



Tesis de Doctorado en Ciencias Químicas

***DROGAS VEGETALES EMPLEADAS COMO
ANALGÉSICAS Y ANTIINFLAMATORIAS EN
LA MEDICINA TRADICIONAL.
VALIDACIÓN CIENTÍFICA DE SU EFECTO
TERAPÉUTICO***

Farm. Micaela Paula Del Gaudio

Departamento de Ciencias Farmacéuticas
Facultad de Ciencias Químicas
Universidad Nacional de Córdoba
Argentina
2021

COMISIÓN DE TESIS

DIRECTORA

Dra. María Gabriela Ortega

COMISIÓN ASESORA

Dra. Mariel Agnese

Dr. Gabriel Cuadra

Dr. Viviana Nicotra

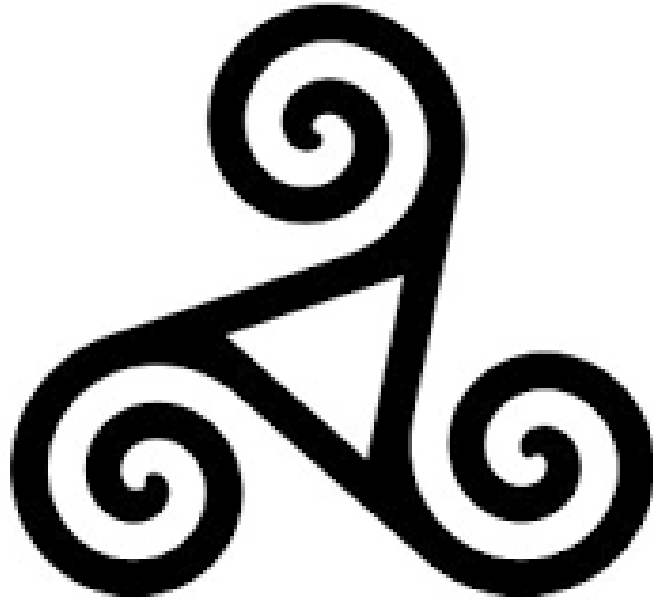
COMISIÓN EVALUADORA

Dra. Mariel Agnese

Dr. Gabriel Cuadra

Dr. Viviana Nicotra

Dra. Nancy Roxana Vera



*A mis Padres: **Rogelio y Gloria***

*A mis Abuelos: **Edmundo y Elvira***

Por darme las fuerzas para luchar cada día

Agradecimientos

Habiendo alcanzado la etapa final de mi tesis doctoral, quiero agradecer a todas las personas que me acompañaron estos años.

A mi Directora de tesis, Gabi, gracias por haberme dado la oportunidad de realizar esta tesis doctoral, por confiar en mí, por brindarme los conocimientos y apoyarme en cada paso que fui dando. Por la paciencia y libertad que me diste para formarme profesionalmente.

A Brenda por aceptarme en su laboratorio, por enseñarme con tanta pasión todo sobre las células, por estar siempre para ayudarme con lo que necesitaba y guiarme. Por ser una excelente persona y compañera siempre voy a estar agradecida.

Al Profesor Adair, por recibirme en su laboratorio, por brindarme su tiempo y conocimientos, por integrarme en su grupo de trabajo. Gracias por enseñarme a trabajar con los animales, por ser una persona justa, por su excelente competencia científica, quiero agradecerle el valioso aporte a esta tesis.

A los profesores miembros de mi comisión asesora y evaluadora de tesis Dr. Gabriel Cuadra, Dra. Viviana Nicotra, por su seguimiento durante el desarrollo de esta tesis, por apoyarme, guiarme y formarme, lo que permitió el enriquecimiento de este trabajo y también mi propio crecimiento profesional.

A la Dra. Mariel Agnese por aceptar integrarse a mi comisión de tesis por sus aportes, correcciones y su apoyo durante estos años.

A la Dra. Nancy Roxana Vera por haber accedido a ser evaluadora externa, por sus opiniones, comentarios y correcciones.

A las instituciones que apoyaron el desarrollo de esta tesis y mi formación académica: IMBIV (CONICET), Facultad de Ciencias Químicas (UNC), Instituto de Virología Dr. José María Vanella de la Facultad de Ciencias Médicas (UNC), Laboratorio de Neurobiología de dolor e Inflamación, Universidad Federal de Santa Catarina (UFSC).

A todos los integrantes del Departamento de Ciencias Farmacéuticas por compartir el día a día y en especial a Sole G. y la Dra. Cristina por el café y las charlas compartidas.

Al grupo de Farmacognosia, por el compañerismo, vivencias, el apoyo diario y los buenos momentos que pasamos. Gracias porque siempre estuvieron ahí en los buenos y malos momentos.

Al Dr. Cabrera por permitirme formar parte de su grupo de investigación, por transmitirme su pasión por el trabajo y las plantas, por sus sabios consejos.

A Mari V., por las mañanas de café con las charlas reflexivas que compartíamos todos los días, por haber estado siempre para ayudarme con mis dudas experimentales y también personales. Por brindarme su amistad y ser una persona de oro, gracias Mari por tanto.

A Marce por su buena predisposición siempre para guiarme y ayudarme con lo que necesitaba, por ser una persona transparente que me brindo siempre su tiempo para escucharme.

A Mati, por compartir tantas risas, donde su buen humor siempre alegraba el día laboral. Por enseñarme tanto de Salud Pública y todos sus conocimientos, por ser una persona honesta siempre, gracias por todo.

A Mari P., por salvarme de tantos almuerzos, por compartir el día a día con risas y buenos momentos. Por transmitirme tus conocimientos y experiencia que ayudaron a mi crecimiento.

A Susy, siempre estuviste ahí para dar el consejo justo, por tu profesionalismo y tus fuerzas de luchar por tus ideales, gracias por transmitirme las ganas de no rendirte nunca.

A los chicos del 208, que me aguantaron estos años, gracias por su predisposición y buena voluntad siempre.

Al grupo de Viro, por aceptarme en el laboratorio, a Javi, Flor y Guille por ayudarme cada vez que lo necesitaba y por sus charlas de cada día.

