



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA
BIOMEDICINA

EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTINOCICEPTIVO Y/O ANTI-INFLAMATORIO DE
***Brassica oleracea* var. *italica* Y METABOLITOS ACTIVOS EN MODELOS**
EXPERIMENTALES

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

Q.F.B. GUADARRAMA ENRÍQUEZ OMAR

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. MARÍA EVA GONZÁLEZ TRUJANO
INSTITUTO NACIONAL DE PSIQUIATRÍA RAMÓN DE LA FUENTE MUÑOZ
COMITÉ TUTOR: DRA. ROSA VENTURA MARTÍNEZ
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM
DR. RICARDO REYES CHILPA
INSTITUTO DE QUÍMICA, UNAM

CD. MX., OCTUBRE 2018



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA
BIOMEDICINA

EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTINOCICEPTIVO Y/O ANTI-INFLAMATORIO DE
***Brassica oleracea var. italica* Y METABOLITOS ACTIVOS EN MODELOS**
EXPERIMENTALES

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

Q.F.B. GUADARRAMA ENRÍQUEZ OMAR

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. MARÍA EVA GONZÁLEZ TRUJANO
INSTITUTO NACIONAL DE PSIQUIATRÍA RAMÓN DE LA FUENTE MUÑIZ
COMITÉ TUTOR: DRA. ROSA VENTURA MARTÍNEZ
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM
DR. RICARDO REYES CHILPA
INSTITUTO DE QUÍMICA, UNAM

MÉXICO, CD. MX., OCTUBRE 2018



Lic. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que el Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 06 de agosto de 2018, aprobó el siguiente jurado para la presentación del examen para obtener el grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** del alumno **GUADARRAMA ENRÍQUEZ OMAR** con número de cuenta 307069111, con la tesis titulada "**EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTINOCICEPTIVO Y/O ANTI-INFLAMATORIO DE *Brassica oleracea* var. *italica* Y METABOLITOS ACTIVOS EN MODELOS EXPERIMENTALES**", realizada bajo la dirección de la **DRA. MARÍA EVA GONZÁLEZ TRUJANO**:

Presidente: DRA. HERMELINDA SALGADO CEBALLOS
Vocal: DRA. AGUSTINA CANO MARTÍNEZ
Secretario: DRA. ROSA VENTURA MARTÍNEZ
Suplente: DRA. SILVIA LAURA GUZMÁN GUTIÉRREZ
Suplente: DR. RICARDO REYES CHILPA

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

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, Cd, Mx., a 04 de octubre de 2018


DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA
COORDINADOR DEL PROGRAMA



AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la UNAM por la oportunidad de realizar mis estudios de maestría.

Al CONACYT por la beca proporcionada para realizar mis estudios de posgrado (CVU/Becario): 781549/610203.

A los proyectos de investigación que permitieron la realización de esta tesis: CONACYT 226254, CONACYT 256448, CNIC-R-2015-785-098, CYTED-RED Cornucopia.

Al Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado de la UNAM por su apoyo para la presentación de este trabajo en Washington D.C., Estados Unidos de América (2018-1) y Madrid, España (2018-2).

A la Dra. María Eva González Trujano por integrarme en su equipo de trabajo. A los miembros del Comité Tutor: Dra. Rosa Ventura Martínez y Dr. Ricardo Reyes Chilpa por su interés, comentarios y aportaciones al presente trabajo de investigación.

AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL

Al pueblo de México que permitió que yo continuara con mi preparación académica.

A la Universidad Nacional Autónoma de México por brindarme la oportunidad de seguir creciendo de manera personal y académica en sus aulas.

Al Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz y al Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez por el uso de sus instalaciones para la realización de este trabajo.

A la Dra. Eva González Trujano por permitir mi formación bajo su tutela, así como por su apoyo académico y personal en el laboratorio que dignamente representa.

A la Dra. Guadalupe Esther Ángeles López por su asesoría en experimentos y situaciones no académicas durante gran parte de esta tesis.

A la M. en C. Mariana Yetlanezy Hernández Arámburo, por las recomendaciones y anotaciones a este trabajo, así como por los buenos momentos en el trabajo de laboratorio.

Al Dr. Alberto Hernández León, por su ayuda en pruebas farmacológicas, así como sus sugerencias en esta tesis y buenos ratos en el laboratorio.

A los doctores Diego Á. Moreno y Nieves Baenas del Laboratorio de Fitoquímica del CEBAS-CSIC, Murcia por el material vegetal y los extractos acuosos que permitieron las pruebas para esta tesis.

A la Dra. Agustina Cano Martínez del Departamento de Fisiología del Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez por la asesoría en la histología.

A los doctores Rosa Ventura y Ricardo Reyes por sus atinados comentarios y por su tutoría en el transcurso de este trabajo. Asimismo agradezco a las doctoras del sínodo Dra. Hermelinda Salgado, Dra. Agustina Cano y Dra. Silvia Laura Guzmán por sus comentarios para la mejora de esta tesis.

A los camaradas que hicieron muy ameno, enriquecedor y divertido el trabajo diario en el laboratorio: Mariana, Claret, Citlalli, Citlali, Sara, Lizeth, Nancy, Adriana, Daniela, Alberto, Leonel, Luis y Fernando.

DEDICATORIAS

**«No estudiamos con el propósito
de acumular conocimientos
estáticos sin contenido humano.
Nuestra causa como estudiantes es
la del conocimiento militante, el
conocimiento crítico, que
impugna, contradice, controvierte,
refuta y transforma, revoluciona
la realidad social, política,
cultural, científica».**

José Revueltas
1968

**A Dios
A mamá
A los abuelitos
Al ahijadito
A los primos, tíos y sobrinillos
A los amigos de la vida**

**Gracias por tanto, perdón por tan poco
Los quiero**

ÍNDICE

Página

ABREVIATURAS

ÍNDICE DE FIGURAS

ÍNDICE DE TABLAS

RESUMEN

1

ABSTRACT

2

I. MARCO TEÓRICO

3

1. Dolor

3

1.1. Epidemiología

3

1.2. Fisiología del dolor

4

1.3. Clasificación del dolor

6

1.3.1. Dolor Nociceptivo

6

1.3.2. Dolor inflamatorio

7

1.3.2.1. Dolor inflamatorio/Edema

7

1.3.3. Dolor patológico

7

1.4. Terapéutica del dolor

8

1.4.1. Antiinflamatorios no esteroideos

9

1.4.2. Opioides

10

1.4.3. Terapias alternativas para el tratamiento de dolor

11

2. Nutracéuticos

12

2.1. Clasificación de nutracéuticos

12

2.2. Legislación de los nutracéuticos

13

3. Brasicáceas

13

3.1. Brócoli

14

3.2. Composición química

15

3.3. La investigación farmacológica de especies del género *Brassica*

18

3.4. Sulforafano

18

4. Modelos experimentales en la investigación biomédica

19

II. JUSTIFICACIÓN

21

III. HIPÓTESIS

21

IV. OBJETIVOS

22

1. Objetivo general

22

2. Objetivos específicos

22

V. METODOLOGÍA

23

1. Animales

23

2. Material vegetal

23

| | |
|--|-----------|
| 2.1. Extractos acuosos de brócoli | 23 |
| 3. Fármacos y reactivos | 23 |
| 4. Evaluación farmacológica | 24 |
| 4.1. Primera etapa de la evaluación farmacológica | 24 |
| 4.1.1. Prueba de toxicidad aguda | 24 |
| 4.1.2. Nocicepción visceral inducida con ácido acético al 1 % | 24 |
| 4.1.3. Nocicepción inducida con formalina al 1 % | 25 |
| 4.1.3.1. Daño gástrico | 25 |
| 4.2. Segunda etapa de la evaluación farmacológica | 26 |
| 4.2.1. Prueba de « <i>plantar test</i> » | 26 |
| 4.2.2. Inflamación inducida con carragenina | 26 |
| 4.2.3. Evaluación del efecto sedante | 27 |
| 4.2.4. Análisis histológico | 27 |
| 4.2.4.1. Tinción tricrómica de Masson | 28 |
| 4.3. Determinación del posible mecanismo de acción del efecto antinociceptivo de los extractos de <i>B. oleracea</i> var. <i>italica</i> | 29 |
| VI. ANÁLISIS ESTADÍSTICO | 29 |
| VII. RESULTADOS | 30 |
| 1. Cuantificación de polifenoles y sulforafano | 30 |
| 2. Primera etapa de la evaluación farmacológica | 31 |
| 2.1. Determinación de la toxicidad aguda de extractos acuosos de brócoli | 31 |
| 2.2. Nocicepción visceral inducida con ácido acético al 1 % | 32 |
| 2.2.1. Efecto antinociceptivo del extracto acuoso de las semillas de brócoli | 32 |
| 2.2.2. Efecto antinociceptivo del extracto acuoso de los brotes de brócoli | 33 |
| 2.2.3. Efecto antinociceptivo del extracto acuoso del vegetal maduro de brócoli | 34 |
| 2.2.4. Efecto antinociceptivo del sulforafano | 35 |
| 2.2.5. Efecto antinociceptivo del ácido clorogénico | 36 |
| 2.3. Nocicepción inducida con formalina al 1 % | 37 |
| 2.3.1. Efecto antinociceptivo del extracto acuoso de semillas de brócoli | 37 |
| 2.3.2. Efecto antinociceptivo del extracto acuoso de brotes de brócoli | 38 |
| 2.3.3. Efecto antinociceptivo del extracto acuoso de vegetal maduro de brócoli | 39 |
| 2.3.4. Efecto antinociceptivo del sulforafano | 40 |
| 2.4. Evaluación del daño gástrico | 41 |
| 3. Segunda etapa de la evaluación farmacológica | 42 |
| 3.1 Prueba de « <i>plantar test</i> » | 42 |
| 3.1.1. Evaluación del efecto antinociceptivo del extracto acuoso de brotes de <i>Brassica oleracea</i> var. <i>italica</i> y del sulforafano | 42 |
| 4. Prueba de sedación: campo abierto | 43 |

| | |
|---|-----------|
| 4.1. Evaluación del efecto sedante del extracto acuoso de brotes de brócoli y sulforafano | 43 |
| 5. Edema inducido con carragenina | 44 |
| 5.1. Evaluación de la actividad antiedematosa de los extractos acuosos de brócoli | 44 |
| 5.2. Evaluación de la actividad antiedematosa del sulforafano | 45 |
| 5.3. Análisis histológico | 46 |
| VIII. DISCUSIÓN | 48 |
| 8.1. Análisis fitoquímico de los posibles constituyentes bioactivos del brócoli | 48 |
| 8.2. Evaluación de la toxicidad aguda de los extractos de brócoli | 49 |
| 8.3. Efecto antinociceptivo de extractos de brócoli en un modelo de dolor abdominal | 50 |
| 8.4. Efecto antinociceptivo de extractos de brócoli en un modelo de dolor nociceptivo | 52 |
| 8.5. Efecto antinociceptivo de extractos de brócoli en « <i>plantar test</i> » | 53 |
| 8.6. Efecto antinociceptivo de extractos de brócoli en la prueba de inflamación y edema inducidos con carragenina λ | 54 |
| 8.7. Efecto antinociceptivo del sulforafano y participación de receptores a opioides | 55 |
| IX. CONCLUSIÓN | 56 |
| X. LITERATURA CITADA | 57 |
| ANEXO A Obtención de extractos acuosos de <i>Brassica oleracea</i> var. <i>italica</i> | 65 |
| ANEXO B Artículos científicos derivados de esta tesis | 69 |

ABREVIATURAS

| | |
|------------------------|---|
| °C | Grado Celsius |
| µL | Microlitros |
| µM | Micromolar |
| µm | Micrómetro |
| µmol | Micromol |
| AC | Adenil cinasa |
| AINE | Antiinflamatorio no esteroideo |
| AMPA | Ácido α-amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico |
| AMP_c | Ácido monofosfórico cíclico |
| ATP | Adenosín trifosfato |
| Ca²⁺ | Calcio |
| CEBAS | Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura |
| cm | Centímetros |
| CNS | Sistema Nervioso Central (por sus siglas en inglés <i>Central Nervous System</i>) |
| CO₂ | Dióxido de carbono |
| COX | Ciclooxigenasa |
| CREB | Elementos de respuesta a AMP _c (por sus siglas en inglés <i>cAMP response element-binding</i>) |
| CSIC | Consejo Superior de Investigaciones Científicas |
| DL₅₀ | Dosis letal media |
| EEM | Error estándar de la media |
| Fe²⁺ | Hierro |
| g | Gramos |
| GABA | Ácido γ-amino butírico |
| GHS | Sistema Globalmente Armonizado de Clasificación y Etiquetado de Productos Químicos (por sus siglas en inglés <i>Globally Harmonized System</i>) |
| h | Hora |
| HPLC-PDA | Cromatografía Líquida de Alta Eficacia con Arreglo de Fotodiodos (Por sus siglas en inglés <i>High Performance Liquid Chromatography with Photodiode Array Detector</i>) |
| Hz | Hertz |
| i.p. | Intraperitoneal |
| IASP | Asociación Internacional para el Estudio del Dolor (por sus siglas en inglés, <i>International Association for the Study of Pain</i>) |
| IL | Interleucina |
| K⁺ | Potasio |
| kg | Kilogramo |
| L | Litro |
| m | Metro |
| M | Molar |
| MeJa | Metiljasmonato |
| mg | Miligramo |
| Mg²⁺ | Magnesio |
| min | Minutos |
| mL | Mililitro |
| Na⁺ | Sodio |

| | |
|------------------------------------|--|
| NF-κB | Factor nuclear kappa B |
| NMDA | N-metil-D-aspartato |
| NSAID | Antiinflamatorio no esteroideo (por sus siglas en inglés <i>Non Steroidal Anti-Inflammatory Drugs</i>) |
| no. | Número |
| Nrf2 | Factor nuclear eritroide 2 relacionado al factor 2 (por sus siglas en inglés <i>Nuclear factor E2-related factor 2</i>) |
| OCDE | Organización para la Cooperación y Desarrollo Económicos |
| OECD | Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (por sus siglas en inglés, <i>Organisation for Economic Co-operation and Development</i>) |
| OMS | Organización Mundial de la Salud |
| ON | Óxido nítrico |
| p.o. | Vía intragástrica, del latín <i>per os</i> |
| PGD₂ | Prostaglandina D ₂ |
| PGE₂ | Prostaglandina E ₂ |
| PGF_{2α} | Prostaglandina F _{2α} |
| PGI₂ | Prostaciclina |
| pH | $-\log[H^+]$ |
| PKA | Proteína cinasa A (por sus siglas en inglés <i>Protein Kinase A</i>) |
| PO₄³⁻ | Fosfato |
| RFA | Radiación Fotosintéticamente Activa |
| s | Segundos |
| s.c. | Subcutánea |
| SO₄²⁻ | Sulfato |
| t | Tiempo |
| TNF-α | Factor de Necrosis Tumoral α |
| TXA₂ | Tromboxano A ₂ |
| var. | Variedad |
| W | Watts |
| Zn²⁺ | Zinc |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | Página |
|--|---------------|
| Figura 1 Rutas fisiológicas del dolor. Vías ascendente y descendente | 5 |
| Figura 2 Escalera analgésica de la OMS | 9 |
| Figura 3 Mecanismo de acción de los AINEs | 10 |
| Figura 4 Mecanismo de acción de los opioides | 11 |
| Figura 5 <i>Brassica oleracea</i> L. var. <i>italica</i> Plenck | 14 |
| Figura 6 Estructura general de los glucosinolatos | 15 |
| Figura 7 Reacciones de hidrólisis de los glucosinolatos | 17 |
| Figura 8 Campo abierto | 27 |
| Figura 9 Actividad antinociceptiva del extracto acuoso de semillas de <i>B. oleracea</i> en la prueba de <i>writhing</i> en ratones | 32 |
| Figura 10 Actividad antinociceptiva del extracto acuoso de brotes de <i>B. oleracea</i> en la prueba de <i>writhing</i> en ratones | 33 |
| Figura 11 Actividad antinociceptiva del extracto acuoso de vegetal maduro <i>B. oleracea</i> . en la prueba de <i>writhing</i> en ratones | 34 |
| Figura 12 Actividad antinociceptiva de sulforafano (0.1, 1 y 10 mg/kg, i.p.) en la prueba de nocicepción visceral inducida con ácido acético al 1 % en ratones | 35 |
| Figura 13 Actividad antinociceptiva de ácido clorogénico (3,10, 30 y 100 mg/kg, i.p.) en la prueba de nocicepción visceral inducida con ácido acético al 1 % en ratones | 36 |
| Figura 14 Actividad antinociceptiva del extracto acuoso de semillas de <i>B. oleracea</i> (2000 mg/kg, i.p.) en la prueba de formalina al 1 % en ratas | 37 |
| Figura 15 Actividad antinociceptiva del extracto acuoso de brotes de <i>B. oleracea</i> (500, 1000 y 2000 mg/kg) en la prueba de formalina al 1 % en ratas | 38 |

| | | |
|------------------|---|-----------|
| Figura 16 | Actividad antinociceptiva del extracto acuoso de vegetal maduro de <i>B. oleracea</i> (500, 1000 y 2000 mg/kg, p.o.) en la prueba de formalina al 1 % en ratas | 39 |
| Figura 17 | Actividad antinociceptiva del sulforafano (0.1 y 1 mg/kg, i.p.) solo y en combinación con naltrexona (5 mg/kg, i.p.) comparados con el grupo vehículo y naltrexona (1 mg/kg, s.c.) sola en la prueba de formalina al 1 % en ratas | 40 |
| Figura 18 | Fotografías representativas de estómagos disecados de ratas | 41 |
| Figura 19 | % Efecto Máximo Posible de latencia de retiro ante el estímulo térmico inducido en ratas que recibieron la administración del extracto acuoso de brotes | 42 |
| Figura 20 | Evaluación del efecto sedante de los extractos acuosos de brócoli y sulforafano | 43 |
| Figura 21 | Inducción de edema con carragenina. Evaluación del efecto antiinflamatorio del extracto acuoso de brotes de brócoli. | 44 |
| Figura 22 | Inducción de edema con carragenina. Evaluación del efecto antiinflamatorio del sulforafano. | 45 |
| Figura 23 | Fotomicrografías histológicas de extremidades posteriores de ratas con distintos tratamientos. | 47 |
| Figura 24 | Secuencia de pasos para la obtención de extractos acuosos de <i>B. oleracea</i> var. <i>italica</i> | 67 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | Página |
|---|---------------|
| Tabla 1 Glucosinolatos presentes en <i>Brassica oleracea</i> var. <i>italica</i> | 16 |
| Tabla 2 Paradigmas comunes de pruebas de nocicepción, conductas observadas y sustratos neuronales | 20 |
| Tabla 3 Cuantificación de compuestos individuales y totales en diferentes estadios de brócoli después de la extracción acuosa | 30 |
| Tabla 4 Cuantificación de sulforafano en diferentes estadios de brócoli después de la extracción acuosa | 31 |
| Tabla 5 Dosis letal media de los extractos acuosos de semilla, brotes y vegetal maduro de <i>Brassica oleracea</i> var. <i>italica</i> | 31 |

RESUMEN

Los productos naturales han sido estudiados debido a su potencial uso como analgésicos, ya que producen efectos similares a los tratamientos de la medicina moderna sin que se hayan reportado efectos adversos graves. Entre estos se encuentran los denominados nutraceuticos, los cuales son derivados de alimentos que han demostrado beneficios terapéuticos resultando una opción relevante para el tratamiento de las enfermedades. El género *Brassica* es de interés para la salud y para esta tesis, ya que el consumo de crucíferas se ha asociado con efectos quimiopreventivos y antiinflamatorios, donde metabolitos como el sulforafano se reportan con diversas actividades farmacológicas sobre el sistema nervioso central, entre éstas su potencial analgésico.

En esta investigación se evaluó el efecto antinociceptivo y antiinflamatorio del brócoli en diferentes etapas vegetativas (semilla, brotes y vegetal maduro) y algunos metabolitos activos. Asimismo, la toxicidad aguda o posibles efectos adversos comúnmente observados en analgésicos de la clínica se valoraron con la finalidad de conocer el potencial farmacológico de esta especie para la terapéutica del dolor. Los extractos acuosos de brócoli fueron evaluados en modelos experimentales de dolor de primera elección en el cernimiento de fármacos analgésicos. No se presentaron efectos adversos o tóxicos en ningún estadio. El extracto de brotes resultó ser el más eficaz, seguido de las semillas y el vegetal maduro en un modelo de dolor nociceptivo con formalina. La actividad antinociceptiva se corroboró con la prueba de nocicepción «*plantar test*» y la inflamatoria con la inducción de edema con carragenina, así como con análisis histológico. El sulforafano y el ácido clorogénico fueron metabolitos activos que disminuyeron significativamente la nocicepción e inflamación. En cuanto al posible mecanismo de acción, los resultados indican la participación de receptores a opioides endógenos esencialmente para sulforafano coincidiendo con datos de la literatura.

Este texto incluye generalidades del dolor nociceptivo e inflamatorio, su influencia biológico-social, fármacos utilizados en clínica y sus efectos adversos, así como los productos naturales como alternativa de terapéutica. Donde se dan evidencias farmacológicas de la evaluación del brócoli como potencial nutraceutico en el tratamiento del dolor.

ABSTRACT

Natural products have been studied due to their potential use as analgesics, since they produce effects like modern medicine treatments without having reported serious adverse effects. Among these are the so-called nutraceuticals, which are derived from foods that have shown therapeutic benefits resulting in a relevant option for the treatment of diseases. The genus *Brassica* is of interest for health and for this thesis, since the consumption of cruciferous has been associated with chemopreventive and anti-inflammatory effects, where metabolites such as sulforaphane are reported with various pharmacological activities on the central nervous system, among these its potential analgesic.

In this study, we investigated the antinociceptive and anti-inflammatory effect of broccoli in different vegetative stage (seed, sprouts and mature vegetable) and some active metabolites. Likewise, the acute toxicity or possible adverse effects commonly observed in analgesics of the clinic were evaluated to know the pharmacological potential of this species for pain therapy. The aqueous extracts of broccoli were evaluated in experimental pain models of first choice in the analgesic drugs screening. There were no adverse or toxic effects at any stage. The sprouts extract was found to be the most effective, followed by the seeds and the inflorescence in a model of nociceptive pain using formalin. The antinociceptive activity was corroborated with the plantar test nociception and the inflammatory effect with an induction of carrageenan edema, as well as with histological analysis. Sulforaphane and chlorogenic acid were active metabolites that significantly decreased nociception and inflammation. Regarding the possible mechanism of action, the results indicated participation endogenous opioids receptors essentially for sulforaphane, data agreed to that of literature.

This text includes generalities of nociceptive and inflammatory pain, its biological-social influence, drugs used in the clinic and its adverse effects, as well as natural products as an alternative therapy. Pharmacological evidence of broccoli effect is given to demonstrate its nutraceutical potential in the treatment of pain.

I. MARCO TEÓRICO

1. Dolor

En 1979 la Asociación Internacional para el Estudio del Dolor (IASP, por sus siglas en inglés) definió al dolor como la experiencia sensorial y emocional desagradable asociada a una lesión tisular presente o potencial, o que se describe en términos de dicha lesión (Merskey *et al.*, 1979; Loeser y Treede, 2008). Éste tiene la función de ser protector y adaptativo, ya que advierte al individuo para su escape ante el estímulo inductor del dolor y así proteja el sitio de lesión de tejido (Grace *et al.*, 2014). El dolor no se define exclusivamente como una percepción nociceptiva, ya que además constituye una experiencia subjetiva integrada por un conjunto de pensamientos, sensaciones y conductas (Muriel, 2008).

1.1. Epidemiología

El dolor es característico y necesario para el diagnóstico de muchas enfermedades, puede servir como índice de severidad y actividad de alguna condición patológica y es determinante en el uso de servicios de salud pública (McBeth y Jones, 2007). Por tanto, el dolor representa un problema clínico, social y económico en individuos de todas las edades alrededor del mundo, ya que las condiciones de dolor generan mayor impacto negativo en la calidad de vida en comparación con otros problemas de salud (Henschke *et al.*, 2015).

El dolor es un problema común en la población, se ha reportado que entre el 7 y el 59 % de los adultos padecen dolor (Hasselström *et al.*, 2002). Los estudios epidemiológicos en diferentes países reportan tasas de prevalencia en dolor crónico entre el 12 y el 80 %, con un promedio del 25 % según la IASP (Covarrubias-Gómez *et al.*, 2010; Griego *et al.*, 2016). Cabe destacar que el dolor es la razón principal de acudir a la sala de urgencias en poco más del 50 % de los casos (Cordell *et al.*, 2002) y en el 30 % de visitas a la consulta familiar (Hasselström *et al.*, 2002). En México existen escasos reportes epidemiológicos de dolor, no obstante en uno de ellos se indica que el 96.3 % de los pacientes hospitalizados refiere dolor (Covarrubias-Gómez, 2008).

1.2. Fisiología del dolor

El dolor es un proceso fisiológico esencial de defensa que permite evitar o limitar el daño tisular a un organismo. Dicho proceso se organiza en cinco etapas esenciales denominadas: transducción, conducción, modulación, transmisión y percepción (Fornasari, 2014).

La transducción es la etapa en la que los estímulos mecánicos, térmicos o químicos potencialmente peligrosos se convierten en señales eléctricas que activan un potencial de acción (Pergolizzi *et al.*, 2017). La transducción ocurre en las terminales periféricas de las fibras nociceptivas somáticas y viscerales aferentes que tienen sus cuerpos en los ganglios de la raíz dorsal. Dichas neuronas sensoriales de umbral alto y especializadas para la respuesta de estímulos potencialmente dañinos son conocidas como nociceptores (Fornasari, 2014; Vijayan, 2015). Las terminales periféricas contienen transductores proteicos altamente especializados, la mayoría son canales que abren en respuesta a estímulos que favorecen la permeabilidad de los iones Ca^{2+} y Na^+ , los cuales son responsables de la despolarización terminal (Fornasari, 2014).

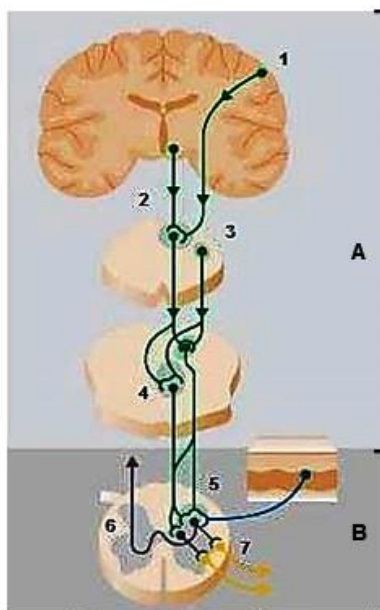
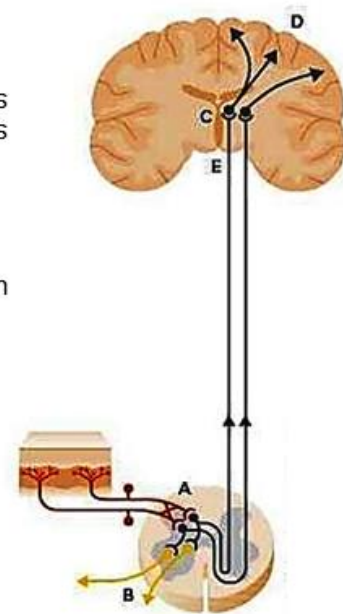
La conducción es la etapa en la que los potenciales de acción viajan a lo largo de los axones para llegar a la médula espinal (los canales de Na^+ convierten el potencial del generador en las terminales periféricas en un potencial de acción). Los axones de los nociceptores pueden ser amielínicos (fibra C) o mielinizados (Fibras A δ) (Winkelstein, 2004). La liberación de neurotransmisores se promueve cuando los potenciales de acción alcanzan las terminales nociceptivas en el asta dorsal de la médula espinal y se abren los canales de voltaje de Ca^{2+} . Cuando los canales de Ca^{2+} son bloqueados, la liberación de neurotransmisores se detiene. La comunicación sináptica entre las neuronas de primer y segundo orden es la etapa de transmisión (Grace *et al.*, 2014). La sinapsis de transmisión entre el nociceptor o la neurona de primer orden y la neurona espinotalámica o de segundo orden es primordialmente glutamatérgica (Fornasari, 2014). En el dolor agudo nociceptivo, el glutamato se une principalmente a los receptores AMPA (ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico o quisqualato), que son canales ionotrópicos de Na^+ que despolarizan a las neuronas de segundo orden y desencadenan el potencial de acción que asciende al tálamo. La

activación de las fibras C da lugar a la liberación de los moduladores neuropeptídicos como la sustancia P o el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (por sus siglas en inglés *calcitonin gene related peptide* CGRP) y una despolarización postsináptica sostenida (Pinho-Ribeiro *et al.*, 2017). Esta despolarización elimina la dependencia del bloqueo de voltaje por Mg^{2+} de los receptores NMDA (N-metil-D-aspartato), otro receptor de glutamato expresado en las neuronas de segundo orden en el asta dorsal causando la afluencia de Ca^{2+} . Cabe mencionar que la activación del receptor NMDA es un paso esencial en la comunicación y ejecución de esta etapa (Fornasari, 2014), donde los principales neurotransmisores inhibidores en el asta dorsal son opioides endógenos, norepinefrina, serotonina, glicina y GABA (Pinho-Ribeiro *et al.*, 2017) (Fig. 1).

Vía ascendente del dolor

Tracto espinotalámico

- A. Transmisión de fibras nerviosas A- δ y C a neuronas de segundo orden en el asta dorsal (fibras aferentes periféricas)
- B. Excitación de neurona motora (refleja)
- C. Relevo talámico
- D. Percepción cortical dolorosa (cognitiva y emocional)
- E. Formación reticular, excitación hipotalámica (reacción motora/endocrina)



Vía descendente del dolor

A. Cerebro

1. Impulsos corticales/subcorticales
2. Impulsos a la materia periacueductual
3. *Locus coeruleus* (sistema inhibitorio noradrenérgico)
4. Núcleo del rafé (sistema inhibitorio serotoninérgico)

B. Medula espinal

5. Sinapsis inhibitoria en el asta dorsal
6. Tracto espinotalámico
7. Neurona motora refleja

Figura 1. Rutas fisiológicas del dolor. Vías ascendente y descendente del dolor. Modificado de CHANGE PAIN®

1.3. Clasificación del dolor

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) el tratamiento farmacológico del dolor puede basarse en las siguientes clasificaciones (Puebla-Díaz, 2005; World Health Organization, 2012):

- Mecanismo fisiopatológico (nociceptivo, inflamatorio, patológico)
- Duración (crónico, agudo, intercurrente)
- Etiología (maligna o no maligna)
- Localización anatómica

La clasificación por mecanismo fisiopatológico es una de las más utilizadas y se divide en (Woolf, 2010):

- Dolor nociceptivo
- Dolor inflamatorio
- Dolor patológico (neuropático o disfuncional).

1.3.1. Dolor nociceptivo

El dolor nociceptivo es aquel que surge del daño real o potencial del tejido no neuronal y se debe a la activación de nociceptores (Le Bars *et al.*, 2001). Los nociceptores son las neuronas sensoriales de alto umbral del sistema nervioso periférico que son capaces de transducir y codificar estímulos nocivos. Entre los estímulos que son codificados pueden ser de tipo térmico, mecánico y químico (Julius y Basbaum, 2001).

El dolor nociceptivo puede clasificarse según la localización de los nociceptores que se activan en (World Health Organization, 2012):

- Dolor somático, que es el causado por la activación de nociceptores presentes en tejidos superficiales o profundos, resultado de la lesión y/o inflamación de un tejido que causa liberación de mediadores.
- Dolor visceral, que es producido por la activación de nociceptores localizados en órganos internos. Estos nociceptores producen sensaciones poco localizadas y difusas que pueden ser referidas a sitios lejanos del lugar de la lesión.

1.3.2. Dolor inflamatorio

El dolor inflamatorio se desarrolla después de la ruptura o la lesión del tejido, ya sea por trauma, calor, infección, toxinas, tumores, entre otros (Costigan y Woolf, 2000). Una vez dañado el tejido, las células infiltradas del sistema inmunológico liberan múltiples mediadores químicos (Chen *et al.*, 2013). Dichos mediadores forman una mezcla conocida como sopa inflamatoria, compuesta de citocinas, quimiocinas, prostaglandinas, bradicininas, purinas, aminos y iones (Murray *et al.*, 2004; Xu y Yaksh, 2011). Las terminales periféricas de los nociceptores expresan receptores para algunos de los mediadores inflamatorios. Dicha expresión de receptores permite el incremento de la sensibilidad de los nociceptores en el tejido inflamado, esto se denomina sensibilización periférica. La sensibilización periférica contribuye a la hipersensibilidad característica del dolor inflamatorio (Hinz y Brune, 2004; Chen *et al.*, 2013).

1.3.2.1. Dolor Inflamatorio/ Edema

La inflamación aguda involucra la sobreproducción de radicales libres, activación de enzimas y liberación de mediadores inflamatorios y proinflamatorios (Mansouri *et al.*, 2015). Los agentes inflamatorios que son liberados y que producen el edema son: el óxido nítrico (ON), prostaglandina 2 (PGE₂), interleucinas (IL-1 β , IL-6) y el factor de necrosis tumoral (TNF- α) (Zhang y An, 2007; Necas y Bartosikova, 2013). En este proceso también intervienen la histamina, la serotonina, la bradicinina y la enzima ciclooxigenasa 2 (COX-2) (Ray *et al.*, 2015). Durante la inflamación se incrementa la permeabilidad vascular que favorece la migración de células hacia el sitio de inflamación, causando edema, eritema y dolor (Ray *et al.*, 2015).

1.3.3. Dolor patológico

El dolor patológico es una situación maladaptativa que resulta de anomalías en el funcionamiento del SNC (Woolf, 2010; Grace *et al.*, 2014). Dicha disfunción puede ser consecuencia de estados de inflamación, diabetes, neuropatía, infecciones virales, quimioterapia, entre otras (Kuner, 2010). El dolor maladaptativo puede clasificarse en neuropático y disfuncional, el primero debido a algún daño o disfunción en el SNC o periférico (Speciali *et al.*, 2016) y

el segundo en condiciones en las que no existe tal daño o inflamación (Kiguchi *et al.*, 2017). El dolor neuropático se caracteriza por los síntomas de hipersensibilidad sensorial definida por dolor, hiperalgesia y alodinia resistentes a los analgésicos tradicionales (Woolf, 2010; Kiguchi *et al.*, 2017). El mecanismo que desencadena el dolor disfuncional no es claro aunque incluye trastornos conocidos como fibromialgia, síndrome de intestino irritable y cistitis intersticial (Nagakura, 2015).

1.4. Terapéutica del dolor

En 1986 la OMS propuso un protocolo para el tratamiento del dolor en pacientes con cáncer conocido como «Escalera Analgésica». Dicho protocolo incluye métodos psicológicos, modificación de procesos patológicos, fármacos, bloqueo de transmisión del dolor, modificación de la rutina e inmovilización (OMS, 1996).

El manejo del dolor es comúnmente asociado a fármacos conocidos por mucho tiempo por sus propiedades analgésicas. Dichos fármacos pueden clasificarse en dos grandes grupos: antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) y analgésicos opioides (Melnikova, 2010). En la escalera analgésica de la OMS se describe el uso de fármacos de tipo no opioide (AINEs) para el alivio del dolor leve. Cuando el dolor no es aliviado se recomienda añadir el uso de opioides débiles, que son útiles para el dolor moderado. Si dicha combinación no surte efecto se debe suspender el uso de opioides débiles y utilizar opioides fuertes, considerados para el alivio del dolor severo y continuar con la administración de AINEs. En cualquiera de los tres casos no se debe utilizar más de un fármaco de cada tipo. Además, fármacos adyuvantes pueden utilizarse en casos específicos (OMS, 1996).

El objetivo de los fármacos adyuvantes es contrarrestar los efectos adversos de los analgésicos, conseguir mayor alivio del dolor y/o tratar trastornos psicológicos concomitantes como el insomnio, la ansiedad y la depresión. Entre los fármacos adyuvantes utilizados están los antieméticos, laxantes, corticoesteroides y psicotrópicos. Cabe destacar que para el alivio del dolor patológico puede ser útil el uso de antidepresivos tricíclicos, anticonvulsivos y/o anestésicos locales (OMS, 1996) (Fig. 2).

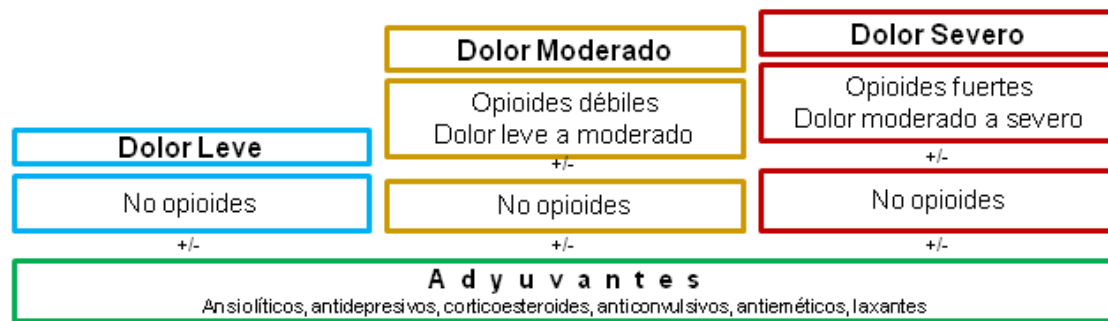


Figura 2. Escalera analgésica de la OMS

1.4.1. Antiinflamatorios no esteroideos

Los AINEs son los fármacos más utilizados en el tratamiento del dolor asociado a inflamación, lo cual se debe a su mecanismo de acción por la inhibición de la enzima ciclooxigenasa (COX) isoenzimas de tipo 1 y 2. Las COX 1 y 2 catalizan la conversión del ácido araquidónico en peroxidases de prostaglandinas (PGs) (Bertolacci *et al.*, 2013; Rius y Clària, 2016). Las PGs son liberadas ante cualquier estímulo químico o mecánico (Botting, 2006) y se forman a partir del ácido araquidónico liberado de la membrana fosfolipídica en presencia de la enzima fosfolipasa A₂. El ácido araquidónico es transformado mediante la enzima microsomal COX para generar los endoperóxidos cíclicos PGG₂ y PGH₂, los cuales son inestables y pueden ser isomerizados de forma enzimática y no enzimática en prostanoides como tromboxano A₂ (TXA₂), prostaciclina (PGI₂) y las PGs de tipo PGD₂, PGE₂ y PGF_{2α} (Botting y Botting, 2011). Las PGs son conocidas por su acción pirogénica, así mismo la PGE₂ y PGI₂ poseen propiedad vasodilatadora, por lo que son consideradas como los principales mediadores inflamatorios (Botting y Botting, 2011; Calatayud y Esplugues, 2016).

La enzima COX-1 es constitutiva en la mayoría de las células y está involucrada en procesos fisiológicos normales. Entre los procesos que involucra están la síntesis de TXA₂, implicado en la agregación plaquetaria; la producción de PGE₂ y PGI₂ que median la protección gástrica y la formación de PGI₂ del endotelio vascular que mantiene la dilatación de vasos sanguíneos e inhibe la formación de trombos plaquetarios. La COX-2 es conocida como inducible, ya que es expresada por las células involucradas en la inflamación, como los macrófagos y monocitos. Ésta se encarga de la producción de PGs en procesos patológicos, como se observa en el edema e hiperalgesia

asociadas a enfermedades inflamatorias (Botting y Botting, 2011; Calatayud y Esplugues, 2016).

Los AINEs al inhibir indistintamente a la isoenzimas COX-1 y COX-2 ejercen actividad analgésica y antiinflamatoria, pero también producen los efectos adversos como sangrado y ulceración estomacal, disfunciones plaquetarias y renales (Hinz y Brune, 2004; Wong y Chan, 2016) (Fig. 3).

