formation of interleukin (IL)-6 in Vitro. *Inflammatory Research*, 369-379.
- Bessou, P., & Perl, E. R. (1969). Responses of cutaneous sensory units with unmyelinated fibers to noxious stimuli. *Journal of Neurophysiology*, 1025-1043.
- Bohlmann, F., & Le Van, N. (1977). Terpen-glykoside aus *Melampodium divaricatum*. *Phytochemistry*, 1765-1768.
- Burke, A., Smyth, E., & FitzGerald, G. A. (2005). Analgesic-antipyretic agents; pharmacotherapy of gout. En L. L. Brunton, J. S. Lazo, & K. L. Parker, *Goodman and Gilman's: The Pharmacological Basis of Therapeutics*. Nueva York: McGraw-Hill.
- CONABIO. (2016 - 2017). *Melampodium divaricatum*. Obtenido de <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/asteraceae/melampodium-divaricatum/fichas/ficha.htm>
- CONABIO. (2016-2017). *Melampodium divaricatum*. México. Obtenido de <http://www.gbif.org/species/8950434>
- Déciga-Campos, M., & López-Muñoz, F. J. (2004). Participation of the L-arginine-nitric oxide-cyclic GMP-ATP-sensitive K⁺ channel cascade in the antinociceptive effect of rofecoxib. *European Journal of Pharmacology*, 193-199.
- Drucker Colín, R., & Anías, C. J. (2005). En R. Drucker Colín, *Fisiología médica* (págs. 751-774). México: El manual moderno.
- Duggan, A. W., & North, R. A. (1983). Electrophysiology of opioids. *Pharmacological Reviews*, 219-282.

- Furst, D. E., & Munster, T. (2001). Nonsteroid Anti-Inflammatory Drugs, Disease-Modifying Antirheumatic Drugs, Nonopioid Analgesics, and Drugs Used in Gout. En B. G. Katzung, *Basic and Clinical Pharmacology* (págs. 596-623). McGraw-Hill.
- Gaskin, D. J., & Richard, P. (2011). Appendix C. The Economic Costs of Pain in the United States. En C. a. Institute of Medicine of the National Academies. Committee on Advancing Pain Research, *Relieving Pain in America: A Blueprint for Transforming Prevention, Care, Education, and Research*. Washington D.C.: National Academies Press.
- Girón, L. e. (1991). Ethnobotanical survey of the medicinal flora used by the Caribs of Guatemala. *Journal of Ethnopharmacology*, 173-187.
- Gregory, N., Harris, A. L., Robinson, C. R., Dougherty, P. M., Fuchs, P. N., & Sluka, K. A. (2013). An overview of animal models of pain: disease models and outcome measures. *Journal of Pain*, 11.
- Grosser, T., Smyth, E., & FitzGerald, G. A. (2011). Anti-inflammatory, antipyretic, and analgesic agents; pharmacotherapy of gout. En L. Laurence Brunton, B. Chabner, & B. Knollman, *Goodman and Gilman's: The Pharmacological Basis of Therapeutics* (págs. 959-992). Colombia: McGraw-Hill.
- Gutstein, H. B., & Akil, H. (2001). Opioid analgesics. En J. G. Hardman, L. E. Limbird, & A. G. Gilman, *Goodman and Gilman's: The Pharmacological Basis of Therapeutics* (págs. 569-619). Nueva York: McGraw-Hill.
- Hardman, J. G., Limbird, L. E., Molinoff, P. B., & Ruddon, R. W. (2001). En *Goodman and Gilman's: The Pharmacological Basis of Therapeutics* (págs. 631-632). Nueva York: McGraw-Hill.
- Hernández Arámburo, M. Y. (2014). *Pruebas de composición e identidad de la droga cruda de Brickellia cavanillesii (Asteraceae) (Tesis de Maestría)*. UNAM. Ciudad de México.
- Herz, A. (1993). *Handbook of Experimental Pharmacology* (Vol. 104: Opioids I). Berlin: Springer-Verlag.
- Hubert, T. D., & Wiemer, D. F. (1985). Ant-repellent terpenoids from *Melampodium divaricatum*. *Phytochemistry*, 1197-1198.