Al grupo de los olímpicos, por los hermosos momentos compartidos y las charlas sobre ciencia que no podían faltar.

Al grupo de LANDI, por integrarme en su laboratorio, a Holly por ser mi guía en el laboratorio y compartir sus conocimientos conmigo, a Scheila y Taysa por ayudarme con los experimentos y estar presente para todo lo que necesitaba, gracias por enseñarme día a día, a trabajar con animales, por brindarme su amistad y hacerme sentir como en casa, a Kelly por su buena predisposición y su buen humor que te alegraban el día.

A las chulengas, por haber sido mí apoyo en lo personal y profesional, por las enseñanzas de cada una, por sus diferentes puntos de vista, por las discusiones, por los logros festejados, por las juntadas, por las broncas y por mucho más. Gracias por estar en mi camino, las quiero mucho.

A Jesi, por tus charlas, por las juntadas, gracias porque siempre estuviste cuando necesitaba ayuda y sobre todo por aguantarme.

Al grupo de handball, que me acompañaron todos estos años, gracias por sus locuras y apoyo incondicional, especialmente a Euge, Vicho, Araña, Pen, Debo y Romi, un placer compartir este deporte con ustedes.

A mis amigas de años, Flor, Cele, Nati M., Nati T. y Flaca, por estar siempre acompañándome en las buenas y en las malas. Por las aventuras vividas, por aguantarme en mis momentos de locura, por alentarme a seguir con mis sueños, gracias por todos estos años de amistad, las quiero con el alma.

A Franco, mi compañero por haberme acompañado en la última etapa de mi tesis y apoyarme para lograr mis sueños.

A mi tía Beti, farmacéutica y excelente mujer, gracias por aconsejarme que estudie esta hermosa carrera ya que fue el inicio de mi profesión, gracias por trasmitirme tus saberes profesionales y personales, te quiero mucho.

A mis hermanos, Nadia y Franco por estar siempre a mi lado, por alentarme y apoyarme en mis sueños. Los quiero.

A mis padres, Gloria y Rogelio, no hubiera podido lograr nada sin el apoyo de ellos, por enseñarme que en la vida si uno se esfuerza puede alcanzar lo que quiera, por apoyarme a lo largo de estos años, en cada decisión que tome, por entenderme y confiar en mí. Los amo con todo mi corazón.

***"Fue el tiempo que pasaste con tu rosa
lo que la hizo tan importante"***

El Principito

Resumen

Las plantas constituyen un recurso valioso en los sistemas de salud de los países en desarrollo. Acorde a informes de la Organización Mundial de la Salud (OMS), se sabe que más del 80% de la población mundial utiliza, rutinariamente, la medicina tradicional para satisfacer sus necesidades de atención primaria de salud.

Con el fin de validar el efecto analgésico y antiinflamatorio atribuido por la medicina popular, se planteó estudiar los extractos acuosos obtenidos de 6 especies vegetales autóctonas: *Berberis ruscifolia* Lam., *Jodina rhombifolia* (Hook. & Arn.) Reissek, *Modiolastrum malvifolium* (Griseb.) K. Schum, *Sphaeralcea bonariensis* (Cav.) Griseb, *Araujia odorata* (Hook & Arn.) Fontella y Goyder y *Schinus fasciculata* (Griseb.) I.M. Johnst.

El efecto antiinflamatorio se evaluó en líneas celulares derivadas de macrófagos de ratón J774A.1 y el efecto analgésico fue estudiado mediante experimentos *in vivo* en ratones albinos machos, cepa suizo ICR.

Los extractos acuosos de las 6 especies propuestas, fueron evaluados como inhibidores de óxido nítrico (NO), mostrando una interesante actividad, la infusión y la decocción obtenidas de la especie *B. ruscifolia*. Por tal motivo, se continuaron los estudios con los extractos acuosos de dicha especie en líneas celulares, incorporando el extracto etanólico (EE) en este estudio, ya que mostró una importante inhibición sobre el NO relacionada a la inhibición proteica de la enzima óxido nítrico sintasa inducible (iNOS).

Con respecto al efecto analgésico *in vivo*, la infusión, decocción y el EE de *B. ruscifolia* presentaron inhibición nociceptiva evaluada mediante el test de inducción de contorsiones por ácido acético y el test de formalina, siendo el EE el más activo.

El estudio químico de los extractos de esta especie fue realizado, demostrando la presencia del alcaloide Berberina (Berb), en los tres extractos, con un contenido mayor en el EE. Por lo tanto, se ensayó Berb para determinar su efecto antiinflamatorio y analgésico.

Berb demostró inhibir la producción de NO mediada por una disminución de la iNOS en el modelo de líneas celulares y mostró ser más activa que el EE en los modelos evaluados *in vivo*.

Esto impulsó a indagar sobre el mecanismo de acción de su actividad, evaluada *in vivo*. Berb produjo un efecto antinociceptivo mediado por la inhibición de las vías del dolor activadas por histamina, prostaglandina E₂, bradicinina, cinamaldehído y capsaicina. Además, se demostró que la inhibición de las distintas vías de dolor producida por Berb, se debe en parte a la inhibición de la proteína kinasa A y proteína kinasa C, las cuales, a nivel intracelular intervienen en la transmisión nociceptiva.

Por lo tanto, se pudo demostrar que los extractos de *B. ruscifolia* ejercen actividad antiinflamatoria en líneas celulares y actividad analgésica *in vivo*, donde dicho efecto terapéutico se debe al menos en parte, al alcaloide Berb, validando así la eficacia de la especie *B. ruscifolia*, reportada en la medicina tradicional como analgésica y antiinflamatoria.

Abstract

Plants are a valuable resource in health systems in developing countries. According to reports from the World Health Organization (WHO), it is known that more than 80% of the world's population routinely uses traditional medicine to provide their primary health care needs.