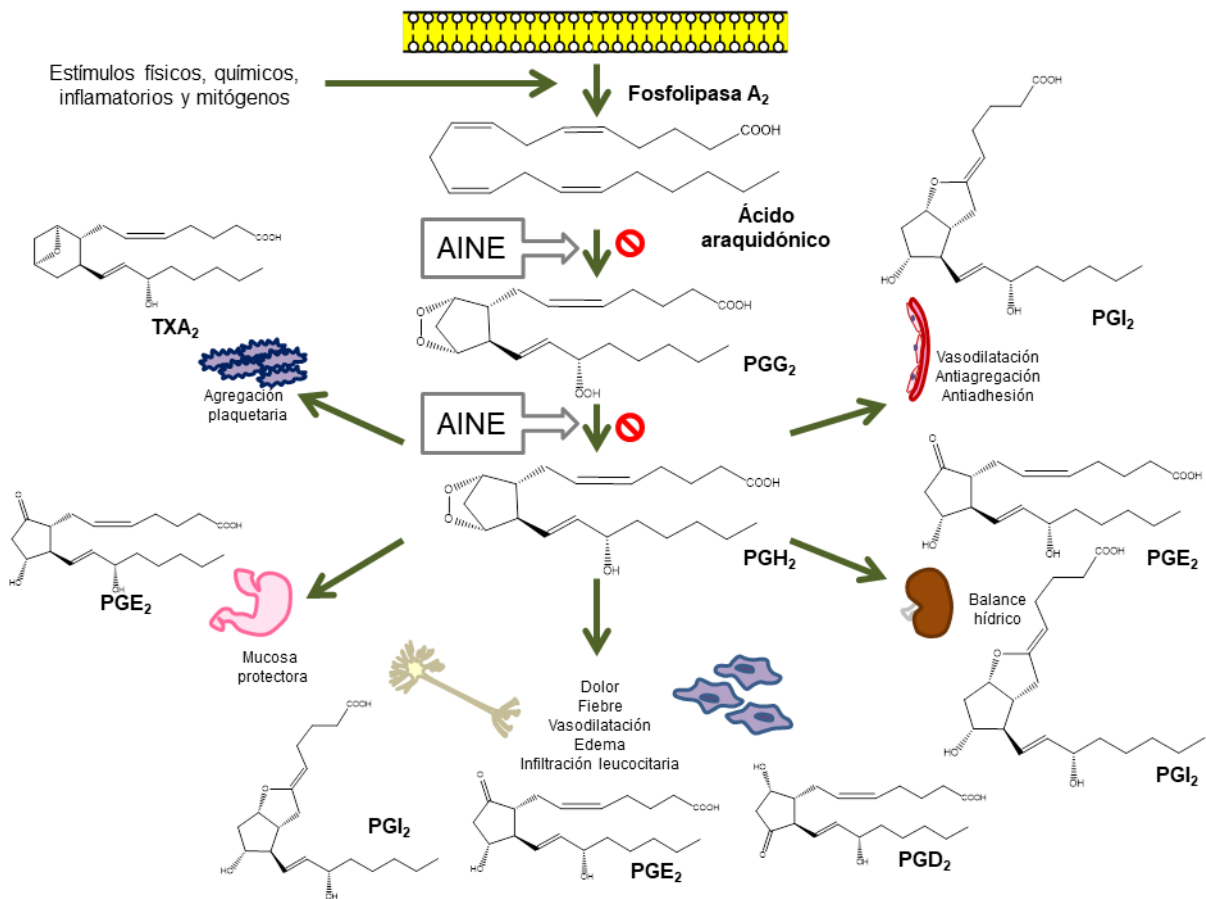


Figura 3. Mecanismo de acción de los AINEs.

1.4.2. Opioides

Los fármacos opioides son analgésicos utilizados en la práctica clínica para el tratamiento del dolor de moderado a severo (Sánchez-Fernández *et al.*, 2013). Los opioides producen analgesia por su unión en los receptores opioides (μ , κ y δ) que se encuentran en el cerebro, tallo cerebral, médula espinal y en algunas terminales periféricas de aferentes primarios. Cabe destacar que en la espina dorsal se encuentran en las regiones presináptica y postsináptica del asta dorsal de las neuronas (Fornasari, 2014; Vijayan, 2015). Los opioides son agonistas de receptores opioides acoplados a proteínas G inhibitorias, éstos modulan y reducen las señales ascendentes del dolor que llegan al cerebro y

activan las vías descendentes inhibitorias que viajan del cerebro medio hacia la médula espinal (Vijayan, 2015) (Fig. 4).

Entre los efectos adversos del tratamiento con opioides se encuentra la tolerancia, que es la reducción del efecto analgésico del fármaco. Dicha complicación limita el uso de este grupo de fármacos. (Benyamin *et al.*, 2008).

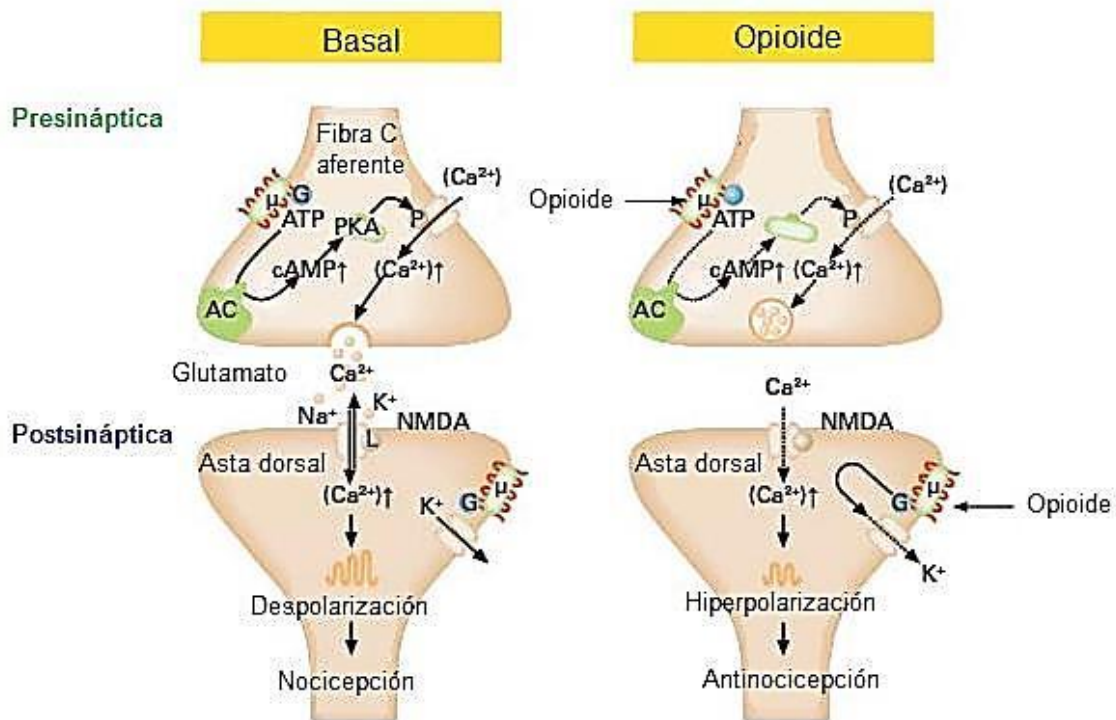


Figura 4. Mecanismo de acción de los opioides. AC: adenil ciclasa; cAMP: ácido monofosfórico cíclico; ATP adenosin trifosfato; G proteína G; PKA proteína cinasa; NMDA N-metil-D-aspartato. Modificado de CHANGEPAIN® y Hetcher 2011.

1.4.3. Terapias alternativas para el tratamiento de dolor

Debido a los efectos adversos, principalmente de los AINEs, es que se buscan alternativas analgésicas en la medicina tradicional y los productos naturales. Entre las alternativas se requiere que produzcan actividad analgésica con la menor ocasión de efectos adversos y/o tóxicos posibles (Ambriz-Pérez *et al.*, 2016). Los pacientes recurren a distintas alternativas para el alivio del dolor, con el fin de reducir los efectos adversos de los tratamientos farmacológicos que impiden la continuidad de las actividades cotidianas. Algunas de las alternativas son la herbolaria y los productos naturales. Tan sólo en México, se estima que entre el 80 y 90 % de la población recurre a la herbolaria para el tratamiento de algunas enfermedades, cifra similar a la población mundial que recurre a la misma (Carrillo-Esper *et al.*, 2010). Lo anterior ha llevado al

aumento en la producción de remedios herbolarios (Verma y Singh, 2008). En el caso de México, la consultora KMPG reportó en 2017 que el 90 % de los productos milagro decomisados son de tipo suplemento alimenticio y el resto pertenecen a la categoría de remedios y medicamentos herbolarios. Asimismo reportó que entre los años 2014 y 2017 la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios otorgó 10 registros al año a medicamentos herbolarios (Rodríguez, 2017). Además, entre los productos naturales se encuentran los nutraceuticos, que son derivados de alimentos que han demostrado beneficios fisiológicos y reducción de enfermedades crónicas (Cencic y Chingwaru, 2010; Shahidi, 2012).

2. Nutraceuticos

Los compuestos derivados de frutas y vegetales a menudo poseen actividades antioxidantes y/o antiinflamatorias, dichas propiedades se sugieren como potenciales protectores contra enfermedades crónicas (Ronis *et al.*, 2018). Dichos vegetales son una fuente importante de metabolitos secundarios o especializados, motivo por el cual algunos son conocidos como alimentos promotores de la salud (Fowke *et al.*, 2003). Aunque no está definido por algunas legislaciones, el nutraceutico es un producto purificado derivado de una fuente de alimento que proporciona beneficios a la salud más allá del valor nutricional básico de los alimentos (Ronis *et al.*, 2018). Además, el nutraceutico está compuesto por metabolitos o micronutrientes en cantidades específicas y en forma farmacéutica (Shahidi, 2012; Santini *et al.*, 2017).

2.1. Clasificación de nutraceuticos

Existen dos tipos de clasificación para los nutraceuticos, ya sea en función de sus fuentes naturales, usos medicinales y la constitución química de los productos, o bien, de la presentación del nutraceutico (Chauhan *et al.*, 2013):

- Sustancias con funciones nutricionales establecidas como vitaminas, minerales, aminoácidos y ácidos grasos;
- Productos herbolarios o botánicos como extractos;
- Reactivos derivados de otras fuentes (piruvato, condroitina, precursores de hormonas esteroideas) que cumplen funciones específicas, tales

como nutrición deportiva, pérdida de peso y reemplazo de alimentos o suplementos dietéticos.

2.2. Legislación de los nutraceuticos

El término nutraceutico ha tomado importancia en las últimas dos décadas, ya que países desarrollados como Canadá los han legislado para su producción y venta como productos funcionales de uso preventivo o correctivo en las enfermedades (Health Canada, 1998). Países en vías de desarrollo como la India, recientemente integraron y modernizaron numerosas regulaciones en relación con los alimentos, suplementos alimenticios y nutraceuticos para robustecer las normas de seguridad alimentaria (Chauhan *et al.*, 2013). Brasil es el único país de América Latina que tiene una legislación definida para declaraciones funcionales y de salud que utilizan componentes de nutrientes o no nutrientes y también para la demostración de seguridad y eficacia de éstos (De Figueiredo y Lajolo, 2008). En la legislación alimentaria de México (Ley General de Salud, 2009), Estados Unidos de América (Federal Food, Drug, and Cosmetic Act, 2017) y la Unión Europea (Reglamento UE 2015/2283) no se encuentra estipulado el término nutraceutico, ya que todavía está considerado en el apartado de suplementos alimenticios (Santini *et al.*, 2017).

3. Brasicáceas

Las especies de la familia Brassicaceae son vegetales conocidos como brasicáceas, crucíferas o de la «familia de la mostaza». Esta familia de angiospermas está compuesta por 338 géneros y alrededor de 3700 especies (Li y Olsen, 2016) de las cuales varias son de importancia económica, alimentaria, ornamental y biotecnológica (Couvreur *et al.*, 2010; Warwick, 2011; Ishida *et al.*, 2014).

El género *Brassica* es uno de los 51 géneros en la tribu Brassicaceae, pertenecientes a la familia de las crucíferas y es el de mayor importancia económica, puesto que incluye a 37 especies cultivares que proporcionan raíces, hojas, tallos, yemas, flores y semillas comestibles, entre ellas destacan el brócoli, coliflor, col de Bruselas, col, mostaza, entre otras (Rakow, 2004; Zhou *et al.*, 2015). Dichas especies están distribuidas en la región del

Mediterráneo, en el suroeste de Europa y el noroeste de África (Buck, 1956; Gray, 1982).

3.1. Brócoli

Brassica oleracea L. var. *italica* Plenck, es conocido comúnmente como brécol o brócoli. Es una planta anual, de crecimiento erecto, con una altura entre 60 a 90 cm y termina en una masa de yemas funcionales. La parte comestible es una masa densa de yemas florales de color verde grisáceo o morado, que puede alcanzar un diámetro de 20 a 35 cm. Los tallos principales rematan en una masa globulosa de yemas hipertrofiadas. Lateralmente en las axilas de las hojas se pueden desarrollar brotes hipertrofiados de yemas florales, de tamaño menor que el de la cabeza principal. Los brotes aparecen de forma paulatina y escalonada, generalmente tras el corte del cogollo principal que pueden ser comercializados haciendo manojos. La planta de brócoli posee tallos cilíndricos y el tallo principal es relativamente grueso (3 a 6 cm diámetro), de 20 a 50 cm de alto, sobre el cual se disponen las hojas en forma helicoidal, con entrenudos cortos. Puede persistir durante 5 a 8 años cuando es establecida, cabe destacar que al madurar las inflorescencias verdes producen flores amarillas (Taiyan *et al.*, 2001; Jaramillo y Díaz, 2006). (Fig. 5).



Figura 5. *Brassica oleracea* L. var. *italica* Plenck (a) Semillas (b) Brotes (c) Vegetal maduro (d) Vegetal maduro con flores.

3.2. Composición química

Los estudios de composición química del brócoli han reportado constituyentes químicos entre los que destacan vitaminas (Moreno *et al.*, 2006), minerales (Koh *et al.*, 2009), compuestos de tipo flavonoide (Ares *et al.*, 2013) y glucosinolato (Bhandari y Kwak, 2015), así como sus correspondientes derivados de hidrólisis (Björkman *et al.*, 2011), por ejemplo:

Minerales esenciales: calcio (Ca^{2+}), magnesio (Mg^{2+}), sodio (Na^+), potasio (K^+), hierro (Fe^{2+}), zinc (Zn^{2+}), fósforo (PO_4^{3-}) y azufre (SO_4^{2-}).

Vitaminas: tiamina (B1), riboflavina (B2), ácido ascórbico (C), fitomenadiona (K)

Flavonoides: canferol, quercetina, isorramnetina

Glucosinolatos: son el principal grupo de compuestos contenidos en plantas de la familia Brassicaceae, los cuales son en gran parte responsables de los sabores amargos y picantes de las crucíferas (Fahey *et al.*, 2001; Halkier y Gershenzon, 2006). Estas moléculas se encuentran en vacuolas de la célula vegetal (Guaâdaoui, 2018) y se caracterizan por una estructura básica similar que contiene un grupo oxima-sulfonado unido mediante un enlace sulfuro a una β -D-glucopiranososa, y una cadena lateral derivada de diferentes aminoácidos (Bones y Rossiter, 2006; Moreno *et al.*, 2006) (Fig. 6).

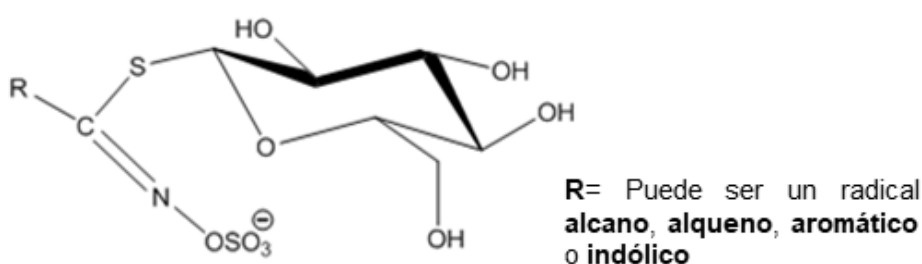
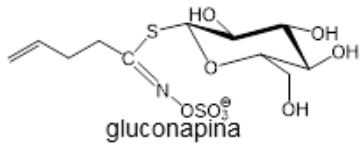
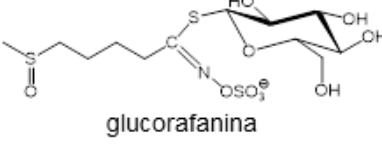
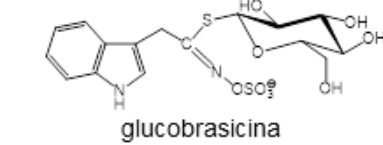
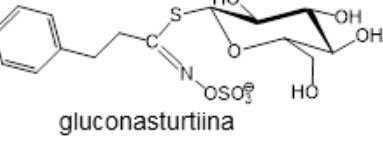
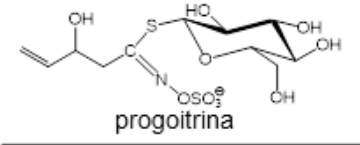
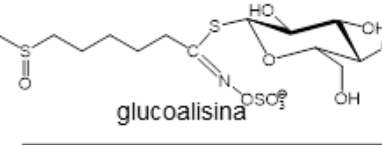
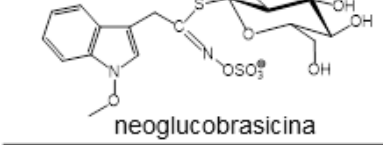
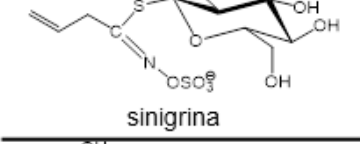
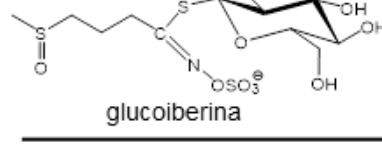
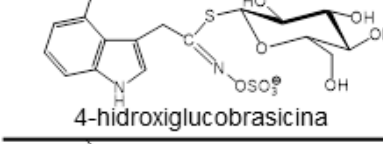
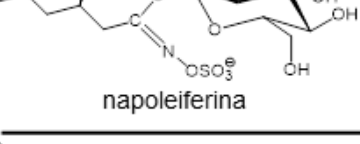
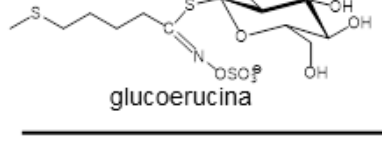
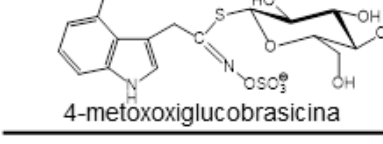
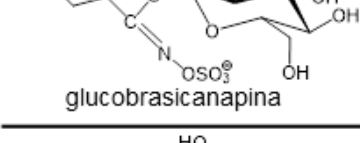
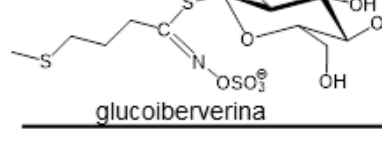
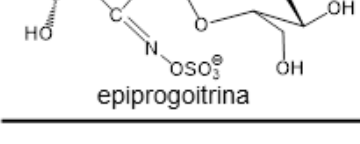


Figura 6. Estructura general de los glucosinolatos

Los glucosinolatos pueden estar sustituidos por radicales alifáticos, alquenos, aromáticos e indólicos (Dinkova-Costova y Kostov, 2012; Rybarczyk-Plonska *et al.*, 2016). De lo anterior se les clasifica de acuerdo a su naturaleza química en alifáticos, indólicos y aromáticos (Zukalová y Vašák, 2002). Los glucosinolatos reportados en *Brassica oleracea* var. *italica* se muestran en la Tabla 1 (Bellostas *et al.* 2007; Latté *et al.*, 2011).

Tabla 1. Glucosinolatos presentes en *Brassica oleracea* var. *italica*

| Glucosinolatos | | | |
|---|---|--|---|
| Alifáticos | | Aromáticos | |
| Alquenos | Azufre | Indólicos | Bencílico |
|  gluconapina |  glucoorafanina |  glucobrasicina |  gluconasturtiina |
|  progoitrina |  glucoalisina |  neoglucobrasicina | |
|  sinigrina |  glucoiberina |  4-hidroxiglucobrasicina | |
|  napoleiferina |  glucoerucina |  4-metoxoxiglucobrasicina | |
|  glucobrasicanapina |  glucoiberverina | | |
|  epiprogoitrina | | | |

Derivados de la hidrólisis de glucosinolatos: en las plantas que producen glucosinolatos existe una proteína denominada mirosinasa, que es una enzima β -tioglucosidasa. La enzima mirosinasa está contenida en los gránulos de la membrana celular (Guaâdaoui, 2018), que se libera cuando hay una ruptura celular en el vegetal. La enzima cataliza la hidrólisis de los glucosinolatos en varios productos, como: isotiocianatos, nitrilos, tiocianatos, epitionitrilos y oxazolidinas. La naturaleza de los compuestos producidos dependerá del pH del medio, sustrato, nivel de actividad de la mirosinasa, etc. (Bones y Rossiter, 2006; Halkier y Gershenzon, 2006) (Fig. 7). Algunos de estos productos producen beneficios a la salud pero otros podrían ser perjudiciales (Cartea *et al.*, 2008)

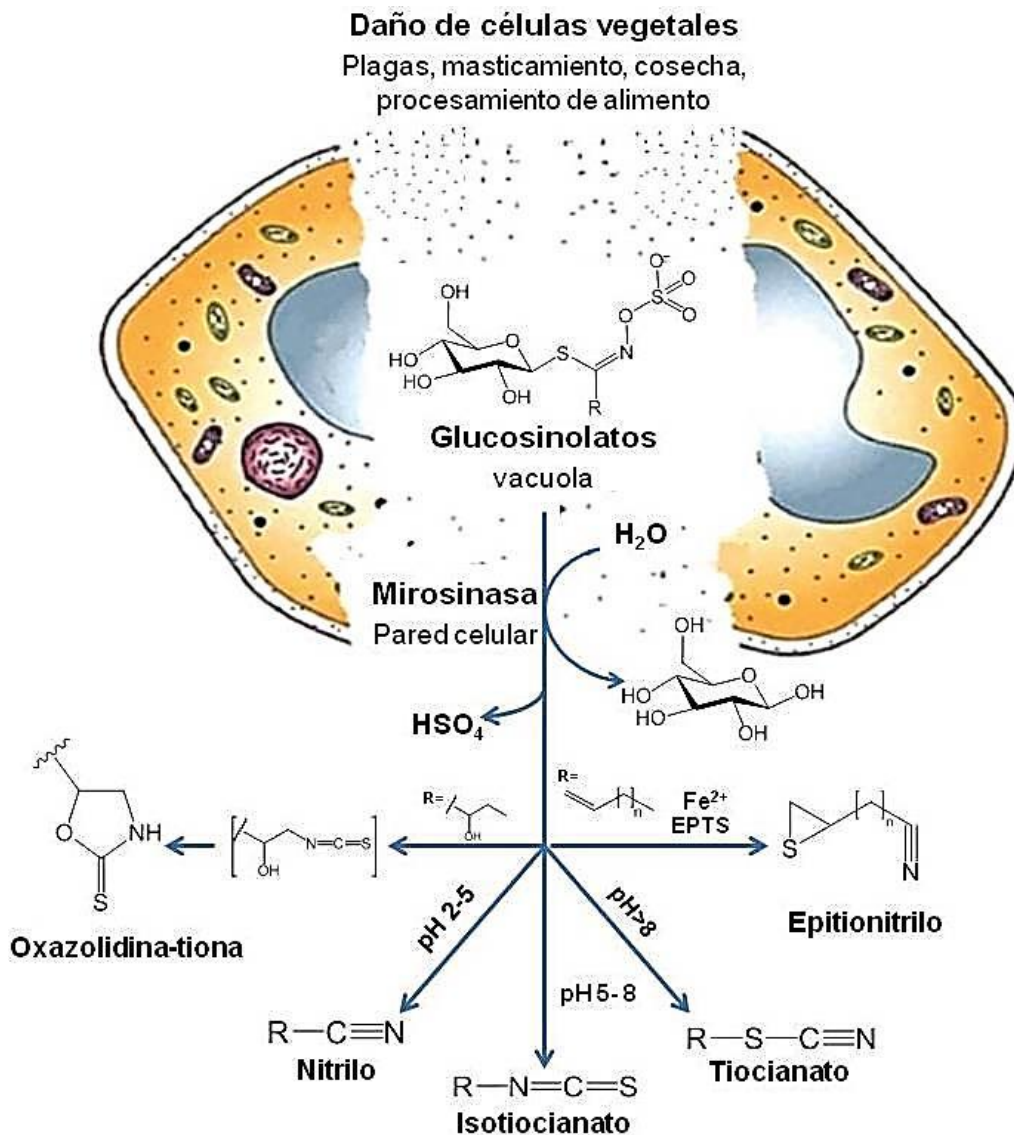


Figura 7. Reacciones de hidrólisis de glucosinolatos. Modificado de Guaâdaoui, 2018.

3.3. La investigación farmacológica de especies del género *Brassica*

El cultivo de especies del género *Brassica* ha sido de interés en las últimas dos décadas por sus beneficios a la salud humana (Björkman *et al.*, 2011; Manchali *et al.*, 2012). Entre los beneficios se ha asociado el consumo de crucíferas con un menor riesgo de infarto de miocardio (Cornelis *et al.*, 2007). Además, los efectos promotores de la salud obtenidos de una dieta rica en vegetales del género *Brassica* reportan que son un punto de partida prometedor para el desarrollo de alimentos funcionales quimiopreventivos y antiinflamatorios (Wagner *et al.*, 2013).

En modelos preclínicos se ha demostrado la eficacia analgésica de extractos metanólicos *B. juncea* (mostaza castaña) (Rahmatullah *et al.*, 2010), *B. rapa* var. *chinensis* (Bok choy) (Rahman *et al.*, 2015), *B. oleracea* var. *gongylodes* (colirrábano) (Jakaria *et al.*, 2015), *B. oleracea* var. *capitata* (Pinky *et al.*, 2015) y *B. oleracea* var. *italica* (brócoli) (Hasan *et al.*, 2015). También se han reportado como compuestos promotores de la salud a las vitaminas y minerales (Moreno *et al.*, 2006), compuestos fenólicos (Hämäläinen *et al.*, 2007) y últimamente a los glucosinolatos (Lippman *et al.*, 2014) e isotiocianatos presentes en el brócoli (Fuentes *et al.*, 2015).

Cabe mencionar que el brócoli es la principal fuente natural del isotiocianato sulforafano, cuyo precursor es la glucorafanina que constituye del 50 al 83 % de los glucosinolatos totales presentes en este vegetal (Borowski *et al.*, 2008; Van Eylen *et al.*, 2009).

3.4. Sulforafano

Recientemente se han reportado estudios clínicos del sulforafano que describen sus efectos benéficos en trastornos neurológicos complejos como el autismo (Singh *et al.*, 2014) y en los niveles séricos de antígeno prostático en hombres prostatectomizados (Cipolla *et al.*, 2015). Mientras que en pruebas preclínicas, se ha descrito que el sulforafano produce actividades farmacológicas sobre el SNC. Dichas actividades son de tipo ansiolítico y antidepresivo (Wu *et al.*, 2016), como antinociceptivo y antiinflamatorio en dolor neuropático (Wang y Wang, 2017). Reportes de actividad antiinflamatoria y antioxidante *in vivo* e *in vitro* del sulforafano involucran la inducción del factor nuclear eritroide 2 relacionado al factor 2 (Nrf2), así como la disminución de la

actividad del factor nuclear kappa B (NF- κ B). Ambos factores se relacionan con el control de enfermedades inflamatorias (Folkard *et al.*, 2015; Redondo *et al.*, 2017), donde además se implica la disminución de las citocinas IL-1 β , TNF- α e inhibición de las enzimas inflamatorias iNOs y COX-2 (Ma *et al.*, 2015).

4. Modelos experimentales en la investigación biomédica

Es bien sabido que el uso de animales en la investigación biomédica ha permitido descubrir maneras de comprender y tratar algunas enfermedades y por lo tanto prolongar la vida humana. Los resultados de las investigaciones con modelos animales proporcionan información relevante a corto plazo debido a que sus ciclos vitales son más cortos.

El estudio experimental de dolor en humanos es complicado, puesto que conlleva condiciones morales y éticas. Los modelos preclínicos *in vivo* son importantes porque el dolor y sus mecanismos subyacentes son procesos emergentes de un SNC y éstos no pueden simularse completamente en células o sistemas de tejidos aislados (Rose y Woodbury, 2008).

Para el estudio del dolor existen diversos modelos que permiten explorar sus mecanismos y mediadores involucrados. Para ello es necesario abordar el desarrollo de estrategias farmacológicas a modelar, las más utilizadas son en roedores (ratas y ratones), a menos que se especifique lo contrario. Es importante resaltar que las medidas de comportamiento de respuesta se describen también en algunos casos sólo para especies específicas (Rose y Woodbury, 2008).

Las respuestas que se miden en modelos de dolor están basadas en la suposición de que la conducta inducida en los animales es comparable a alguna de las observadas en las patologías del ser humano. Además, éstas cuentan con tres criterios de validez: la de apariencia, de constructo y predictibilidad. La validez aparente se refiere a que las respuestas y síntomas observados en el modelo animal deben ser similares a los observados en los pacientes. La validez de constructo es la razón subyacente o causa que produce la patología, es decir que algunos marcadores del padecimiento o motivos orgánicos que lo producen deben estar presentes en el modelo y en la enfermedad. Finalmente, la validez de predictibilidad se da cuando el tratamiento farmacológico utilizado en la terapéutica produce efectos

comparables en la conducta analizada en el modelo animal (McKinney y Bunney, 1969; Ohl, 2005).

Entre los modelos de dolor nociceptivo de primera elección se encuentran los que incluyen estímulos mecánicos, térmicos y químicos (Tabla 2).

Tabla 2. Paradigmas comunes de pruebas de nocicepción, conductas observadas y sustratos neuronales. Tomado de Rose y Woodbury, 2008.

| Tipo de estímulo | Paradigmas utilizados | Comportamientos cuantificables | Sustratos mínimos centrales |
|-------------------------|--|--|--|
| Mecánico | Aparato de Hargreaves (filamentos de Von Frey) | Latencia de retiro | Segmental (espinal) |
| Térmico | Inmersión de la cola (caliente/frío), suspensión de la cola, plato caliente, plato frío), Aparato de Hargreaves (calor radiante) | Latencia de retiro, saltos, lamidas, protegidas | Segmental y suprasegmental (tronco cerebral) |
| Químico | Formalina, ácido, capsaicina, taxol | Lamidas, mordidas, protegidas, sacudidas, cambios de postura, vocalizaciones | Segmental y suprasegmental |

En cuanto a los modelos de dolor inflamatorio existen los que producen daño tisular, enfermedades autoinmunes o los que liberan mediadores inflamatorios por exposición a agentes irritantes. La inducción de edema con carragenina o zymosan es uno de los más utilizados en el cernimiento y búsqueda de analgésicos, en éste se daña el tejido circundante al área de aplicación. El adyuvante completo de Freund o el colágeno se caracterizan por la activación del sistema inmunológico y producción de daños articulares. Y en el caso de la formalina se produce respuesta asociada a una activación central y en una segunda fase al daño causado por la irritación y mediadores producidos por la inflamación (Hogan, 2002).

II. JUSTIFICACIÓN

El dolor es una afección frecuente en las personas que hacen uso de los servicios de salud. Los fármacos utilizados en la terapéutica para su manejo son eficaces, pero aun así presentan riesgos al producir efectos adversos.

Debido a los efectos adversos de estos fármacos es que se requieren nuevas alternativas eficaces y seguras para el tratamiento del dolor, por lo que la medicina tradicional en relación al uso de plantas medicinales y los productos naturales para el tratamiento de los diversos padecimientos se sigue considerando de relevancia. Lo anterior requiere además de las evidencias científicas que validen esta opción de terapéutica.

De lo anterior, *Brassica oleracea* var. *italica* es un candidato de interés que evaluar, tanto química como farmacológicamente, por su potencial utilidad en tratamiento de las enfermedades o sus síntomas, como es el caso del dolor. Para ello resultan elementales los modelos experimentales que permitirán validar su potencial actividad biológica, identificar los metabolitos responsables y los posibles mecanismos de acción. Cabe mencionar que los modelos utilizados en esta tesis son para determinar su eficacia analgésica tanto en la nocicepción como en la inflamación.

III. HIPÓTESIS

Si el brócoli contiene metabolitos bioactivos con potencial analgésico y antiinflamatorio que varían con la etapa vegetativa, entonces éstos producirán una respuesta antinociceptiva y antiinflamatoria diferencial en los modelos experimentales en roedores mediada por receptores a opioides.

IV. OBJETIVOS

1. Objetivo general

Evaluar el efecto antinociceptivo y/o antiinflamatorio de *Brassica oleracea* var. *italica* y metabolitos activos en modelos experimentales en roedores.

2. Objetivos específicos

Establecer la toxicidad aguda mediante el cálculo de la dosis letal media (DL₅₀) de extractos acuosos de semillas, brotes y vegetal maduro de *Brassica oleracea*

Determinar el efecto antinociceptivo y/o antiinflamatorio de extractos acuosos de semillas, brotes y vegetal maduro de brócoli y compararlos con el efecto de un fármaco de referencia en la prueba de «*writhing*» en ratones y formalina en ratas.

Determinar el efecto antinociceptivo y/o antiinflamatorio del extracto acuoso de brócoli con mayor eficacia en las pruebas de nocicepción anteriores, empleando las pruebas de «*plantar test*» e inflamación en el edema inducido con carragenina, respectivamente.

Evaluar posibles efectos adversos como sedación (nivel central) y daño gástrico (nivel periférico) del extracto de brócoli con mayor eficacia antinociceptiva y/o antiinflamatoria y además de su metabolito activo.

Evaluar el posible mecanismo de acción responsable del efecto antinociceptivo y/o antiinflamatorio de brócoli y al menos de un metabolito activo.

V. METODOLOGÍA

1. Animales

Ratas macho de la cepa Wistar (200 a 250 g de peso corporal) se utilizaron en los experimentos de nocicepción inducida con formalina, en el «*plantar test*» y en la prueba de edema inducido con carragenina, así como para la evaluación de daño gástrico y análisis histológico. Así mismo, ratones macho de la cepa Swiss Webster Taconic (20-25 g de peso corporal) se utilizaron en la prueba de «*writhing*». Los animales fueron mantenidos a temperatura controlada de 22 °C ± 2 °C con ciclos luz/oscuridad de 12 horas y libre acceso al alimento y al agua. El protocolo experimental siguió las recomendaciones de la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999), del Comité de Investigación y Ética de la IASP, de los Lineamientos y Estándares Éticos para la Investigación del Dolor Experimental en Animales (Zimmermann, 1983) y del Comité de Bioética del Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente (NC12.3280.0).

2. Material vegetal

2.1. Extractos acuosos de brócoli

Los extractos acuosos de semillas (EAS), brotes (EAB) y vegetal maduro (EAV) fueron obtenidos y estandarizados en el Laboratorio de Fitoquímica del CEBAS-CSIC, Murcia, España conforme al método que se describe en el Anexo A.

3. Fármacos y reactivos

Indometacina (Sigma-Aldrich), cloruro de sodio (Reactivos Meyer), formaldehído 37 %, ácido acético (JT Baker), tramadol, ketorolaco (Sigma-Aldrich), carragenina λ (Sigma-Aldrich), paraformaldehído (ICN Biomedicals Inc), sulforafano (Cayman-Chemical), naltrexona (Sigma-Aldrich), ácido clorogénico (Sigma-Aldrich), tween 80 (Sigma-Aldrich), reactivos de tinción tricrómica de Masson (Hycel), sacarosa (Sigma-Aldrich), fosfato de sodio dibásico (JT Baker), fosfato de sodio monobásico (JT Baker), hidróxido de sodio (Sigma-Aldrich), Tissue Tek[®] (Sakura).

4. Evaluación farmacológica

El diseño experimental del proyecto se dividió en dos etapas: evaluación general y evaluación específica. En la primera etapa se probaron los extractos de brócoli en los estadios de semillas, brotes y vegetal maduro para obtener la dosis letal media (DL₅₀), también definir el extracto con mayor actividad antinociceptiva y/o antiinflamatoria de los tres estadios de madurez y las dosis a evaluar en la ventana de actividad biológica antinociceptiva. La actividad antinociceptiva se evaluó en la prueba de dolor abdominal «*writhing*» en ratones y la de formalina en ratas.

En la segunda etapa se determinó la actividad antinociceptiva y/o antiinflamatoria del extracto más activo, con las pruebas de *plantar test* y edema inducido con carragenina en ratas. En ambas etapas los roedores fueron manipulados al menos un día antes de realizar las evaluaciones. Los animales se dividieron en grupos de 6 individuos al azar y sin remplazo. Las evaluaciones de nocicepción y posibles efectos adversos se realizaron 30 min después de la administración de los tratamientos (vehículo, extractos y fármacos de referencia).

4.1. Primera etapa de la evaluación farmacológica

4.1.1. Prueba de toxicidad aguda

La dosis letal 50 (DL₅₀) se determinó por vía intraperitoneal (i.p.) e intragástrica (p.o.) en ratas hembra empleando el método de Lorke (1983) modificado acorde con las pautas del protocolo «*OECD Guideline for testing of chemicals*» No. 423 (2001), el cual indica que la dosis máxima permitida a probar es de 2000 mg/kg. La DL₅₀ se calculó con la media geométrica de la dosis máxima con la cual todos los sujetos experimentales mueren y la dosis máxima con la que todos sobreviven. Después de la administración, los animales fueron monitoreados durante 14 días y se registró su peso. En el último día los animales se sacrificaron y se inspeccionaron macroscópicamente comparados contra el grupo control.

4.1.2. Nocicepción visceral inducida con ácido acético al 1 %

En un grupo de ratones, después de la administración del vehículo o de los tratamientos, se dejaron transcurrir 30 min y los ratones recibieron ácido

acético al 1 % (10 mL/kg, vía i.p.) para inducir la nocicepción. La latencia al primer estiramiento y el número de estiramientos abdominales inducidos por el ácido acético se registraron durante 30 min en intervalos de 5 min (Collier *et al.*, 1968). La antinocicepción visceral se obtuvo mediante el área bajo la curva (ABC) de estiramientos durante la prueba de *writhing*. El porcentaje de antinocicepción se obtuvo mediante la fórmula:

$$\% \text{ Antinocicepción} = 100 - \left(\frac{\text{ABC}_{0-30 \text{ min}} \text{ Tratamiento} \times 100}{\text{ABC}_{0-30 \text{ min}} \text{ Control}} \right)$$

4.1.3. Nocicepción inducida con formalina al 1 %

Para esta prueba se utilizaron ratas, en cada grupo de animales se administraron los tratamientos e inmediatamente después se colocaron durante 30 min en forma individual dentro de un cilindro de acrílico (21 cm diámetro y 30 cm de altura). Dicho cilindro está rodeado con espejos para facilitar la visión de la conducta desde todos los ángulos del evaluador. Trascurrido el tiempo, los animales fueron administrados vía subcutánea en la superficie plantar de la extremidad posterior derecha con 50 µL de formalina al 1 %. La conducta nociceptiva se cuantificó como el número de sacudidas y el tiempo invertido en lamer la pata inyectada mediante la observación de dos fases: la neurogénica (actividad central) de 0–5 min y la inflamatoria (actividad central-periférica) de 20–25 min. La disminución significativa de cualquiera de las conductas se interpretó como efecto antinociceptivo (Dubuisson y Dennis, 1977; Tjølsen *et al.*, 1992).

4.1.3.1. Daño gástrico

Terminada la prueba de la formalina, los animales fueron sacrificados dentro de una cámara de CO₂. Los estómagos se disecaron y llenaron con 10 mL de formaldehído al 10 % para la identificación de un posible daño gástrico. Pasados 10 min, los estómagos fueron abiertos por la curvatura mayor y se enjuagaron con agua destilada para eliminar su contenido y proceder a su escaneo para la posterior observación y medición de las posibles lesiones gástricas (Robert, 1979; Tanaka *et al.*, 1997; Cristians *et al.*, 2013).

4.2. Segunda etapa de la evaluación farmacológica

Para determinar la actividad antinociceptiva a nivel central, grupos independientes de ratas se evaluaron en el estímulo térmico en el «*plantar test*»; mientras que, para evaluar la actividad antiinflamatoria se utilizó la prueba de edema inducido con carragenina λ . Los animales que recibieron el extracto que produjo mayor actividad antinociceptiva también se evaluaron en las pruebas de campo abierto y cilindro de exploración para valorar la actividad ambulatoria y detectar posible efecto sedante. Las extremidades se aprovecharon para realizar el análisis histológico.