- Huerta-Cruz, J. C. (2005). *Determinación de la importancia antinociceptiva en dolor intenso de la asociación de inhibidores preferentemente selectivos COX-2 y un opioide. (Tesis de maestría)*. México: CINVESTAV-Sede Sur.
- Hüther, J., Passreiter, C. M., Wray, V., & Willuhn, G. (1999). Acylated 2-Hydroxythymol-3-O-diglycosides from *Melampodium divaricatum*. *Phytochemistry*, 979-986.

- Insel, P. A. (1996). Analgesic-antipyretic and antiinflammatory agents and drugs employed in the treatment of gout. En J. G. Hardman, L. E. Limbird, P. B. Molinoff, R. W. Ruddon, & A. G. Gilman, *Goodman and Gilman's: The Pharmacological Basis of Therapeutics* (págs. 617-634). Nueva York: McGraw-Hill.
- Koltzenburg, M., & Scadding, J. (2001). Neuropathic pain. *Current Opinion in Neurology*, 641-647.
- Kuhar, M. J., & Pasternak, G. W. (1984). *Analgesics: Neurochemical, Behavioral and Clinical Perspectives*. Nueva York: Raven Press.
- Kuner, R. (2010). Central mechanisms of pathological pain. *Nature Medicine*, 1258-1266.
- Le Bars, D., Gozariu, M., & Cadden, S. W. (2001). Animal models of nociception. *Pharmacological Reviews*, 597-652.
- Lee, H. M., Kim, H. I., Shin, Y. K., Lee, C. S., Park, M., & Song, J. H. (2003). Diclofenac inhibition of sodium currents in rat dorsal root ganglion neurons. *Brain Research*, 120-127.
- Lee-Kubli, C. A., Mixcoatl-Zecuatl, T., Jolival, C. G., & Calcutt, N. A. (2014). Animal models of diabetes-induced neuropathic pain. *Current Topics in Behavioral Neuroscience*, 147-170.
- Lim, R. K. (1967). Pain mechanisms. *Anesthesiology*, 106-110.
- Lizárraga, I., Sumano, H., & Castillo, F. (2002). Inhibidores selectivos de la ciclooxigenasa 2: Usos potenciales en perros. *Veterinaria México*, 285-307.
- Luo, X., Chen, B., Yao, S., & Zeng, J. (2003). Simultaneous analysis of caffeic acid derivatives and alkaloids in roots and extracts of *Echinacea purpurea* by high-performance liquid chromatography-photodiode array detection-electrospray mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 73-81.
- Martínez Alfaro, M. (1984). Medicinal plants used in a Totonac community of the Sierra Norte de Puebla: Tuzamapan de Galeana, Puebla, México. *Journal of Ethnopharmacology*, 203-221.
- Martínez, A. L., Madariaga-Mazón, A., Rivero-Cruz, I., Bye, R., & Mata, R. (2017). Antidiabetic and Antihyperalgesic Effects of a Decoction and Compounds from *Acourtia thurberi*. *Planta Médica*, 534-544.
- McNamara, C. R., Mandel-Brehm, J., Bautista, D. M., Siemens, J., Deranian, K. L., Zhao, M., . . . Fanger, C. M. (2007). TRPA1 mediates formalin-induced pain. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 13525-1530.
- Merskey, H., & Bogduk, N. (1994). Classification of Chronic Pain: Descriptions of Chronic Pain Syndromes and Definitions of Pain Terms. *IASP Press*, 210.

- Mexicana, A. d. (2016 - 2017). *Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana*. Obtenido de <http://www-medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=&id=7076>
- Miranda, H. F., Sierralta, F., & Pinardi, G. (2001). An isobolographic analysis of the adrenergic modulation of diclofenac antinociception. *Anesthesia & Analgesia*, 430-435.
- Morton, J. (1981). *Atlas of Medicinal Plants of Middle America, Bahamas to Yucatan*. Springfield, IL: C. Thomas.
- Nahin, R. L. (2015). Estimates of pain prevalence and severity in adults: United States, 2012. *Journal of Pain*, 769-780.