In order to validate the analgesic and anti-inflammatory effect attributed by folk medicine, the aqueous extracts obtained from 6 autochthonous plant species: *Berberis ruscifolia* Lam., *Jodina rhombifolia* (Hook. & Arn.) Reissek, *Modiolastrum malvifolium* (Griseb.) K. Schum, *Sphaeralcea bonariensis* (Cav.) Griseb, *Araujia odorata* (Hook & Arn.) Fontella and Goyder and *Schinus fasciculata* (Griseb.) IM Johnst, were studied.

The anti-inflammatory effect was evaluated in J774A.1 mouse macrophages cell lines and the analgesic effect was studied by *in vivo* experiments in male albino mice, swiss strain ICR.

The aqueous extracts of the 6 proposed species were evaluated as inhibitors of nitric oxide (NO), showing an interesting activity, the infusion and the decoction of *B. ruscifolia* species. For this reason, the studies of these aqueous extracts in cell line were continued, incorporating the ethanolic extract (EE), which showed an important NO inhibition related to the decrease of inducible nitric oxide synthase (iNOS) enzyme.

With regard to the analgesic effect *in vivo*, the infusion, decoction and EE of *B. ruscifolia* showed nociceptive inhibition by contortions induction by acetic acid and the formalin tests, being the EE the most active.

The extracts chemical study of this species was carried out, demonstrating the presence of the alkaloid Berberine (Berb), in the three extracts, with a higher content in the EE. Therefore, Berb was tested to determine its anti-inflammatory and analgesic effect.

Berb was shown to inhibit NO production mediated by a decrease in iNOS in the cell line model and was shown to be more active than EE in the models evaluated *in vivo*.

This prompted us to investigate the mechanism of action of its activity, evaluated *in vivo*. Berb produced an antinociceptive effect mediated by inhibition of pain pathways activated by histamine, prostaglandin E₂, bradykinin, cinnamaldehyde, and capsaicin. In addition, it was shown that the inhibition of the different pain pathways produced by Berb is due in part to the inhibition of protein kinase A and protein kinase C, which, at the intracellular level, are involved in nociceptive transmission.

Therefore, the anti-inflammatory activity in cell lines and analgesic activity *in vivo* were demonstrated for *B. ruscifolia* extracts being said therapeutic effect, at least in part, by the Berb alkaloid, thus validating the efficacy of the *B. ruscifolia* species, reported as an analgesic and anti-inflammatory in traditional medicine.

DE LA EXPRESIÓN PROTEICA DE LA ÓXIDO NÍTRICO SINTASA INDUCIBLE, EN LÍNEAS CELULARES

4.1. Introducción	47
4.2. Objetivos	47
4.3. Metodología	48
4.3.1. Líneas celulares derivadas de Macrófago J774 A.1	48
4.3.2. Preparación de los extractos	48
4.3.3. Determinación de la viabilidad celular	48
4.3.4. Evaluación de la inhibición de la producción del óxido nítrico	49
4.3.5. Evaluación de la inhibición de la expresión proteica de la óxido nítrico sintasa inducible	51
4.3.6. Análisis estadístico	52
4.4. Resultados y Discusión.....	52
4.4.1. Determinación de la máxima concentración no citotóxica e inhibición del óxido nítrico por parte de los diferentes extractos en líneas celulares.....	52
4.4.2. Efecto del extracto etanólico de <i>B. ruscifolia</i> sobre la inhibición de la expresión proteica de la óxido nítrico sintasa inducible	56
4.5. Conclusiones Parciales.....	57

CAPÍTULO 5: EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTINOCICEPTIVA *IN VIVO*

5.1. Introducción	60
5.2. Objetivos	62
5.3. Metodología	62
5.3.1. Animales.....	62
5.3.2. Preparación de muestras para los experimentos <i>in vivo</i>	63
5.3.3. Actividad antinociceptiva	63
5.3.3.1. Prueba de nocicepción inducida por ácido acético.....	63
5.3.3.2. Prueba de nocicepción inducida por formalina.....	64
5.3.4. Análisis estadístico	66
5.4. Resultados y Discusión.....	66
5.4.1. Efecto de extractos de <i>Berberis ruscifolia</i> en la nocicepción inducida por ácido acético	66
5.4.2. Efecto de extractos de <i>Berberis ruscifolia</i> en la nocicepción inducida por formalina	67
5.4.3. Efecto de extractos acuosos de otras especies vegetales en la nocicepción inducida por formalina.....	70
5.5. Conclusiones Parciales.....	72

CAPÍTULO 6: ANÁLISIS QUÍMICO DE LA ESPECIE *Berberis ruscifolia*

6.1. Introducción	75
6.2. Objetivos	75

6.3. Metodología	76
6.3.1. Identificación del alcaloide berberina en los extractos de <i>Berberis ruscifolia</i> por cromatografía líquida de alta resolución y espectrometría de masas	76
6.3.2. Cuantificación del alcaloide berberina en los extractos de <i>Berberis ruscifolia</i> por cromatografía líquida de alta resolución	77
6.4. Análisis estadístico	78
6.5. Resultados y Discusión.....	78
6.5.1. Identificación de la presencia de berberina en los extractos de <i>Berberis ruscifolia</i>	78
6.5.2. Cuantificación de berberina en los extractos de <i>Berberis ruscifolia</i>	80
6.6. Conclusiones Parciales.....	82

CAPÍTULO 7: EVALUACIÓN DEL EFECTO DE BERBERINA SOBRE LA INHIBICIÓN DEL ÓXIDO NÍTRICO Y DE LA EXPRESIÓN PROTEICA DE LA ÓXIDO NÍTRICO SINTASA INDUCIBLE, EN LÍNEAS CELULARES

7.1. Introducción	85
7.2. Objetivos.....	85
7.3. Metodología	86
7.3.1. Ensayos en Líneas celulares derivadas de Macrófago J774A.1	86
7.3.2. Preparación de la solución de berberina	86
7.3.3. Determinación de la viabilidad celular en presencia de berberina... ..	86
7.3.4. Evaluación de la inhibición de la producción de óxido nítrico	86
7.3.5. Evaluación de la inhibición de la expresión proteica de la óxido nítrico sintasa inducible	86
7.3.6. Análisis estadístico	87
7.4. Resultados y Discusión.....	87
7.4.1. Determinación de la Máxima Concentración No Citotóxica e inhibición del óxido nítrico por parte de berberina en líneas celulares	87
7.4.2. Efecto de berberina sobre la inhibición de la expresión proteica de la óxido nítrico sintasa inducible	88
7.5. Conclusiones Parciales.....	89