4.2.1. Prueba de «*plantar test*»

En esta prueba se midió la hiperalgesia térmica o nocicepción a nivel central usando el aparato de Hargreaves, en el cual las ratas se colocaron en cámaras de plexiglás con base de vidrio por un periodo de adaptación de 30 min. Posteriormente, un haz de calor emitido por una lámpara con intensidad de 60 Hz por 20 s se hizo incidir en el área plantar de la extremidad posterior de la rata. Este ensayo se realizó 3 veces para obtener el tiempo promedio de latencia al retiro de la extremidad. Los datos fueron expresados como el efecto máximo posible (% EMP), calculado de la siguiente forma (Hargreaves *et al.*, 1988; González-Ramírez *et al.*, 2012; Cheah *et al.*, 2017):

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

4.2.2. Inflamación inducida con carragenina

Al término de la prueba de «*plantar test*», a los animales se les administró 50 μL de carragenina λ al 1 % (agente flogógeno inductor de actividad edematosa) en la extremidad posterior derecha por vía s.c. La inflamación inducida por la carragenina se determinó por la medición del espesor del edema plantar con el vernier a los tiempos 0 (basal), 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 24 h (Winter *et al.*, 1962; González *et al.*, 2007). Los valores obtenidos fueron expresados como % Inflamación, que se calculó con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Inflamación} = \frac{\text{Espesor inicial} - \text{Espesor tiempo}}{1 - \text{Espesor inicial}} \times 100$$

Posteriormente, los animales fueron sacrificados y sus extremidades fueron retiradas para el examen histológico.

4.2.3. Evaluación del efecto sedante

Las ratas fueron manipuladas al menos un día antes de la realización de las evaluaciones para su adaptación al espacio y condición experimental. Entonces, los tratamientos se administraron y 30 min después se realizó la evaluación conductual en la prueba de campo abierto (2 min). Esta consistió en observar a cada rata colocada dentro de una caja dividida en 12 cuadros para determinar la actividad ambulatoria. El número de cuadros explorados (las cuatro extremidades del animal estaban en un cuadrado) durante 2 min fue registrado como actividad ambulatoria (Hall, 1934; Prut y Belzung, 2003; Hernández-León, 2017).

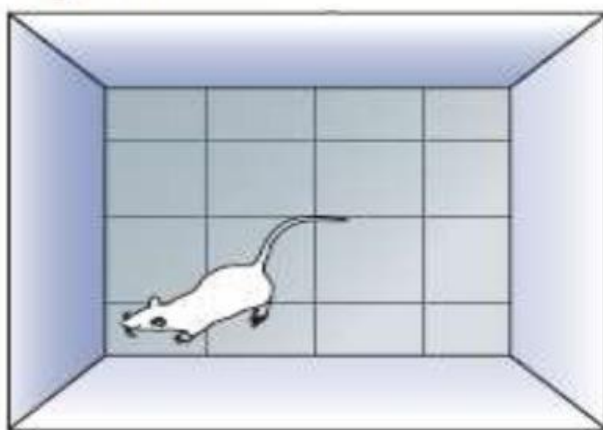


Figura 8. Campo abierto

4.2.4. Análisis histológico

Para el análisis del tejido se eliminó el pelaje de las extremidades posteriores y se sumergieron en solución tamponada de paraformaldehído al 4 %. Transcurridas 72 h de fijación, las extremidades se lavaron con amortiguador de fosfatos 0.1 M, pH 7.4, y el tejido dérmico dorsal de las extremidades se desprendió y se cortaron los huesos del tarso y las falanges. Después se fragmentó el tercer hueso metatarsiano para retirar los huesos restantes del metatarso y obtener sólo tejido muscular, conjuntivo y epitelio estratificado plano queratinizado del cojinete plantar. Los tejidos fueron sumergidos en solución de sacarosa al 30 % a 4 °C por 72 h. Después se embebieron en

resina protectora de criocorte TissueTek[®], por al menos 72 h. Las extremidades fueron congeladas en orientación longitudinal y cortadas en láminas de 10 µm de grosor. Las muestras obtenidas son representativas de 4 animales. Los cortes se montaron sobre laminillas gelatinizadas y se mantuvieron a 4 °C para su tinción posterior con la técnica tricrómica de Masson. La técnica fue realizada en colaboración con la Dra. Agustina Cano Martínez en las instalaciones del departamento de Fisiología, de la dirección de Investigación del Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez.

4.2.4.1. Tinción tricrómica de Masson

La tinción tricrómica de Masson es una técnica diferencial que permite identificar fibras musculares, de colágena y también detectar núcleos celulares en un mismo corte, en función de los colorantes utilizados. La fucsina ácida de Biebrich tiñe las fibras musculares (rojo); el azul de anilina las fibras de colágena (azul) y la hematoxilina férrica de Weigert los núcleos (negro). El protocolo para la tinción tricrómica se describe a continuación:

1. Secado de laminillas a temperatura ambiente al menos por 30 min
2. Hidratación del tejido en PBS 0.01 M, pH 7.4 por 5 min a temperatura ambiente
3. Incubado de tejido en solución Bouin a 56 °C por 15 min
4. Enjuagado del tejido en agua destilada
5. Tinción con hematoxilina férrica de Weigert por 5 min
6. Lavado con agua destilada y vire con solución de Scott
7. Lavado con agua desionizada
8. Teñido con escarlata de Biebrich y fucsina ácida por 5 min
9. Lavado con agua desionizada
10. Colocación de cortes en mezcla de ácidos fosfotúngstico y fosfomolibdico, por 5 min (presencia de fibras de colágeno color rosa claro)
11. Tinción con azul de anilina por 20 min (tinción de colágeno color azul)
12. Lavado por inmersión del tejido con ácido acético al 0.1 %
13. Lavado con agua desionizada
14. Deshidratación rápida con etanol al 95 % y con etanol absoluto
15. Aclaración rápida con xilenos y montaje

4.3. Determinación del posible mecanismo de acción del efecto antinociceptivo de extractos de *Brassica oleracea* var. *italica*

Con la finalidad de conocer si el efecto antinociceptivo del extracto más activo de brócoli involucra la participación de receptores de tipo opioide, éste o el sulforafano fueron administrados 15 min después de la dosis de 5 mg/kg de naltrexona (antagonista opioide no selectivo). Treinta min después de los tratamientos se procedió a realizar la prueba de estiramiento abdominal en ratones o de la formalina en ratas.

VI. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos se presentan como el promedio \pm error estándar de la media (EEM) y se analizaron mediante t de Student o análisis de varianza (ANDEVA) de una o dos vías, según correspondió. Las pruebas *post hoc* de la comparación de las medias contra grupo control se analizaron con la prueba de Dunnett o entre grupos con la prueba de Tukey. La diferencia significativa se consideró para una $p < 0.05$. El análisis se realizó con el programa de cómputo GraphPad Prism (Prism 6 for Windows Version 6.04, GraphPad Software, 2012).

VII. RESULTADOS

1. Cuantificación de polifenoles y sulforafano

Con base en el análisis de HPLC, se observó que en el caso de los polifenoles, el extracto acuoso de vegetal maduro de brócoli contiene la mayor proporción de derivados de ácido clorogénico y le siguen en menor proporción los extractos de brotes y semillas. En tanto que los compuestos de tipo flavonol y derivados de ácido sinápico están contenidos en mayor cantidad en el extracto de brócoli maduro, le siguen en proporción los extractos de semillas y brotes. La variación entre el contenido de flavonoles entre el vegetal maduro, las semillas y los brotes es de 5 y 6.6 veces, respectivamente. La cantidad de derivados del ácido sinápico entre el extracto de vegetal maduro y las semillas es de 16 % y con el extracto de brotes es del 87.24 %.

Por último, el contenido total de los compuestos fenólicos fue mayor en el vegetal maduro, seguido de las semillas y en menor proporción en los brotes. Las semillas contienen poco más de la mitad de la cantidad compuestos fenólicos con respecto al vegetal maduro y los brotes tienen 14 veces menos. (Tabla 3)

Tabla 3. Cuantificación de compuestos fenólicos individuales y totales en diferentes estadios de brócoli después de la extracción acuosa.

| <i>Brassica oleracea var. italica</i> | | | |
|---------------------------------------|--------------|------------|----------------|
| Compuestos | Semillas | Brotes | Vegetal maduro |
| Derivados de ácido clorogénico | 1.7 ± 0.2 | 4.4 ± 0.3 | 241.0 ± 6.0 |
| Flavonoles | 8.0 ± 1.1 | 1.6 ± 0.6 | 53.0 ± 4.0 |
| Derivados de ácido sinápico | 203.0 ± 24.8 | 31.0 ± 4.0 | 243.0 ± 12.0 |
| Total de compuestos fenólicos | 212.7 ± 26.4 | 37.0 ± 4.9 | 537.0 ± 22.0 |

Promedio (n=3) ± desviación estándar (µg/g peso seco)

El extracto acuoso de semillas fue el que presentó la mayor cantidad del sulforafano seguido del extracto de brotes y el extracto acuoso de vegetal maduro. En cifras, los brotes contienen casi 5 veces menos sulforafano que las semillas y el vegetal maduro hasta 17 veces menos (Tabla 4).

Tabla 4. Cuantificación de sulforafano en diferentes estadios de brócoli después de la extracción acuosa.

| <i>Brassica oleracea var. italica</i> | | | |
|--|-----------------|---------------|-----------------------|
| Compuesto | Semillas | Brotes | Vegetal Maduro |
| Sulforafano | 1060 ± 60 | 220 ± 51 | 63 ± 7 |

Promedio (n=3) ± desviación estándar (µg/g peso seco)

2. Primera etapa de la evaluación farmacológica

2.1. Determinación de la toxicidad aguda de extractos acuosos de brócoli

Con los extractos acuosos de semillas y vegetal maduro administrados por vía intragástrica se obtuvo una $DL_{50} > 2000$ mg/kg en rata; mientras que para el extracto de brotes se obtuvo la misma dosis letal, pero en ratones.

Por otro lado, la dosis letal media de los extractos acuosos de brotes y vegetal maduro administrados por vía intraperitoneal fue calculada como 1000 y 2000 mg/kg, respectivamente; mientras que no se presentó toxicidad con el extracto acuoso de semillas a la dosis de 2000 mg/kg (Tabla 5).

Tabla 5. Dosis letal media de los extractos acuosos de semilla, brotes y vegetal maduro de *Brassica oleracea var. italica*.

| | Extracto acuoso | | |
|---|------------------------|---------------|-----------------------|
| | Semillas | Brotes | Vegetal maduro |
| DL_{50} (mg/kg, p.o.) | *No Tóxico | *No Tóxico | *No Tóxico |
| DL_{50} (mg/kg, i.p.) | *No Tóxico | 1000 | 2000 |

*No Tóxico a la dosis de 2000 mg/kg

2.2. Nocicepción visceral inducida con ácido acético al 1 %

2.2.1. Efecto antinociceptivo del EAS

El EAS aumentó la latencia al primer estiramiento y produjo un efecto antinociceptivo cuando se administró por vía i.p. La latencia al primer estiramiento fue significativa sólo a dosis altas (500 y 1000 mg/kg) y menor al efecto inducido por metamizol, control positivo (Fig. 9a). Aunque con relación al efecto antinociceptivo todas las dosis fueron tan eficaces como el metamizol (9b). En el caso de la vía p.o., las dosis utilizadas de EAS retardaron el primer estiramiento ante el estímulo nocivo de manera similar al metamizol (9c) y también produjeron actividad antinociceptiva con ambas dosis (9d).

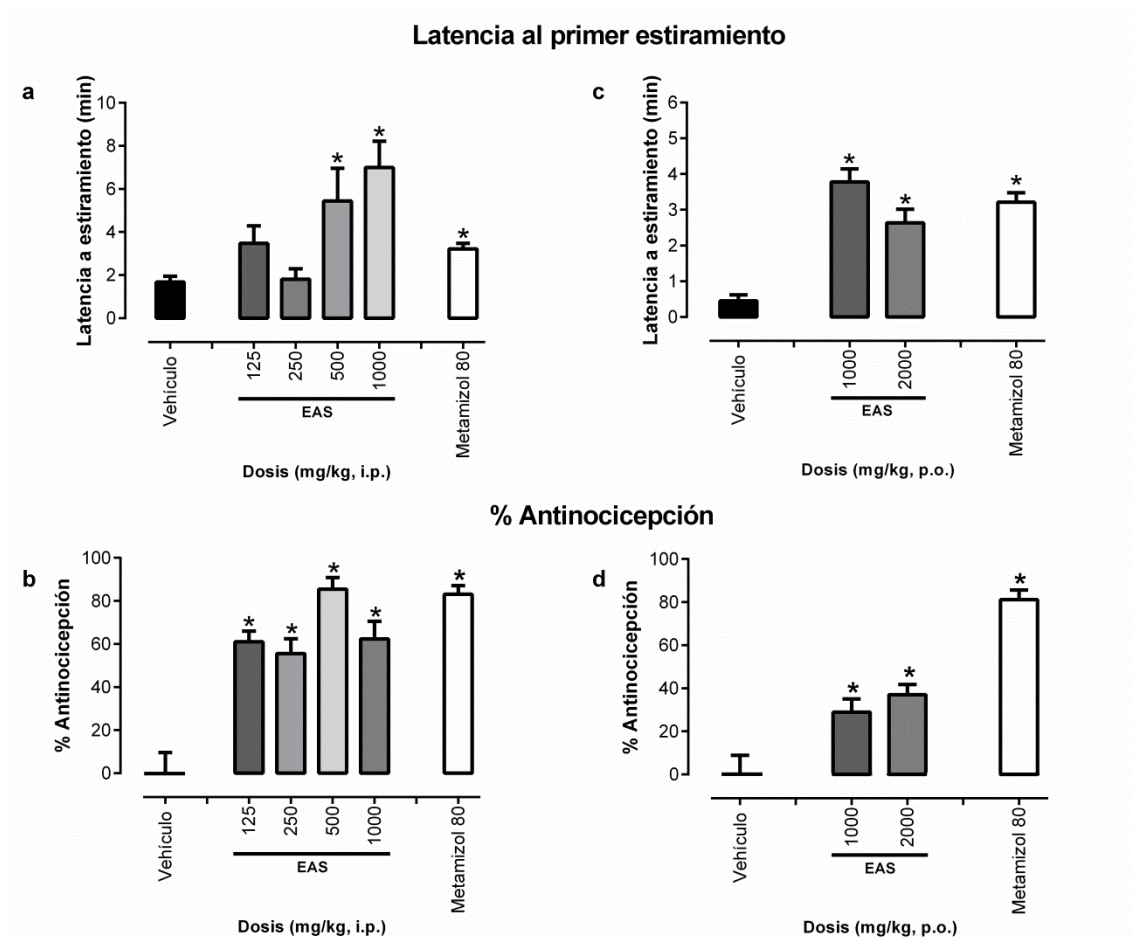


Figura 9. Actividad antinociceptiva del extracto acuoso de semillas (EAS) de *B. oleracea* en la prueba de *writhing* en ratones. Latencia al primer estiramiento vías a) intraperitoneal y b) intragástrica, así como % Antinocicepción vías c) intraperitoneal y d) intragástrica. Comparación con el grupo que recibió el vehículo. El fármaco de referencia fue metamizol (80 mg/kg, i.p.). Promedio \pm EEM * $p < 0.05$, indica diferencia significativa vs vehículo.

2.2.2. Efecto antinociceptivo del EAB

Por otro lado, en el mismo modelo, los EAB por vía i.p. aumentaron la latencia a la primera contorsión (10a) y la actividad antinociceptiva (10b) de manera dosis dependiente y con efecto significativo en dosis bajas. Además, el EAB por vía p.o. retardó la latencia a estiramiento en las dosis más altas (10c) y también mostraron un porcentaje de antinocicepción dosis dependiente (10d), con una eficacia comparable al metamizol, control positivo.

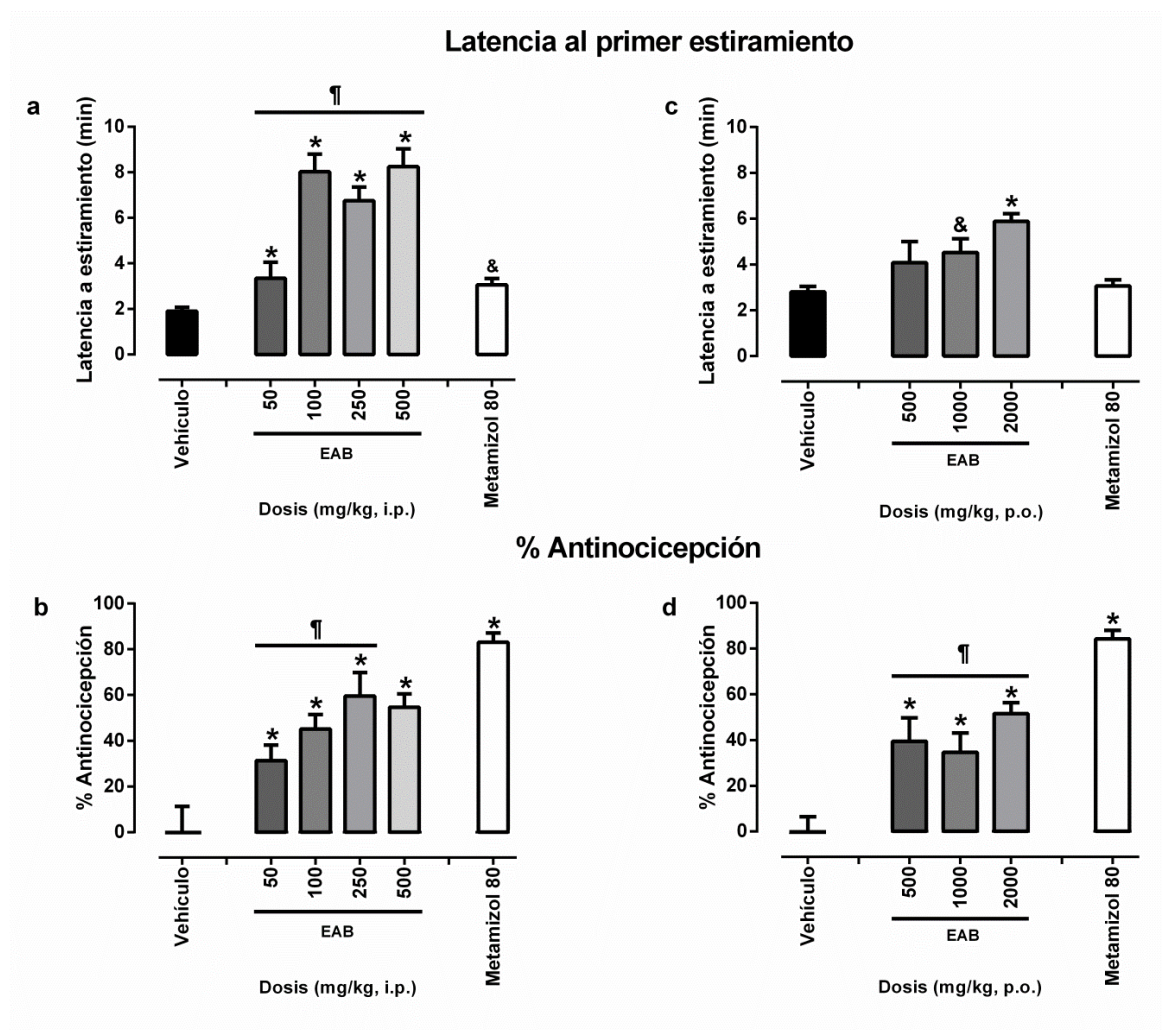


Figura 10. Actividad antinociceptiva del extracto acuoso de brotes (EAB) de *B. oleracea* en la prueba de *writhing* en ratones. Latencia al primer estiramiento vías a) intraperitoneal y b) intragástrica, así como % Antinocicepción vías c) intraperitoneal y d) intragástrica. Comparación con el grupo que recibió el vehículo. El fármaco de referencia fue metamizol (80 mg/kg, i.p.). Promedio \pm EEM * $p < 0.05$, indica diferencia significativa vs vehículo. & $p < 0.05$ t de Student

2.2.3. Efecto antinociceptivo del EAV de brócoli

El EAV de *Brassica oleracea* var. *italica* aumentó la latencia al primer estiramiento, sólo que a la dosis de 1000mg/kg por vía i.p. (11a); mientras que en el porcentaje de antinocicepción mostró un efecto significativo desde la dosis más pequeña (250mg/kg) y alcanzó una eficacia similar a la del metamizol (11b). Por otra parte el EAV por vía esofágica prolongó la latencia al estiramiento, de igual forma al fármaco de referencia (11c). En el caso de la actividad nociceptiva, el EAV la disminuyó a la dosis de 1000 mg/kg, p.o. (11d)

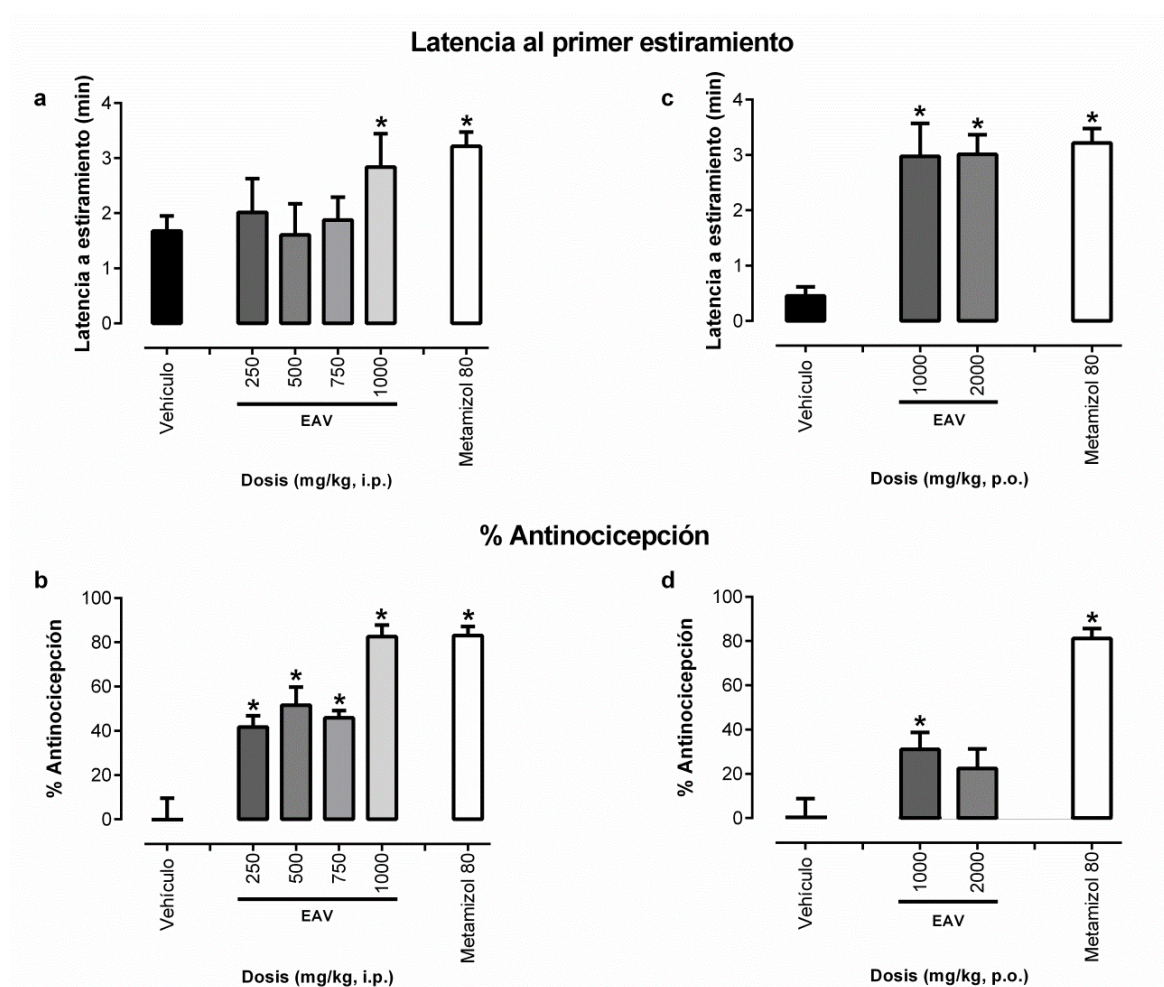


Figura 11. Actividad antinociceptiva del extracto acuoso de vegetal maduro (EAV) *B. oleracea* en la prueba de *writhing* en ratones. Latencia al primer estiramiento vías a) intraperitoneal y b) intragástrica, así como % Antinocicepción vías c) intraperitoneal y d) esofágica. Comparación con el grupo que recibió el vehículo. El fármaco de referencia fue metamizol (80 mg/kg, i.p.). Promedio \pm EEM * $p < 0.05$ indica diferencia significativa vs vehículo.

2.2.4. Efecto antinociceptivo del sulforafano

En esta prueba se observó que el sulforafano aumentó la latencia al primer estiramiento y produjo un efecto antinociceptivo con todas las dosis probadas, aunque ambos efectos fueron menores al producido por el metamizol. Por otro lado, el efecto antinociceptivo del sulforafano disminuyó en la presencia del antagonista opioide, naltrexona (Fig. 12).

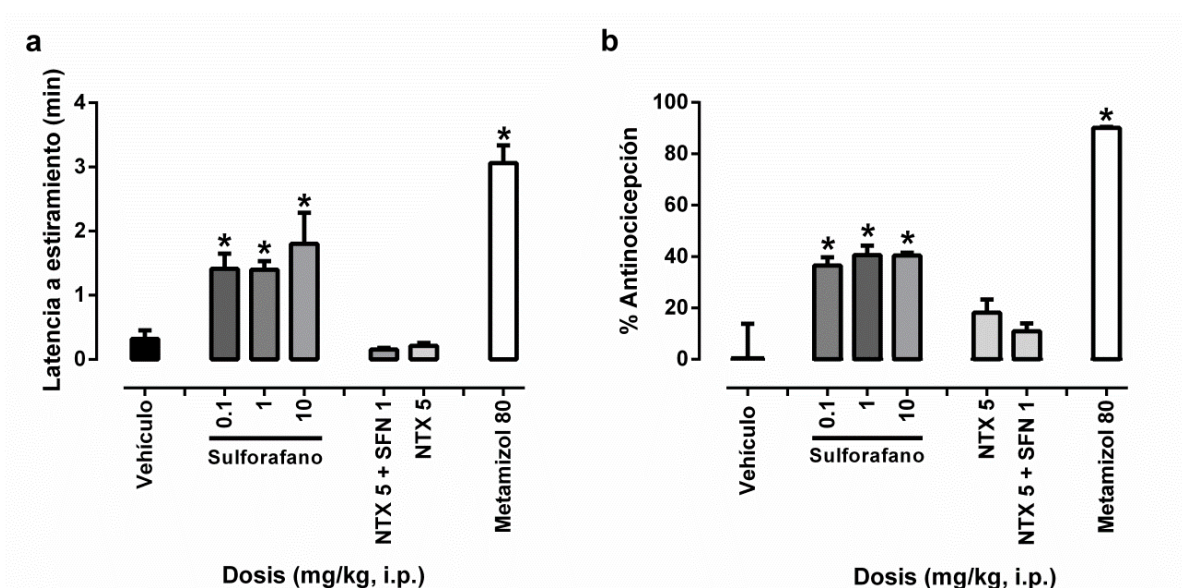


Figura 12. Actividad antinociceptiva de sulforafano (0.1, 1 y 10 mg/kg, i.p.) en la prueba de nocicepción visceral inducida con ácido acético al 1 % en ratones. a) Latencia al primer estiramiento abdominal y b) antinocicepción producida por el sulforafano y antinocicepción producida por sulforafano en presencia de naltrexona (NTX) en comparación con el grupo vehículo y el fármaco de referencia metamizol (80 mg/kg, p.o.). Promedio \pm EEM * $p < 0.05$ diferencia significativa vs vehículo.

2.2.5. Efecto antinociceptivo del ácido clorogénico

El ácido clorogénico, otro metabolito de los extractos del brócoli, también aumentó la latencia al primer estiramiento inducido con ácido acético a las dosis de 3 a 30 mg/kg, incluso la dosis de 30 mg/kg produjo un efecto parecido al del metamizol (Fig. 13a). Al analizar el efecto antinociceptivo, se encontró que a partir de la dosis de 10 mg/kg este fue dosis dependiente, observándose un efecto máximo del 70 % (Fig. 13b).

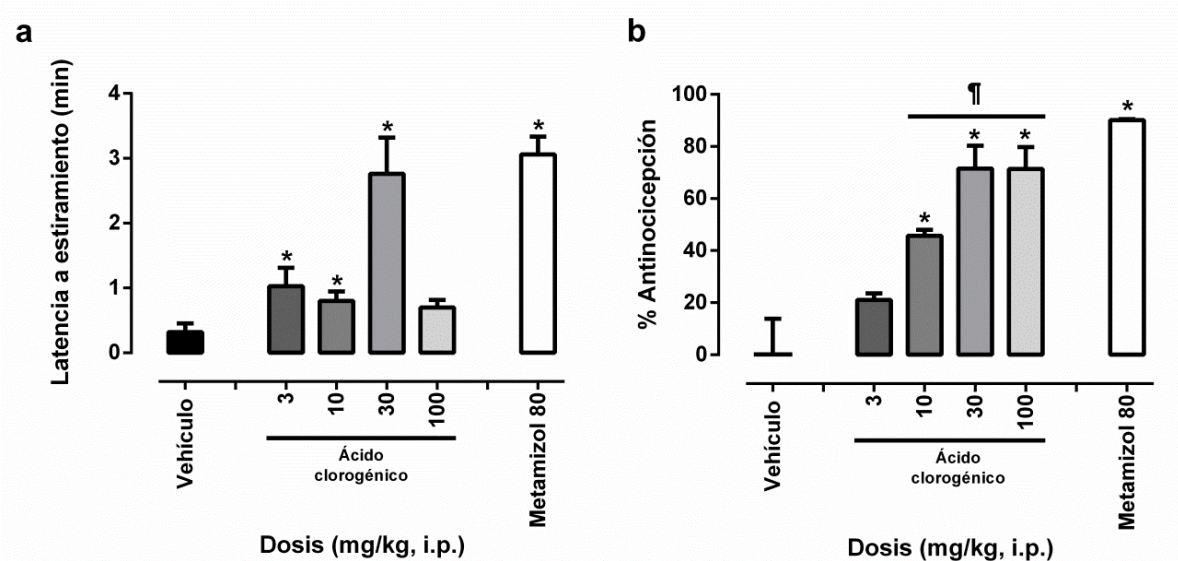


Figura 13. Actividad antinociceptiva de ácido clorogénico (3,10, 30 y 100 mg/kg, i.p.) en la prueba de nocicepción visceral inducida con ácido acético al 1 % en ratones. a) Latencia al primer estiramiento abdominal y b) antinocicepción producida por el ácido clorogénico en comparación con el grupo vehículo y el fármaco de referencia metamizol (80 mg/kg, p.o.). Promedio \pm EEM * $p < 0.05$ diferencia significativa vs vehículo.

2.3. Nocicepción inducida con formalina al 1 %

2.3.1. Efecto antinociceptivo del EAS de brócoli

La administración i.p. del EAS (2000 mg/kg) disminuyó el número de sacudidas inducidas en ambas fases de la prueba de formalina. Mientras que, por vía p.o., sólo disminuyó el tiempo acumulado de lamidas en la fase neurogénica. (Fig. 14).

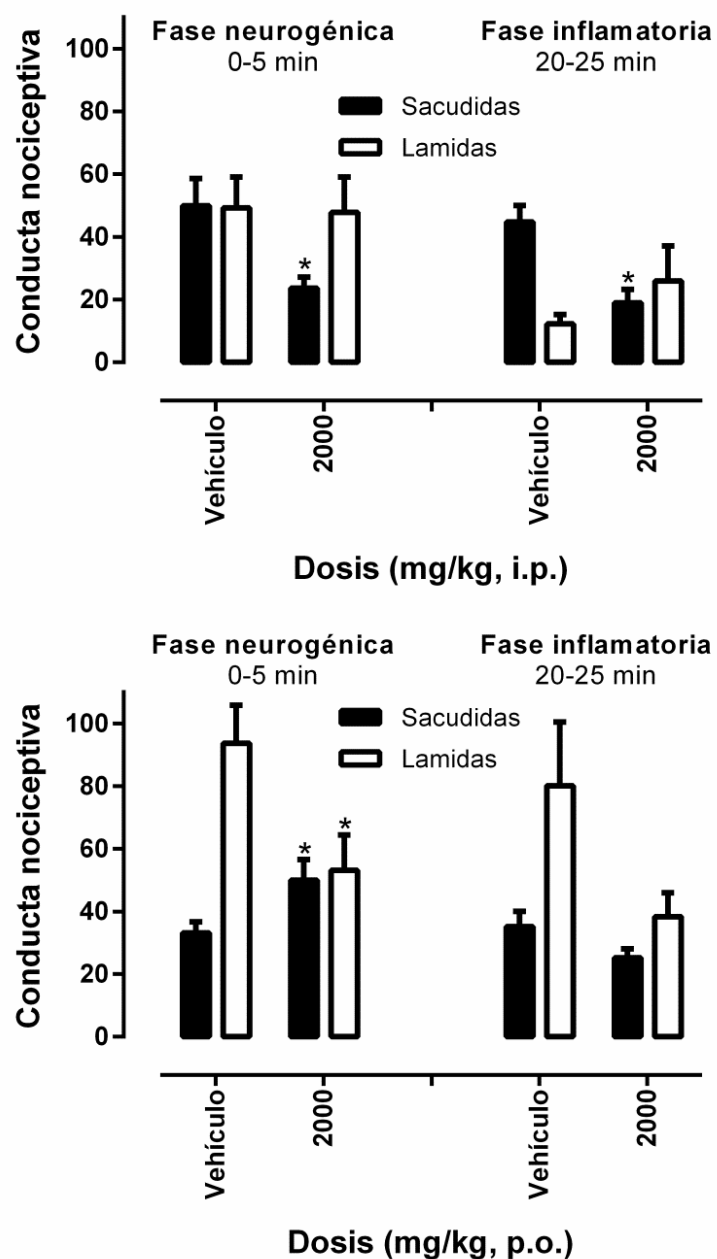


Figura 14. Actividad antinociceptiva del extracto acuoso de semillas de *B. oleracea* (2000 mg/kg, i.p.) en la prueba de formalina al 1 % en ratas en comparación con el grupo que recibió el vehículo. Promedio \pm EEM. * $p < 0.05$ indica diferencia significativa vs vehículo.

2.3.2. Efecto antinociceptivo del EAB de brócoli

Tanto la administración i.p. del EAB (50, 100 y 250 mg/kg) como la administración p.o. (50,1000 y 2000 mg/kg) disminuyeron las conductas nociceptivas (lamidas y sacudidas) de manera dosis dependiente, en ambas fases de la prueba de la formalina, de manera similar al control positivo tramadol (30 mg/kg) (Fig. 15).

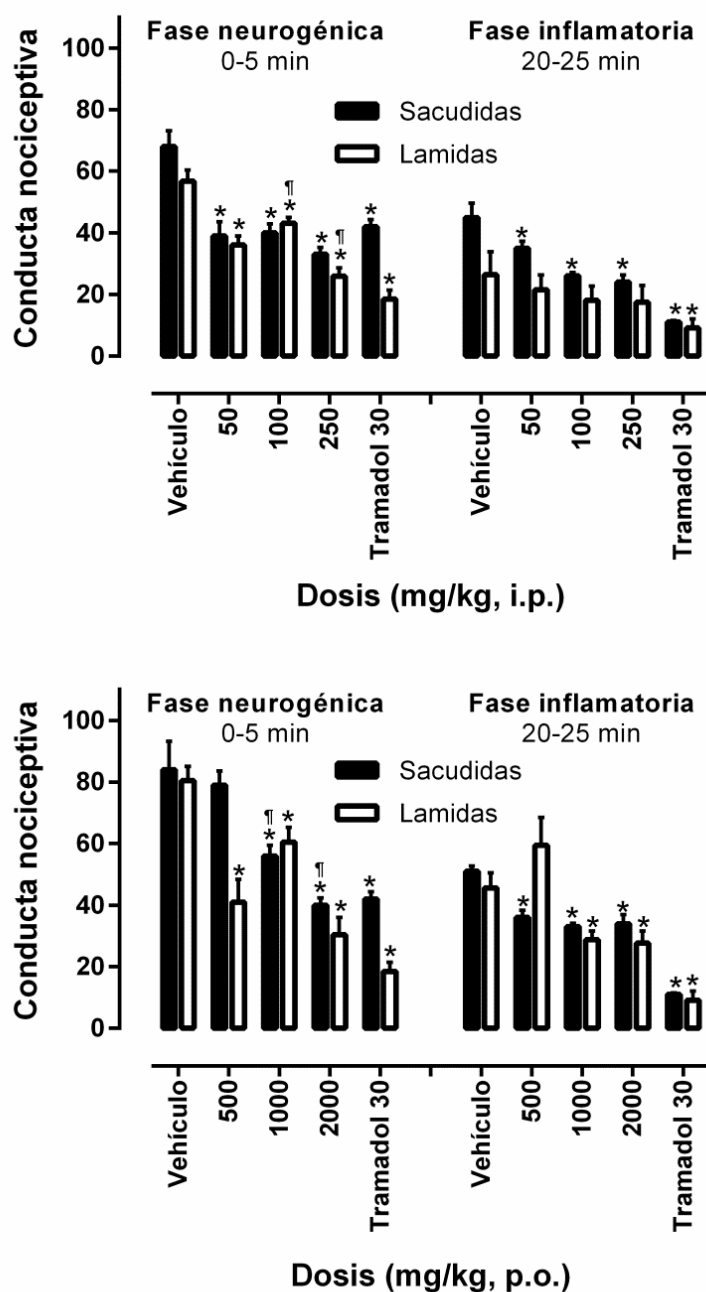


Figura 15. Actividad antinociceptiva del extracto acuoso de brotes de *B. oleracea* (500, 1000 y 2000 mg/kg) en la prueba de formalina al 1 % en ratas en comparación con el grupo que recibió el vehículo. Promedio \pm EEM * $p < 0.05$ indica diferencia significativa vs vehículo.

2.3.3. Efecto antinociceptivo del EAV de brócoli

El EAV administrado vía i.p. a las dosis de 500 y 1000 mg/kg disminuyó las conductas de sacudidas en la fase inflamatoria (Fig. 16a). Mientras que administrado vía p.o. a las mismas dosis disminuyó el tiempo acumulado de las lamidas en ambas fases (neurogénica e inflamatoria) (Fig. 16b).

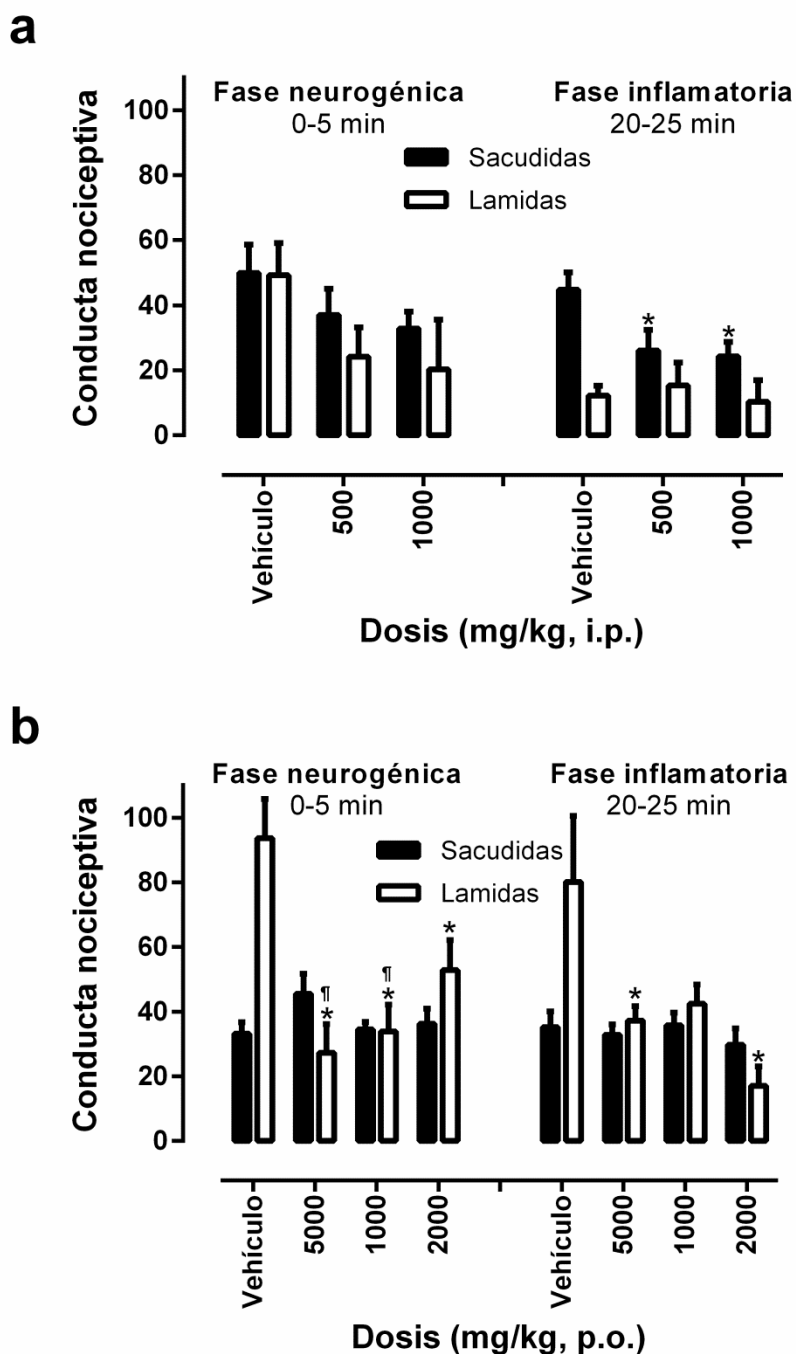


Figura 16. Actividad antinociceptiva del extracto acuoso de vegetal maduro de *B. oleracea* (500, 1000 y 2000 mg/kg, p.o.) en la prueba de formalina al 1 % en ratas en comparación con el grupo que recibió el vehículo. Promedio \pm EEM. * $p < 0.05$ indica diferencia significativa vs vehículo.