- Nogueira, M. (2006). Investigation of genotoxic and antigenotoxic activities of *Melampodium divaricatum* in *Salmonella typhimurium*. *Toxicology in Vitro*, 361-366.
- OMS. (2002-2017). *Pautas generales para las metodologías de investigación y evaluación de la medicina tradicional*. Obtenido de <http://apps.who.int/medicinedocs/es/d/Js4930s>
- OMS. (2012-2017). *Directrices de la OMS sobre el tratamiento farmacológico del dolor persistente en niños con enfermedades médicas*. Obtenido de http://www.who.int/medicines/areas/quality_safety/3PedPainGLs_coverspanish.pdf
- Peltier, A., Goutman, S. A., & Callaghan, B. C. (2014). Painful diabetic neuropathy. *British Medical Journal*, 1799.
- Pini, L. A., Sandrini, M., & Vitale, G. (1996). The antinociceptive action of paracetamol is associated with changes in the serotonergic system in the rat brain. *European Journal of Pharmacology*, 31-40.
- Rang, H. P., Bevan, S., & Dray, A. (1994). Nociceptive peripheral neurons: cellular properties. En P. D. Wall, & R. Melzack, *Textbook of pain* (págs. 57-78). Nueva York: Churchill Livingstone.
- Raouf, R., Quick, K., & Wood, J. N. (2010). Pain as a channelopathy. *The Journal of Clinical Investigation*, 3745-3752.
- Rosland, J. H., Tjolsen, J. H., Maehle, B., & Hole, K. (1990). The formalin test in mice: effects of formalin concentration. *Pain*, 235-242.
- Satoh, M., & Minami, M. (1995). Molecular pharmacology of opioid receptors. *Pharmacology & Therapeutics*, 343-364.
- Sawynok, J., & Liu, X. J. (2004). The formalin test: characteristics and usefulness of the model. 145-163.

- Scholz, J., & Woolf, C. J. (2002). Can we conquer pain? *Nature Neuroscience*, 1062-1067.
- Schüngel, J., & Passreiter, C. M. (2002). New Diacylated 2-Hydroxythymol Derivatives from *Melampodium divaricatum*. *Z. Naturforsch*, 966-968.
- Shibata, M., Ohkubo, T., Takahashi, H., & Inoki, R. (1989). Modified formalin test: characteristic biphasic pain response. *Pain*, 347-352.
- Tegeder, I., Niederberger, E., Israr, E., Gühring, H., Brune, K., Euchenhofer, C., . . . Geisslinger, G. (2001). Inhibition of NF- κ B and AP-1 activation by R- and S-flurbiprofen. *FASEB*, 595-597.
- Tortorici, V., & Vanegas, H. (1994). Putative roles of medullary off- and on-cells in the antinociception produced by dipyrone (metamizol) administered systematically or microinjected into PAG. *Pain*, 197-205.
- Vane, J. R., & Warner, T. D. (2000). Nomenclature COX-2 inhibitors. *The Lancet*, 1373-1374.
- Way, W. L., Fields, H. L., & Schumacher, M. A. (2001). Opioid Analgesics and Antagonists. En B. G. Katzung, *Basic & Clinical Pharmacology* (págs. 512-531). McGraw-Hill.
- Weinberg, D. S., Inturrisi, C. E., Reidenberg, B., Moulin, D. E., Nip, T. J., Wallenstein, S., . . . Foley, K. M. (1988). Sublingual absorption of selected opioid analgesics. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 335-342.
- Wheeler-Aceto, H., & Cowan, A. (1991). Standardization of the rat paw formalin test for evaluation of analgesics. *Psychopharmacology*, 35-44.
- Whiteside, G. T., Pomonis, J. D., & Kennedy, J. D. (2013). An industry perspective on the role and utility of animal models of pain in drug discovery. *Neuroscience Letters*, Pt A: 65-72.
- Woolf, C. J. (2004). Pain: Moving from Symptom Control toward Mechanism-Specific Pharmacologic Management. *Annals of Internal Medicine*, 441-451.
- Woolf, C. J., & Ma, Q. (2007). Nociceptors-noxious stimulus detectors. *Neuron*, 353-364.