CAPÍTULO 8: EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTINOCICEPTIVA DE BERBERINA Y LAS VÍAS IMPLICADAS EN LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA

8.1. Introducción	92
8.2. Objetivos	99
8.3. Metodología	99
8.3.1. Animales.....	99
8.3.2. Preparación de las muestras para los experimentos <i>in vivo</i>	99
8.3.3. Actividad antinociceptiva	99

8.3.3.1. Prueba de nocicepción inducida por ácido acético.....	99
8.3.3.2. Prueba de nocicepción inducida por formalina.....	99
8.3.4. Estudio del mecanismo de acción antinociceptivo de berberina....	100
8.3.4.1. Prueba de nocicepción inducida por los diferentes compuestos	100
8.3.5. Análisis estadístico	101
8.4. Resultados y Discusión.....	101
8.4.1. Nocicepción inducida por ácido acético.....	101
8.4.2. Nocicepción inducida por formalina.....	102
8.4.3. Evaluación de mecanismos de acción de berberina.....	104
8.4.3.1. Nocicepción inducida por prostaglandina E ₂ , Bradicinina e Histamina	104
8.4.3.2. Nocicepción inducida por Glutamato.....	106
8.4.3.3. Nocicepción inducida por Capsaicina y Cinamaldehido	106
8.4.3.4. Nocicepción inducida por PMA y Forskolina	107
8.5. Conclusiones Parciales.....	108

CAPÍTULO 9: CONCLUSIONES GENERALES Y PROYECCIONES

9.1. Conclusiones generales.....	111
9.2. Proyecciones	113

CAPITULO 10: BIBLIOGRAFÍA

10.1. Bibliografía	117
--------------------------	-----

Abreviaturas y Acrónimos

[M] ⁺	ión molecular
5-HT	serotonina
AC	adenilato ciclasa
AcN	Acetonitrilo
AINEs	antiinflamatorios no esteroideos
AMPc	adenosín monofosfato cíclico
APME	láminas del asta posterior de la medula espinal
ASIC	canal iónico sensible a ácidos
Asp	aspirina
Berb	berberina
Br	bradicinina
BK	receptor de bradicinina
Caps	capsaicina
CGRP	péptido relacionado con el gen de la calcitonina
Cl ₅₀	concentración inhibitoria media
Cin	cinamaldehido
CO ₂	dióxido de carbono
COX	ciclooxigenasas
D	decocción
DAG	diacilglicerol
DMSO	dimetilsulfóxido
DRG	ganglio de la raíz dorsal
ECF-A	factor quimiotáctico del eosinófilo
EE	extracto etanólico
EMAS	sistema analgésico fisiológico endógeno mediado por endorfinas
EP	receptor de prostaglandina E ₂
ERO	especies reactivas del oxígeno
eNOS	óxido nítrico sintasa endotelial
Fig.	figura
FLA ₂	fosfolipasa A ₂
FM	fase móvil
FSK	forskolina
Glu	glutamato
GluR	receptor de glutamato

GRs	glucocorticoides
His	histamina
I	infusión
IgE	inmunoglobulina E
iGluRs	receptores de glutamato ionotrópicos
IL-1	interleucina 1
IL-12	interleucina 12
IL-1 β	interleucina 1 beta
INF- γ	interferón gamma
iNOS	óxido nítrico sintasa inducible
IP ₃	trifosfato de inositol
i.p.	Intraperitoneal
i.pl.	intraplantar
LOX	lipooxigenasa
LPS	lipopolisacárido
MAPK	proteína kinasa activada por mitógenos
MCNC	máxima concentración no citotóxica
mGluRs	receptores de glutamato metabotrópicos
MH	medicamentos herbarios
Morf	morfina
MR	mineralocorticoide
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-bromuro de tetrazolio
NADPH	dinucleótido de nicotinamida y adenina fosfato
NCF	factor quimiotáctico del neutrófilo
NF- κ B	factor de transcripción nuclear kappa B
NGF	factor de crecimiento nervioso
nNOS	óxido nítrico sintasa neuronal
NO	óxido nítrico
NOS	óxido nítrico sintasa
Nt	Neurotransmisores
OMS	organización mundial de la salud
PP.AA.	principio activo
PGs	prostaglandinas
PGE ₂	prostaglandina E2
PKA	proteína kinasa A
PKC	proteína kinasa C

PLC	fosfolipasa C
PMA	forbol-12-miristato-13-acetato
PN	productos naturales
RI	respuesta inflamatoria
SFB	suero fetal bovino
SN	sistema nervioso
SNC	sistema nervioso central
SNP	sistema nervioso periférico
TLR4	receptor 4 tipo toll
TNF- α	factor de necrosis tumoral alfa
t _R	tiempo de retención
TRP	receptor de potencial transitorio
TRPM8	receptor de potencial transitorio familia M8
TRPV1	receptor de potencial transitorio vanilloide
TRPA1	receptor de potencial transitorio con repetición de anquirina
v.o.	vía oral

CAPÍTULO 1

ANTECEDENTES

1.1 Plantas Medicinales: Relevancia de su estudio

1.1.1 Impacto del conocimiento de las plantas medicinales

Las plantas desde el inicio de la civilización han sido empleadas por la humanidad para cubrir necesidades primarias como alimentación, vestimenta y vivienda. A través de los siglos, el ser humano aprendió a diferenciar las plantas útiles de las peligrosas y descubrir sus propiedades terapéuticas, para usarlas en la medicina, constituyendo una parte sustancial en la vida del hombre desde la antigüedad (Najera, 1983).

Los registros arqueológicos han permitido rastrear el uso de plantas con fines terapéuticos en una gran variedad de culturas, como la egipcia, india, china, griega, romana, entre otras. En la mayoría de los casos, los descubrimientos de plantas curativas, fueron el resultado de la búsqueda de nuevos alimentos. Esta situación llevó a las comunidades a descubrir que muchas de ellas eran comestibles y, observando las costumbres de los animales, pudieron determinar que otras eran venenosas, y algunas servían para combatir enfermedades (Castiglioni, 1941; Rodríguez y col., 2015).