2.3.4. Efecto antinociceptivo del sulforafano

El sulforafano a las dosis de 0.1 y 1 mg/kg, i.p. produjo disminución de la conducta de lamidas en la fase neurogénica con ambas dosis. Dicho efecto disminuye al aumentar la dosis (Fig. 17). La administración previa del antagonista opioide naltrexona (5 mg/kg, i.p.) disminuyó el efecto antinociceptivo del sulforafano administrado a la dosis de 0.1 mg/kg, i.p. En el caso de la fase inflamatoria, el sulforafano no produjo actividad antinociceptiva, incluso la dosis más alta aumentó la conducta nociceptiva de lamidas (Fig. 17).

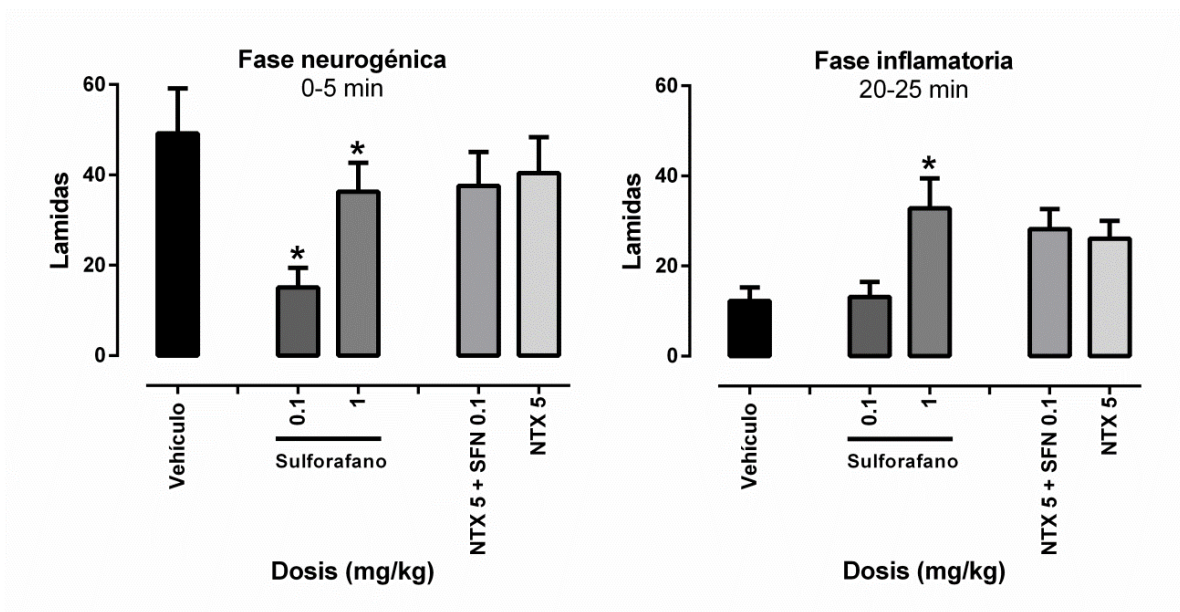


Figura 17. Actividad antinociceptiva del sulforafano (0.1 y 1 mg/kg, i.p.) solo y en combinación con naltrexona (5 mg/kg, i.p.) comparados con el grupo vehículo y naltrexona (1 mg/kg, s.c.) sola en la prueba de formalina al 1 % en ratas. Promedio ± EEM * $p < 0.05$ indica diferencia significativa vs vehículo.

2.4. Evaluación del daño gástrico

Al terminar la prueba de la formalina, los estómagos de los animales fueron disecados para la observación del posible daño gástrico que comúnmente se presenta con los analgésicos antiinflamatorios como con el control positivo (indometacina, 20 mg/kg, i.p.). En esta evaluación se observó que ninguno de los extractos acuosos del brócoli, ni el sulforafano, produjeron lesiones gástricas con ninguna de las dosis probadas. Tampoco en los grupos control se observó daño alguno (Fig.18).

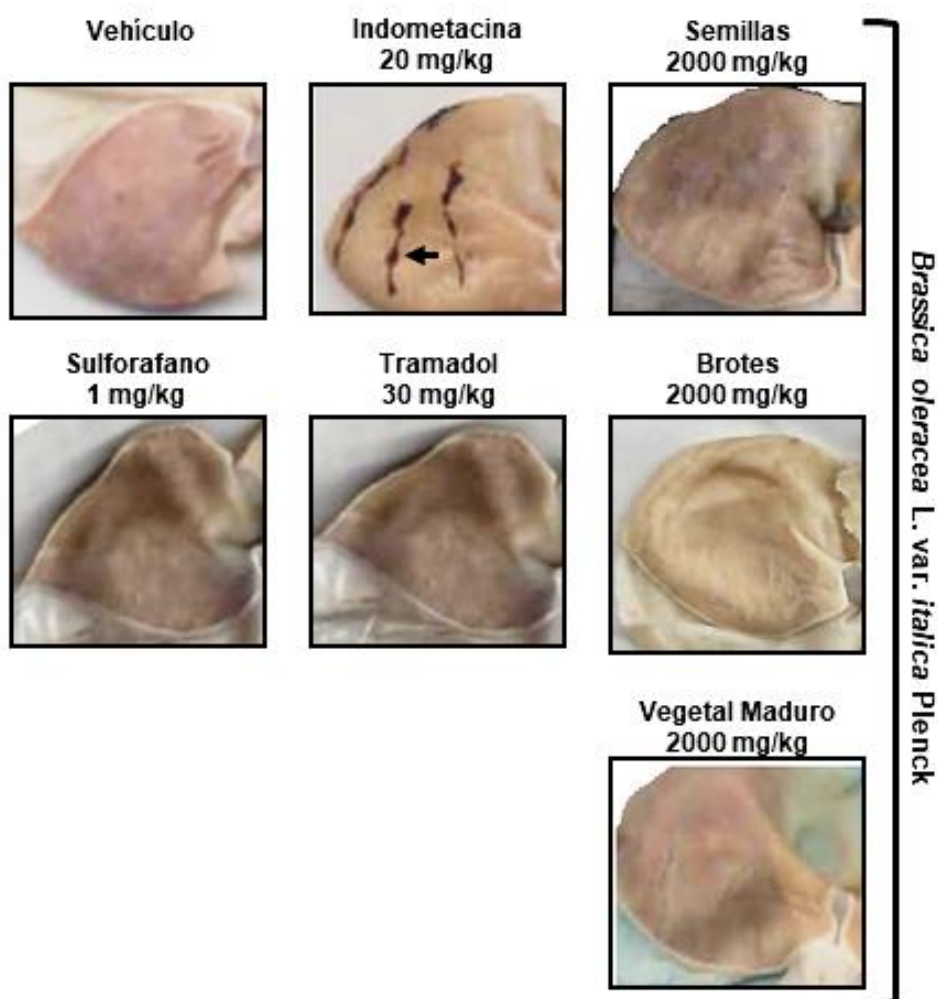


Figura 18. Fotografías representativas de los estómagos disecados de ratas que recibieron los diferentes extractos acuosos de brócoli, así como el sulforafano en comparación con vehículo, indometacina (20 mg/kg, p.o.) y tramadol (30 mg/kg, i.p.) para evaluar el daño gástrico después del modelo de nocicepción inducida con formalina al 1 %. Las úlceras gástricas están marcadas con una flecha negra.

3. Segunda etapa de la evaluación farmacológica

3.1. Prueba de «plantar test»

3.1.1. Evaluación del efecto antinociceptivo del EAB de *Brassica oleracea* var. *italica* y del sulforafano

Dado que el EAB de *Brassica oleracea* var. *italica* indujo el mejor efecto antinociceptivo en la fase neurogénica de la prueba de la formalina, sólo éste fue utilizado para determinar si el brócoli induce un efecto antinociceptivo a nivel central usando la prueba de «plantar test». Los resultados muestran que las dosis de 30 y 300 mg/kg de este extracto aumentaron significativamente el % Efecto Máximo Posible de la latencia al estímulo térmico utilizado en esta prueba, al igual que el tramadol, control positivo, mientras que el ketorolaco no alteró la latencia de los animales en esta prueba.

Por otro lado, sólo la dosis de 0.1 mg/kg de sulforafano incrementó el periodo de latencia al estímulo nocivo (Fig. 19).

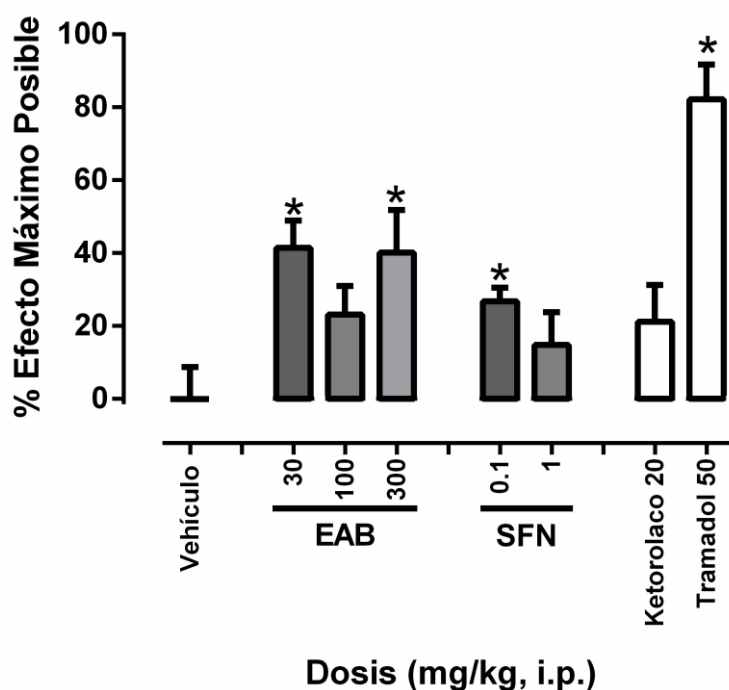


Figura 19. % Efecto Máximo Posible de latencia de retiro ante el estímulo térmico inducido en ratas que recibieron la administración del extracto acuoso de brotes (EAB) a las dosis de 30, 100 y 300 mg/kg, i.p. y sulforafano (SFN) a las dosis de 0.1 y 1 mg/kg, i.p., así como los fármacos de referencia ketorolaco (20 mg/kg, i.p.) y tramadol (30 mg/kg, i.p.) Promedio ± EEM. * $p < 0.05$ indica diferencia significativa vs vehículo.

4. Prueba de sedación: campo abierto

4.1. Evaluación del efecto sedante del EAB de brócoli y sulforafano

Con relación al posible efecto sedante se observó que ni el EAB (30, 100 y 300 mg/kg, i.p.), ni el sulforafano (0.1 y 1 mg/kg) alteraron la actividad ambulatoria de las ratas en la prueba de campo abierto, a diferencia del grupo con tramadol, que sí mostró cambios en la actividad ambulatoria de las ratas (Fig. 20)

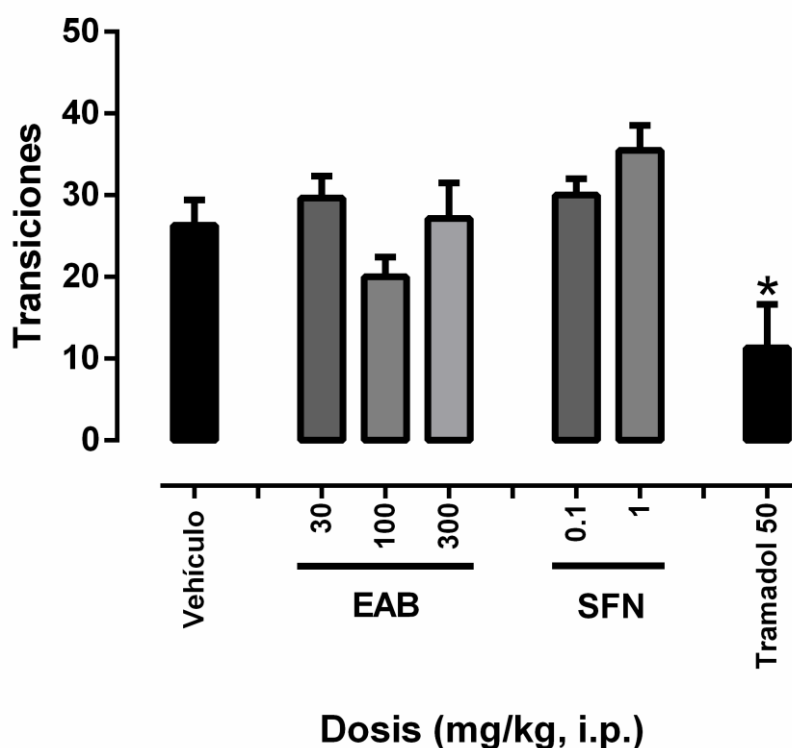


Figura 20. Evaluación de la actividad ambulatoria en campo abierto en ratas que recibieron el extracto acuoso de brotes (EAB) de *B. oleracea* (30, 100, 300 mg/kg, i.p.) y administración intraperitoneal de sulforafano (SFN) (0.1 y 1 mg/kg), así como los fármacos de referencia ketorolaco (20 mg/kg, i.p.) y tramadol (30 mg/kg, i.p.) Promedio ± EEM. * $p < 0.05$ indica diferencia significativa vs vehículo.

5. Edema inducido con carragenina

5.1. Evaluación de la actividad antiedematosa de los EAB de brócoli

Para corroborar la actividad antiinflamatoria observada en la fase II de la prueba de formalina se evaluó el efecto del extracto de brotes en el edema inducido con carragenina en ratas. Los resultados en el curso temporal muestran una disminución gradual de la inflamación con los tratamientos de extracto acuoso de brotes a las dosis de 30, 100 y 300 mg/kg, i.p., así como con el ketorolaco 20 mg/kg, i.p., control positivo. Dicha disminución inició a las 2 h de la inducción con el flogógeno y fue significativa después de 4 h. Transcurridas 24 h se observó actividad antiinflamatoria con todos los tratamientos, siendo significativa con los brotes a la dosis de 30 mg/kg y con el ketorolaco (Fig. 21a). En el análisis del área bajo la curva del porcentaje de inflamación en el intervalo de tiempo de 0 a 6 h, en la figura 21b, mientras que se observa la actividad antiinflamatoria significativa del extracto acuoso de brotes a las dosis de 100 y 300 mg/kg, similar a la producida por el ketorolaco (20 mg/kg) (Fig. 21b).

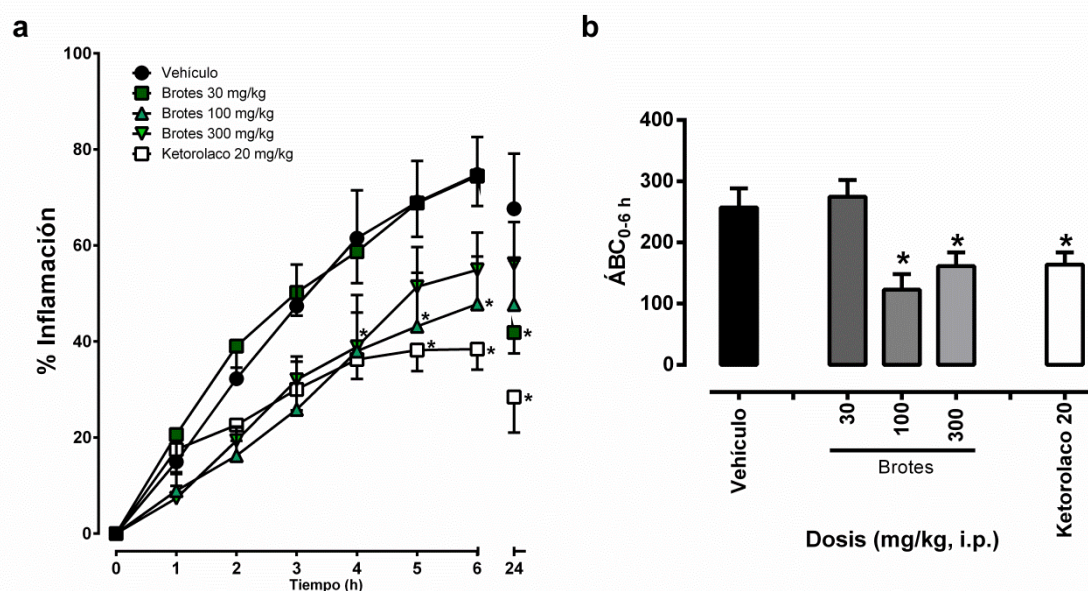


Figura 21. Inducción de edema con carragenina. a) Curso temporal del porcentaje de inflamación en el intervalo de 0 a 24 h con vehículo, extracto acuoso de brotes de brócoli (30, 100 y 300 mg/kg, i.p.) y Ketorolaco (20 mg/kg, i.p.). Promedio \pm EEM. ANDEVA de dos vías * $p < 0.05$ indica diferencia significativa vs vehículo. b) Área bajo la curva de la inflamación en el intervalo de 0 - 6 h (ABC_{0-6h}) del vehículo, brotes de *B. oleracea* (30, 100 y 300 mg/kg, i.p.). ANDEVA de una vía * $p < 0.05$ en comparación con el vehículo.

5.2. Evaluación de la actividad antiedematosa del sulforafano

Por otro lado, el sulforafano a la dosis de 0.1 mg/kg, i.p., disminuyó la inflamación inducida por la carragenina, de manera similar al ketorolaco 20 mg/kg, i.p. Dicha disminución inició a partir de las 2 h de la inducción edematosa y es significativa a partir de las 4 h (Fig. 22a). El área bajo la curva del porcentaje de inflamación en el intervalo de tiempo de 0 a 6 h, muestra la disminución de inflamación producida por el sulforafano (0.1 mg/kg), similar a la producida por el ketorolaco (20 mg/kg) (Fig. 22b).

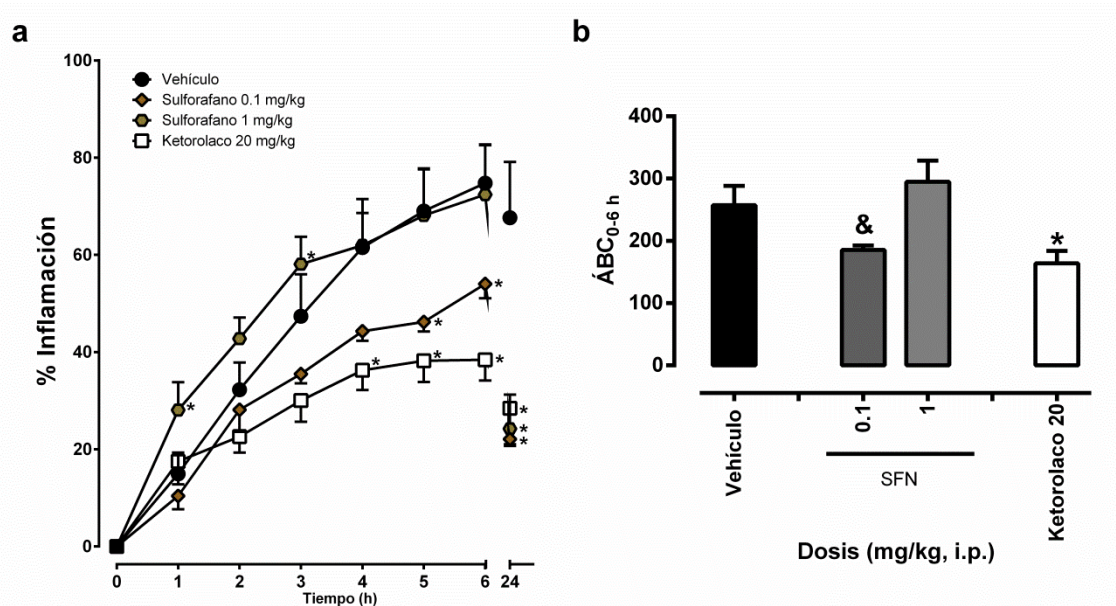


Figura 22. Inducción de edema con carragenina. a) Curso temporal del % Inflamación del tiempo 0 a 24 h con vehículo, sulforafano (0.1 y 1 mg/kg, i.p.) y Ketorolaco (20 mg/kg, i.p.). Promedio \pm EEM. ANDEVA de dos vías $*p < 0.05$ indica diferencia significativa vs vehículo. b) Área bajo la Curva de la inflamación del intervalo 0 - 6 h ($\text{ÁBC}_{0-6 h}$) del vehículo, sulforafano (0.1 y 1 mg/kg, i.p.).

5.3. Análisis histológico

Tejido muscular

Los cortes histológicos que se presentan a continuación son representativos de las extremidades con edema inducido con carragenina que se tiñeron con la técnica tricrómica de Masson. En todas las figuras se observa la zona muscular longitudinal en coloración rojiza, las fibras de colágena en la coloración azul y las células sanguíneas infiltradas como hematíes de color rojo y/o leucocitos con núcleos color violeta.

Las fibras musculares de los animales a los que no se les indujo edema se observan en las figuras 23a y 23b, donde se aprecian fibras musculares continuas y algunas de colágena unidas al músculo, es decir que su integridad estructural está conservada. En el caso de la imagen 23c, los espacios entre fibras contienen múltiples células inflamatorias. En el recuadro 23d se observan fibras discontinuas y, de igual manera, espacios entre fibras que contienen eritrocitos, leucocitos y macrófagos.

También se muestra el tejido músculo esquelético de ratas que recibieron tratamiento de extracto acuoso de brotes a las dosis de 100 (Fig. 23e) y 300 mg/kg (Fig. 23f), respectivamente. En la imagen que representa los efectos de la dosis más baja se observan los espacios intrafibrosos con mayor cantidad de células blancas (Fig. 23e). En los animales que recibieron el extracto a la dosis de 300 mg/kg, sus tejidos musculares están mejor preservados y se distinguen fibras de músculo continuas, aunque con igual espacio entre las fibras es posible notar menor cantidad de leucocitos y eritrocitos (Fig. 23f). En el caso de los animales que recibieron el antiinflamatorio de referencia, aunque presenta menor espacio entre fibras musculares y preservación de las fibras, el contenido de células es similar en comparación con los demás tratamientos con el extracto (Fig. 23g).

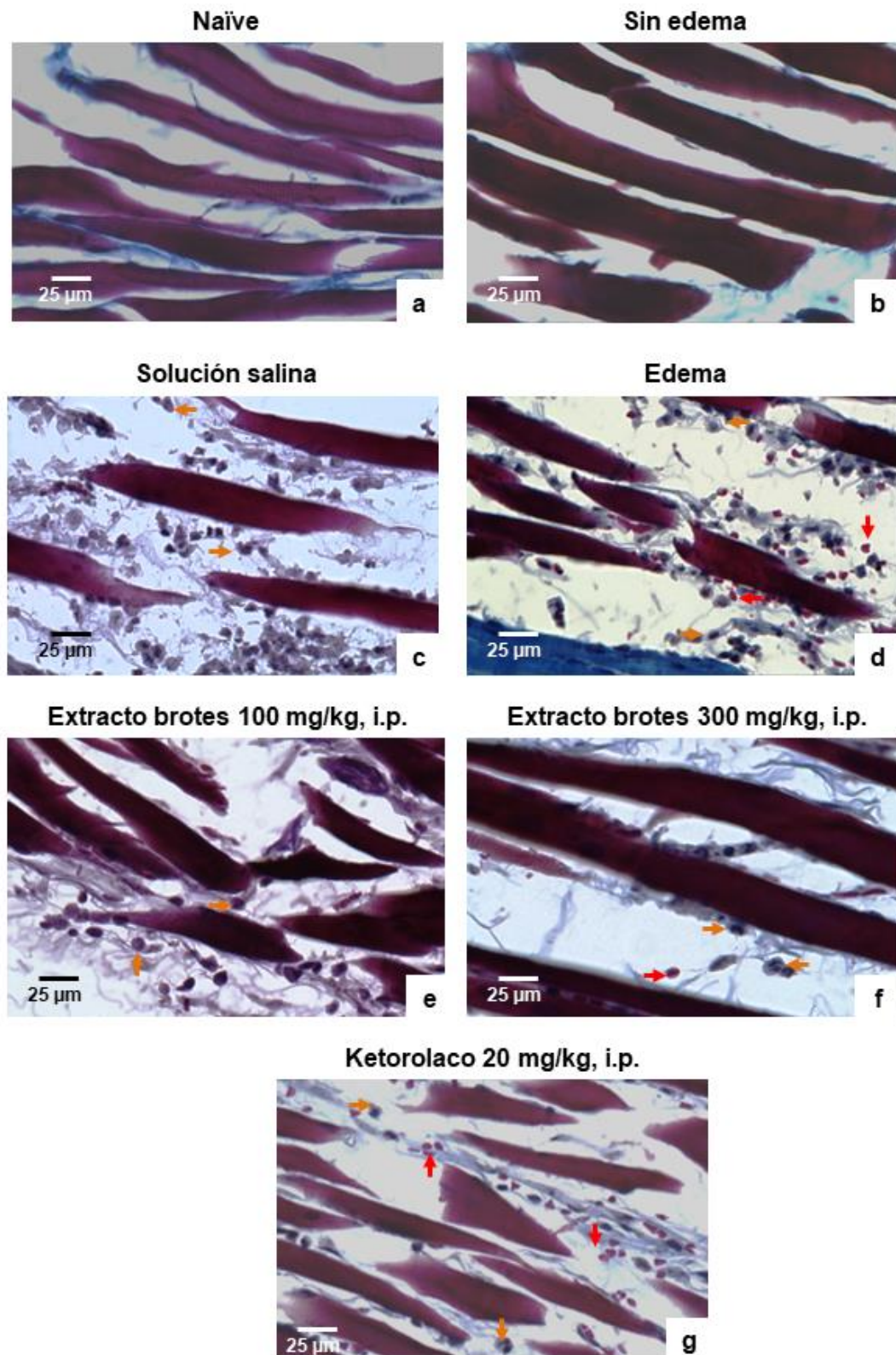


Figura 23. Fotomicrografías de la extremidad posterior derecha de ratas naïve sin inducción de edema ni tratamientos (a) o con administración de solución salina intraperitoneal (vehículo, b). Fotografías de extremidad posterior de rata con administración de solución salina (vehículo, c) y con inducción de edema por administración de carragenina λ (d). Administración del extracto acuoso de brotes de brócoli a las dosis de 100 (e) y 300 mg/kg, i.p. (f). Fotografías de la extremidad posterior con inducción de edema y administración de ketorolaco a 20 mg/kg, i.p. (g). Los eritrocitos están señalados con flechas rojas y los leucocitos con flechas anaranjadas. Imágenes al microscopio con aumento a 40x.

VIII. DISCUSIÓN

En este proyecto se dan evidencias del potencial nutracéutico para el alivio del dolor del brócoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) y de dos de sus metabolitos bioactivos: el sulforafano y ácido clorogénico. Además de su eficacia sin la manifestación de los efectos adversos que se conocen para fármacos analgésicos usados en la clínica del dolor como los AINEs. Lo anterior se sugiere por los datos de toxicidad aguda y la eficacia tipo analgésica y antiinflamatoria de extractos acuosos del brócoli en su diferente estadio vegetativo; además de un posible mecanismo de acción de uno de sus principales metabolitos.

8.1. Análisis fitoquímico de los posibles constituyentes bioactivos del brócoli

Entre los productos naturales que presentan potencial para la terapéutica están los llamados nutracéuticos, que son micronutrientes, purificados y derivados de alimentos que en cantidades específicas, en forma farmacéutica y dosis adecuadas que pueden utilizarse en diversos procesos patológicos (Santini *et al.*, 2017; Ronis *et al.*, 2018). El brócoli tiene potencial nutracéutico ya que contiene vitaminas (Moreno *et al.*, 2006), minerales, flavonoides (Hämäläinen *et al.*, 2007; Hussain *et al.*, 2016), glucosinolatos (Lippmann *et al.*, 2014) y sus derivados de hidrólisis llamados isotiocianatos, de los cuales hay reportes de su actividad antinociceptiva y/o antiinflamatoria (Fuentes *et al.*, 2015). Uno de los compuestos de interés biológico es el sulforafano, un isotiocianato producto de la hidrólisis del glucosinolato glucorafanina uno de los componentes más abundantes del brócoli.

En México, escasos grupos investigan a *Brassica oleracea* var. *italica*. El enfoque más estudiado del brócoli es a nivel industrial, en el cual se evalúan las condiciones de almacenaje y para la elicitación y producción de mayor cantidad de metabolitos secundarios (compuestos bioactivos de tipo polifenol y glucosinolato) (Alanís-Garza *et al.*, 2015; Moreira-Rodríguez *et al.*, 2017). Se sabe que existen diferencias en el contenido de metabolitos secundarios en una sola especie vegetal, en función de la variedad, madurez de la cosecha,

condiciones de crecimiento, tipo de suelo y condiciones poscosecha (Podsędek, 2007). Por lo cual, en este estudio se cuantificaron las concentraciones de polifenoles (derivados de ácido clorogénico, ácido sinápico y flavonoles) y del sulforafano en los extractos acuosos de diferentes estadios de madurez del brócoli como semilla, brotes y vegetal maduro; además de identificar el estadio con mejor actividad antinociceptiva y/o antiinflamatoria. De manera general se encontró que el contenido de estos constituyentes sí varía dependiendo del estado vegetativo del brócoli, observándose diferencia de concentración de sus componentes en cada extracto.

8.2. Evaluación de la toxicidad aguda de los extractos de brócoli

Se sabe que el dolor representa un problema clínico, social y económico (Henschke *et al.*, 2015) y para su alivio la OMS sugiere el uso de analgésicos de tipo AINE u opioide, dependiendo del tipo de dolor (1996). La desventaja de estos fármacos son los efectos adversos que producen; como ulceración gástrica y disfunciones plaquetarias en el caso de los AINEs (Wong y Chang, 2016); y depresión respiratoria, dependencia y tolerancia en el caso de los opioides (Harkouk *et al.*, 2018). La OMS también ha autorizado el uso de los remedios herbolarios para diversos fines terapéuticos, de los que al menos el 80 % de la población hace uso de ellos como alternativas terapéuticas en la medicina tradicional (OMS, 2013) ya que existe la creencia de que no producen efectos adversos (Ambriz-Pérez *et al.*, 2016).

Los resultados sobre toxicidad obtenidos en este trabajo sugieren que el brócoli no produce efectos tóxicos con ninguno de los extractos en los estadios estudiados, semillas, brotes e inflorescencias cuando se administran por vía intragástrica; ya que en la dosis de 2000 mg/kg no produjo la muerte de ninguna de las ratas incluidas en el estudio. Estos datos están de acuerdo con reportes previos que sugieren que el vegetal maduro tiene una DL_{50} mayor a 5000 mg/kg (Danesh *et al.*, 2014; Shah *et al.*, 2016). Con el dato anterior, y de acuerdo con el sistema globalmente armonizado de clasificación y etiquetado de productos químicos (GHS, por sus siglas en inglés), los tres extractos utilizados en este estudio son de categoría 5, o de «riesgo mínimo». Por vía intraperitoneal, el extracto de vegetal maduro si produjo un efecto letal con una

DL₅₀ de 2000 mg/kg; mientras que con el extracto de brotes, fue de 1000 mg/kg. En ambos casos, son considerados como productos de categoría 4 o de «leve peligro».

En cuanto al sulforafano, presente en los tres estadios vegetativos del brócoli, el fabricante reporta DL₅₀ de 1060 mg/kg y 3450 mg/kg en rata y ratón, respectivamente para vía enteral (Cayman Chemical, 2017). Datos recientes indican que a dosis tóxicas (150-300 mg/kg), el sulforafano produce convulsiones en ratón (Socala *et al.*, 2017). Estas dosis son mucho más grandes que las que produjeron eficacia antinociceptiva y antiinflamatoria en nuestro estudio (0.1 y 1.0 mg/kg); lo que sugiere se debe tomar con cautela en pacientes con predisposición a las crisis convulsivas como los epilépticos.

8.3. Efecto antinociceptivo de extractos de brócoli en un modelo de dolor abdominal

La prueba de estiramiento abdominal consiste en la respuesta inducida por irritantes a través de nociceptores y se caracteriza por episodios de retracción abdominal y estiramiento de las extremidades posteriores en ratones de laboratorio (Collier *et al.*, 1968) representando el dolor abdominal que refieren los pacientes, el cual puede ser un síntoma de una enfermedad subyacente grave que puede llevar a la hospitalización. Se ha reportado que al menos el 25 % de la población adulta refiere este tipo de dolor de manera similar en diferentes grupos de edad, etnias y áreas geográficas (Tolba *et al.*, 2015). El dolor abdominal agudo, generalmente es de corta duración (cerca de 5 días) y es también conocido como dolor de origen no traumático y es uno de los síntomas que a menudo causa que la población asista a la atención médica (Cervellin *et al.* 2016).

Esta prueba denominada «*writhing*» es inducida con ácido acético intraperitoneal en ratones para promover la liberación de mediadores inflamatorios endógenos que estimulan las terminales aferentes primarias y esto permite la sensación nociceptiva (Collier *et. al.*, 1968). La inducción de nocicepción visceral con ácido acético emite señales hacia el SNC debido a que los mediadores inflamatorios como las prostaglandinas contribuyen al incremento de la sensibilidad de dichos nociceptores (Knowles y Aziz, 2009).

Los resultados de este estudio demuestran que la administración de diferentes dosis de los extractos acuosos de brócoli produjo efecto antinociceptivo comparable al producido por el analgésico de referencia metamizol.

La respuesta antinociceptiva del extracto de semillas se observó a dosis menores en comparación con las de las inflorescencias; no obstante, éstas fueron aún menores en el caso del extracto de brotes, tal como fue reportado por Baenas *et al.*, 2017. Según el contenido de derivados de ácido sinápico y clorogénico, así como de glucosinolatos de los que se puede derivar el sulforafano, éstos pueden ser de los principales metabolitos involucrados en su efecto antinociceptivo. Existen reportes de diferentes especies del género *Brassica* como bok choy, colirrábano y col con actividad antinociceptiva en este modelo experimental (Jakaria *et al.*, 2015; Pinky *et al.*, 2015; Rahman *et al.*, 2015). Del brócoli (*Brassica oleracea* var. *italica*), además de nuestros resultados existe otro reporte sobre su eficacia antinociceptiva en el mismo modelo (Hasan *et al.*, 2015). Lo anterior apoya su efectividad en el alivio del dolor abdominal. En el caso de la inflorescencia, la concentración de derivados del ácido sinápico es similar a la contenida en semillas y la concentración de derivados de ácido clorogénico es la mayor de las tres etapas vegetativas, lo que permite sugerir que los derivados de los ácidos sinápico y clorogénico participan en la actividad antinociceptiva, aunque no son los principales.

En este trabajo se demostró el efecto antinociceptivo del ácido clorogénico, del cual no habían reportes en el modelo «*writhing*» de manera individual pero sí como constituyente de algunas especies vegetales (dos Santos *et al.*, 2006). En el modelo de nocicepción visceral se observó que a dosis menores de 100 mg/kg, el ácido clorogénico retardó la respuesta tipo dolorosa. Éste requirió de mayor dosis para generar la actividad antinociceptiva durante los 30 min de prueba. Existe un reporte sobre la actividad antiinflamatoria del ácido clorogénico ante un agente inflamatorio como el cisplatino. En dicha investigación se reportó que la administración de ácido clorogénico disminuyó la producción de factores inflamatorios como TNF- α , COX-2 y caspasa-3 y también se observó la recuperación a nivel tisular (Domitrović *et al.*, 2014). En otros modelos de inflamación como colitis o artritis, después de la administración de ácido clorogénico disminuyeron los factores inflamatorios IL-1 β , IL-6, IL-8, PGE₂ y NF- κ B (Liang y Kitts, 2016).

También se ha reportado que el ácido clorogénico administrado por vía intratecal en modelos de dolor neuropático, disminuye la actividad hiperalgésica mecánica y térmica, la cual es revertida por el antagonista GABAérgico bicuculina, por lo que se sugiere que dicha actividad antinociceptiva involucra la activación del receptor GABA_A en la vía descendente a nivel de la médula espinal (Hara *et al.*, 2014).

8.4. Efecto antinociceptivo de extractos de brócoli en un modelo de dolor nociceptivo

La prueba de la formalina genera nocicepción en forma bifásica, ésta consiste en una etapa neurogénica o central que se presenta en los primeros 0-5 min después de la administración de la formalina y presenta la activación de las fibras tipo C; mientras que la segunda etapa se denomina inflamatoria o tardía y se presenta desde los 5 a 10 min y puede durar hasta 60 min (Lucarini *et al.*, 2013). En la fase inflamatoria se involucra la liberación de mediadores de manera local identificándola como una respuesta nociceptiva periférica (Yamamoto *et al.*, 2002). Entre los mediadores más importantes que participan en la fase inflamatoria están las prostaglandinas, las cuales se sintetizan principalmente por la COX-2, que al inhibirse disminuye la frecuencia de las conductas en esta fase (Yamamoto *et al.*, 2002).

Nuestros resultados mostraron que el extracto de las inflorescencias produjo efecto antinociceptivo por vía p.o. En este modelo experimental Danesh y cols. (2014) reportaron la misma actividad para un extracto hidroalcohólico de floretes de *B. oleracea* a las dosis de 500 y 2000 mg/kg, p.o., corroborando los datos obtenidos en este trabajo a las mismas dosis y vía de administración.

En la fase inflamatoria, la administración de los extractos por vía intragástrica e intraperitoneal disminuyeron las conductas nociceptivas en porcentajes de entre 50 y 80 %, mayor que lo previamente reportado (21 %) (Danesh *et al.*, 2014). En el caso del extracto de semillas, la dosis de 2000 mg/kg por vía i.p. y p.o. también mostró respuesta antinociceptiva significativa. Sin embargo, nuevamente los efectos fueron mejores con dosis más pequeñas del extracto de brotes para ambas vías de administración y para ambas fases

de la prueba de formalina, donde los efectos fueron dosis-dependientes. Estos datos son relevantes, ya que no existen reportes en la prueba de formalina de ninguna especie del género *Brassica* en dichos estadios.

Cabe mencionar que los efectos del brócoli pudieron estar influenciados por la biodisponibilidad de los componentes en los diferentes estadios de éste ya que hubo diferencias por la vía de administración, entre la parenteral y enteral, en esta última todos los tratamientos produjeron respuesta similar a las dosis más altas probadas.

La ingesta de brotes de brócoli puede modular a los prostanoideos inflamatorios y vasculares (Medina *et al.*, 2015). Por lo anterior, se sugiere que el efecto antinociceptivo del brócoli en la fase inflamatoria de la prueba de la formalina pudo deberse a la inactivación de la enzima COX-2, que es la que pudo ser inhibida por los componentes de los extractos que fueron utilizados en este modelo de dolor. Además la COX-2 e interleucinas proinflamatorias son inhibidas por compuestos de tipo polifenol y azufrados contenidos en especies del género *Brassica* (Rotelli *et al.*, 2003; dos Santos *et al.*, 2006; Yun *et al.*, 2008). En el caso de la COX-1, ésta cataliza las prostaglandinas involucradas en la protección gástrica y renal pero no están involucradas propiamente con la transmisión de la información nociceptiva (Calatayud y Esplegues, 2016).

Debido a que los efectos de los fármacos antiinflamatorios se han asociado a daño gástrico; en este estudio se determinó el número de úlceras con los diferentes tratamientos, observándose que ninguno de ellos produjeron úlceras gástricas como lo hizo la indometacina, uno de los AINEs que causa lesiones gástricas (García-Rodríguez y Hernández-Díaz, 2004).

8.5. Efecto antinociceptivo de extractos de brócoli en «plantar test»

En la evaluación antinociceptiva del extracto de los brotes de brócoli en el «plantar test», prueba en la que se estimulan las neuronas sensoriales (fibras A δ y C), la latencia de retiro aumentó en las dosis de 30 y 300 mg/kg, i.p. del extracto en un 35 a 45 %, respectivamente. Estos datos están de acuerdo con lo reportado por Rahman y colaboradores (2015) con el extracto etanólico de *Brassica rapa* subespecie *chinensis*, ya que éste aumentó el tiempo de retiro en la prueba de inmersión de la cola.

En general los modelos nociceptivos que emplean estímulos térmicos son considerados de utilidad en la búsqueda de analgésicos con acción central (Sayyah *et al.*, 2004). Tal es el caso del tramadol, fármaco de referencia que produce parte de sus efectos a través de la activación de receptores a opioides, su efecto analgésico es independiente de la inflamación y aumenta el umbral nociceptivo en varios modelos experimentales (Harkouk *et al.*, 2018).

Los extractos polares de especies del género *Brassica* poseen metabolitos bioactivos que disminuyen la transmisión de la señal dolorosa y/o alivian el dolor producido por un componente a nivel del SNC (Hämaäläinen *et al.*, 2007). Por otro lado, los fármacos que activan la vía opioide también pueden producir efectos adversos como la sedación, ya que producen depresión del SNC a nivel subcortical y en el sistema límbico (Harkouk, 2018). Nuestros resultados muestran que el extracto de brotes de *Brassica oleracea* var. *italica* no disminuyó la actividad ambulatoria, aunque sí los levantamientos en la prueba de cilindro de exploración, sugiriendo un posible efecto sedante no dependiente de la dosis.

8.6. Efecto antinociceptivo de extractos de brócoli en la prueba de inflamación y edema inducidos con carragenina λ

El edema inducido con la carragenina es una de las pruebas predictivas para fármacos antiinflamatorios (Tatiya *et al.*, 2017) que actúan mediante mediadores de inflamación aguda. La prueba consiste en dos fases, la fase inicial que es atribuida a la liberación de histamina, serotonina y bradicininas; y la fase de aceleración de la inflamación que se ha correlacionado con la inducción de la enzima COX-2, ya que induce la producción de prostaglandinas (Necas y Bartosikova, 2013; Cai *et al.*, 2014), además de la migración de neutrófilos, macrófagos y células al sitio de inflamación, las cuales pueden producir especies reactivas de oxígeno que desempeñan un papel modulador en la respuesta inmune inflamatoria (Ghildiyal *et al.*, 2013).

En esta prueba, la dosis más alta del extracto acuoso de brotes produjo un efecto antiinflamatorio similar a la del fármaco de referencia, el ketorolaco. También se ha reportado que la inhibición de la COX-2 es primordial en la disminución de la condición edematosa (Cai *et al.*, 2014). Datos de la literatura

reportan que componentes químicos del brócoli como el sulforafano, el ácido sinápico, el ácido clorogénico y la quercetina poseen actividad antiinflamatoria y antiedematosa (Yun *et al.*, 2008; Liang y Kitts, 2016; Wang y Wang, 2017).

Los cortes histológicos mostraron que el extracto de brotes de *Brassica oleracea* var. *italica* reduce el aumento del espacio entre las fibras musculares inducido por el edema, de tal manera que la disminución de la zona ocupada por el líquido edematoso inducido con carragenina sugiere un efecto antiinflamatorio.

La actividad antiinflamatoria ha sido estudiada tanto a nivel *in vitro* como *in vivo* mediante mecanismos inflamatorios inducidos por vía estéril (daños tisulares) o no estéril (infecciones involucradas en inflamación crónica). Los mecanismos de inhibición incluyen las formas enzimáticas de la óxido nítrico sintasa (ONS), COX-2 y los factores proinflamatorios TNF- α e IL-1 β a través de la inactivación por NF- κ B (Heiss *et al.*, 2001; Rotelli *et al.*, 2003; dos Santos *et al.*, 2006; Yun *et al.*, 2008). Estos mecanismos también se han reportado para el metabolito sulforafano, el cual disminuye conductas tipo dolorosas en modelos de dolor neuropático y gotoso por medio de la inhibición del NF- κ B y de la producción de interleucinas inflamatorias IL-1 β , IL-6 y TNF- α aunado al aumento de la interleucina antiinflamatoria IL-10 (Wang y Wang, 2017; Yang *et al.*, 2018). Estos mediadores podrían también estar involucrados en el efecto antinociceptivo inducido por *Brassica oleracea* y sus metabolitos activos (ácido clorogénico y sulforafano) observados en las diferentes pruebas nociceptivas exploradas en el presente estudio.

8.7. Efecto antinociceptivo del sulforafano y participación de receptores a opioides

En nuestro estudio, el sulforafano mostró actividad antinociceptiva y antiinflamatoria en los ensayos *in vivo* de «*writhing*», formalina, «*plantar test*» y edema inducido con carragenina. Si bien la actividad antinociceptiva no fue dosis-dependiente en la prueba de «*writhing*», en las otras pruebas sí lo fue.

El bloqueo del efecto antinociceptivo del sulforafano en la prueba de formalina en presencia del antagonista opioide sugiere un posible efecto central del extracto de los brotes y uno de sus metabolitos mediado por este sistema

como depresor no sólo de la actividad antinociceptiva sino también con efectos tranquilizantes.

El mecanismo opioide se ha vinculado con la actividad antinociceptiva del sulforafano, ya que dichos efectos fueron revertidos preliminarmente por la presencia del antagonista naltrexona (Baenas *et al.*, 2017). Reportes recientes indican que el sulforafano mejora los efectos producidos por la aplicación de morfina a nivel local (Redondo *et al.*, 2017). Estos datos se refuerzan con lo reportado en la inhibición de conductas en el modelo de dolor neuropático (Wang y Wang, 2017). Además, Redondo y cols. (2017) proponen que la activación de la vía Nrf2/HO-1 es quizás la que produce mejor la expresión del receptor μ opioide en animales administrados con sulforafano y morfina.

A nivel periférico, la actividad antiinflamatoria del sulforafano pudo deberse a la inhibición de la COX-2 y la iNOS, así como factores proinflamatorios reportados por Wang y Wang (2017), donde demuestra la disminución de estos factores en individuos que recibieron sulforafano.

De acuerdo a Lucarini y cols. (2013), los analgésicos con acción central como los opioides inhiben ambas fases de la prueba de formalina; en cambio analgésicos periféricos como los AINEs y los corticoesteroides inhiben solamente la segunda fase (Yamamoto *et al.*, 2002). En otro estudio, la actividad antinociceptiva de los extractos de brócoli disminuyó en presencia de un antagonista opioide sugiriendo que en la actividad central podría participar el sistema opioide (Baenas *et al.*, 2017), aunque a nivel periférico también puede estar involucrado este sistema (Stein y Küchler, 2012).

IX. CONCLUSIÓN

Los resultados de esta tesis dan evidencia de que los extractos acuosos de brócoli en diferente etapa vegetativa producen actividad antinociceptiva de manera diferencial, siendo más activo en su etapa de brotes. Lo anterior depende en parte de la presencia de diferentes concentraciones de los constituyentes. El ácido clorogénico y el sulforafano fueron metabolitos parcialmente responsables de la actividad involucrando la participación de receptores de tipo opioide en el efecto del sulforafano. No se reportan efectos de toxicidad o adversos relacionados con analgésicos de tipo AINE y opioides.

X. LITERATURA CITADA

- Alanís-Garza PA, Becerra-Moreno A, Mora-Nieves JL, Mora-Mora JP, Jacobo-Velázquez DA. **2015**. Effect of industrial freezing on the stability of chemopreventive compounds in broccoli. *International Journal of Food Sciences and Nutrition* **66**, 282-288
- Álvarez-Parrilla E, Palos R, de la Rosa L.A., Frontana-Urbe BA, González-Aguilar GA, Machi L, Ayala-Zavala JF. **2010**. Formation of Two 1:1 Chlorogenic Acid: β -cyclodextrin Complexes at pH 5: Spectroscopic, Thermodynamic and Voltammetric study. *Journal of the Mexican Chemical Society* **54**, 103-110
- Ambriz-Pérez DL, Leyva-López N, Gutierrez-Grijalva EP, Basilio Heredia J. **2016**. Phenolic compounds: Natural alternative in inflammation treatment. A Review. *Cogent Food & Agriculture* **2**, 1-14
- Ares AM, Nozal MJ, Bernal J. **2013**. Extraction, chemical characterization and biological activity determination of broccoli health promoting compounds. *Journal of Chromatography A* **1313**, 78-95
- Baenas N, Moreno DA, García-Viguera C. **2012**. Selecting Sprouts of Brassicaceae for Optimum Phytochemical Composition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **60**, 11409-11420.
- Baenas N, García-Viguera C, Moreno DA. **2014**. Biotic elicitors effectively increase the glucosinolates content in Brassicaceae sprouts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **26**, 1881-1889
- Baenas N, González-Trujano ME, Guadarrama-Enríquez O, Pellicer F, García-Viguera C, Moreno DA. **2017**. Broccoli sprouts in analgesia – preclinical *in vivo* studies. *Food & Function* **8**, 167-176
- Bellostas N, Kachlicki P, Sørensen JC, Sørensen H. **2007**. Glucosinolate profiling of seeds and sprouts of Brassica oleracea varieties used for food. *Scientia Horticulturae* **114**, 234-242
- Benyamin R, Trescot AM, Datta S, Buenaventura R, Adlaka R, Sehgal N, Glaser SE, Vallejo R. **2008**. Opioid Complications and Side Effects. *Pain Physician* **11**, 105-120
- Bertolacci L, Romeo E, Veronesi M, Magotti P, Albani C, Dionisi M, Lambruschini C, Scarpelli R, Cavalli A, De Vivo M, Piomelli D, Garau G. **2013**. A binding site for non-steroidal anti-inflammatory drugs in FAAH. *Journal of the American Chemical Society* **135**, 22-25
- Bhandari SR, Kwak JH. **2015**. Chemical Composition and Antioxidant Activity in Different Tissues of *Brassica* vegetables. *Molecules* **20**, 1228-1243
- Bones AM, Rossiter JT. **2006**. The enzymic and chemically induced decomposition of glucosinolates. *Phytochemistry* **67**, 1053-1067
- Borowski J, Szajdek A, Borowska EJ, Ciska E, Zieliński H. **2008**. Content of selected bioactive components and antioxidant properties of broccoli (*Brassica oleracea* L.) *European Food Research and Technology* **226**, 459-465
- Botting RM. **2006**. Inhibitors of cyclooxygenases: mechanisms, selectivity and uses. *Journal of Physiology and Pharmacology* **57**, 113-124
- Botting RM, Botting JH. **2011**. Non-steroidal anti-inflammatory. En *Principles of Immunopharmacology* (ed. Nijkamp FP, Parnham MJ), Springer Basel AG, Germany. 573-584
- Björkman M, Klingen I, Birch ANE, Bones AM, Bruce TJA, Johansen TJ, Meadow R, Møllmann J, Seljåsen R, Smart LE, Stewart D. **2011**. Phytochemicals of Brassicaceae in plant protection and human health – Influences of climate, environment and agronomic practice. *Phytochemistry* **72**, 538-556
- Buck PA. **1956**. Origin and taxonomy of broccoli. *Economic Botany* **10**, 250-253
- Cai C, Chen Y, Zhong S, Ji B, Wang J, Bai X, Shi G. **2014**. Anti-Inflammatory Activity of N-Butanol Extract from *Ipomoea stolonigera* In vivo and In vitro. *PLOS ONE* **9**, 1-9
- Calatayud S, Esplugues JV. **2016**. Chemistry, Pharmacodynamics, and Pharmacokinetics of NSAIDs. En *NSAIDs and Aspirin* (ed. Lanos A), Springer International Publishing, Switzerland. 17-34
- Carrillo Esper R, Lara Caldera B, Ruiz Morales J. **2010**. Hierbass, medicina herbolaria y su impacto en la práctica clínica. *Revista de Investigación Médica Sur* **23**, 124-130
- Cartea ME, Velasco P, Obregón S, Padilla G, de Haro A. **2008**. Seasonal variation in glucosinolate content in *Brassica oleracea* crops grown in northwestern Spain. *Phytochemistry* **69**, 403-410
- Cayman Chemical. **2017**. Safety Data Sheet L-Sulforaphane.

- Cencic A, Chingwaru W. **2010**. The Role of Functional Foods, Nutraceuticals, and Food Supplements in Intestinal Health. *Nutrients* **2**, 611-625
- Cervellin G, Mora R, Ticinesi A, Meschi T, Comelli I, Catena F, Lippi G. **2016**. Epidemiology and outcomes of acute abdominal pain in a large urban Emergency Department: retrospective analysis of 5,340 cases. *Annals of Translational Medicine* **4**, 1-8
- Chauhan B, Kumar G, Kalam N, Ansari SH. **2013**. Current concepts and prospects of herbal nutraceutical: A review. *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research* **4**, 4-8
- Cheah M, Fawcett JW, Andrews MR. **2017**. Assessment of Thermal Pain Sensation in Rats and Mice Using the Hargreaves Test. *Bio-Protocol*. **7**, 1-13
- Chen L, Yang G, Grosser T. **2013**. Prostanoids and inflammatory pain. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators* **104-105**, 58-66
- Christie MJ. **2008**. Cellular neuroadaptations to chronic opioids: tolerance, withdrawal and addiction. *British Journal of Pharmacology* **154**, 384-396
- Cipolla BG, Mandron E, Lefort JM, Coadou Y, Della Negra E, Corbel L, Le Scodan R, Azzouzi AB, Mottet N. **2015**. Effect of sulforaphane in men with biochemical recurrence after radical prostatectomy. *Cancer Prevention Research* **8**, 712-719
- Collier HOJ, Dinneen LC, Johnson CA, Schneider S. **1968**. The abdominal constriction response and its suppression by analgesic drugs in the mouse. *British Journal of Pharmacology and Chemotherapy* **32**, 295-310
- Cordell WH, Keene KK, Giles BK, Jones JB, Jones JH, Brizendine EJ. **2002**. The High Prevalence of Pain in Emergency Medical Care. *American Journal of Emergency Medicine* **20**, 165-169
- Cornelis MC, El-Sohemy A, Campos H. **2007**. GSTT1 genotype modifies the association between cruciferous vegetable intake and the risk of myocardial infarction. *American Journal of Clinical Nutrition* **86**, 752-758
- Costigan M, Woolf CJ. **2000**. Pain: molecular mechanisms. *The Journal of Pain* **1**, 35-44
- Couvreur TLP, Franzke A, Al-Shehbaz IA, Bakker FT, Koch MA, Mummenhoff. **2010**. Molecular Phylogenetics, Temporal Diversification, and Principles of Evolution in the Mustard Family (Brassicaceae). *Molecular Biology and Evolution* **27**, 55-71
- Covarrubias-Gómez A. **2008**. Las clínicas del dolor en México. *Revista Mexicana de Anestesiología* **31**, 66-70
- Covarrubias-Gómez A, Guevara-López U, Gutiérrez-Salmerón C, Betancourt-Sandoval JA, Córdova-Domínguez JA. **2010**. Epidemiología del dolor crónico en México. *Revista Mexicana de Anestesiología* **33**, 207-213
- Cramer JM, Jeffery EH. **2011**. Sulforaphane absorption and excretion following ingestion of a semi-purified broccoli powder rich in glucoraphanin and broccoli sprouts in healthy men. *Nutrition and Cancer* **63**, 196-201
- Cristians S, Bye R, Navarrete A, Mata R. **2013**. Gastroprotective effect of *Hintonia latiflora* and *Hintonia standleyana* aqueous extracts and compounds. *Journal of Ethnopharmacology* **145**, 530-535
- Danesh E, Khatamsaz S, Shojaeifard M, Khabbaz Z. **2014**. Effects of hydro-alcoholic extract of broccoli (*Brassica oleracea*) on sensory threshold of pain using the formalin test in adult male rats. *Journal of Biology and Today's World* **3**, 147-151
- De Figueiredo Toledo MC, Lajolo FM. **2008**. Supplements and Functional Foods Legislation in Brazil. En *Nutraceutical and Functional Food Regulations* (ed. Bagchi D), Academic Press, Estados Unidos de América, 349-364
- Dinkova-Kostova AT, Kostov RV. **2012**. Glucosinolates and isothiocyanates in health and disease. *Trends in Molecular Medicine* **18**, 337-347
- dos Santos MD, Almeida MC, Lopez NP, de Souza GEP. **2006**. Evaluation of the Anti-inflammatory, Analgesic and Antipyretic Activities of the Natural Polyphenol Chlorogenic Acid. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* **29**, 2236-2240
- Domínguez-Perles R, Medina S, Moreno DA, García-Viguera C, Ferreres F, Gil-Izquierdo Á. **2014**. A new ultra-rapid UHPLC/MS/MS method for assessing glucoraphanin and sulforaphane bioavailability in human urine. *Food Chemistry* **143**, 132-138
- Domitrović R, Cvijanović O, Šušnić V, Katalinić N. **2014**. Renoprotective mechanisms of chlorogenic acid in cisplatin-induced kidney injury. *Toxicology* **324**, 98-107
- Dubuisson D, Dennis SG. **1977**. The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats. *Pain* **4**, 161-174
- Fahey JW, Zalcman AT, Talalay P. **2001**. The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants. *Phytochemistry* **56**, 5-51

- Federal Food, Drug, and Cosmetic Act. **2017**. Sec. 413. 21 [U.S.C. 350b]
- Folkard DL, Marlow G, Mithen RF, Ferguson LR. **2015**. Effect of sulforaphane on NOD2 via NF- κ B: implications for Crohn's disease. *Journal of Inflammation* **12**, 1-6
- Fornasari D. **2014**. Pain pharmacology: focus on opioids. *Clinical Cases in Mineral and Bone Metabolism* **11**, 165-168
- Fowke JH, Chung FL, Jin F, Qi D, Cai Q, Conoway C, Cheng JR, Shu CX, Gao YT y Zheng W. **2003**. Urinary isothiocyanate levels, Brassica, and human breast cancer. *Cancer research* **63**, 3980-3986
- Fuentes F, Paredes-González X, Tony Kong AN. **2015**. Dietary glucosinolates sulforaphane, phenethyl isothiocyanate, indole-3-carbinol/3,3'-diindolylmethane: anti-oxidative stress/inflammation, Nrf2, epigenetics/epigenomics and in vivo cancer chemopreventive efficacy. *Current Pharmacology Reports* **1**, 179-196
- García-Rodríguez LA y Hernández-Díaz S. **2004**. Risk of uncomplicated peptic ulcer among users of aspirin and nonaspirin nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *American Journal of Epidemiology* **159**, 23-31.
- Gebhart GF, Basbaum AI, Bird SJ, Flecknell P, Goodly LJ, Karas AZ, Kelley ST, Lacher J, Mason G, Sneddon LU, Soriano SG. **2009**. Appendix A. Models of pain. *Recognition and Alleviation of Pain in Laboratory Animals. National Academies of Sciences*, 143-158
- Ghildiyal S, Gautam MK, Joshi V, Goel RK. **2013**. Anti-inflammatory activity of two classical formulations of Laghupanchamula in rats. *Journal of Ayurveda & Integrative Medicine* **4**, 23-27
- González MC, Ospina LF, Calle J y Rincón J. **2007**. Evaluación de extractos y fracciones de plantas colombianas en modelos de inflamación aguda, subcrónica y crónica. *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas* **36**, 166-174
- González-Ramírez A, González-Trujano ME, Pellicer F, López-Muñoz FJ. **2012**. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of the *Agastache Mexicana* extracts by using several experimental models in rodents. *Journal of Ethnopharmacology* **142**, 700-705
- Grace PM, Hutchinson MR, Maier SF, Watkins LR. **2014**. Pathological pain and the neuroimmune interface. *Nature Reviews Immunology* **14**, 217-231.
- Gray AR. **1982**. Taxonomy and evolution of Broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*). *Economic Botany* **36**, 397-410
- Griego JM, Gómez MP, Gomezese OF, Cadavid AM, Yepes CJ, Mayungo T, Acosta-Reyes J, Meléndez HJ, López JJ, Chaparro LE, Cifuentes LF. **2016**. Adaptación colombiana de las guías de neuroestimulación espinal en el manejo del dolor crónico e isquémico. *Revista Colombiana de Anestesiología* **44**, 334-340
- Guaádaoui A. **2018**. Recent Advances in Bioactivities of Common Food Biocompoundactives. En *Fruit and Vegetable Phytochemicals: Chemistry and Human Health* (ed. E.M. Yahia), John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK. 541-593
- Hall CS. **1934**. Emotional behavior in the rat. I. Defecation and urination as measures of individual differences in emotionality. *Journal of Comparative Psychology* **18**, 385-403
- Halkier BA, Gershenzon J. **2006**. Biology and Biochemistry of Glucosinolates. *Annual Review of Plant Biology* **57**, 303-333
- Hämääläinen M, Nieminen R, Vuorela P, Heinonen M, Moilanen E. **2007**. Anti-inflammatory effects of flavonoids: genistein, kaempferol, quercetin, and daidzein inhibit STAT-1 and NF- κ B activations, whereas flavone, isorhamnetin, narigenin, and pelargonidin inhibitory effect on iNOs expression and NO production in activated macrophages. *Mediators of Inflammation* **2007**, 1-10
- Hara K, Haranishi Y, Kataoka K, Takahashi Y, Terada T, Nakamura M, Sata T. **2014**. Chlorogenic acid administered intrathecally alleviates mechanical and cold hyperalgesia in a rat neuropathic pain model. *European Journal of Pharmacology* **723**, 459-464
- Hargreaves K, Dubner R, Brown F, Flores C y Joris J. **1988**. A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. *Pain* **32**, 77-88
- Harkouk H, Pares F, Daoudi K, Fletcher D. **2018**. Farmacología de los opioides. *EMC – Anestesia-Reanimación* **44**, 1-24
- Hasan MY, Al-Mahamud R, Rahman S, Ahmad I, Rahmatullah M. **2015**. A preliminary report on antihyperglycemic and analgesic properties of methanol extract of *Brassica oleracea* L. var. *italica* sprouts. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* **4**, 225-234
- Hasselström J, Liu-Palmgren J, Rasjö-Wrååk G. **2002**. Prevalence of pain in general practice. *European Journal of Pain* **6**, 375-385

- Health Canada. **1998**. Nutraceutical/Functional foods and Health Claims on Foods. *Therapeutic Products Programme and the Food Directorate from the Health Protection Branch*. 1-29
- Heiss E, Herhaus C, Klimo K, Bartsch H, Gerhäuser C. **2001**. Nuclear factor κ B is a molecular target for sulforaphane-mediated anti-inflammatory mechanisms. *The Journal of Biological Chemistry* **276**, 32008-32015
- Henschke N, Kamper SJ, Maher CG. **2015**. The Epidemiology and Economic Consequences of Pain. *Mayo Clinic Proceedings* **90**, 139-147
- Hernández-León A, González-Trujano ME, Fernández-Guasti A. **2017**. The anxiolytic-like effect of rutin in rats involves GABA_A receptors in the basolateral amygdala. *Behavioural pharmacology* **28**, 303-312.
- Hetcher D. **2011**. Pharmacologie des opioïdes. EMC (Elsevier Masson SAS, Paris), *Anesthésie-Réanimation*, 36-371-A-10
- Hiller KO, Zetler G. **1996**. Neuropharmacological Studies on Ethanol Extracts of *Valeriana officinalis* L.: Behavioural and Anticonvulsant Properties. *Phytotherapy Research* **10**, 145-151.
- Hinz B, Brune K. **2004**. Perspectives and Clinical Significance of Eicosanoids in Pain and Inflammation. En *The Eicosanoids* (ed. Curtis-Prior P), John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK. 321-325
- Hogan Q. **2002**. Animal Pain Models. *Regional Anesthesia and Pain Medicine* **27**, 385-401
- Hussain T, Tan B, Win W, Blachier F, Tossou MCB, Rahu N. **2016**. Oxidative Stress and Inflammation: What Polyphenols Can Do for Us? *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* **2016**, 1-9
- Ishida M, Hara M, Fukino N, Kakizaki T, Morimitsu Y. **2014**. Glucosinolate metabolism, functionality and breeding for the improvement of Brassicaceae vegetables. *Breeding Science* **64**, 48-59
- Jakaria A, Ahmed H, Hossain N, Rahman S, Hossain S, Rahman M, Rahmatullah M. **2015**. Analgesic activity of boiled and non-boiled *Brassica oleracea* L. var. *gongylodes* swollen stems. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* **4**, 106-112.
- Jaramillo JE, Díaz CA. **2006**. El cultivo de las Crucíferas. Brócoli, Coliflor, Repollo, Col China. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria
- Julius D, Basbaum AI. **2001**. Molecular mechanisms of nociception. *Nature* **413**, 203-210
- Kiguchi N, Kobayashi D, Saika F, Matsuzaki S, Kishioka S. **2017**. Pharmacologic Regulation of Neuropathic Pain Driven by Inflammatory Macrophages. *International Journal of Molecular Sciences* **18**, 1-6
- Knowles CH, Aziz Q. **2009**. Basic and clinical aspects of gastrointestinal pain. *Pain* **141**, 191-209
- Koh E, Wimalasiri KMS, Chassy AW, Mitchell AE. **2009**. Content of ascorbic acid, quercetin, kaempferol and total phenolics in commercial broccoli. *Journal of Food Composition and Analysis* **22**, 637-643
- Kumar V, Ali Bhat Z, Kumar D. **2013**. Animal models of anxiety: A comprehensive review. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* **68**, 175-183
- Kuner R. **2010**. Central mechanisms of pathological pain. *Nature medicine* **16**, 1258-1266
- Le Bars D, Gozariu M, Cadden SW. **2001**. Animal Models of Nociception. *Pharmacological Reviews* **53**, 597-652
- Latté KP, Appel KE, Lampen A. **2011**. Health benefits and possible risks of broccoli – An overview. *Food and Chemical Toxicology* **49**, 3287-3309
- Ley General de Salud. **2009**. Capítulo II. Alimentos y bebidas no Alcohólicas. Artículo 215.
- Li LF, Olsen KM. **2016**. Chapter Three – To Have and to Hold: Selection for Seed and Fruit Retention During Crop Domestication. *Current Topics in Developmental Biology* **119**, 63-109.
- Liang N, Kitts DD. **2016**. Role of Chlorogenic Acids in Controlling Oxidative and Inflammatory Stress Conditions. *Nutrients* **8**, 1-20
- Lippmann D, Lehmann C, Florian S, Barknowitz G, Haack M, Mewis I, Wiesner M, Schreiner M, Glatt H, Brigelius-Flohé R, Kipp AP. **2014**. Glucosinolates from pak choi and broccoli induce enzymes and inhibit inflammation and colon cancer differently. *Food & Function* **5**, 1073-1081
- Loeser JD, Treede RD. **2008**. The Kyoto protocol of IASP Basic Pain Terminology. *Pain* **137**, 473-477
- Lorke D. **1983**. A New Approach to Practical Acute Toxicity Testing. *Archives of Toxicology* **54**, 275-287

- Lucarini R, Bernardes WA, Ferreira DS, Tozatti MG, Furtado R, Bastos JK, Pauletti PM, Januário AH, Andrade e Silva ML, Cunha WR. **2013**. In vivo analgesic and anti-inflammatory activities of *Rosmarinus officinalis* aqueous extracts, rosmarinic acid and its acetyl ester derivative. *Pharmaceutical Biology* **51**, 1087-1090
- Ma LL, Xing GP, Yu Y, Liang H, Yu TX, Zheng WH, Lai TB. **2015**. Sulforaphane exerts neuroprotective effects via suppression of the inflammatory response in a rat model of focal cerebral ischemia. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine* **8**, 17811-17817
- Manchali S, Chidambara Murthy KN, Patil BS. **2012**. Crucial facts about health benefits of popular cruciferous vegetables. *Journal of Functional Foods* **4**, 94-106.
- Mansouri MT, Hemmati AA, Naghizadeh B, Mard SA, Rezaie A, Ghorbanzadeh B. **2015**. A study of the mechanisms underlying the anti-inflammatory effect of ellagic acid in carrageenan-induced paw. *Indian Journal of Pharmacological* **47**, 292-298
- McBeth J, Jones K. **2007**. Epidemiology of chronic musculoskeletal pain. *Best Practice & Research Clinical Rheumatology* **21**, 403-425
- McKinney WT Jr, Bunney WE Jr. **1969**. Animal model of depression: I. review of evidence: implications for research. *Archives of general psychiatry* **21**, 240-248
- Medina S, Domínguez-Perles R, Moreno DA, García-Viguera C, Ferreres F, Gil JI, Gil-Izquierdo Á. **2015**. The intake of broccoli sprouts modulates the inflammatory and vascular prostanoids but not the oxidative stress-related isoprostanes in healthy humans. *Food Chemistry* **173**, 1187-1194
- Melkinova I. **2010**. Pain market. *Nature reviews. Drug discovery* **9**, 589-590
- Merskey H. **1979**. Pain terms: a list with definitions and notes on usage. Recommended by the IASP subcommittee on taxonomy. *Pain* **6**, 249-252
- Moreira-Rodríguez M, Nair V, Benavides J, Cisneros-Zevallos L, Jacobo-Velázquez DA. **2017**. UVA, UVB Light, and Methyl Jasmonate, Alone or Combined, Redirect the Biosynthesis of Glucosinolates, Phenolics, Carotenoids, and Chlorophylls in Broccoli Sprouts. *International Journal of Molecular Sciences* **18**, 2330-2350
- Moreno DA, Carvajal M, López-Berenguer C y García-Viguera C. **2006**. Chemical and biological characterisation of nutraceutical compounds of broccoli. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **41**, 1508-1522
- Muriel C. **2008**. Dolor crónico Módulo 1. Arán Ediciones, S.L.: México, 18-23
- Murray L, Sarau H, Belmonte KE. **2004**. Eicosanoids and Algesia in Inflammation. En *The Eicosanoids* (ed. Curtis-Prior P), John Wiley & Sons, Ltd, Chinchester, UK. 333-339
- Nagakura Y. **2015**. Challenges in drug discovery for overcoming 'dysfunctional pain': and emerging category of chronic pain. *Expert Opinion on Drug Discovery* **10**, 1043-1045
- Necas J, Bartosikova L. **2013**. Carrageenan: a review. *Veterinarni Medicina* **58**, 187-205
- Negus SS, Selley De, Sim-Selley LJ. **2014**. Pharmacodynamic Tolerance. En *Encyclopedia of Psychopharmacology* (ed. Stolerman I y Price L) Springer, Berlin, Heidelberg.
- NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio
- OECD. **2001**. Acute Oral Toxicity – Acute Toxic Class Method. *OECD Guideline for testing of chemicals. Section 4: Health Effects* **423**, 1-14
- Ohl F. **2005**. Animal models of anxiety. *Anxiety and Anxiolytic Drugs* **169**, 35-69
- Organización Mundial de la Salud. **1996**. Alivio del dolor en el cáncer. 2ª ed. España
- Organización Mundial de la Salud. **2013**. Estrategia de la OMS sobre la medicina tradicional 2014-2023. Hong Kong.
- Pergolizzi JV, LeQuang JA, Berger GK, Raffa RB. **2017**. The Basic Pharmacology of Opioids Informs the Opioid Discourse about Misuse and Abuse: A Review. *Pain and Therapy* **6**, 1-16
- Pinho-Ribeiro FA, Verri WA Jr, Chiu I. **2017**. Nociceptor Sensory Neuron-Immune Interactions in Pain and Inflammation. *Trends in Immunology* **38**, 5-19.
- Pinky BRT, Banna H, Al Labib B, Al-Mahamud R, Rahman S. Rahman M, Rahmatullah M. **2015**. Analgesic activity of boiled *Brassica oleracea* L. var. *capitata* (cabbage) leaves. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* **4**, 113-119.
- Podsędek A. **2007**. Natural antioxidants and antioxidant capacity of Brassica vegetables: A review. *LWT* **40**, 1-11.
- Prut L, Belzung C. **2003**. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *European Journal of Pharmacology* **463**, 3-33
- Puebla Díaz F. **2005**. Tipos de dolor y escala terapéutica de la OMS. Dolor iatrogénico. *Oncología* **28**, 139-143

- Rahman MS, Jahan N, Rahman SMA, Rashid MA. **2015**. Analgesic and antidepressant activities of *Brassica rapa* subspecies *chinensis* (L.) Hanelt on Swiss-albino mice model. *Bangladesh Medical Research Council Bulletin* **41**, 114-120
- Rahmatullah M, Shefa TF, Hasan L, Hossain T, Ahmed S, Al Mamun A, Islam R, Rahman S, Chowdhury MH. **2010**. A study on Antinociceptive and Anti-hyperglycemic activity of methanol extract of *Brassica juncea* (L.) Czern. Leaves in mice. *Advances in Natural and Applied Sciences* **4**, 221-225.
- Rakow G. **2004**. Species Origin and Economic Importance of *Brassica*. En *Brassica. Biotechnology in Agriculture and Forestry* (ed. Pua EC, Douglas CJ), Springer International Publishing, Berlin, Heidelberg. 3-7
- Ray SD, Ray S, Zia-Ul-Haq M, De Feo V, Dewanjee S. **2015**. Pharmacological basis of the use of the root bark of *Zizyphus nummularia* Aubrev. (*Rhamnaceae*) as anti-inflammatory agent. *BMC Complementary and Alternative Medicine* **15**, 416-427
- Rahman MS, Jahan N, Rahman SMA, Rashid MA. **2015**. Analgesic and antidepressant activities of *Brassica rapa* subspecies *chinensis* (L.) Hanelt on Swiss-albino mice model. *Bangladesh Medical Research Council Bulletin* **41**, 114-120
- Redondo A, Ferreira Chamorro PA, Riego G, Leáñez S, Pol O. **2017**. Treatment with sulforaphane produces antinociception and improves morphine effects during inflammatory pain in mice. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **365**, 293-302
- Rius B, Clària J. **2016**. Principles, Mechanisms of Action, and Future Prospects of Anti-inflammatory Drugs. En *NSAIDs and Aspirin* (ed. Lanas A), Springer International Publishing, Switzerland. 17-34
- Robert A. **1979**. Cytoprotection by Prostaglandins. *Gastroenterology* **77**, 761-767
- Rodríguez MA. **2017**. Suplementos, 90 % de los productos milagro decomisados. 26 de febrero de 2017. Consultado en línea el 16 de septiembre de 2018 en la página (<https://www.eleconomista.com.mx/empresas/Suplementos-90-de-los-productos-milagro-decomisados-20170226-0083.html>)
- Rodríguez-Hernández MC, Medina S, Gil-Izquierdo A, Martínez-Ballesta M, Moreno DA. **2013**. Broccoli isothiocyanate content and *in vitro* availability according to variety and origin. *Macedonian Journal of Chemistry and Chemical Engineering* **32**, 251-264
- Ronis MJJ, Pedersen KB, Watt J. **2018**. Adverse Effects of Nutraceuticals and Dietary and Dietary Supplements. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* **58**, 24.1-24.19
- Rose JD, Woodbury CJ. **2008**. Animal Models of Nociception and Pain. En *Sourcebook of Models for Biomedical Research*, 333-339
- Rotelli AE, Guardia T, Juárez AO, de la Rocha NE, Pelzer LE. **2003**. Comparative study of flavonoids in experimental models of inflammation. *Pharmacological Research* **48**, 601-606
- Rybarczyk-Plonska A, Hagen SF, Borge GIA, Bengtsson GB, Hansen MK, Wold AB. **2016**. Glucosinolates in broccoli (*Brassica oleracea* L. var. *italica*) as affected by postharvest temperature and radiation treatments. *Postharvest Biology and Technology* **116**, 16-25
- Sánchez-Fernández C, Montilla-García Á, González-Cano R, Nieto FR, Romero L, Artacho-Cordón A, Montes R, Fernández-Pastor B, Merlos M, Baeyens JM, Entrena JM, Cobos EJ. **2013**. Modulation of Peripheral μ -Opioid Analgesia by σ_1 Receptors. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **348**, 32-45
- Santini A, Tenore GC, Novellino E. **2017**. Nutraceuticals: a paradigm of proactive medicine. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **96**, 53-61
- Sayyah M, Hadidi N, Kamalinejad M. **2004**. Analgesic and anti-inflammatory activity of *Lactuca sativa* seed extract in rats. *Journal of Ethnopharmacology* **92**, 325-329.
- Shah MA, Sarker MMR, Goussudin M. **2016**. Toxicity Study of *Brassica oleracea* var. *italica* Extracts in Sprague Dawley (SD) rats. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research* **8**, 735-741
- Shahidi F. **2012**. Nutraceuticals, Functional Foods and Dietary Supplements in Health and Disease. *Journal of Food and Drug Analysis* **20**, 226-230
- Singh K, Connors SL, Macklin EA, Smith KD, Fahey JW, Talalay P, Zimmerman AW. **2014**. Sulforaphane treatment of autism spectrum disorder (ASD). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **43**, 15550-15555
- Socala K, Nieoczym D, Kowalczyk-Vasilev E, Wyska E, Wlaź P. **2017**. Increased seizure susceptibility and other toxicity symptoms following acute sulforaphane treatment in mice. *Toxicology and Applied Pharmacology* **326**, 43-53
- Speciali JG, Pereira Fleming, Fortini I. **2016**. Primary headaches: dysfunctional pains. Cefaleias primárias: dores disfuncionais. *Revista Dor* **17**, 72-74

- Stein C, K uchler S. **2012**. Non-Analgesic Effects of Opioids: Peripheral Opioid Effects on Inflammation and Wound Healing. *Current Pharmaceutical Design* **18**, 6053-6069
- Taiyan Z, Lianli L, Guaung Y y Al-Shehbaz I. **2001**. Brassicaceae (Cruciferae). *Flora of China* **8**, 20.
- Tanaka S, Guth PH, Carryl OR y Kautnitz JD. **1997**. Cytoprotective effect of bismuth subsalicylate in indomethacin-treated rats is associated with enhanced mucus bismuth concentration. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* **11**, 605-612
- Tatiya AU, Saluja AK, Kalaskar MG, Surana SJ, Patil PH. **2017**. Evaluation of analgesic and anti-inflammatory activity of *Bridelia retusa* (Spreng) bark. *Journal of Traditional and Complementary Medicine* **7**, 441-451
- Tolba R, Shroll J, Kanu A, Rizk MK. **2015**. The Epidemiologic of Chronic Abdominal Pain. . En *Chronic Abdominal Pain* (ed. Kapural L), Springer-Verlag, New York. 13-24
- Tj olsen A, Berge OG, Hunnskaar S, Rosland JH y Hole K. **1992**. The formalin test: an evaluation of the method. *Pain* **51**, 5-17
- Unión Europea. **2015**. Reglamento (UE) 2015/2283 del Parlamento Europeo y del Consejo de 25 de noviembre de 2015. Diario Oficial de la Unión Europea del 25 de noviembre de 2015. Consultado en línea el 25 de octubre de 2017 en la página (<http://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/PDF/?uri=CELEX:32015R2283&from=ES>)
- Van Eylen D, Bellostas N, Strobel BW, Oey I, Hendrickx M, Van Loey A, S rensen H, S rensen JC. **2009**. Influence of pressure/temperature treatments on glucosinolato conversion in broccoli (*Brassica oleraceae* L. cv *Italica*) heads. *Food Chemistry* **112**, 646-653
- Verma S, Singh SP. **2008**. Current and future status of herbal medicines. *Veterinary World* **1**, 347-350
- Vijayan R. **2015**. Drugs for Management of Pain. En *Pharmacological Basis of Acute Care* (ed. Kuen Chan Y, Peng Ng K y Si Mui Sim D), Springer International Publishing, Switzerland, 153
- Wagner AE, Terschluessen AM, Rimbach G. **2013**. Health promoting effects of Brassica-derived phytochemicals: from chemopreventive and anti-inflammatory activities to epigenetic regulation. *Oxidative Medicine Cellular Longevity* **2013**, 1-12
- Wang C, Wang C. **2017**. Anti-nociceptive and anti-inflammatory actions of sulforaphane in chronic constriction injury-induced neuropathic pain mice. *Inflammopharmacology* **25**, 99-106
- Warwick SI. **2011**. Brassicaceae in Agriculture. En *Genetics and Genomics of the Brassicaceae* (ed. Schmidt R, Bancroft I), Springer, New York, NY. 33-65
- Winkelstein BA. **2004**. Mechanisms of central sensitization, neuroimmunology & injury biomechanics in persistent pain: implications for musculoskeletal disorders. *Journal of Electromyography and Kinesiology* **14**, 87-93
- Winter CA, Risley EA y Nuss GW. **1962**. Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for antiinflammatory drugs. *Experimental Biology and Medicine* **111**, 544-547
- Wong SH, Chan FKL. **2016**. Adverse Effects of NSAIDs in the Gastrointestinal Tract: Risk Factors of Gastrointestinal Toxicity with NSAIDs. En *NSAIDs and Aspirin* (ed. Lanas A), Springer International Publishing, Switzerland. 45-59
- Woolf CJ. **2010**. What is this thing called pain? *The Journal of Clinical Investigation* **120**, 3742-3744
- World Health Organization. **2012**. WHO guidelines on the pharmacological treatment of persisting pain in children with medical illnesses. WHO: Switzerland. 16-25
- Wu S, Gao Q, Zhao P, Gao Y, Xi Y, Wang X, Liang Y, Shi H, Ma Y. **2016**. Sulforaphane produces antidepressant- and anxiolytic- like effects in adult mice. *Behavioural Brain Research* **301**, 55-62
- Xu Q, Yaksh L. **2011**. A brief comparison of the pathophysiology of inflammatory versus neuropathic pain. *Current Opinion in Anaesthesiology* **24**, 400-407
- Yamamoto T, Nozaki-Taguchi N. **2002**. The Role of Cyclooxygenase-1 and -2 in the Rat Formalin Test. *Anesthesia & Analgesia* **94**, 962-967
- Yang G, Yeon SH, Lee HE, Kang HC, Cho YY, Lee HS, Lee JY. **2018**. Suppression of NLRP3 inflammasome by oral treatment with sulforaphane alleviates acute gouty inflammation. *Rheumatology* **57**, 727-736
- Yun KJ, Koh DJ, Kim SH, Park SJ, Ryu JH, Kim DG, Lee JY, Lee KT. **2008**. Anti-Inflammatory Effects of Sinapic Acid through the Suppression of inducible Nitric Oxide Synthase, Cyclooxygenase-2, and Proinflammatory Cytokines Expressions via Nuclear Factor- B inactivation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **56**, 10265-10272

- Zhang JM, An J. **2007**. Cytokines, Inflammation and Pain. *International Anesthesiology Clinics* **45**, 27-37
- Zhou Y, Yang H, Li Y, Lynch B, Jia X. **2015**. Broccoli seed extract: Genotoxicity and subchronic toxicity studies. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* **73**, 442-451
- Zimmermann M. **1983**. Ethical Guidelines for Investigations of Experimental Pain in Conscious Animals. *Pain* **16**, 109-110.
- Zukalová H, Vašák J. **2002**. The role and effects of glucosinolates of *Brassica* species – a review. *Rostlinná Výroba* **48**, 175-180

ANEXO A

Obtención de extractos acuosos de *Brassica oleracea* var. *italica*

Las semillas de brócoli se adquirieron con Intersemillas S.A. (Valencia, España). Las semillas se lavaron con disolución de hipoclorito de sodio al 0.5 % durante dos horas y se enjuagaron con agua tipo Milli-Q, luego se airearon por 24 h (Baenas *et al.*, 2014; Baenas *et al.*, 2017). Después los diferentes extractos se obtuvieron bajo el siguiente procedimiento (Fig. 24):

Extracto acuoso de semillas (EAS)

Las semillas se congelaron en nitrógeno líquido, se liofilizaron y se molieron hasta obtener un polvo fino. Se resuspendió 1.6 g del polvo en 50 mL de agua Milli-Q y se dejó en reposo durante una noche a temperatura ambiente. El extracto obtenido se decantó y congeló para posterior liofilizado (Cramer y Jeffery, 2011; Baenas *et al.*, 2017).