Antiguamente, se consideraba que la enfermedad, más que un hecho natural, era causada por agentes místicos o sobrenaturales, logrando la cura desde la esfera mágico-religiosa, y empleando también plantas y animales (Babini, 2000). Este conocimiento biológico que fue adquiriendo el hombre primitivo fue fundamentalmente empírico, y le permitió reconocer qué plantas le eran útiles y cuáles venenosas o peligrosas (Najera, 1983; Ody, 2017).

Con el tiempo, se descubrieron los motivos del uso de plantas medicinales específicas para el tratamiento de ciertas enfermedades; así, el uso de plantas con fines terapéuticos abandonó gradualmente el marco empírico y se fundó en hechos explicativos, donde el hombre comenzó a comprender las propiedades curativas o benéficas de algunas de ellas (Kelly, 2009).

El descubrimiento de América tuvo importantes implicancias sobre la medicina del viejo mundo, dado que se tuvo conocimiento sobre otras especies que eran empleadas medicinalmente, como así también sobre otros conceptos relacionados a enfermar, curar, vivir, morir y diferentes actitudes de quien curaba frente al paciente, por parte de las culturas aborígenes.

Además, los profundos cambios sociales, el surgimiento de nuevas corrientes de pensamiento y el desarrollo de las doctrinas científicas incentivaron los primeros estudios científicos de las propiedades medicinales de las plantas, alejándolas del misticismo que las rodeaba (Edelsztein, 2011), teniendo en cuenta lo aportado por las diferentes culturas, dando origen a todo un conocimiento de plantas medicinales que ha constituido la base de la medicina moderna. Este es un patrimonio que no puede atribuirse a ninguna cultura en particular sino al hombre en su globalidad y que nos corresponde a todos conocer y salvaguardar.

De acuerdo con la OMS (2002), una planta medicinal es definida como cualquier especie vegetal que contiene sustancias que pueden ser empleadas para propósitos terapéuticos o cuyos principios activos (PP.AA) pueden servir de precursores para la síntesis de nuevos fármacos.

A su vez, la Farmacopea Argentina define Droga Vegetal de la siguiente manera: “*Se denomina así a las plantas o sus partes enteras, molidas o pulverizadas (flores, frutos, semillas, tubérculos, cortezas, etc.) frescas o secas, así como los jugos, gomas, látex, aceites esenciales o fijos y otros componentes similares, que se emplean puras o mezcladas en la elaboración de medicamentos*”. (Farmacopea VII edición, 2013).

La primera separación de un compuesto químico a partir de una droga vegetal, fue obtenido de la especie *Papaver somniferum* L., el principio activo fue la morfina utilizado en la actualidad como un potente analgésico narcótico (Villar del Fresno, 1999). Este hecho marcó una nueva era en el estudio de las plantas medicinales, encaminada hacia el aislamiento, purificación e identificación de las moléculas (PP.AA.) que producen el efecto curativo de las plantas medicinales (Sewell y Rafieian-Kopaei, 2014).

Además, los numerosos metabolitos activos aislados de plantas medicinales sirvieron y continúan siendo valiosos modelos para el desarrollo de nuevos fármacos sintéticos o semisintéticos con igual o mayor actividad biológica y, en algunos casos, más estables y menos tóxicos. Es relevante destacar, que muchos PP.AA. se siguen obteniendo de la naturaleza, dado que su síntesis es compleja o su costo es mayor que su producción a partir de la especie vegetal.

Según los informes, se ha demostrado que alrededor de 70.000 especies de plantas desde el nivel más bajo de líquenes hasta el nivel más alto de árboles tienen el potencial para tratar diversas enfermedades (Kuruppu y col., 2019).

A su vez, se ha informado que un 50% de los medicamentos utilizados en la terapia moderna contienen Productos Naturales (PN) o sus derivados, y cerca de un tercio de las drogas más comercializadas, derivan de plantas (Barboza y col., 2006; Gurib-Fakim, 2006).

Toda esta información plasmada revaloriza el estudio de las plantas, y específicamente aquellas con un uso medicinal.

1.1.2 Bioprospección de plantas medicinales: porqué investigarlas

El consumo de plantas con fines terapéuticos ha constituido el objetivo prioritario de numerosas instituciones internacionales y fue declarado de interés mundial por la OMS en 1987 (Vignale y Pochettino, 2009).

A la hora de investigar y encontrar nuevos fármacos, los métodos de prospección al azar en la búsqueda de compuestos activos por parte de la industria farmacéutica permanecen vigentes, pero en los últimos años se ha prestado una mayor atención a la utilización de la información etnofarmacológica, para seleccionar plantas en la búsqueda de compuestos con actividad biológica (Pochettino, 2015).

El uso de plantas como medicamentos a través de los siglos también ha derivado en el descubrimiento de un importante número de PP.AA. de origen vegetal. Algunos de ellos han sido aprobados como medicamentos, destacando el antimalárico artemisinina, los antiinflamatorios curcumina y ácido acetil-salicílico, la digoxina, utilizada en el tratamiento de enfermedades cardiovasculares, la morfina un potente analgésico narcótico, la silimarina con

un efecto hepatoprotector, la galantamina, utilizada en la enfermedad de Alzheimer, los antitumorales paclitaxel, resveratrol, vincristina y vinblastina, entre otros (Martínez, 2008; Morales, 1996; Newman y col., 2003; Pirttila y col., 2004).

En la actualidad, las referencias de plantas empleadas por sus habitantes como medicinales, en la mayoría de los casos, sólo cubren aspectos botánicos básicos. Incluso los datos acerca de sus acciones terapéuticas son empíricos y aún se carece de un fundamento científico que lo demuestre, ya que el 45% de estas especies no han sido analizadas químicamente y el 58% no se ha comprobado farmacológicamente la actividad, según la información etnobotánica disponible (Barboza y col., 2009). Esto refuerza la necesidad de profundizar la bioprospección de estas especies, empleadas tradicionalmente.