Extracto acuoso de brotes (EAB)

Para obtener los brotes, las semillas lavadas fueron germinadas en cámara oscura a 28 °C durante dos días. Los germinados se transfirieron a una cámara de cultivo en ciclo de 16 h de luz y 8 h de oscuridad a las temperaturas de 25 °C y 20 °C durante 6 días. La humedad relativa de la cámara fue del 60 % (día) y 80 % (noche) y la radiación fotosintéticamente activa (RFA) de 400 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$. Dicha radiación se controló mediante tubos fluorescentes (Phillips TLD 36 W / 83, Hamburgo, Alemania; Sylvania F36W / GRO, Danvers, MA, EE.UU.) y lámparas de halogenuros metálicos (Osram HQI.T 400 W, Munich, Alemania). La fitoinducción se realizó mediante la aspersion de metiljasmonato (MeJa) (250 μM) una vez al día en los cotiledones, cuatro días antes de la cosecha. Los brotes colectados se congelaron en nitrógeno líquido, se liofilizaron y se molieron hasta obtener polvo fino. Se resuspendió 1.6 g de polvo en 50 mL de agua Milli-Q y se dejó reposar durante una noche a temperatura ambiente. El extracto obtenido se filtró y congeló para su posterior liofilizado (Cramer y Jeffery, 2011; Baenas *et al.*, 2017).

Extracto acuoso de vegetal maduro (EAV)

Para obtener el vegetal maduro, las semillas se cultivaron durante 4 días sobre celulosa en la cámara de cultivo controlada (similar a los brotes) y las plántulas se trasplantaron a contenedores de cultivo hidropónico (15 L) en solución nutritiva de Hoagland, la cual se cambió cada día. Tras 24 días en cultivo hidropónico, las plantas se trasplantaron al campo con densidad de cultivo de 2 plantas por metro cuadrado y se utilizó la misma solución para el riego. Dicho campo está en la finca experimental situada en la zona semiárida de la pedanía La Matanza, municipio de Santomera, Murcia, España (latitud 38°06'N; 1°02'O). La temperatura de cultivo fue de 2–10 °C (mínima) y 18–20 °C (máxima), la humedad relativa de 70–100 % (máxima) y 20–40 % (mínima), la RFA 1000 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ durante los primeros 43 días y 500 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ desde el día 44 al 72 y se incrementó a 1500 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ el día 72. Las plantas se recogieron el día 95, es decir que se obtuvo material de 120 días. El material vegetal se cortó y se congeló en nitrógeno líquido, se liofilizó y se molió para obtener un polvo fino. Después, 1.6 g del polvo se resuspendieron en 50 mL de agua Milli-Q durante una noche a temperatura ambiente. El extracto obtenido fue filtrado y se congeló para ser liofilizado (Cramer y Jeffery, 2011; Rodríguez-Hernández *et al.*, 2013).

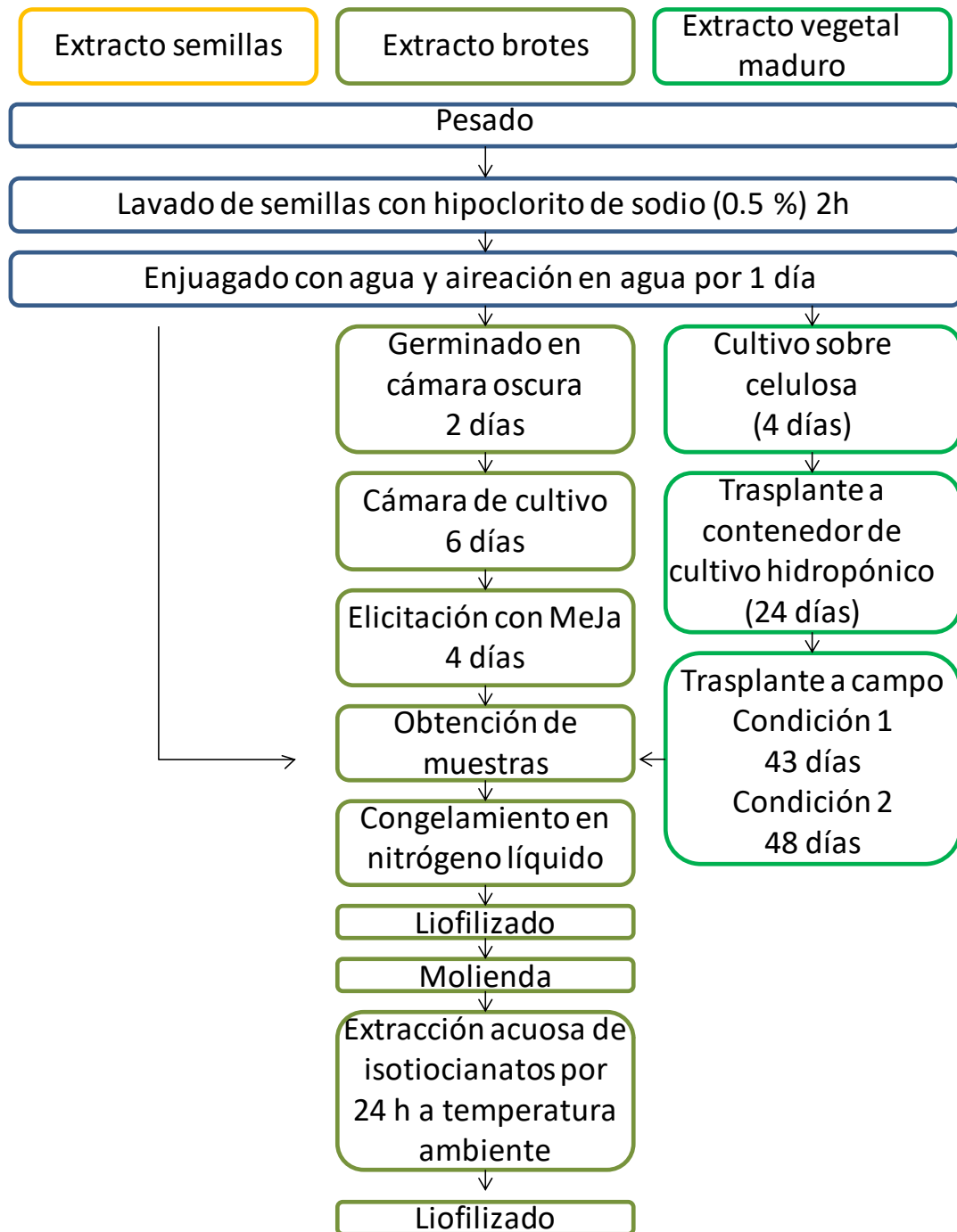


Figura 24. Secuencia de pasos para la obtención de los extractos acuosos de *B. oleracea* var. *italica*

Extracción y cuantificación de compuestos fenólicos y sulforafano

Muestras de 100 mg de cada extracto acuoso liofilizados se extrajeron con 1.5 mL de solución hidrometanólica al 70 %, fueron sonicadas y después calentadas a 70 °C por 30 min con agitación cada 5 min. Posteriormente, las muestras fueron centrifugadas durante 30 min, a 4 °C y 17500 × g. Los sobrenadantes se colectaron y el metanol se removió con un rotaevaporador. El material seco se disolvió en agua ultra pura y se filtró a través de la membrana Millex-HV13 de 0.45 µm, según los métodos reportados por Baenas y colaboradores (2012; 2014). Los derivados del ácido cafeoilquínico fueron cuantificados como ácido clorogénico (ácido 5-cafeoilquínico; Sigma-Aldrich), flavonoides como quercetina (quercetina 3-rutinósido; Sigma-Aldrich) y derivados del ácido sinápico como el propio ácido sinápico (Sigma-Aldrich). En el caso del isotiocianato, el estándar utilizado fue sulforafano (Cayman-Chemical).

La cuantificación de polifenoles se realizó mediante HPLC-PDA (Agilent HPLC 1200) en la columna Luna C18 100A (150 × 1.0 mm, tamaño de partícula de 3 µm; Phenomenex, Macclesfield, U.K.). La fases A y B fueron agua: ácido fórmico (99:1) y acetonitrilo, respectivamente, con la velocidad de flujo de 20 µL/min. El gradiente inició con 1 % de fase B, hasta alcanzar el 17 % de la fase a los 15 min hasta llegar a los 17 min, 25 % a 22 min, 35 % a 30 min, 50 % a 35 min que se mantuvo hasta 45 min. El volumen de inyección fue de 3 µL. Los cromatogramas fueron obtenidos a 227 nm (Baenas *et al.*, 2012).

El sulforafano se utilizó como estándar, bajo el método de análisis reportado por Domínguez-Perles y colaboradores (2014), cuya separación utiliza la columna ZORBAX Eclipse Plus C-18 Rapid Resolution HD (2.1 × 50 mm, partícula de 1.8 µm) (Agilent Technologies). Las fases móviles utilizadas fueron el disolvente A: acetato de amonio, 13 mM (pH= 4 con ácido acético) y disolvente B: acetonitrilo/ácido acético (99.9:0.1). El flujo fue de 0.3 mL/min y se utilizó el gradiente lineal que a continuación se indica: 12 % de fase B al inicio, 20 % al tiempo 0.20 min, 52 % al 1 min, 95 % al 2.5 min y 12 % al tiempo 2.51 min.

ANEXO B
Artículos científicos derivados de esta tesis



Broccoli sprouts produce abdominal antinociception but not spasmolytic effects like its bioactive metabolite sulforaphane



O. Guadarrama-Enríquez^{a,b}, M.E. González-Trujano^{a,*,1}, R. Ventura-Martínez^{c,1}, R. Rodríguez^c, G.E. Ángeles-López^c, R. Reyes-Chilpa^e, N. Baenas^d, D.A. Moreno^d

^a Neuropharmacology of Natural Products Laboratory, Neuroscience Research Department, National Institute of Psychiatry “Ramón de la Fuente”, Av. México-Xochimilco 101, Col. Sn Lorenzo Huipulco, 14370. México, D. F., Mexico

^b Postdegree in Biological Sciences. National Autonomous University of Mexico, Av Universidad No. 3000, Col. Ciudad Universitaria, Delegación Coyoacán, 04510 Cd. de México, México

^c Pharmacology Department, Faculty of Medicine, National Autonomous University of Mexico, Av Universidad No. 3000, Col. Ciudad Universitaria, Delegación Coyoacán, 04510 Cd. de México, Mexico

^d Phytochemistry Lab, Department of Food Science and Technology, CEBAS-CSIC, Camp de Espinardo 25, 30100 Murcia, Spain

^e Institute of Chemistry, National Autonomous University of Mexico, Av Universidad No. 3000, Col. Ciudad Universitaria, Delegación Coyoacán, 04510 Cd. de México, Mexico

ARTICLE INFO

Chemical compounds studied in this article:

Acetic acid (PubChem CID: 176)
 Calcium chloride (PubChem CID: 5284359)
 Choline chloride (PubChem CID: 6209)
 Chlorogenic acid (PubChem CID: 1794427)
 Glucose (PubChem CID: 107526)
 Hexamethonium (PubChem CID:3604)
 L-NAME (PubChem CID:39836)
 Magnesium chloride (PubChem CID: 5360315)
 Metamizole (PubChem CID: 3111)
 Monosodium phosphate (PubChem CID: 23672064)
 Naltrexone (PubChem CID: 5360515)
 Papaverine (PubChem CID: 4680)
 Potassium chloride (PubChem CID: 4873)
 Sodium bicarbonate (PubChem CID: 516892)
 Sodium chloride (PubChem CID: 5234)
 Sodium hypochlorite (PubChem CID: 23665760)
 Sulforaphane (PubChem CID:5350)
 Verapamil (PubChem CID:2520)

Keywords:

Abdominal analgesia
 Broccoli
 Opioids
 Sprouts
 Sulforaphane

ABSTRACT

Abdominal pain is a common health problem that requires efficacious and safe therapy. Broccoli is a rich source of health-promoting bioactive compounds with potential for pain therapy. However, there is a lack of scientific pharmacological evidence to support this. Our aim was to investigate the antinociceptive and spasmolytic activities of broccoli aqueous extracts from seeds, sprouts, and inflorescence, as well as some metabolites. Experiments were done using enteral and parenteral administration in an *in vivo* model of pain accompanied with an *in vitro* assay. Data established that sprouts (100 mg/kg, i.p. and 1000 mg/kg, p.o.) produced significant and major antinociceptive effect at similar or even lower doses in comparison to the seeds (125 mg/kg, i.p. and 1000 mg/kg, p.o.) and broccoli heads (250 mg/kg, i.p. and 1000 mg/kg, p.o.). These results resembled the analgesic response observed with the reference drug metamizole (80 mg/kg, i.p.). Chlorogenic acid (CA, 3, 10, 30, and 100 mg/kg, i.p.) and SFN (0.1, 1 and 10 mg/kg, i.p.) were partial responsible antinociceptive metabolites of broccoli. SFN effects involved participation of endogenous opioids, since they were inhibited in the presence of naltrexone (5 mg/kg, s.c.). In the *in vitro* assay, a significant 80% spasmolytic-like response was reached with SFN alone in comparison to 20% obtained with aqueous extracts of sprouts and seeds. Participation of calcium channels was a mechanism involved in the *in vitro* response of SFN. In conclusion, broccoli sprouts, SFN and CA are potential nutraceuticals for abdominal pain therapy.

Abbreviations: ANOVA, analysis of Variance; AUC, area under the curve; CA, chlorogenic acid; CNS, central nervous system; COX, cyclooxygenase; EC₅₀, effective concentration 50; DW, dry weight; GLS, glucosinolates; K-B, Krebs-Bicarbonate; MJ, methyl Jasmonate; NTX, naltrexone; NF-κB, nuclear factor kappa B; NOS, nitric-oxide synthase; NSAIDs, nonsteroidal antiinflammatory drugs; PAR, photosynthetically active radiation; SEM, standard error of the mean; SFN, sulforaphane; TNF-α, tumor necrosis factor-α

* Corresponding author at: National Institute of Psychiatry “Ramón de la Fuente”, Av. México-Xochimilco No. 101, Col. San Lorenzo Huipulco, Delegación Tlalpan 14370, Ciudad de México, Mexico.

E-mail address: evag@imp.edu.mx (M.E. González-Trujano).

¹ These authors contribute equally.

<https://doi.org/10.1016/j.bioph.2018.09.010>

Received 16 May 2018; Received in revised form 22 August 2018; Accepted 3 September 2018

0753-3322/ © 2018 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

1. Introduction

Abdominal pain is one of the most common reasons for presentation to outpatient and inpatient gastrointestinal clinics and leads to substantial health care costs. Both organic and functional disorders of the gastrointestinal tract can cause abdominal pain, but it may arise from any system, including the genitourinary, gastrointestinal, and gynecologic tracts. The acute abdominal pain, usually of short duration with a maximum no longer than 5 days and also known as pain of non-traumatic origin, is one of the most common symptoms that often causes the population to attend medical care [1].

Although analgesic medication produces different levels of efficacy, the adverse effects observed in the most used pharmacological treatments like non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and opioids, or even steroidal anti-inflammatory drugs, limit getting a better quality of life of patients suffering of pain [2]. For centuries and currently, natural products from dietary supplements and traditional medicine with analgesic and anti-inflammatory properties are an option and origin of possible bioactive metabolites for pain therapy [2]. A diet rich in vegetables like species of *Brassica* have been reported to be the promising starting point for the development of functional chemopreventive and anti-inflammatory foods, food supplements, and drugs [3]. *Brassica oleracea* var. *italica* (broccoli) is a species with health promoting properties depending on the concentration of constituents such as glucosinolates [4], isothiocyanates [5], phenolics [6], as well as vitamins and minerals [7], bioactive molecules that might differ according to the vegetative stage.

Sulforaphane (SFN) is an isothiocyanate bioactive metabolite derived from glucoraphanin, an abundant glucosinolate of broccoli. It has been reported as responsible of several health benefits; for example: clinical effects against autism disorders [8], a promoter of a decrease in the serum levels of prostate antigen in prostatectomized men [9], and efficacious against *Helicobacter pylori* infection suggesting its properties for gastrointestinal diseases [10]. *In vivo* and *in vitro* experiments have established its antioxidant activity and reduced activity of the nuclear factor kappa B (NF- κ B) related to the control of inflammatory diseases [11]. It has also been involved in reduction of inflammatory cytokines like IL-1 β and TNF- α , and in the inhibition of inflammatory enzymes like iNOs and COX-2 [12].

The potential of SFN, and others compounds like chlorogenic acid (CA), has not been explored in abdominal pain. In this study, pharmacological evidence of the antinociceptive properties of broccoli aqueous extracts and bioactive metabolites were investigated in an *in vitro* and/or an *in vivo* experimental model of pain. It was found that sprouts produced better antinociceptive response than seeds and inflorescence of broccoli, where SFN and CA were partial responsible of this activity. Opioid receptors were implicated in the *in vivo* antinociceptive effect of SFN, whereas calcium channels were involved in the concentration-dependent spasmolytic activity in the *in vitro* assay.

2. Material and methods

2.1. Reactives and drugs

Metamizole (Antibióticos de México S.A. de C.V.). SFN (Cayman-Chemical Company, Michigan USA). Acetic acid (J.T. Baker, USA) was prepared at 1% solution. Acetylcholine chloride (Ach, Sigma St. Louis, Mo. USA) was dissolved in saline solution (NaCl, 0.9%). SFN was dissolved in a 4% ethanol solution before adding to the organ bath to get 1, 3.16, 5.62, and 10 μ g/mL. Papaverine (Sigma St. Louis, Mo. USA) was used as a smooth muscle relaxant drug at 1, 3, 10, and 30 μ M. The Krebs-Bicarbonate solution (K-B) used in the *in vitro* antispasmodic

evaluation was prepared as follows (mM): NaCl, 118; KCl, 4.7; CaCl₂, 2.5; MgCl₂, 1.2; NaH₂PO₄, 1.2; NaHCO₃, 25; Glucose, 11; Choline chloride, 0.3. All these compounds, chlorogenic acid (CA) and naltrexone (NTX) were purchased from Sigma (ST. Louis, Mo, USA). Potassium chloride (KCl) was bought from J.T. Baker. Drugs and extracts were prepared freshly on the day of the experiments. Control animals received the vehicle. Other drugs and extracts were dissolved in saline solution (s.s) that was used as the vehicle. Treatments were administered by oral (p.o.) or intraperitoneal (i.p.) route in a volume of 0.1 mL/10 g body weight in mice.

2.2. Plant material and preparation of the extracts

Broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) seeds were purchased from Intersemillas S.A. (Valencia Spain). For all extracts, the seeds were washed with 0.5% sodium hypochlorite solution for two hours and rinsed with Milli-Q type water, then aerated for 24 h [13]. After this step the different aqueous extracts were obtained as follows:

Seed extract. – A sample of lyophilized seeds (1.6 g) was resuspended in 50 mL Milli-Q water overnight at room temperature, then the aqueous extract obtained was frozen, ground and lyophilized again.

Sprouts extract. – The washed seeds were germinated in a dark chamber at 28 °C for two days. The germinates were transferred to culture chamber in a cycle of 16 h of light and 8 h of darkness at 25 °C and 20 °C for six days. Elicitation was induced by spreading methyl-jasmonate (MJ) (250 μ M) once daily in cotyledons, four days before harvest and its lyophilization. This powder (1.6 g) was resuspended in 50 mL of Milli-Q water overnight at room temperature and then lyophilized again [14].

Inflorescence extract. – The seeds were cultured for 4 days on cellulose in the controlled culture chamber (like shoots) and the seedlings were transplanted into containers of hydroponic culture (15L) with nutrient solution from Hoagland, which was changed every day. After 24 days in hydroponic cultivation, the plants were transplanted to the field with culture density of 2 plants per square meter and the same solution was used for irrigation. Plants were harvested on day 95, *i.e.* obtained material of 120 days and lyophilized. The inflorescence (1.6 g) was also resuspended in 50 mL of Milli-Q water overnight at room temperature and lyophilized [14,15].

Glucosinolates, phenolic compounds or SFN were identified and quantified in the seeds, sprouts, and inflorescence vegetative phase and/or in the aqueous extracts by HPLC-DAD-ESI-MSⁿ and UHPLC-QqQ-MS/MS according to previous reports [16,17] (Table 1).

2.3. Pharmacological evaluation

2.3.1. Animals

Male Swiss Webster mice (25–30 g) and adult male guinea pigs (300–400 g) obtained from our breeding facilities were used. Mice were housed 6 per cage, and guinea pigs one per cage, in a temperature-controlled room (22 \pm 2 °C) with an automatically timed cycle of 12 h light/dark (lights on 08:00–20:00). Food (Purina Chow, St. Louis, MO, USA) and water were available *ad libitum*. Experiments were performed between 07:00–14:00 h. The experimental protocol was carried out under the provisions of the Declaration of Helsinki and adhered to the local (NC12.3280.0/NC17073.0 and FM-012/2015) and National Health Ministry guidelines for the use of laboratory animals.

2.3.2. *In vivo* study for antinociceptive activity

Experimental groups consisted in at least six animals that were administered in either oral or intraperitoneal route. Treatment consisted in the aqueous extracts obtained from the seeds (125, 250, 500

Table 1
Quantification of compounds in broccoli vegetative stages of seeds, sprouts and inflorescence and in aqueous extracts.

| <i>Brassica oleracea</i> var. <i>italica</i> | | | |
|---|---------------------|---------------------|---------------------|
| Compounds (%) | Vegetative stage | | |
| | Seeds | Sprouts | Inflorescence |
| Glucosinolates (GLS) | | | |
| Glucobrassicin | 24.96 | 18.52 | 27.07 |
| Glucoraphanin | 33.76 | 37.07 | 47.23 |
| Glucosin | 5.29 | – | – |
| 4-Hydroxyglucobrassicin | 10.88 | 3.58 | 1.81 |
| Glucorucin | 25.11 | 8.02 | – |
| Glucobrassicin | – | 9.88 | 12.94 |
| 4-Methoxyglucobrassicin | – | 4.22 | 3.43 |
| Neoglucobrassicin | – | 18.71 | 7.51 |
| Total (mg/g dry weight) | 41.62 ± 4.68 | 29.51 ± 0.82 | 12.90 ± 0.48 |
| Phenolic compounds | | | |
| Chlorogenic acid derivatives | – | 5.63 | 44.83 |
| Flavonols | 4.05 | 2.39 | 22.19 |
| Sinapic acid derivatives | 95.95 | 91.97 | 32.97 |
| Total (mg/g dry weight) | 12.87 ± 0.32 | 7.10 ± 0.68 | 2.23 ± 0.18 |
| Isothiocyanates | | | |
| Sulforaphane (mg/g dry weight of aqueous extract) | 1.06 ± 0.03 | 0.22 ± 0.03 | 0.06 ± 0.004 |

Data are expressed as percentage or the mean of mg/g dry weight of three repetitions ± standard error of the mean.

and 1000 mg/kg, i.p. or 1000–2000 mg/kg, p.o.) and inflorescence (250, 500, 750 and 1000 mg/kg, i.p. or 1000–2000 mg/kg, p.o.). Both were compared to the sprouts administered at 100 mg/kg, i.p. or 1000 mg/kg, p.o. Doses of broccoli sprouts were chosen according to the previous study [14]. The bioactive metabolite SFN was tested at 0.1, 1, and 10 mg/kg, i.p., as well as CA (3, 10, 30 and 100 mg/kg, i.p.). The reference analgesic drug was metamizole (80 mg/kg, i.p.), since it can control mild-to-moderate visceral pain. Nociception was induced 30 min after treatment administration as follows:

Writhing test. This consisted of administering 1% acetic acid *via* i.p. at a volume of 10 mL/kg of corporal weight [18]. Immediately after administration of the acetic acid, latency to the stretching was measured and the number of stretches counted in periods of 5 min for a temporal course of 30 min. The area under the curve of the temporal course curves was described as a dose-response in comparison to the vehicle and metamizole responses.

To explore the participation of endogenous opioid receptors in the antinociceptive effect of SFN, an independent group of mice was administered with NTX (5 mg/kg, s.c., an opioid receptor antagonist) 15 min before the antinociceptive dosage of SFN (1 mg/kg, i.p.). Thirty min after treatment, mice were submitted to the writhing test to be compared with the effect of vehicle or SFN alone.

2.3.3. *In vitro* study for spasmolytic activity

The aqueous extract of seeds, sprouts, and inflorescence from broccoli were suspended and diluted in saline solution (0.9% NaCl) before adding to the organ bath to get 31.6, 100, 316, or 562 µg/mL. SFN was dissolved in ethanol solution (4%) before adding to the organ bath to get 1, 3.16, 5.62 and 10 µg/mL. Papaverine (1, 3, 10 and 30 µM) was used as a referenced smooth muscle relaxant, and acetylcholine (ACh) chloride were dissolved in saline solution. Drugs were freshly prepared on the day of the experiments.

Tissue preparation. – Guinea pigs were sacrificed by a blow to the base of the skull and cervical dislocation. A selected portion of the ileum (approximately 15 cm), without considering the 10 cm nearest to the ileocecal valve, was removed and placed in a Petri dish with K-B solution maintained at 37 °C and bubbled with 95% O₂ and 5% CO₂.

Intraluminal contents were flushed out with K-B solution and 2 cm segments of the portion were cut. Each segment was mounted in a 30 mL organ-bath containing K-B solution maintained at 37 °C and constantly bubbled with the mixture of O₂ and CO₂. The resting tension was fixed at 1 g. Preparations were equilibrate for 30 min under continuous superfusion (10 mL/min) of warm K-B solution, continuously bubbled with 95% O₂ and 5% CO₂ to maintain the pH at 7.4, and then stimulated with ACh (1 × 10⁻⁵ M) to ascertain their suitability. The mechanical response of the ileum was recorded with a Grass FT-03C force displacement transducer connected to a Grass 7B polygraph and computerized data acquisition system (PolyView System, version 2.5, Grass instruments).

Evaluation of the spasmolytic activity. – After stabilization for 30 min, the spasmolytic effect of the aqueous extract of seeds, sprouts and inflorescence of Broccoli, as well as SFN, were evaluated in preparations contracted with KCl (32 mM). Only preparations with at least 5-min lasting plateau contraction were used. The percentage of relaxation induced by each extract or the reference drug papaverine was calculated with the following formula [19]:

$$\% \text{ relaxation} = \frac{(\text{g of tension of KCl}) - (\text{g of tension treatment})}{(\text{g of tension of KCl})} \times 100$$

The possible mechanism of action in the spasmolytic effect of SFN was investigated by exploring the effect of L-NAME (a selective inhibitor of NO synthase, 100 µM); hexamethonium (HEXA, nicotinic cholinergic blocker, 0.5 mM), or verapamil (a calcium channel blocker, 0.1 µM) [19]. In a first set of experiments, the vehicle, L-NAME or HEXA was added to tissues after obtaining a maximal-contraction response with KCl (32 mM). Twenty min later, the calculated EC₅₀ of SFN (6 µg/mL) was added at each group of tissues. In other experiment, tissues were stabilized in Ca²⁺-free K-B solution containing EDTA (0.1 mM) for 30 min to remove intracellular calcium. Then, concentration-contraction response curves to CaCl₂ (0.05–12.5 mM) were built in the absence or presence of SFN (6 µg/mL) or verapamil (as positive control). The maximal response obtained with CaCl₂ (12.5 mM) from the cumulative concentration–response curve control (in the absence of any treatment) was taken as 100%.

2.4. Statistical analysis

Data were expressed as the mean ± standard error of the mean (SEM) of 6 repetitions as indicated in the figure legends. Temporal course curves were plotted to describe the dose-response on the effects of the aqueous extracts of broccoli compared to the vehicle group, then statistical differences were analyzed using a two-way repeated-measures analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's test, considering factors like time and treatment. The area under the curve (AUC) was obtained from the time course curves using the trapezoidal rule and represented in bars as the mean ± SEM, in this case statistical difference was analyzed by one-way analysis of variance followed by the Dunnett's or Tukey's test. The P value < 0.05 was considered as significant difference. It is important to notice that different number of asterisks was used to describe level of significance as follows: *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001, or ****P < 0.0001. Analysis was done using GraphPad Prism version 3.02 for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

3. Results

3.1. Chemical composition of the broccoli seeds, sprouts, and inflorescence

Variety of glucosinolates and phenolic compounds was detected in broccoli at different vegetative phase (mg/g dry weight). The specific glucosinolates identified are described in percentage from the total contained (Table 1). In a similar manner, phenolics compounds

(chlorogenic and sinapic acids derivatives) and flavonols are described in both, plant material and aqueous extracts (Table 1).

SFN was obtained only in the aqueous extracts of broccoli in different quantity depending on the vegetative phase (Table 1). If we considered as 100% the total presence of this isothiocyanate adding up its amount between the three vegetative phases, it would represent a minimal presence in the inflorescence, followed by the sprouts, and the major quantity would be found in the seeds aqueous extracts (See graphical abstract).

3.2. Antinociceptive effects of the broccoli aqueous extracts from the seeds, sprouts, and inflorescence

Temporal course curves show significant antinociceptive effects in the presence of the seeds (125–1000 mg/kg, i.p.) (Fig. 1A) and inflorescence (250–1000 mg/kg, i.p.) (Fig. 1B) aqueous extracts, in both cases the pharmacological response was minor in comparison to that observed with a lower dosage of the broccoli sprouts (100 mg/kg, i.p.) or metamizole (80 mg/kg, i.p.) (Fig. 1A and B).

Latency to the first writhe was significantly enhanced in the seeds in a dose-dependent manner (500 and 1000 mg/kg, i.p.) using five to 10-fold higher dosage than in the sprouts (Fig. 1C) and reaching at least two times the level of response observed in the reference drug metamizole (Fig. 1C). No changes were observed in the latency of mice receiving the inflorescence aqueous extract in comparison to the vehicle (Fig. 1C). Antinociceptive response represented in percentage of the AUC from 0 to 30 min demonstrated similar activity in either seeds or

inflorescence aqueous extracts using major doses in comparison to the effects observed with the sprouts extract and resembling the activity of metamizole (Fig. 1C and D).

Regarding the antinociceptive effects of doses of 1000 and 2000 mg/kg using oral route of administration, the temporal course curves of seeds (Fig. 2A) and inflorescence extracts (Fig. 2B) demonstrated reduced and significant inhibition in the nociception, mainly after 20 and 25 min of the induction (Fig. 2A and B). A significant and similar delay in the presence of the onset of writhes was observed in all the treatments resembling the effect of metamizole by this route of administration (Fig. 2C). In a similar manner, all the aqueous extracts showed an equivalent significant percentage of antinociceptive response *via* oral (Fig. 2D), but this effect was almost half of that observed with metamizole using *via* intraperitoneal (Fig. 2D).

Chlorogenic acid derivatives were also abundant compounds in broccoli (Table 1). In our study, CA produced a significant reduction in the nociception as observed in the temporal course curves (Fig. 3A), and in a dose-dependent manner expressed as percentage (Fig. 3B). CA reached an 80% maximal response at dosage of 30 mg/kg in comparison to the maximal efficacy obtained with metamizole (80 mg/kg) (Fig. 3A and B).

Another bioactive metabolite of broccoli was SFN (Table 1). Mice receiving lower doses of SFN than CA showed a similar significant delay in the latency to the first writhe from 0.1 (1.41 ± 0.24 min), 1 (1.4 ± 0.13 min), and 10 mg/kg (1.80 ± 0.48 min) as compared to the vehicle group (0.32 ± 0.13 min) (Fig. 4A). Antinociception, expressed as percentage, was also produced by SFN in an independent

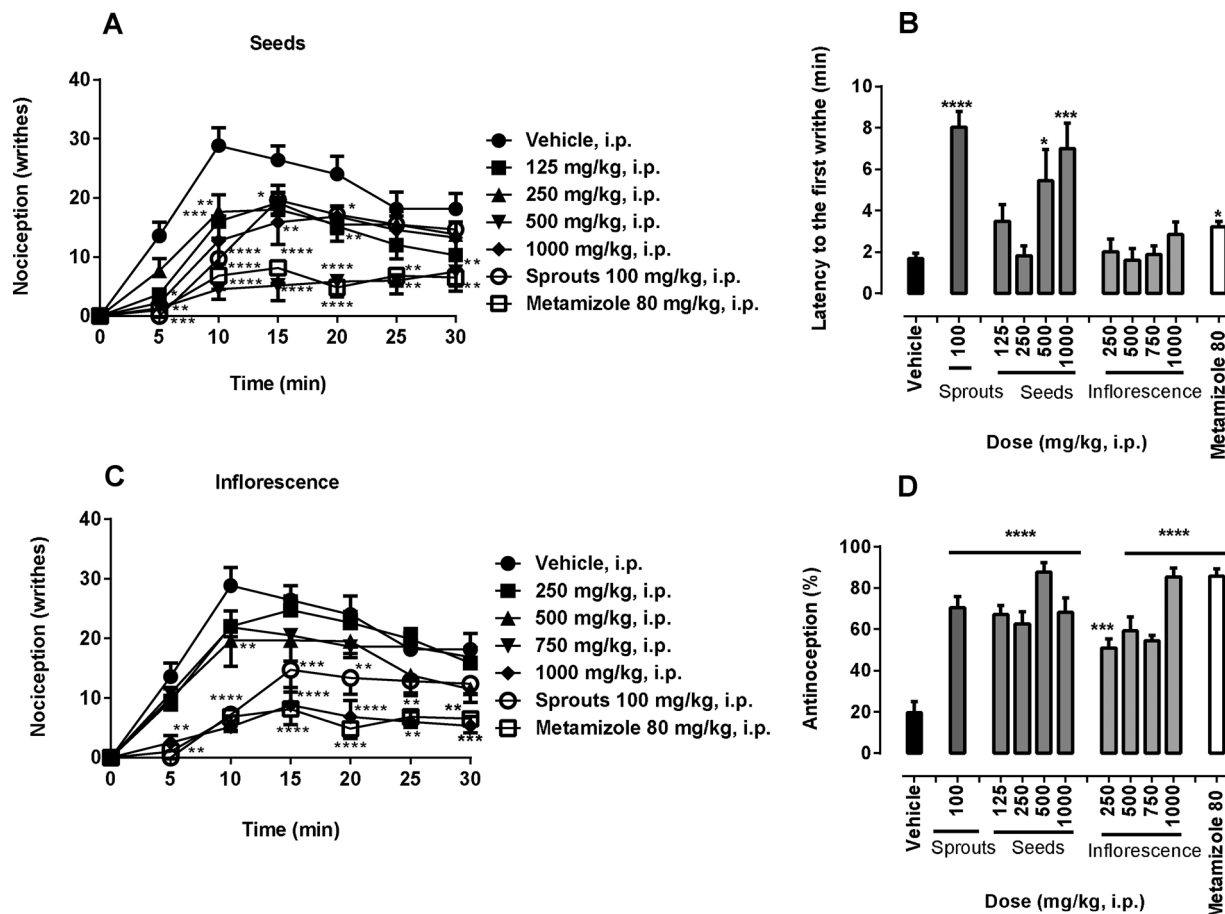


Fig. 1. Temporal course curves of the antinociceptive activity of seeds (A) and inflorescence (B) aqueous extracts at different doses in comparison to the effect of sprouts aqueous extract (100 mg/kg) of broccoli, vehicle and metamizole, as reference analgesic drug using intraperitoneal (i.p.) route of administration in mice. Latency to the first writhe induced by 1% acetic acid after 30 min of treatments (C) and antinociceptive dose-response in percentage from the AUC of temporal course curves (D). Each point or bar represents the mean ± SEM of at least 6 individuals. Treatments were compared by analysis of variance followed by the Dunnett's test. *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001, ****P < 0.0001.

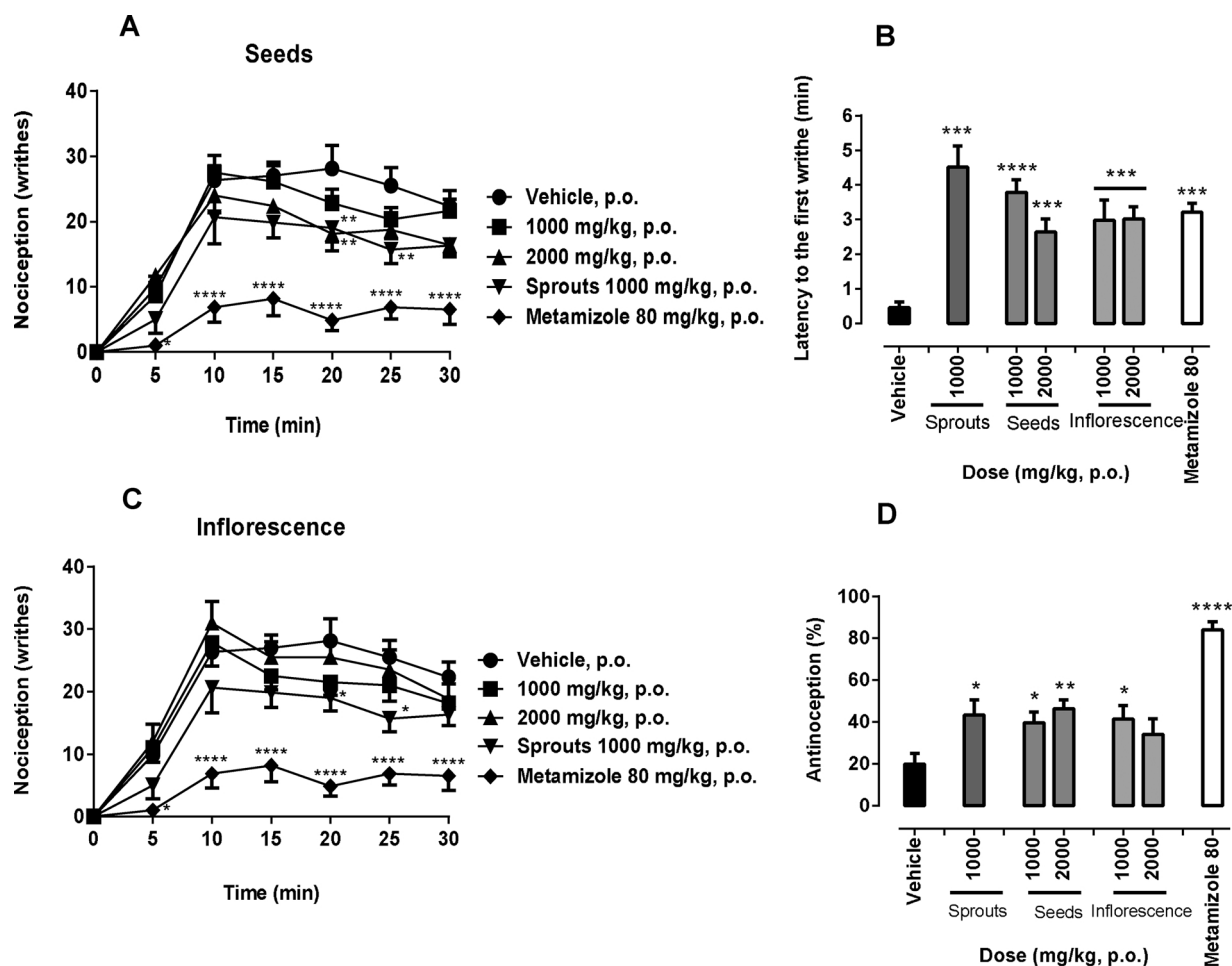


Fig. 2. Temporal course curves of the antinociceptive activity of seeds (A) and inflorescence (B) aqueous extracts at different doses in comparison to the effect of sprouts aqueous extract (1000 mg/kg) of broccoli, vehicle and metamizole, as reference analgesic drug using oral (p.o.) route of administration in mice. Latency to the first writhe induced by 1% acetic acid after 30 min of treatments (C) and antinociceptive dose-response in percentage from the AUC of temporal course curves (D). Each point or bar represents the mean \pm SEM of at least 6 individuals. Treatments were compared by analysis of variance followed by the Dunnett's test. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$.

fashion of the dose reaching at least 40% of the maximal response (Fig. 4B). Both latency and percentage of antinociception of SFN were inhibited in the presence of NTX (Fig. 4A and B).

3.3. Spasmodic effects of SFN and broccoli aqueous extracts from seeds, sprouts, and inflorescence

The seeds (562 $\mu\text{g}/\text{mL}$) induced significant relaxation (17.9 \pm 6.8%) in the tissues pre-contracted with KCl (32 mM). In the case of the sprouts, significant relaxation was obtained from 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (17.6 \pm 5.02%); this effect remained even when concentrations were increased at 316 (17.08 \pm 2.05%) and 562 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (20.93 \pm 2.43%) (Fig. 5A). Relaxant activity was also observed with the major concentration of seeds, but not in the inflorescence (Fig. 5A). Papaverine, as positive control, induced a concentration-dependent relaxation from 1 μM with statistical significance from 3 to 30 μM in comparison to the vehicle group (24.01 \pm 2.2, 64.6 \pm 4.5, 107.6 \pm 5.5% vs 0%, respectively) (Fig. 5A). Interestingly, SFN (from a minimal concentration of 3.16 $\mu\text{g}/\text{mL}$) induced significant and concentration-dependent relaxation resembling the maximal response obtained with papaverine (Fig. 5A). SFN maximal response was reached at 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (68.75 \pm 5.72%) with a calculated EC_{50} of 5.9 \pm 1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Fig. 5A).

The significant spasmodic response of SFN (36.3 \pm 4.8%) was increased in the presence of L-NAME (100 μM , 52.6 \pm 2.6%) or HEXA (0.5 mM, 61.5 \pm 3.9%) (Fig. 5B). In contrast, the maximal contractile

response of SFN was diminished in the Ca^{2+} -free medium, in a similar manner than a calcium channel blocker (verapamil), reaching a maximal response of 53.3 \pm 4.1% and 45.6 \pm 6.4%, respectively (Fig. 5C). Consequently, an increase in the EC_{50} from 1.16 \pm 0.11 mM to 6.35 \pm 1.32 mM was calculated due to the displacement to the right of the dose-response curve of SFN (Fig. 5C).

4. Discussion

It is well known that the content of possible bioactive compounds in vegetable species can change depending on different factors, among them the vegetative phase [16,17,20]. In a preliminary study, the aqueous extract of broccoli sprouts demonstrated significant and dose-dependent antinociceptive response in the writhing and formalin tests in mice and rats, respectively [14]. In this study, a comparison of the antinociceptive effect of broccoli in the aqueous extracts obtained from seeds, sprouts and inflorescence was done to know if the vegetative phase was a factor that modifies its pharmacological activity. In addition, the presence of SFN was explored as one of the possible responsible metabolites of broccoli and some mechanisms of action.

For the pharmacological evaluation, the mouse writhing test was used as the most common *in vivo* abdominal model to evaluate analgesic drugs. Writhing consisted in a behavioral nociceptive response induced by irritant substance *via* nociceptors and characterized by episodes of retraction of abdomen and stretching of hind limbs [15]. Thus,

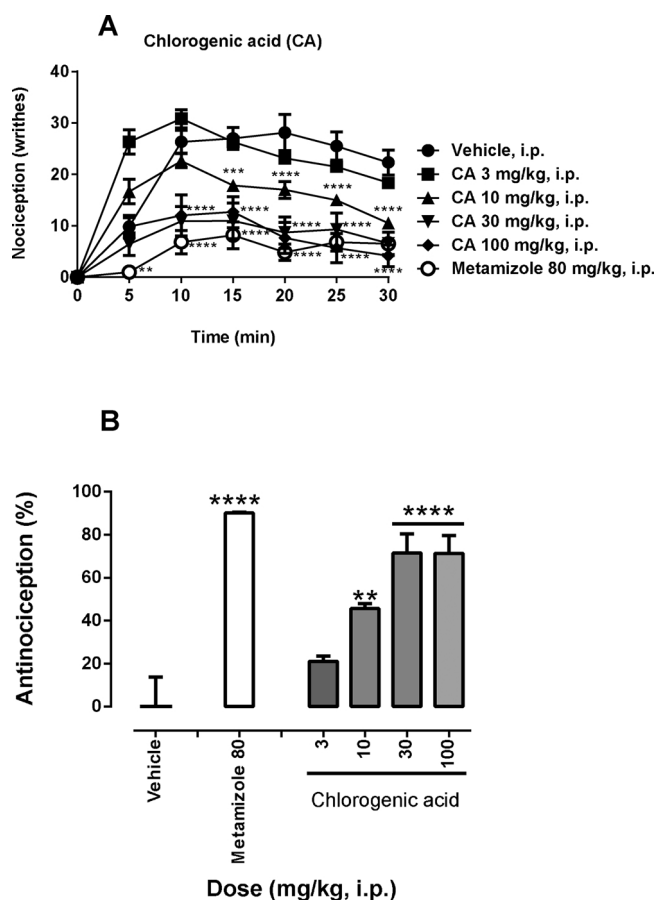


Fig. 3. Antinociceptive effect of chlorogenic acid (CA) in comparison to metamizole. Data are expressed as temporal course curves of nociception in number of writhes (A) and the percentage of antinociception obtained from the AUC (B) induced by 1% acetic acid after 30 min of treatments. Each point or bar represents the mean ± SEM of at least 6 individuals. Treatments were compared by analysis of variance followed by Tukey’s test. *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001, ****P < 0.0001.

analgesic activity was inferred due to a significant decrease in the frequency of the writhes observed in the three explored vegetative phases of broccoli, mainly in the presence of sprouts. Major activity was evidenced after administration of several doses of the seeds aqueous extract in comparison to the inflorescence, by producing not only antinociceptive response in a lower dosage but also a delay in the presence of the first writhe. However, the effects of seeds were found also in a major dosage of that observed in the antinociceptive response of the sprouts aqueous extract [14]. These data confirmed the potential antinociceptive activity of broccoli demonstrating differential level of activity depending on the vegetative phase.

The plant tissue throughout the whole food chain from grower to consumer has a vital influence on its ultimate biological role in human nutrition or health [21,22]. Bioavailability of the bioactive constituents of broccoli was influenced by its different vegetative stage and the route of administration. We observed different significance in the effectiveness of the antinociceptive effect after parenteral administration in comparison to the enteral route. In the last mentioned, all the treatments showed similar response at the higher doses tested [14]. To this respect, it is known that digestion of glucosinolates is influenced by bacterial microflora, but the myrosinase activity is the major route for the delivery of isothiocyanates like SFN [21,22]. Few studies have been reported about the antinociceptive effects of *Brassica* genus using the writhing test in mice and oral administration; for example, by preparing a methanol extract of *B. juncea* (L.) Czern. leaves [23], boiled and non-boiled stems of *B. oleracea* var. *gongylodes* [24], aqueous and methanol extracts of *B. oleracea* var. *italica* sprouts [14,25], and the whole plant of *B. rapa* var. *chinensis* [26].

To reinforce antinociceptive visceral activity of broccoli extracts and SFN, an *in vitro* study in isolated guinea pig ileum was included in the experimental design. In these experiments, SFN produced significant spasmolytic activity almost like the reference drug papaverine. In contrast, only sprouts and seeds produced a minimal relaxant effect on the tissues pre-contracted with KCl (32 mM) in comparison to none response with the inflorescence. It is known that high potassium concentration (> 30 mM) causes smooth muscle contraction through opening of L-type Ca²⁺ voltage-dependent channels, which promotes the increase in the intracellular Ca²⁺ and activation of the myosin light-chain [27,28]. Our results suggest that spasmolytic effect of SFN involves inhibition of the L-type Ca²⁺ voltage-dependent channels. It has been reported that substances reducing high K⁺-induced contraction are considered possible inhibitors of calcium influx [28] as it was

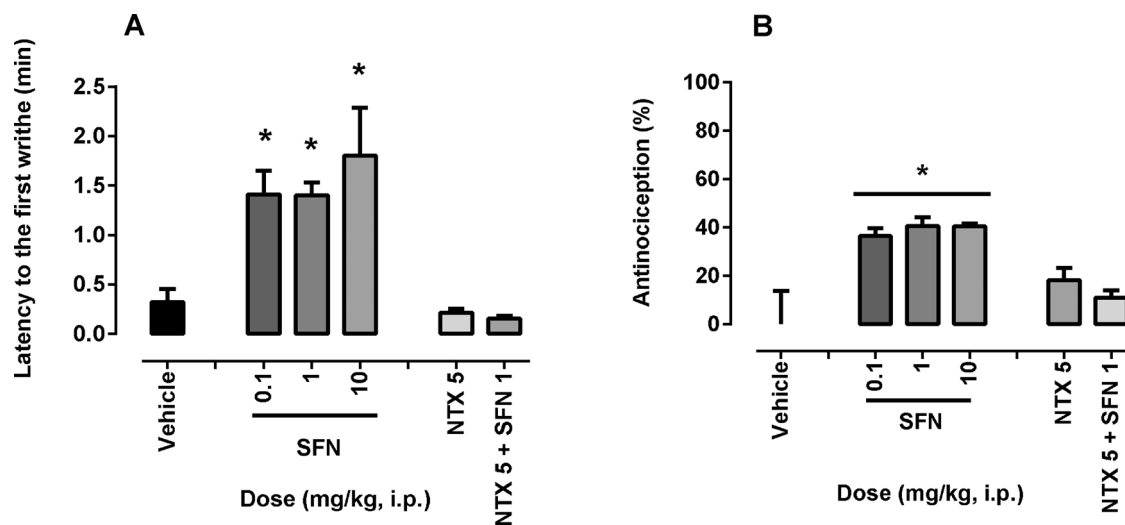


Fig. 4. Antinociceptive effect of sulforaphane (SFN) alone and in the presence of naltrexone (NTX, 5 mg/kg, s.c.). Data are expressed as the Latency to the first writhe (A) and the percentage of antinociception obtained from the area of temporal course curves (B) induced by 1% acetic acid after 30 min of treatments. NTX was administered 15 min before treatments. Each represents the mean ± SEM of at least 6 individuals. Treatments were compared by analysis of variance followed by Tukey’s test. *P < 0.05.

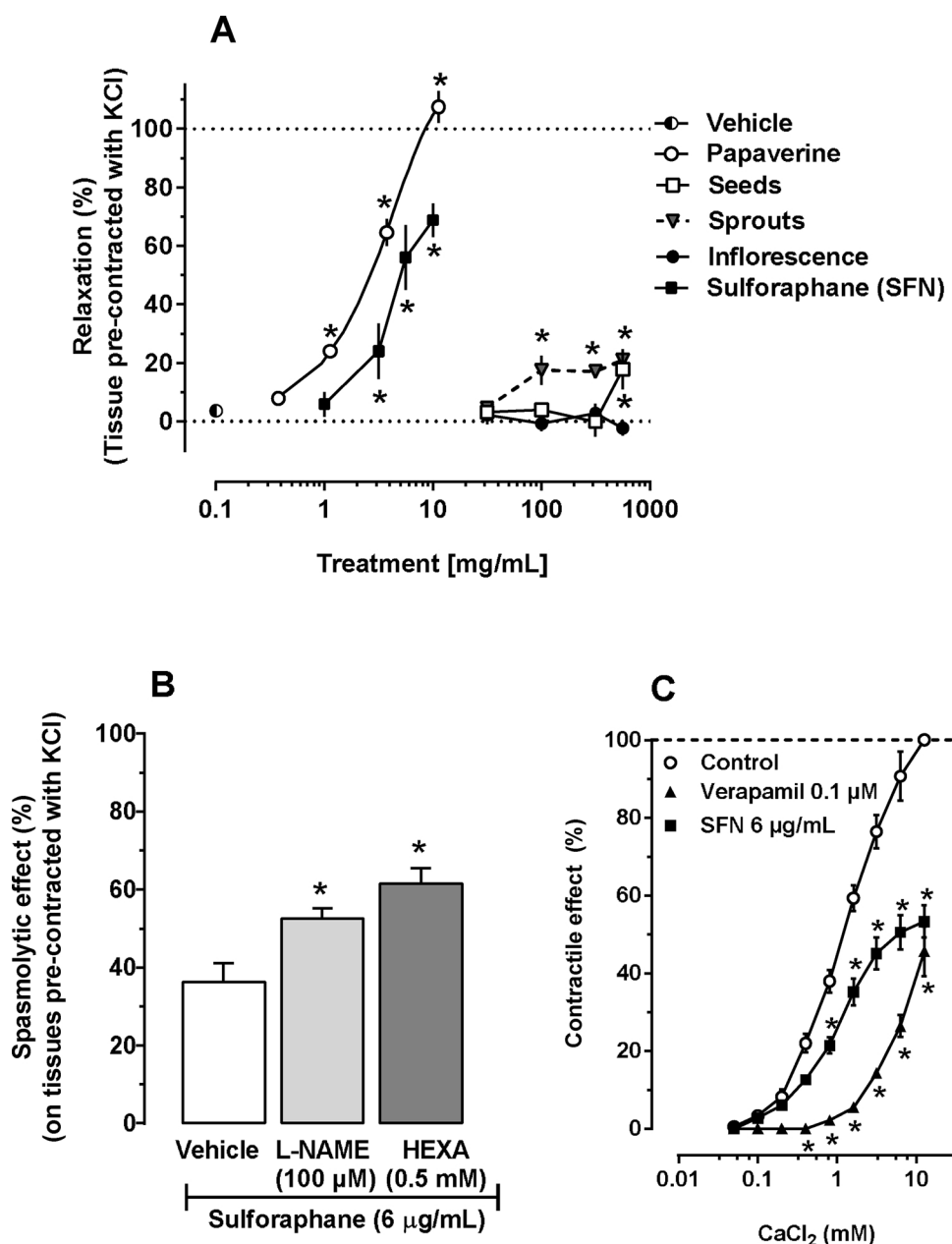


Fig. 5. Relaxant effect of the aqueous extracts from seeds, sprouts, and inflorescence of broccoli compared to the vehicle, sulforaphane (SFN) and verapamil responses (A); and spasmolytic effect of SFN alone and in the presence of L-NAME (100 μM) or hexamethonium (HEXA, 0.5 mM) (B), on the guinea pig isolated ileum pre-contracted with KCl (32 mM). Concentration response curves to explore Ca²⁺ involvement in the absence and presence of SFN or verapamil in the isolated guinea pig ileum (C). Each point or bar represents the mean of each treatment ± SEM of 6 experiments. Treatments were compared by analysis of variance followed by Dunnett's or Tukey's test. *P < 0.05.

observed with verapamil, a well-known Ca²⁺ channel inhibitor with beneficial effects in gut hyperactivity [29]. The spasmolytic effects of SFN were increased in the presence of HEXA and L-NAME suggesting interaction with relaxant neurotransmission from nerve terminals of the enteric system [30] and the possible NO-cGMP pathway [31], mechanisms that would be interesting to explore in detail in future studies. All these results together support antinociceptive properties of broccoli, mainly in the vegetative stage of sprouts and because of bioactive metabolites like SFN and CA-derivatives to alleviate abdominal pain.

Glucosinolates were detected as major constituents in the chemical composition of the three broccoli vegetative phases explored in this study, mainly in the seeds and sprouts, as described for species of *Brassica* [32]. These were precursors of SFN in the aqueous extracts as observed in Table 1. Sinapic and chlorogenic acid derivatives were phenolic compounds also present in abundant manner in these extracts. Sinapic acid has been reported to exert anti-inflammatory activity by inhibiting NF-κB activation in macrophages, as well as the production of iNOS, COX-2, and proinflammatory cytokines [33]. CA is similarly recognized as an abundant natural phenolic compound in plants, fruits

and vegetables producing analgesic and anti-inflammatory effects in several acute and chronic models of pain [34,35]. CA has been mentioned as possible responsible (0.67 mg/g of an ethanol extract) for the analgesic effect in the *Urtica urens* aerial parts [36] and *Porana sinensis* [37] in abdominal pain. Nevertheless, there was no data in literature about its evaluation in the writhing test as pure compound. Our results give evidence of a dose-dependent antinociceptive effect of CA that might act in a synergic interaction with SFN and other metabolites to produce antinociceptive activity in this species.

Nociceptive response induced in the writhing test is due to an irritation by the diluted acetic acid that promotes signals transmitted to the central nervous system, this before cause the release of mediators such as prostaglandins and other inflammatory molecules from immunological systems that contribute to the increased sensitivity to nociceptors [38,39]. Literature reports not only an involvement of peripheral mediators but also central mechanisms in the antinociceptive effect of broccoli by the presence of SFN explored in neuropathic [40] and gouty [41] models of pain. The significant activity of SFN observed in the *in vivo* writhing test, as well as in the *in vitro* spasmolytic effects in

guinea pig ileum, gives evidence of the potential antinociceptive activity of this isothiocyanate compound involving participation of opioid neurotransmission as well as calcium channels, respectively.

5. Conclusion

Antinociceptive activity of broccoli was observed in the vegetative phases of seed and inflorescence, but preferentially in the sprouts. Sulforaphane plays a role as a potential antinociceptive compound even for visceral pain, but it is not the unique or principal metabolite in this pharmacological activity; where an opioid endogenous participation might not be the unique mechanism of action in it either.

Author contributions

González-Trujano ME, Ventura-Martínez R, and Moreno A.D. contributed in the elaboration of the experimental design, follow-up of the experiments, data analysis, preparation of the manuscript and financing of the study. Guadarrama-Enrriquez O, Baenas N, and Ángeles-López contributed in the elaboration of the *in vivo* or *in vitro* pharmacological experiments, data analysis and preparation of the manuscript. Rodríguez R. and Reyes-Chilpa E. contributed in the experimental design of *in vitro* and *in vivo*, respectively, follow-up of the experiments, data analysis, and preparation of the manuscript. All authors discussed the results and commented on the manuscript.

Funding sources

This work was partially supported by the projects CONACYT-226454 and 256448, as well as Program to Support Research Projects and Technological Innovation (UNAM-DGAPA-PAPIIT-IN204416) in Mexico City, and MINECOAGL2013-46247-P in Spain, as well as the Grant for *Research Group of Excellence - Fundación Seneca*, Murcia Regional Agency for Science and Technology, Project 19900/GERM/15. Authors would also like to thank the CYTED Programme, Action 112RT0460 CORNUCOPIA Thematic Network.

Conflicts of interest

None declared.

Acknowledgements

We are thankful to MSc Mariana Yetlanezy Hernández Arámburo, Mr Raúl Cardoso, Mr José Luis Calderon, and Mr Jorge Valdés for their technical assistance, as well as to Professor Marissa González for proof-reading English version of the manuscript. We also thank to the Posgrado en Ciencias Biológicas (Universidad Nacional Autónoma de México) for having received academic training for Omar Guadarrama CONACYT Number 781549.

References

- [1] G. Cervellin, R. Mora, A. Ticinesi, T. Meschi, I. Comelli, F. Catena, G. Lippi, Epidemiology and outcomes of acute abdominal pain in a large urban Emergency Department: retrospective analysis of 5,340 cases, *Ann. Transl. Med.* 4 (2016) 1–8.
- [2] D.L. Ambriz-Pérez, N. Leyva-López, E.P. Gutierrez-Grijalva, J.B. Heredia, Phenolic compounds: natural alternative in inflammation treatment. A review, *Food Sci. Tech.* 2 (2016) 1–14.
- [3] A.E. Wagner, A.M. Terschluessen, G. Rimbach, Health promoting effects of Brassica-derived phytochemicals: from chemopreventive and anti-inflammatory activities to epigenetic regulation, *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2013 (2013) 1–12.
- [4] D. Lippmann, C. Lehmann, S. Florian, G. Barknowitz, M. Haack, I. Mewis, M. Wiesner, M. Schreiner, H. Glatt, R. Brigelius-Flohé, A.P. Kipp, Glucosinolates from pak choi and broccoli induce enzymes and inhibit inflammation and colon cancer differently, *Food Funct.* 5 (2014) 1073–1081.
- [5] F. Fuentes, X. Paredes-González, A.N. Tony Kong, Dietary glucosinolates sulforaphane, phenethyl isothiocyanate, indole-3-carbinol/3,3'-diindolylmethane: anti-oxidative stress/inflammation, Nrf2, epigenetics/epigenomics and *in vivo* cancer chemopreventive efficacy, *Curr. Pharmacol. Rep.* 1 (2015) 179–196.
- [6] M. Hämaäläinen, R. Nieminen, P. Vuorela, L. Heino, E. Moilanen, Anti-inflammatory effects of flavonoids: genistein, kaempferol, quercetin, and daidzein inhibit STAT-1 and NF- κ B activations, whereas flavone, isorhamnetin, naringenin, and pelargonidin inhibit only NF- κ B activation along with their inhibitory effect on iNOS expression and NO production in activated macrophages, *Mediators Inflamm.* 2007 (2007) 45673, <https://doi.org/10.1155/2007/45673>.
- [7] D.A. Moreno, M. Carvajal, C. López-Berenguer, C. García-Viguera, Chemical and biological characterisation of nutraceutical compounds of broccoli, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 41 (2006) 1508–1522.
- [8] K. Singh, S.L. Connors, E.A. Macklin, K.D. Smith, J.W. Fahey, P. Talalay, A.W. Zimmerman, Sulforaphane treatment of autism spectrum disorder (ASD), *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 43 (2014) 15550–15555.
- [9] B.G. Cipolla, E. Mandron, J.M. Lefort, Y. Coadou, E. Della Negra, L. Corbel, R. Le Scodan, A.B. Azzouzi, N. Mottet, Effect of sulforaphane in men with biochemical recurrence after radical prostatectomy, *Cancer Prev. Res.* 8 (2015) 712–719.
- [10] M.V. Galan, A.A. Kishan, A.L. Silverman, Oral broccoli sprouts for the treatment of *Helicobacter pylori* infection: a preliminary report, *Dig. Dis. Sci.* 49 (2004) 1088–1090.
- [11] D.L. Folkard, G. Marlow, R.F. Mithen, L.R. Ferguson, Effect of sulforaphane on NOD2 via NF- κ B: implications for Crohn's disease, *J. Inflamm.* 12 (2015) 1–6.
- [12] L.L. Ma, G.P. Xing, Y. Yu, H. Liang, T.X. Yu, W.H. Zheng, T.B. Lai, Sulforaphane exerts neuroprotective effects via suppression of the inflammatory response in a rat model of focal cerebral ischemia, *Int. J. Clin. Exp. Med.* 8 (2015) 17811–17817.
- [13] N. Baenas, D. Villano, C. García-Viguera, D.A. Moreno, Optimizing elicitation and seed priming to enrich broccoli and radish sprouts in glucosinolates, *Food Chem.* 204 (2016) 314–316.
- [14] N. Baenas, M.E. González-Trujano, O. Guadarrama-Enrriquez, F. Pellicer, C. García-Viguera, D.A. Moreno, Broccoli sprouts in analgesia – preclinical *in vivo* studies, *Food Funct.* 8 (2017) 167–176.
- [15] M.C. Rodríguez-Hernández, S. Medina, A. Gil-Izquierdo, M.C. Martínez-Ballesta, D.A. Moreno, Broccoli isothiocyanate content and *in vitro* availability according to variety and origin, *Maced. J. Chem. Chem. Eng.* 32 (2013) 251–264.
- [16] N. Baenas, D.A. Moreno, C. García-Viguera, Selecting sprouts of Brassicaceae for optimum phytochemical composition, *J. Agric. Food Chem.* 60 (2012) 11409–11420.
- [17] N. Baenas, C. García-Viguera, D.A. Moreno, Biotic elicitors effectively increase the glucosinolates content in Brassicaceae sprouts, *J. Agric. Food Chem.* 62 (2014) 1881–1889.
- [18] H.O.J. Collier, L.C. Dinneen, C.A. Johnson, C. Scheider, The abdominal constriction response and its suppression by analgesic drugs in the mouse, *Br. J. Pharmacol. Chemother.* 32 (1968) 295–310.
- [19] R. Ventura-Martínez, O. Rivero-Osorno, C. Gómez, M.E. González-Trujano, Spasmolytic activity of *Rosmarinus officinalis* L. involves calcium channels in the guinea pig ileum, *J. Ethnopharmacol.* 137 (2011) 1528–1532.
- [20] R.R. Mphahlele, O.J. Caleb, O.A. Fawole, U.L. Opara, Effects of different maturity stages and growing locations on changes in chemical, biochemical and aroma volatile composition of 'Wonderful' pomegranate juice, *J. Sci. Food Agric.* 96 (2016) 1002–1009.
- [21] I.T. Johnson, Glucosinolates in the human diet. Bioavailability and implications for health, *Phytochem. Rev.* 1 (2002) 183–188.
- [22] M. Traka, R. Mithen, Glucosinolates, isothiocyanates and human health, *Phytochem. Rev.* 8 (2009) 269–282, <https://doi.org/10.1007/s11101-008-9103-7>.
- [23] M. Rahmatullah, T.F. Shefa, L. Hasan, M.D. Hossain, S. Ahmed, A. Mamun, M.R. Islam, Sh. Rahman, M.H. Chowdhury, A study on antinociceptive and anti-hyperglycemic activity of methanol extract of *Brassica juncea* (L.) Czern. leaves in mice, *Adv. Nat. Appl. Sci.* 4 (2010) 221–225.
- [24] M.A. Jakaria, H. Ahmed, M.N. Hossain, Sh. Rahman, M.Sh. Hossain, M.M. Rahman, M. Rahmatullah, Analgesic activity of boiled and non-boiled *Brassica oleracea* L. var. *gongyloides* swollen stems, *World J. Pharm. Pharmacol. Sci.* 10 (2015) 113–119.
- [25] M.Y. Hasan, R. Al-Mahamud, S. Rahman, I. Ahmad, M.A. Rahmatullah, A preliminary report on antihyperglycemic and analgesic properties of methanol extract of *Brassica oleracea* L. var. *italica* sprouts, *World J. Pharm. Pharmacol. Sci.* 9 (2015) 225–234.
- [26] M.S. Rahman, N. Jahan, S.M.A. Rahman, M.A. Rashid, Analgesic and antidepressant activities of *Brassica rapa* subspecies *chinensis* (L.) Hanelt on Swiss-albino mice model, *Bangladesh Med. Res. Council Bull.* 41 (2015) 114–120.
- [27] H. Karaki, H. Ozaki, M. Hori, M. Mitsui-Saito, K. Amano, K. Harada, S. Miyamoto, H. Nakasawa, K.J. Won, K. Sato, Calcium movements, distribution and function in smooth muscle, *Pharmacol. Rev.* 49 (1997) 157–230.
- [28] L.H.C. Vasconcelos, A.C.C. Correia, I.L.L. de Souza, M.C.C. Silva, E.J. Paredes-Gamero, B.V.O. Santos, F.A. Cavalcante, B. da Silva, Flavonoid galein 3,6-dimethyl ether attenuates guinea pig ileum contraction through K⁺ channel activation and decrease in cytosolic calcium concentration, *Eur. J. Pharmacol.* 767 (2015) 52–60.
- [29] A.U. Khan, A.H. Gilani, Antispasmodic and bronchodilator activities of *Artemisia vulgaris* are mediated through dual blockade of muscarinic receptors and calcium influx, *J. Ethnopharmacol.* 126 (2009) 480–486.
- [30] Barlow R.B, M. Franks, J.D.M. Pearson, A comparison of the affinities of antagonists for acetylcholine receptors in the ileum, bronchial muscle and iris of the guinea-pig, *Br. J. Pharmacol.* 46 (1972) 300–308.
- [31] J.A. Carvajal, A.M. Germain, J.P. Huidobro-Toro, C.P. Weiner, Molecular mechanism of cGMP-mediated smooth muscle relaxation, *J. Cell. Physiol.* 184 (2000) 409–420.
- [32] M. Possenti, S. Baima, A. Raffo, A. Durazzo, A.M. Giusti, F. Natella, Glucosinolates in food, in: J.M. Mérillon, K. Ramawat (Eds.), *Glucosinolates. Reference Series in Phytochemistry*, Springer, Cham, 2017.

- [33] K.Y. Yun, D.J. Koh, S.H. Kim, S.J. Park, J.H. Ryu, D.J. Kim, J.Y. Lee, K.T. Lee, Anti-inflammatory effects of sinapic acid through the suppression of inducible nitric oxide synthase, cyclooxygenase-2, and proinflammatory cytokines expressions via nuclear factor- κ B inactivation, *J. Agric. Food Chem.* 56 (2008) 10265–10272.
- [34] M.D. dos Santos, M.C. Almeida, N.P. Lopes, G.E. de Souza, Evaluation of the anti-inflammatory, analgesic and antipyretic activities of the natural polyphenol chlorogenic acid, *Biol. Pharm. Bull.* 29 (2006) 2236–2240.
- [35] K. Hara, Y. Haranishi, K. Kataoka, Y. Takahashi, T. Terada, M. Nakamura, T. Sata, Chlorogenic acid administered intrathecally alleviates mechanical and cold hyperalgesia in a rat neuropathic pain model, *Eur. J. Pharmacol.* 723 (2014) 459–464.
- [36] C. Marrassini, C. Acevedo, J. Miño, G. Ferraro, S. Gorzalezany, Evaluation of antinociceptive, anti-inflammatory activities and phytochemical analysis of aerial parts of *Urtica urens* L., *Phytother. Res.* 24 (2010) 1807–1812.
- [37] Z. Chen, L. Liao, Z. Zhang, L. Wu, Z. Wang, Comparison of active constituents, acute toxicity, anti-nociceptive and anti-inflammatory activities of *Porana sinensis* Hemsl., *Erycibe obtusifolia* Benth, and *Erycibe schmidtii* Craib, *J. Ethnopharmacol.* 150 (2013) 501–506.
- [38] C.H.H. Knowles, Q. Aziz, Basic and clinical aspects of gastrointestinal pain, *Pain* 141 (2009) 191–209.
- [39] G.F. Pavao-de-Souza, A.C. Zarpelon, G.C. Tedeschi, S.S. Mizokami, J.S. Sanson, T.M. Cunha, S.H. Ferreira, F.Q. Cunha, R. Casagrande, W.A. Jr Verri, Acetic acid- and phenyl-p-benzoquinone-induced overt pain-like behavior depends on spinal activation of MAP kinases, PI (3)K and microglia in mice, *Pharmacol. Biochem. Behav.* 101 (2012) 320–328.
- [40] C. Wang, C. Wang, Anti-nociceptive and anti-inflammatory actions of sulforaphane in chronic constriction injury-induced neuropathic pain mice, *Inflammopharmacol* 25 (2017) 99–106.
- [41] G. Yang, S.H. Yeon, H.E. Lee, H.C. Kang, Y.Y. Cho, H.S. Lee, J.Y. Lee, Suppression of NLRP3 inflammasome by oral treatment with sulforaphane alleviates acute gouty inflammation, *Rheumatology (Oxford)* 57 (2018) 727–736, <https://doi.org/10.1093/rheumatology/kex499>.



Cite this: *Food Funct.*, 2017, 8, 167

Broccoli sprouts in analgesia – preclinical *in vivo* studies

Nieves Baenas,^{a,b} María Eva González-Trujano,^{*a} Omar Guadarrama-Enríquez,^a Francisco Pellicer,^a Cristina García-Viguera^b and Diego A. Moreno^{*b}

Background: Broccoli is a rich source of health-promoting glucosinolates, phenolic compounds, minerals and vitamins, which might have potential to alleviate pain. **Aim:** To explore the antinociceptive effects of a broccoli sprout aqueous extract (BSE) in experimental models of pain and an opioid mechanism. **Materials and methods:** the BSE was administered to mice and rats that were subjected to the writhing and formalin tests, respectively. Gastric damage or sedative-like response, as adverse effects observed in anti-inflammatory non-steroidal and opioid analgesic drugs, respectively, were also explored. **Results:** Antinociception, but not sedative or gastric injury response, was observed in a significant and dose-dependent manner with the BSE (50–500 mg kg⁻¹, i.p. and 500–2000 mg kg⁻¹, p.o.) in comparison to the control group; these effects resembled those observed with the analgesic tramadol (30 mg kg⁻¹, i.p.) in writhing and formalin assessments. Blockage of opioid receptors by naloxone (1 mg kg⁻¹, i.p.) produced partial inhibition of the antinociceptive effect of the BSE in both assays. **Conclusion:** This study gives evidence of the potential activity of broccoli sprouts in pain therapy.

Received 11th October 2016,
Accepted 21st November 2016

DOI: 10.1039/c6fo01489e

www.rsc.org/foodfunction

Introduction

Pain is an enormous problem of health. It is associated with a wide range of injuries and diseases often caused by inflammation and it is sometimes the disease itself. The prevalence, incidence, and vast social and health consequences of pain require attention from the public health system to address this global issue.¹ Because of the significant side effects of opioids, steroidal and NSAID medications, currently the most applied analgesics, there is greater interest in natural alternatives, such as dietary supplements and herbal remedies, which have been used for centuries to reduce pain and inflammation, not only for mild to moderate aches but also for chronic pain.²

Studies have revealed that dietary consumption of *Brassica* vegetables may potentially have a chemopreventive and anti-inflammatory effect diminishing the risk of several chronic diseases.³ The *in vitro* and *in vivo* studies have shown that *Brassica* phytochemicals may palliate inflammatory and antioxidant pathways through inhibition of the nuclear factor kappa B (NF-κB) activity, which is consistently related to the

control of inflammatory diseases in animal models.⁴ Broccoli sprouts (*Brassica oleracea* var. *italica*) are considered a rich source of health-promoting compounds including glucosinolates (GLS), isothiocyanates (ITC),⁵ phenolic compounds,⁶ vitamins and minerals,⁷ and bioactive compounds also related to the reduction of oxidative stress and inflammation.⁸

Very few preliminary studies of broccoli have reported significant central nervous system (CNS) actions by administration of extracts from mature plant organs (inflorescences), sprouts or isolated phytochemicals to induce antinociceptive activity, for example, the oral administration of a hydro-alcoholic extract of mature broccoli⁹ or the anxiolytic-like activity of pure sulforaphane.¹⁰ As a plant material used in this work, the *Brassica oleracea* sprouts were elicited with the phytohormone methyl jasmonate (MeJA) (250 μM), following the protocol studied by Baenas *et al.*,¹¹ obtaining safe and ready-to-eat vegetables enriched with bioactive compounds. As mentioned, these sprouts have been investigated because they contain higher levels of constituents with anti-inflammatory and antioxidant activities than the mature plant, useful in cancer prevention and development. However, there is very limited information to support the antinociceptive properties of broccoli sprouts and their possible mechanisms of action. Therefore, we evaluated the potential of an aqueous broccoli sprout extract (BSE) for analgesic and anti-inflammatory activities and the involvement of the opioid mechanism *in vivo* using experimental models of nociception, and also examining gastric damage and sedative effects in rodents as the possible adverse effects observed when using analgesic therapy.

^aLaboratory of Neuropharmacology of Natural Products, Neuroscience Research Department, Instituto Nacional de Psiquiatría “Ramón de la Fuente”, Av. México-Xochimilco 101, Col. Sn Lorenzo Huipulco, 14370 México, D. F., Mexico. E-mail: evag@imp.edu.mx; Fax: (+52 55) 5655-9980; Tel: (+52 55) 4160-5085

^bPhytochemistry Lab, Department of Food Science and Technology, CEBAS-CSIC, Campus de Espinardo 25, 30100 Murcia, Spain. E-mail: dmoreno@cebas.csic.es; Fax: (+34 968) 396213; Tel: (+34 968) 396369

Materials and methods

Plant material and extract preparation

Broccoli seeds for sprouting (*Brassica oleracea* var. *italica* Plenck.) were provided by Intersemillas S.A (Valencia, Spain). Sprouts were germinated under controlled conditions for 8 days according to Baenas *et al.*¹¹ protocols, and elicited by spraying methyl jasmonate (MeJA, 250 μ M) once a day, during 4 days prior to harvest. Briefly, sprouts were collected, flash frozen in liquid nitrogen, and stored at -80 °C until lyophilized and ground into a fine powder.

The BSE was obtained by maceration and continuous shaking of 1.6 g of ground and freeze-dried broccoli sprouts in 50 mL MilliQ water overnight at room temperature. The sample was sonicated before and after the maceration, and then the BSE was centrifuged and the supernatant was lyophilized to obtain a fine powder used in the experiments.

Drugs

Tramadol, pharmaceutical grade (98%) (Grünenthal de México, S.A. de C.V.), bismuth subsalicylate (Pepto-Bismol®), and sodium pentobarbital (Sedalpharma®) were used. Naloxone, diazepam and indomethacin were purchased from Sigma (Sigma-Aldrich Co., St Louis MO, USA) and dissolved in saline solution (s.s.) or resuspended in 0.5–1% Tween 80 in s.s. correspondingly. Control animals received distilled water as vehicle. Formalin and acetic acid (J.T. Baker, USA) were prepared at 1% solutions to induce nociception. Absolute ethanol (J.T. Baker, USA) was used for analyzing the gastric damage. Drugs were freshly prepared on the day of the experiments; all treatments were administered intraperitoneally (i.p.) or orally (p.o.) in a volume of 0.1 ml per 10 g or 100 g body weight in mice and rats, respectively.

Identification and quantitative analysis of broccoli sprouts and BSE by HPLC-DAD-ESI-MSⁿ and UHPLC-QqQ-MS/MS

The GLS and phenolic compounds in broccoli sprouts and the BSE were identified and quantified by HPLC-DAD-ESI-MSⁿ according to Baenas *et al.*¹² Briefly, lyophilized samples were extracted with methanol (70% v/v) and heated at 70 °C in order to avoid enzyme myrosinase activity which hydrolyzes GLS to ITC, allowing the quantification of individual compounds that were identified based on retention times, UV absorption maxima, and mass spectra or comparison with authentic compounds when possible. The ITC in broccoli sprouts and the BSE were extracted according to the Cramer and Jeffery¹³ protocol and quantified by UHPLC-QqQ-MS/MS following Domínguez-Perles *et al.*¹⁴

Pharmacological evaluation

Animals. Female Swiss albino mice (25–30 g) and female Wistar rats (200–250 g) were used in the study. The animals were kept at constant room temperature (22 ± 1 °C) and maintained in a 12 light/dark cycle. All experimental procedures were carried out according to a protocol approved by the local Animal Ethics Committee of the Instituto Nacional de

Psiquiatría Ramón de la Fuente in compliance with national (NOM-062-ZOO-1999) and international regulations on the care and use of laboratory animals. The animals were fed *ad libitum* with standard feed and water, except when fasting was needed in the course of the study (at least 16 h before testing). For each experimental procedure, animal groups consisted of six individuals each.

Experimental groups

Groups of at least six mice or rats, depending on the experimental model, were organized as follows: vehicle group (mice or rats received distilled water); three or four groups receiving acute administration of BSE, p.o. (500, 1000 and 2000 mg kg⁻¹) or i.p. (50, 100, 250 and 500 mg kg⁻¹), respectively, 30 min previous to the experimental test, and one group receiving the positive control (opioid analgesic tramadol, i.p.). Bismuth subsalicylate (antiulcer drug, p.o.) and indomethacin (anti-inflammatory inhibitor of cyclooxygenases, p.o.) were used as reference drugs in gastric protection and gastric ulcer, respectively.