Muchas de las plantas medicinales que se dispensan en las Farmacias comunitarias no son oficiales (no se encuentran en Farmacopeas) y su aplicación se basa en las experiencias de su uso popular, desconociéndose en la mayoría de los casos la naturaleza de sus PP.AA. (OMS; 2013).

Así, y en favor de una terapia adecuada y aplicada con éxito, el conocimiento del diagnóstico preciso de la enfermedad, así como de las plantas medicinales, es decir, el efecto farmacológico de sus componentes, es esencial (Petrovska, 2012).

Por otra parte, existe una falsa creencia que todo lo natural es más saludable y, analizando a las plantas medicinales, éstas son un material bioactivo, que utilizado en dosis adecuadas puede resultar benéfico con fines terapéuticos, pero también puede ser nocivo generando intoxicaciones en quien las consume, ya sea por un efecto directo (presencia de sus PP.AA.) como por su mal uso (técnicas de preparación, de administración, error en la identificación de las especies, adulteración). Numerosos ejemplos pueden ser citados en este sentido como lo son el consumo de: borraja, hinojo, mastuerzo, peperina, nuez moscada, paico, ricino, yerba de pollo, entre otras (Ragonese y Milano, 1984).

Por lo explicitado anteriormente, la OMS acordó impulsar la documentación y evaluación científica de las plantas utilizadas en la medicina tradicional, abriendo las puertas al diálogo entre la medicina tradicional y la moderna, sobre la base de que las prácticas peligrosas fueran eliminadas y sólo se promovería lo que fuese seguro y eficaz (Albornoz, 1993; Akerele, 1993).

En virtud de lo expuesto, la autoridad sanitaria elaboró normativas específicas que regulan a las plantas medicinales y sus preparados para garantizar calidad seguridad y eficacia en su utilización.

En este sentido, cobra importancia no sólo la separación, purificación e identificación de sus principales componentes activos sino también, la determinación de sus efectos biológicos ya sea de preparados de la droga vegetal o de sus PP.AA.

En nuestro país y mediante la Resolución 1817/13 del Ministerio de Salud del año 2013, se definió la figura de Medicamentos Herbarios (MH), otorgando así el marco legal necesario para estos productos. Posteriormente, se reglamentó (Disposición Reglamentaria 5418/2015), definiendo además la figura de Medicamentos Herbarios de Uso Tradicional. Este marco regulatorio incluye a las plantas medicinales, las personas y las actividades relacionadas con las mismas (importación, exportación, elaboración, fraccionamiento, y

distribución de las drogas vegetales, los preparados de drogas vegetales y los medicamentos herbarios) que permite poder garantizar la calidad, inocuidad y eficacia de los medicamentos herbarios, para ayudar a las autoridades nacionales, organizaciones científicas y fabricantes (Ministerio de Salud, 2013).

Estos antecedentes permiten valorar la importancia de la investigación de la flora nativa con un uso medicinal. Así, esta tesis doctoral está orientada a la evaluación del uso designado de ciertas drogas vegetales no oficiales y su eficacia. Específicamente, se quieren validar los efectos analgésicos y antiinflamatorios atribuidos por la medicina tradicional. De esta manera podremos avalar la información etnofarmacológica existente sobre estas drogas vegetales, validando su efecto terapéutico, aportando información científica que redundaría en beneficio de la salud de la población. Por otro lado, esta información sería de utilidad para los laboratorios elaboradores de medicamentos herbarios ya que contarían con investigación científica relacionada a la eficacia de las diferentes especies analizadas.

1.2. Estudio de Actividad Biológica

1.2.1. Inflamación: respuesta a un estímulo nocivo

La reacción inflamatoria constituye el despliegue de una serie de respuestas defensivas producidas en los tejidos frente a la presencia de agentes patógenos (bacterias, virus, parásitos y hongos), agentes físicos como radiaciones, agentes químicos (venenos y toxinas), traumatismos (daños físicos) y cuerpos extraños. A nivel macroscópico, los signos clínicos que acompañan la respuesta inflamatoria son enrojecimiento (rubor), hinchazón (tumor), aumento de la temperatura (calor), sensibilidad (dolor) y pérdida de la función en la zona afectada, conocidos como los puntos cardinales de Celsos (Medzhitov, 2010), en donde el cuerpo intenta restaurar el daño ocasionado.

Por esta razón, se afirma que la inflamación es fundamentalmente una respuesta de carácter protector y de no existir este proceso, las infecciones se propagarían de manera incontrolada, las heridas no se curarían nunca y los órganos lesionados presentarían lesiones supurativas de forma permanente. Sin embargo, en ciertas situaciones, como en reacciones alérgicas y enfermedades crónicas, el proceso inflamatorio constituye el mecanismo patogénico básico (Regal y col., 2015).

Los acontecimientos celulares y vasculares de la respuesta inflamatoria (RI) están mediados por factores químicos provenientes del plasma o de las células que son activadas por el propio estímulo inflamatorio. Estos mediadores actúan de forma aislada, secuencial o en combinación, y en fases posteriores, amplifican la RI e influyen en su evolución. Las células y tejidos necróticos también pueden activar la formación de mediadores químicos (Munford, 2006).

El edema es generado por la acumulación de líquido (agua, electrolitos y proteínas) en la zona dañada debido al aumento de la permeabilidad en los vasos sanguíneos, ocasionado por la vasodilatación (hiperemia) que ocurre en el proceso inflamatorio. Como resultado se observa la elevación de la temperatura, enrojecimiento, hinchazón y dolor ocasionado por la presión ejercida sobre las terminales nerviosas, debido al exceso del líquido comprimido en la zona inflamada. El dolor también es el resultado de la acción

de un grupo específico de mediadores que se generan en el proceso inflamatorio [principalmente: prostaglandinas (PGs), bradicinina (Br) y sustancia P], los cuales actúan sobre las terminales nerviosas, desencadenando una señal nerviosa que activa los centros de dolor en el cerebro. Estos eventos se deben a los procesos vasculares que ocurren en la RI (Serhan y col., 2010; Hart y Loeffler, 2012; Regal y col., 2015).

Otros eventos que ocurren durante la inflamación se debe a los procesos celulares, los cuales incluyen la activación de células endoteliales, reclutamiento de leucocitos, interacciones adhesivas entre leucocitos y el epitelio vascular, activación de los macrófagos del tejido, activación de las plaquetas y su agregación, activación de los sistemas del complemento, fibrinolítico y de coagulación, y liberación de proteasas y agentes oxidantes por parte de las células fagocíticas (Serhan y col., 2010; Hart y Loeffler, 2012).

La resolución de la inflamación requiere la finalización de las rutas de señalización proinflamatorias y la eliminación de células inflamatorias, seguido de la restauración de la función normal del tejido. (Serhan y col., 2010).

Todos los sucesos que caracterizan al proceso inflamatorio son inducidos y regulados por una serie de moléculas conocidas, en conjunto, como mediadores de la inflamación. Algunos de estos agentes químicos provienen de células (principalmente mastocitos), mientras que otros tienen su origen en proteínas que se encuentran en el plasma sanguíneo y son sintetizadas en respuesta a diferentes estímulos. Los mediadores químicos fundamentales en la RI, se muestran en la tabla 1.1 (Regal y col., 2015).

Tabla 1.1: Mediadores Químicos de la respuesta inflamatoria

Mediador químico	Acción
Histamina y serotonina	Incremento de la permeabilidad y dolor.
Bradicinina	Incremento de la permeabilidad y dolor.
Sustancia P	Incremento de la permeabilidad y dolor.
C3a (producto del complemento, anafilotoxinas)	Incremento de la permeabilidad.
C5a (producto del complemento, anafilotoxinas)	Incremento de la permeabilidad, quimiotaxis, adhesión y activación leucocitaria.
Prostaglandinas	Vasodilatación, dolor, fiebre, activa a otros mediadores.
Leucotrieno B ₄ (metabolitos del ácido araquidónico)	Quimiotaxis, adhesión y activación leucocitaria.
Leucotrieno C ₄ , D ₄ , E ₄ (metabolitos del ácido araquidónico)	Incremento de la permeabilidad, broncoconstricción.
Interleucina-1 (IL-1) y Factor de necrosis tumoral (TNF) (citocinas)	Reacciones de fase aguda, activación endotelial, quimiotaxis.
NO (Óxido nítrico)	Incremento de la permeabilidad, vasodilatación, citotoxicidad.

1.2.1.1. Fases de la inflamación

La respuesta inflamatoria se puede organizar en una serie de cinco etapas: liberación de mediadores, efecto de mediadores, llegada de moléculas y células inmunes al foco inflamatorio, regulación del proceso inflamatorio, y resolución o finalización.

➤ Liberación de mediadores

Aunque todos los tejidos al lesionarse van a liberar mediadores de la inflamación, la fuente principal de los mismos es el mastocito, célula inmune inespecífica que procede de la médula ósea. En su citoplasma contiene gránulos con mediadores de la inflamación preformados, que son liberados al activarse, junto con otros de carácter lipídico. El mastocito se detecta en casi todos los tejidos, siendo localizado principalmente alrededor de los pequeños vasos, sobre los que actuarán los mediadores [histamina (His), enzimas proteolíticas, el factor quimiotáctico del eosinófilo (ECF-A) y el factor quimiotáctico del neutrófilo (NCF)], una vez liberados (Crowley, 2010).

El daño también desencadena una cascada de reacciones que lleva a la liberación del ácido araquidónico, que será utilizado como sustrato para la síntesis *de novo* de PGs, tromboxanos, leucotrienos y factor activador de plaquetas.

➤ Efectos de mediadores

Una vez que son liberados, los mediadores producen alteraciones vasculares como la acción dilatadora de los vasos más pequeños que son arteriolas, metaarteriolas y esfínteres precapilares, hiperemia activa (aumento del flujo sanguíneo en la zona de la lesión generando eritema), aumento de la permeabilidad de vénulas poscapilares, produciendo la salida de un exudado inflamatorio hacia los tejidos extravasculares y la aparición de edema inflamatorio. Por otra parte, estos mediadores también estimulan las terminaciones nerviosas del dolor y de los efectos quimiotácticos que favorecen la llegada de moléculas y células inmunes al foco inflamatorio (eosinófilos, neutrófilos, mastocitos y macrófagos). El objetivo de esta etapa es mantener la respuesta inflamatoria hasta que el daño sea controlado y reparado (Crowley, 2010).

➤ Llegada de moléculas y células inmunes al foco inflamatorio

Tanto las alteraciones vasculares como los factores quimiotácticos, determinan la llegada de células inmunes procedentes de la sangre y de los tejidos circundantes. El movimiento de leucocitos tiene lugar desde la luz vascular hacia la zona de la lesión, acorde a los siguientes pasos secuenciales: adhesión, transmigración y quimiotaxis, teniendo lugar la activación leucocitaria, inducida por los factores quimiotácticos, por la fagocitosis y/o por los complejos antígeno-anticuerpo. Los leucocitos fagocitan a los patógenos, destruyen a las bacterias y a los microorganismos y degradan el tejido necrótico, pero también pueden prolongar la lesión tisular, al liberar enzimas,

mediadores químicos y especies reactivas del oxígeno (ERO) (Cook y Deem, 2005; Munford, 2006).

En el proceso de reclutamiento de leucocitos que ocurre durante la inflamación, los neutrófilos son los primeros en salir de los vasos en número significativo y migrar al sitio de lesión para eliminar el agente infeccioso. Más tarde llegan los macrófagos, los cuales se encargan de fagocitar los agentes patógenos y detritus celulares, productos obtenidos de la apoptosis y necrosis celular. Los basófilos contribuyen, junto con el mastocito, a la liberación de mediadores. Por último, los linfocitos T y B, potenciados por el macrófago, inician la respuesta específica. Las células B procedentes de los tejidos linfoides asociados a tejidos o mucosas sintetizan inmunoglobulina E (IgE), que unidas al mastocito o basófilo, pueden potenciar la inflamación. Por otra parte, las células T comienzan a producir linfoquinas que prolongan la inflamación en una respuesta inmune más elaborada (Crowley, 2010).