Antinociceptive activity

The *Writhing test* was used as previously described by Collier *et al.*¹⁵ Immediately after 1% acetic acid, i.p., administration, latency to the onset of the writhes and the total number of writhes were recorded in the following periods: 0–5, 5–10, 10–15, 15–20, 20–25 and 25–30 min. The area under the curve (AUC) of the temporal courses was plotted to describe the dose-response in the effects of the BSE in comparison to tramadol and the vehicle group.

Formalin test: Immediately after 50 μ l injection in the subplantar area of the right hind paw with 1% formalin by using a 30-gauge needle, each rat was placed into a glass cylinder provided with mirrors to enable a total panorama of the nociceptive behavior. The number of shakings and/or the accumulated time spent in licking the injected paw was taken as the nociceptive response.¹⁶ Two periods of high shaking activity were considered: the first one was present immediately after injection and lasted 5 min; this was known as the early phase (neurogenic phase). The second period was observed 20–25 min after formalin injection and denoted as the late phase (inflammatory phase). Animals were administered with the aqueous extract 30 min before the intraplantar injection of formalin. Control animals received vehicle by the same route (p.o. or i.p.) and time of administration.

At the end of the nociceptive evaluation, rats were euthanized in a CO₂ chamber and their stomachs were dissected and fixed with 4% formaldehyde to be qualitatively examined for tentative gastric damage by comparing the effect of indomethacin as the positive ulcerogenic drug.

Mechanism of action analysis

In order to explore the participation of the endogenous opioid system in the antinociceptive effect of the BSE, independent groups of mice and rats were administered naloxone (1 mg kg⁻¹, s.c., an opioid receptor antagonist) 15 min previous to an antinociceptive dosage of the extract (50 or 250 mg kg⁻¹,

i.p.) or the vehicle. Thirty min after treatments, mice or rats were subjected to the corresponding nociceptive test to compare also with the effect of naloxone *per se*.

Experimental absolute ethanol-induced gastric ulcer

Simultaneous to rat fasting, the groups were administered as follows: BSE (100 mg kg⁻¹, p.o.), indometacin (20 mg kg⁻¹, p.o., ulcerogenic drug) or the antiulcer drug bismuth subsalicylate (17.5 mg mL⁻¹, p.o., 1 mL per rat). Control rats received distilled water as vehicle in the same volume and route of administration.

Gastric ulcers were induced as follows: after 30 min of treatment or vehicle administration, each rat received a 0.5 mL volume of absolute ethanol *via* p.o. as modified from the report previously described.¹⁷ One hour after ethanol administration, the animals were sacrificed in a CO₂ chamber. The stomach of each rat was dissected and examined to measure gastric lesions.

Measurement of gastric injury

Each stomach was dissected out from the esophagus to the pyloric portion and inflated with 10 ml of 4% formalin for 15 min to fix both the inner and outer gastric layers. The stomachs were incised along the greater curvature and examined for ulcers. Photographs of the hemorrhagic lesions were taken, scanned and saved in a processor to be measured by using a millimeter grid. The gastric injury was obtained as the ulcer area in mm.²

Sedative-like response

Thirty minutes after a significant antinociceptive dose of BSE (100 mg kg⁻¹, i.p.), sedative-like response in mice was investigated by using:

Open-field test. The number of squares explored by each mouse placed into a cage divided into 12 squares (4 cm × 4 cm) in a 2 min interval was registered.

Cylinder test. The number of spontaneous liftings on its posterior limbs of each mouse individually placed on a filter paper-covered floor of a glass cylinder (16 cm in height, 11 cm in diameter) was counted during the first 5 min.¹⁸ A reduced exploratory activity showed by mice after placement in this unfamiliar environment revealed a sedative-like effect.

Sodium pentobarbital (SP)-induced hypnosis. To induce sedative and hypnotic effects, each mouse received SP (42 mg kg⁻¹, i.p.). Immediately the mice were placed individually in an acrylic box to be observed for the onset of uncoordinated movements (sedative phase) and the duration of hypnosis (the criterion for sleep or hypnosis is defined as the loss of righting reflex). The time between loss and recovery of the righting reflex was recorded as sleeping time.¹⁹

Statistical analysis

Data are expressed as the mean ± standard error of the mean (S.E.M.). The area under the curve (AUC) values were calculated from the respective temporal course curves obtained in the writhing test, and were considered as an expression of the

overall antinociceptive activity during a 30 min period in area units; the AUC was calculated using the trapezoidal rule. Statistical differences were analyzed using a one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's test for multiple comparisons. A value of $P < 0.05$ was considered significant.

Results

Potential bioactive compounds in broccoli sprouts and BSE

Broccoli sprouts are rich in glucoraphanin, quantified as 40% of the total GLS in our samples (Table 1). This compound is naturally hydrolysed by the enzyme myrosinase to the ITC sulforaphane allowing its detection in the BSE in a concentration of 0.95 mg g⁻¹ dry weight (Table 1). A dosage of 100 mg kg⁻¹ of BSE contains 0.54 μmol (rat) or 0.054 μmol (mice) of the ITC sulforaphane.

The ITC iberin and indole-3-carbinol were also present in the BSE, as products of the aliphatic GLS glucoiberin and the indole glucobrassicin, respectively (Table 1). Individual GLS in the BSE were not identified (Table 1).

The predominant class of phenolic compounds in both broccoli sprouts and the BSE is the sinapic acid derivatives, accounting for 98–99% of the total amount, respectively (Table 1). Also, a little concentration of chlorogenic acid derivatives was found in both samples and less than 1% of total phenolics in broccoli sprouts corresponded to flavonols (Table 1).

Antinociception

BSE at doses of 1000 to 2000 mg kg⁻¹, p.o. (Fig. 1A) and 50 to 500 mg kg⁻¹, i.p. (Fig. 1B) significantly and in a dose-

Table 1 Quantification of individual and total compounds in broccoli sprouts and its aqueous extract (BSE)

| Glucosinolates | Broccoli sprouts | BSE |
|---|------------------|---------------|
| Bioactive compounds (mg g⁻¹ D.W.) | | |
| Glucoiberin | 6.08 ± 0.38 | — |
| Glucoraphanin | 15.69 ± 0.09 | — |
| 4-Hydroxyglucobrassicin | 1.65 ± 0.20 | — |
| Glucorucin | 3.59 ± 0.08 | — |
| Glucobrassicin | 3.02 ± 0.29 | — |
| 4-Methoxyglucobrassicin | 1.40 ± 0.10 | — |
| Neoglucobrassicin | 8.81 ± 0.20 | — |
| Aliphatic GLS | 25.36 ± 0.50 | — |
| Indole GLS | 14.88 ± 0.64 | — |
| Total | 40.25 ± 0.79 | — |
| Phenolic compounds | | |
| Chlorogenic acid derivatives | 0.239 ± 0.039 | 0.075 ± 0.03 |
| Flavonols | 0.237 ± 0.039 | — |
| Sinapic acid derivatives | 26.588 ± 6.192 | 19.30 ± 1.75 |
| Total | 27.064 ± 6.270 | 19.38 ± 1.78 |
| Isothiocyanates | | |
| Sulforaphane | 0.383 ± 0.010 | 0.951 ± 0.001 |
| Iberin | 0.009 ± 0.001 | 0.026 ± 0.001 |
| Indole-3-carbinol | — | 0.013 ± 0.003 |
| Total | 0.392 ± 0.010 | 0.990 ± 0.005 |

Mean values ($n = 3$) ± SD. D.W. (dry weight).

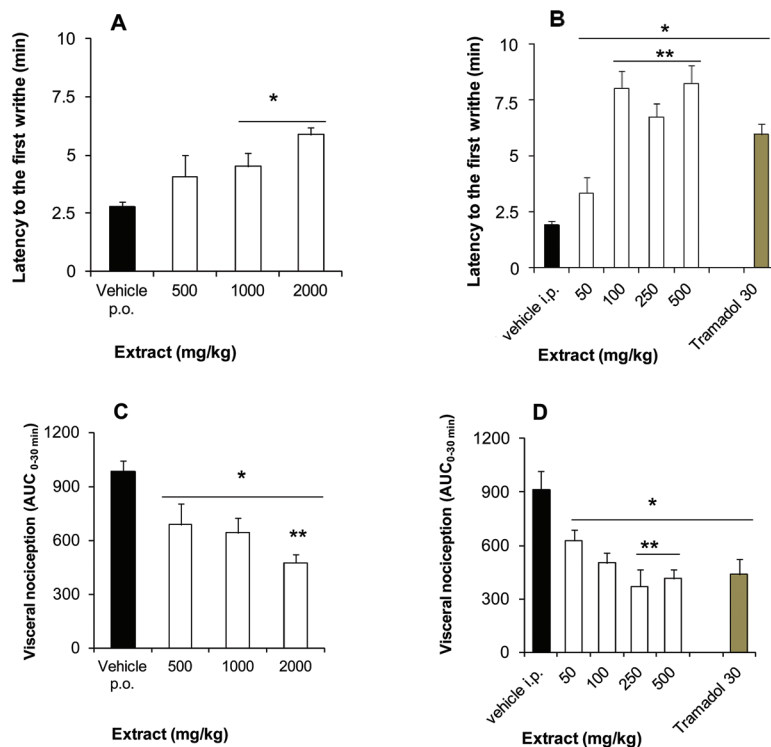


Fig. 1 Dose-response antinociceptive effect of the extract in comparison to vehicle or tramadol in the latency to the first writhe (A–B) and the number of abdominal writhes (C–D) in a 30 min trial period, after oral or intraperitoneal administration, respectively. Each bar represents the mean \pm S.E.M. of six animals. ANOVA followed by Tukey's test. $P < 0.05$, *comparison vs. vehicle, **amongst doses.

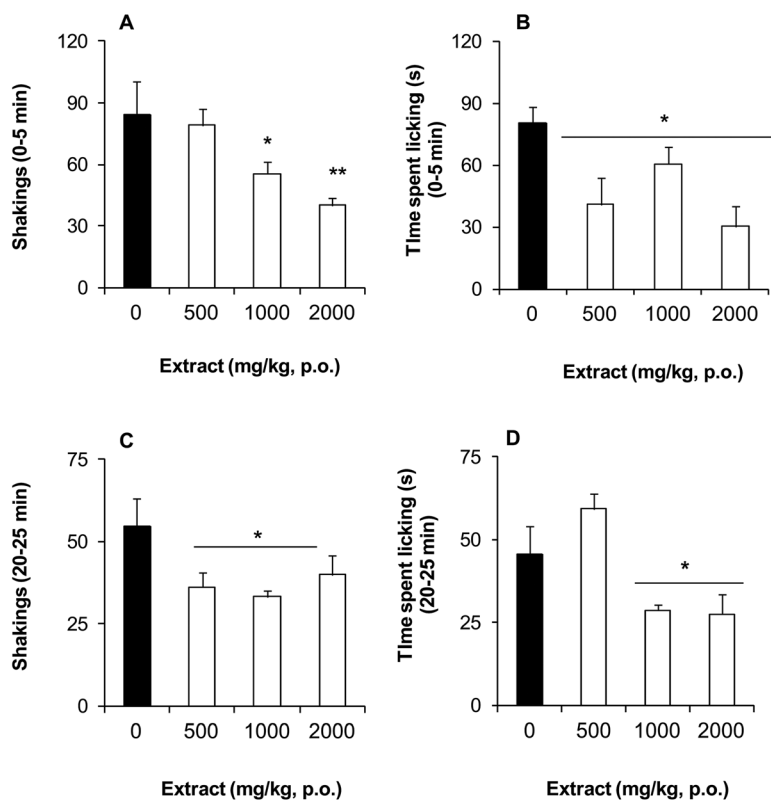


Fig. 2 Antinociceptive effect of the extract, p.o., in the shaking and time spent licking behavior of the neurogenic (A–B) and inflammatory (C–D) phases, respectively. Each bar represents the mean \pm S.E.M. of six animals. ANOVA followed by Tukey's test. $P < 0.05$, *comparison vs. vehicle, **amongst doses.

dependent manner delayed the presence of the first writhe in the acetic acid-induced nociception in comparison to the vehicle group, resembling the delay observed with the analgesic tramadol (30 mg kg⁻¹, i.p.) (Fig. 1B). The intensity of the acetic acid-induced nociception was also significant and in a dose-dependent trend decreased in all the doses of the BSE tested and in both routes of administration, fitting in the range of the observed effects of the analgesic drug taken as the reference (Fig. 1C and D).

The BSE, by p.o. administration, significantly reduced the number of shakings (Fig. 2A and C) and the time spent doing licking behavior (Fig. 2B and D) in both phases of the formalin-induced nociception. A dose-dependent effect in shakings of the first phase was observed between the doses of 1000 to 2000 mg kg⁻¹ (Fig. 2A).

Similarly, a significant and dose-dependent reduction (50 to 500 mg kg⁻¹) was observed in the shakings (Fig. 3A) and time spent doing licking (Fig. 3C) behaviour of the first phase of this test when the BSE was administered by the i.p. route. In the second phase, only shaking behaviour was significantly decreased, but not in a dose-dependent manner (Fig. 3C); while no changes were obtained in the time spent licking (Fig. 3D) in comparison to the vehicle group, resembling the antinociceptive response of the analgesic tramadol (30 mg kg⁻¹, i.p.), mainly in the neurogenic phase.

With regard to the mechanism of action, the presence of naloxone (1 mg kg⁻¹, s.c.) *per se* did not produce different nociceptive responses in comparison to the vehicle group in both tests (Fig. 4). Nevertheless, naloxone partially inhibited the delay to the first writhe (Fig. 4A) and visceral nociception (Fig. 4B) produced by the BSE (250 mg kg⁻¹, i.p.) in the acetic acid-induced nociception in mice. Moreover, this opioid antagonist abolished the reduction produced by this extract (50 mg kg⁻¹, i.p.) in both neurogenic (Fig. 4C) and inflammatory (Fig. 4D) nociceptive responses in the formalin test in rats.

Gastric damage or protection

No ulcers were found in the group receiving the vehicle after evaluation in the formalin-induced nociception test, but they showed a slight erosion of the mucous layer; this effect was also observed in the rats receiving the BSE. In contrast, rats administered the analgesic indomethacin showed significant development of gastric ulcers (97.25 ± 43.55 mm²).

In the presence of the ulcerogenic agent (0.5 mL of absolute ethanol), the rats receiving vehicle showed a major occurrence of ulcers all along the corpus area in the rat stomach (200 ± 13 mm²); this effect increased because of the combination with indomethacin (235.38 ± 78.39 mm²). The pre-treatment with the BSE prevented the severity of the gastric damage

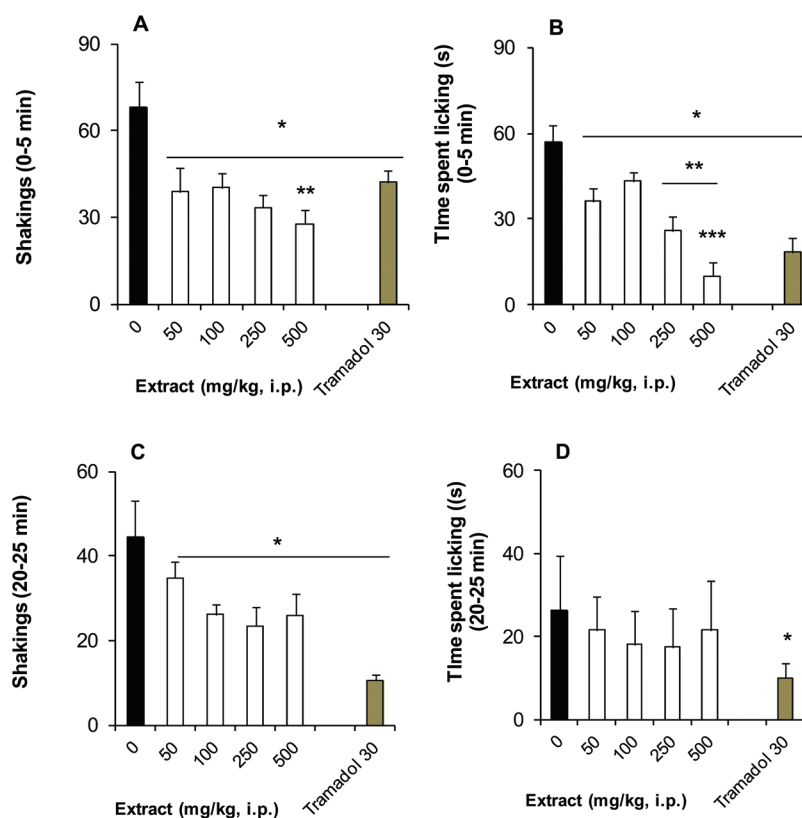


Fig. 3 Antinociceptive effect of the extract, i.p., in comparison to tramadol in the shaking and time spent licking behavior of the neurogenic (A–B) and inflammatory (C–D) phases, respectively. Each bar represents the mean ± S.E.M. of six animals. ANOVA followed by Tukey's test. $P < 0.05$, *comparison vs. vehicle, **, ***amongst doses.

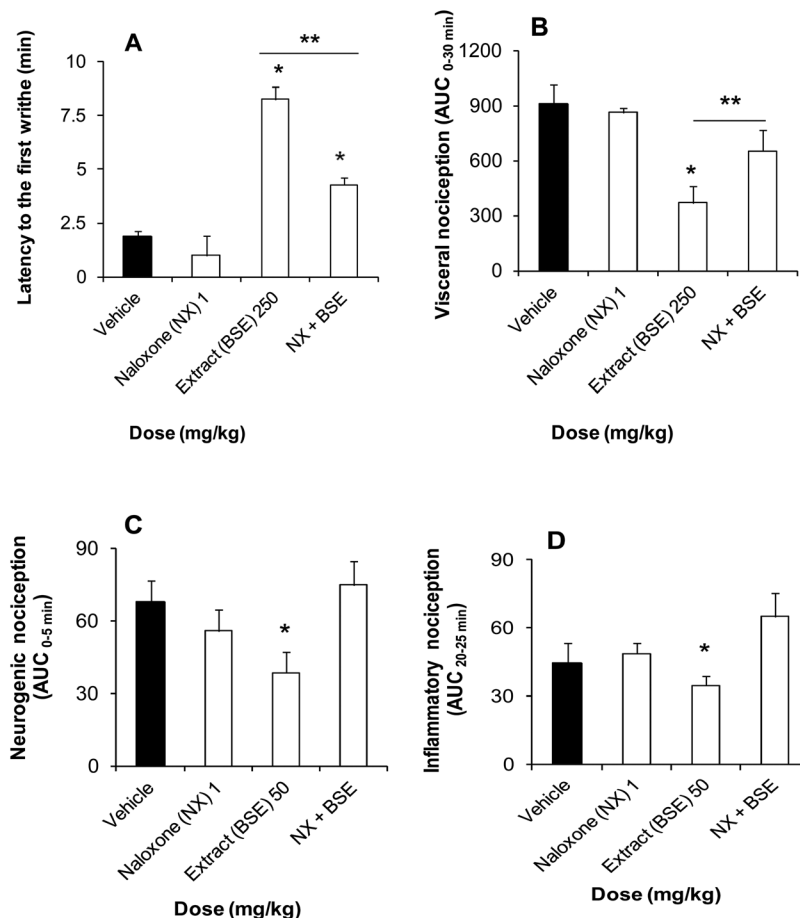


Fig. 4 Dose–response antinociceptive effect of the extract (BSE, 250 or 50 mg kg⁻¹) alone or in the presence of naloxone (NX, 1 mg kg⁻¹, s.c.) in comparison to the vehicle group and NX in the latency (A) and visceral nociception (B) of the writhing test, and in the neurogenic (C) and inflammatory (D) phases of the formalin test. Each bar represents the mean \pm S.E.M. of six animals. ANOVA followed by Tukey's test, * $P < 0.05$. *comparison vs. vehicle, **amongst groups.

mainly in the surrounding of the corpus of the stomach ($108.50 \pm 41.50 \text{ mm}^2$), but less effectively than the protection obtained with an anti-acid reference drug ($26.81 \pm 4.20 \text{ mm}^2$).

Sedative-like effects

The BSE (100 mg kg⁻¹) did not modify the ambulatory activity of mice in the open-field test (Fig. 5A) or in the exploration behaviour in the cylinder test (Fig. 5B) compared to the vehicle group, and in contrast to diazepam (an anxiolytic and sedative drug) (Fig. 5A and B). However, the extract combined with a sedative-hypnotic like SP was capable to facilitate the beginning of sedative-like behaviour (Fig. 5C) and to enhance significantly the duration of the sleeping time in mice receiving BSE administration (Fig. 5D) in a similar manner to diazepam (Fig. 5C and D).

Discussion

Promoting the daily intake of bioactive compounds may be a valuable strategy to improve the management of pain.²⁰ The

present work reported a beneficial significant effect of antinociception of the broccoli sprout aqueous extract, administered by enteral (p.o.) and parenteral (i.p.) routes, and using two different models of induced nociception in rodents. The writhing test is used in mice as an acute tonic pain model; whereas the formalin test is applied to evaluate neurogenic and inflammatory nociception in mice and rats, both involve an opioid mechanism.

The characteristic bioactive compounds present in broccoli sprouts have been studied before planning their studies in animal models, considering 8-day-old sprouts as optimum for consumption and phytochemical content.¹² It has been observed that the profile of bioactive compounds found in sprouts varies with environmental stress, growth conditions and storage.²¹ In addition, application of the elicitor MeJA (250 μM) has been employed as a tool to increase the GLS content in these broccoli sprouts. Thus, in this study, it was important to evaluate the content of phytochemicals of the samples prior to developing the *in vivo* antinociceptive assays. Under our conditions, the total GLS content in the sprouts was higher than in other sprouted species²² and mature plants.²³

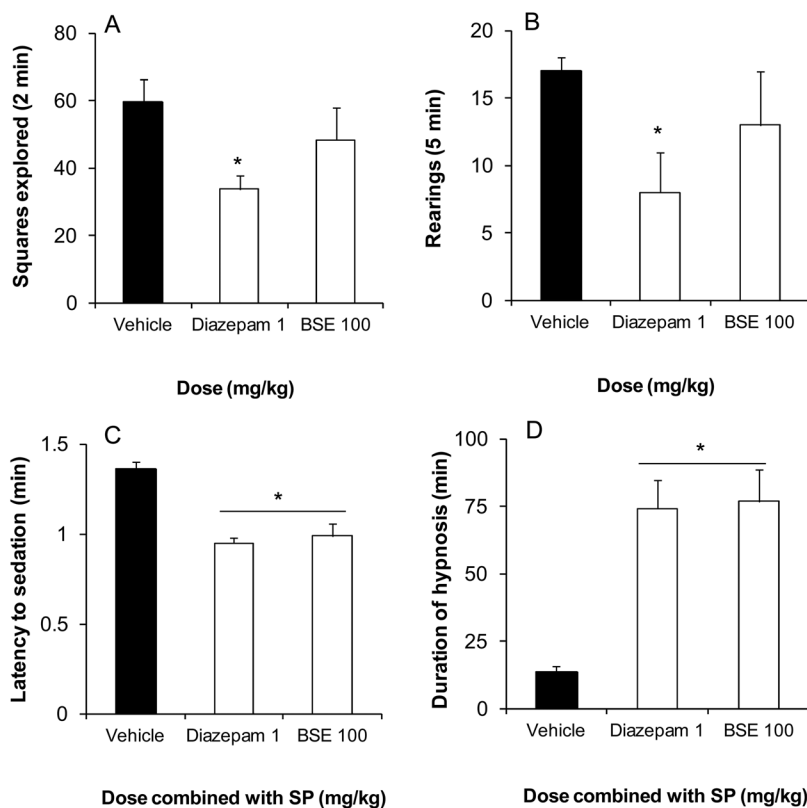


Fig. 5 Analysis of sedative-like effects of the extract (100 mg kg^{-1} , i.p.) in comparison to the reference drug diazepam (1 mg kg^{-1} , i.p.) on the exploratory activity in the open-field (A) and cylinder behavior tests (B), as well as in the pharmacological interaction in the sodium pentobarbital (SP)-induced hypnotic potentiation test (C) in mice. Each bar represents the mean \pm S.E.M. of six animals. * $P < 0.05$, ANOVA followed by Tukey's test.

GLS are naturally hydrolyzed to ITC, and these bioactive compounds are considered responsible for the reported bioactivity of cruciferous foods, such as anti-inflammatory and chemopreventive foods.³

The preliminary antinociceptive effects of *Brassica* vegetables have been described with a dose-dependent activity in the writhing test in mice by administering a hydro-methanolic extract of *Brassica juncea* ($200\text{--}400 \text{ mg kg}^{-1}$, p.o.)²⁴ and in both phases of the formalin test in rats by a hydro-alcoholic mature broccoli extract (2000 mg kg^{-1} , p.o.).⁹ In our study, the inhibitory response in the abdominal constrictions produced by the BSE *via* oral administration was improved when the extract was tested by the parenteral route of administration in mice. Antinociceptive effects were also observed when the BSE was administered orally, it reduced painful behavior in both neurogenic and inflammatory phases of the formalin test in rats. These results together suggest that the bioavailability of constituents is modulated by the route of administration, but they do not affect the antinociceptive properties; moreover, central activity is possible in the effects of broccoli sprouts since the neurogenic phase (I) showed major and significant changes in both behaviors (shakings and time spent licking) in comparison to their diminution in the inflammatory phase (II) of the formalin test. The antinociceptive effects of the BSE in the writhing and the two phases of formalin tests suggest an

involvement at both central and peripheral levels of pain combining the antinociceptive and anti-inflammatory activities.

Intraperitoneal administration of dilute acetic acid induces nociception in mice leading to writhing behavior, a widely used test commonly employed as a screening method for analgesic drugs.¹⁵ Analgesia is demonstrated by the decrease of the number of writhing by blockage of prostaglandin synthesis, a peripheral mechanism of pain inhibition. In addition, during inflammatory pain evoked by injection of pro-inflammatory agents such as formalin into a hind paw, neuronal nitric oxide synthase (nNOS) and iNOS are up-regulated.²⁵ Also in the formalin test, the inhibition of COX-2 plays an important role in the nociceptive behavior suppression associated with acute inflammation. This anti-inflammatory activity agreed with the fact that the intake of broccoli sprouts *per se* modulates the inflammatory and vascular prostanoids²⁶ suggesting the central and also peripheral involvement in its antinociceptive response.

Writhing behavior is also a model of clinical relevancy in intestinal pain in humans responding to the effect of analgesic opioid drugs.²⁷ A tonic activation of the endogenous opioids has also been described in the inhibitory effect on pain behavior after subcutaneous formalin injection.²⁸ In the antinociceptive effect of the BSE, the presence of naloxone produced a significant blockage in both antinociceptive tests and also in

both phases of the formalin test reinforcing central and peripheral actions modulated also by an opioid neurotransmission.

The health beneficial effects of broccoli have been suggested because of the action of some bioactive compounds that positively modulate the immune system and the antioxidant defense. *In vivo* experiments on humans have reported that the hydrolysis of GLS and, therefore, the absorption of ITC is greater following the consumption of raw plant material with the presence of the enzyme myrosinase, than after ingestion of the cooked plant with the enzyme totally or partially denatured.²⁹ The predominant ITC sulforaphane is able to significantly suppress muramyl dipeptide-induced NF- κ B activity, a central participant in inflammatory processes at physiologically relevant concentrations (5–10 μ M) achievable *via* the consumption of broccoli within the diet.⁴ This compound has also shown anti-inflammatory mechanisms based on the inhibition of lipopolysaccharide-mediated induction of forms of nitric-oxide synthase (iNOS), cyclooxygenase (COX-2), the tumor necrosis factor- α (TNF- α), and interleukin-1 beta (IL-1 β) *via* NF κ B inactivation, responsible for chronic inflammation and infections involved in the pathogenesis of many chronic diseases.^{30,31}

The phenolic acids present in Brassicaceae extracts, especially sinapic and chlorogenic acids,³² enhance the cellular defense system avoiding oxidation and inflammation;³³ this might contribute to the health-promoting properties of these broccoli sprouts and the BSE. Sinapic acid derivatives contained in broccoli sprouts have been studied as efficacious inhibitors of iNOS and COX-2 expression, responsible for the elevated levels of NO and prostaglandins.³¹ Other compounds present in broccoli sprouts such as anthocyanins³⁴ and vitamin C³⁵ act as natural antioxidants conferring protection against chronic diseases.

Our results showed that the BSE was not only capable of reducing gastric damage, but was also able to produce certain gastric protection against ulcerogenic substances. These effects might be associated with the presence of bioactive ITC sulforaphane, which stimulates Nrf-2 gene-dependent antioxidant enzyme activity, thereby protecting and repairing cells of the gastric mucosa from oxidative injury and inflammation.³⁶ Finally, in this study the aqueous extract *per se* did not produce sedative effects as it is observed in the adverse effect of the opioid analgesia. Nevertheless, central actions of the constituents of broccoli sprouts are reinforced by the synergism of the combination between a significant antinociceptive dosage of the extract and the sedative-hypnotic effect of pentobarbital.

Conclusion

The aqueous extract obtained from broccoli sprouts produces a significant and dose-dependent antinociceptive activity suggesting its utility for the treatment of visceral and nociceptive pain mediated by not only central, but also peripheral opioid receptors. These results give scientific evidence to support

the beneficial health effects for pain diseases without producing adverse effects as observed in analgesic drug therapy.

Chemical compounds

Absolute ethanol (PubChem CID: 702); acetic acid (PubChem CID: 176); bismuth subsalicylate (PubChem CID: 16682734); diazepam (PubChem CID: 3016); formaldehyde (PubChem CID: 712); indomethacin (PubChem CID: 3715); naloxone (PubChem CID: 5284596); sodium pentobarbital (PubChem CID: 4737); tramadol (PubChem CID: 33741); tween 80 (443315).

Abbreviations

| | |
|----------------|-------------------------------------|
| ANOVA | Analysis of variance |
| AUC | Area under the curve |
| BSE | Broccoli sprout aqueous extract |
| CNS | Central nervous system |
| COX | Cyclooxygenase |
| GLS | Glucosinolates |
| ITC | Isothiocyanates |
| MeJA | Methyl jasmonate |
| NF- κ B | Nuclear factor kappa B |
| NOS | Nitric-oxide synthase |
| NSAID | Nonsteroidal antiinflammatory drugs |
| SEM | Standard error of the mean |
| SP | Sodium pentobarbital |
| TNF- α | Tumor necrosis factor- α |

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements

We are thankful to Dra. Guadalupe Esther Ángeles, Mr Raúl Cardoso and Mr José Luis Calderon, and the students Frida Blancas and Claret Gutiérrez for the technical assistance. We also thank Aide M. González for proof-reading of the English version of the manuscript and Posgrado en Ciencias Biológicas (Universidad Nacional Autónoma de México) for having received academic training for Omar Guadarrama No.781549. This work was partially supported by the projects CONACYT-226454 and 256448 in Mexico City, and MINECO AGL2013-466247-P in Spain, as well as the Grant for *Research Group of Excellence – Fundación Seneca*, Murcia Regional Agency for Science and Technology, Project 19900/GERM/15. The authors would also like to thank the CYTED Programme, Action 112RT0460 CORNUCOPIA Thematic Network.

References

- 1 D. S. Goldberg and S. J. McGee, Pain as a global public health priority, *BMC Public Health*, 2011, **11**, 770.

- 2 J. C. Maroon, J. W. Bost and A. Maroon, Natural anti-inflammatory agents for pain relief, *Surg. Neurol. Int.*, 2010, **1**, 80.
- 3 A. E. Wagner, A. M. Terschluesen and G. Rimbach, Health promoting effects of brassica-derived phytochemicals: from chemopreventive and anti-inflammatory activities to epigenetic regulation, *Oxid. Med. Cell. Longevity*, 2013, **964539**, 23.
- 4 D. Folkard, G. Marlow, R. Mithen and L. Ferguson, Effect of Sulforaphane on NOD2 via NF-kappaB: implications for Crohn's disease, *J. Inflammation*, 2015, **12**, 6.
- 5 N. Juge, R. F. Mithen and M. Traka, 2007. Molecular basis for chemoprevention by sulforaphane: a comprehensive review, *Cell. Mol. Life Sci.*, 2007, **64**, 1105–1127.
- 6 M. E. Cartea, M. Francisco, P. Soengas and P. Velasco, Phenolic compounds in brassica vegetables, *Molecules*, 2011, **6**, 251–280.
- 7 D. A. Moreno, M. Carvajal, C. López-Berenguer and C. García-Viguera, Chemical and biological characterisation of nutraceutical compounds of broccoli, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2006, **41**, 1508–1522.
- 8 J. W. Fahey, S. L. Wehage, W. D. Holtzclaw, T. W. Kensler, P. A. Egner, T. A. Shapiro and P. Talalay, Protection of humans by plant glucosinolates: efficiency of conversion of glucosinolates to isothiocyanates by the gastrointestinal microflora, *Cancer Prev. Res.*, 2012, **5**, 603–611.
- 9 E. Danesh, S. Khatamsaz, M. Shojaeifard and Z. Khabbaz, Effects of hydro-alcoholic extract of broccoli (*Brassica oleracea*) on sensory threshold of pain using the formalin test in adult male rats, *J. Biol. Today's World*, 2014, **3**, 147–151.
- 10 S. Wu, Q. Gao, P. Zhao, Y. Gao, Y. Xi, X. Wang, Y. Liang, H. Shi and Y. Ma, Sulforaphane produces antidepressant and anxiolytic-like effects in adult mice, *Behav. Brain Res.*, 2016, **301**, 55–62.
- 11 N. Baenas, C. García-Viguera and D. A. Moreno, Biotic Elicitors Effectively Increase the Glucosinolates Content in Brassicaceae Sprouts, *J. Agric. Food Chem.*, 2014, **31**, 31.
- 12 N. Baenas, D. A. Moreno and C. García-Viguera, Selecting sprouts of Brassicaceae for optimum phytochemical composition, *J. Agric. Food Chem.*, 2012, **60**, 11409–11420.
- 13 J. M. Cramer and E. H. Jeffery, Sulforaphane absorption and excretion following ingestion of a semi-purified broccoli powder rich in glucoraphanin and broccoli sprouts in healthy men, *Nutr. Cancer*, 2011, **63**, 196–201.
- 14 R. Domínguez-Perles, S. Medina, D. A. Moreno, C. García-Viguera, F. Ferreres and A. Gil-Izquierdo, A new ultra-rapid UHPLC/MS/MS method for assessing glucoraphanin and sulforaphane bioavailability in human urine, *Food Chem.*, 2014, **143**, 132–138.
- 15 H. O. Collier, L. C. Dinneen, C. A. Johnson and C. Schneider, The abdominal constriction response and its suppression by analgesic drugs in the mouse, *Br. J. Pharmacol. Chemother.*, 1968, **32**, 295–310.
- 16 H. Wheeler-Aceto, F. Porreca and A. Cowan, The rat paw formalin test: comparison of noxious agents, *Pain*, 1990, **40**, 229–238.
- 17 A. Robert, J. E. Nezamis, C. Lancaster and A. J. Hanchar, Cytoprotection by prostaglandins in rats. Prevention of gastric necrosis produced by alcohol, HCl, NaOH, hypertonic NaCl, and thermal injury, *Gastroenterology*, 1979, **77**, 433–443.
- 18 M. Ugalde, V. Reza, M. E. González-Trujano, B. Avula, I. A. Khan and A. Navarrete, Isobolographic analysis of the sedative interaction between six central nervous system depressant drugs and *Valeriana edulis* hydroalcoholic extract in mice, *J. Pharm. Pharmacol.*, 2005, **57**, 631–639.
- 19 M. E. González-Trujano, A. Navarrete, B. Reyes and E. Hong, Some pharmacological effects of the ethanol extract of leaves of *Annona diversifolia* on the central nervous system in mice, *Phytother. Res.*, 1988, **12**, 600–602.
- 20 R. F. Bell, J. Borzan, E. Kalso and G. Simonnet, Food, pain, and drugs: does it matter what pain patients eat?, *Pain*, 2012, **153**, 1993–1996.
- 21 M. Bjorkman, I. Klingen, A. N. Birch, A. M. Bones, T. J. Bruce, T. J. Johansen, R. Meadow, J. Molmann, R. Seljasen, L. E. Smart and D. Stewart, Phytochemicals of Brassicaceae in plant protection and human health-influences of climate, environment and agronomic practice, *Phytochemistry*, 2011, **72**, 538–556.
- 22 A. P. Vale, J. Santos, N. V. Brito, D. Fernandes, E. Rosa and M. B. P. Oliveira, Evaluating the impact of sprouting conditions on the glucosinolate content of *Brassica oleracea* sprouts, *Phytochemistry*, 2015, **115**, 252–260.
- 23 A. Aires, R. Carvalho and E. Rosa, Glucosinolate composition of brassica is affected by postharvest, food processing and myrosinase activity, *J. Food Process. Preserv.*, 2012, **36**, 214–224.
- 24 M. Rahmatullah, T. F. Shefa, L. Hasan, T. Hossain, S. Ahmed, A. Al Mamun, R. Islam, S. Rahman and M. H. Chowdhury, A study on antinociceptive and anti-hyperglycemic activity of methanol extract of *Brassica Juncea* (L.) Czern. leaves in mice, *Adv. Nat. Appl. Sci.*, 2010, **4**, 221.
- 25 A. Schmidtke, I. Tegeder and G. Geisslinger, No NO, no pain? The role of nitric oxide and cGMP in spinal pain processing, *Trends Neurosci.*, 2009, **32**, 339–346.
- 26 S. Medina, R. Domínguez-Perles, D. A. Moreno, C. García-Viguera, F. Ferreres, J. I. Gil and A. Gil-Izquierdo, The intake of broccoli sprouts modulates the inflammatory and vascular prostanooids but not the oxidative stress-related isoprostanes in healthy humans, *Food Chem.*, 2015, **173**, 1187–1194.
- 27 H. F. Miranda, V. Noriega, P. Zanetta, J. C. Prieto, J. C. Prieto-Rayó, N. Aranda and F. Sierralta, Isobolographic analysis of the opioid-opioid interactions in a tonic and a phasic mouse model of induced nociceptive pain, *J. Biomed. Sci.*, 2014, **21**, 62.
- 28 C. H. S. Zhao, Y. X. Tao, J. M. Tall, D. M. Donovan, R. A. Meyer and S. N. Raja, Role of μ -opioid receptors in formalin-induced pain behavior in mice, *Exp. Neurol.*, 2003, **184**, 839–845.

- 29 V. Rungapamestry, A. J. Duncan, Z. Fuller and B. Ratcliffe, Effect of cooking brassica vegetables on the subsequent hydrolysis and metabolic fate of glucosinolates, *Proc. Nutr. Soc.*, 2007, **66**, 69–81.
- 30 E. Heiss, C. Herhaus, K. Klimo, H. Bartsch and C. Gerhäuser, Nuclear Factor κ B is a molecular target for sulforaphane-mediated anti-inflammatory mechanisms, *J. Biol. Chem.*, 2001, **276**, 32008–32015.
- 31 K. J. Yun, D. J. Koh, S. H. Kim, S. J. Park, J. H. Ryu, D. G. Kim, J. Y. Lee and K. T. Lee, Anti-inflammatory effects of sinapic acid through the suppression of inducible nitric oxide synthase, cyclooxygenase-2, and proinflammatory cytokines expressions via nuclear factor-kappaB inactivation, *J. Agric. Food Chem.*, 2008, **56**, 10265–10272.
- 32 J. Shan, J. Fu, Z. Zhao, X. Kong, H. Huang, L. Luo and Z. Yin, Chlorogenic acid inhibits lipopolysaccharide-induced cyclooxygenase-2 expression in raw264.7 cells through suppressing NF- κ B and JNK/AP-1 activation, *Int. Immunopharmacol.*, 2009, **9**, 1042–1048.
- 33 C. Chen, Sinapic acid and its derivatives as medicine in oxidative stress-induced diseases and aging, *Oxid. Med. Cell. Longevity*, 2016, **2016**, 10.
- 34 P. Mecocci, C. Tinarelli, R. J. Schulz and M. C. Polidori, Nutraceuticals in cognitive impairment and Alzheimer's disease, *Front. Pharmacol.*, 2014, **5**, 147.
- 35 N. Mikirova, J. Casciari, A. Rogers and P. Taylor, Effect of high-dose intravenous vitamin C on inflammation in cancer patients, *J. Transl. Med.*, 2012, **10**, 1479–5876.
- 36 A. Yanaka, S. Zhang, M. Tauchi, H. Suzuki, T. Shibahara, H. Matsui, A. Nakahara, N. Tanaka and M. Yamamoto, Role of the Nrf-2 gene in protection and repair of gastric mucosa against oxidative stress, *Inflammopharmacology*, 2015, **13**, 83–90.