➤ **Regulación del proceso inflamatorio**

La respuesta inflamatoria llega a su fin mediante un mecanismo de autorregulación, el cual disminuye los mediadores activos generados en el proceso mediante la expresión de genes antiinflamatorios.

De esta manera el fenómeno inflamatorio se encuentra estrechamente regulado, evitando así una respuesta exagerada o perjudicial.

Dicha etapa de la inflamación está mediada por un cambio activo en los mediadores al variar su concentración o al actuar sobre distintos receptores que predominan en el sitio de inflamación, este cambio debe producirse para que ocurra la transición del estado inflamatorio a la homeostasis (Crowley, 2010).

➤ **Resolución**

El proceso de resolución se inicia rápidamente en el lugar por mecanismos que incluyen la remoción de las células del sistema inmune por vía linfática o por apoptosis, termina la migración de los leucocitos, los vasos sanguíneos adquieren su permeabilidad normal, eliminación de los depósitos de fibrinas, de restos celulares, y producción de mediadores que inhiben y limitan la inflamación.

Cuando las causas de la agresión han desaparecido o han sido eliminadas por la propia respuesta inflamatoria, se inician los procesos de reparación. Estos procesos integran la llegada a la zona de fibroblastos que van a proliferar y sintetizar colágeno, proliferación de células epiteliales y proliferación de vasos dentro de la herida (Nathan y Ding, 2010).

En el caso que el agente que generó la respuesta inflamatoria no se eliminó, la fase de resolución puede no inducirse adecuadamente lo que lleva a un estado inflamatorio crónico (Kumar y col., 2003; Majno y Joris, 2004).

1.2.1.2. Diferentes enzimas involucradas al proceso inflamatorio

El proceso inflamatorio es regulado por diferentes vías metabólicas, las cuales desencadenan una cascada de respuestas reguladas por enzimas específicas de la inflamación. Por ende, la inhibición de ciertas enzimas permite

regular la respuesta inflamatoria. En el siguiente apartado, se hará mención de algunas de las enzimas involucradas en el proceso inflamatorio.

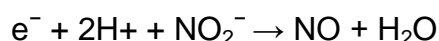
✓ *Enzimas que metabolizan el ácido araquidónico*, el cual es un ácido graso unido a la membrana celular que es liberado por la enzima fosfolipasa A₂ (FLA₂), la cual es activa en el proceso inflamatorio (Yarla y col., 2015). El metabolismo del ácido araquidónico se lleva a cabo por dos vías enzimáticas: una es la producida por las enzimas *ciclooxigenasas* (COX) dando como productos finales las PGs y los tromboxanos, y la otra es la vía de la enzima *lipooxigenasa* (LOX) obteniendo los leucotrienos y lipoxinas (Nworu y Akah, 2015).

✓ *Enzima hialuronidasa*, cuyo sustrato es el ácido hialurónico, genera fragmentos del ácido donde los de menor peso molecular son responsables de estimular la transcripción de genes proinflamatorios, como los que codifican para el factor de necrosis tumoral alfa (TNF-α), interleucina 12 (IL-12) e interleucina 1 beta (IL-1β), también estimulan la producción de citocinas, factores de crecimiento, proteasas y NO (Petrey y De la Motte, 2014).

✓ *Enzima óxido nítrico sintasa (NOS)*, responsable de la producción de NO la cual describiremos a continuación.

Óxido Nítrico Sintasa inducible

El NO es una molécula que en nuestro organismo produce una gran variedad de efectos tanto beneficiosos como perjudiciales para la salud humana. Esta molécula se encuentra en nuestro organismo por medio de la síntesis de diferentes células, ya sea por la vía no enzimática o por la enzimática. En el caso de la síntesis no enzimática, el NO se obtiene por reducción de los nitritos, síntesis beneficiada en condiciones ácidas, por medio de la siguiente fórmula general (Luiking y col., 2010):



Cuando es por vía enzimática, un conjunto de enzimas llamadas óxido nítrico sintasa, sintetizan al NO, donde el aminoácido L-arginina es el precursor de su síntesis (Moncada y col., 1989), mediante un proceso de oxidación-reducción en presencia de oxígeno molecular y de NADPH (dinucleótido de nicotinamida y adenina fosfato) (Fig. 1.1) (Janakiram y Rao, 2012).

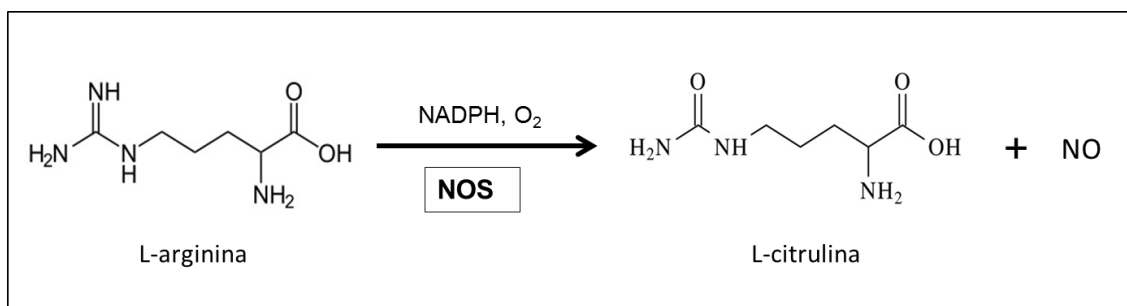


Fig. 1.1: Síntesis del óxido nítrico a partir del aminoácido L-arginina.

Debido a las características del NO, esta molécula no puede ser almacenada, de modo que la regulación de la enzima que cataliza su síntesis

es fundamental. Tres isoformas de esta enzima son encontradas en nuestro organismo, dos de ellas constitutivas, dependientes de calcio: la isoforma neuronal (nNOS), también denominada tipo I (NOS1) y la isoforma endotelial (eNOS), también conocida como tipo III (NOS3). Dichas isoformas son las que producen cantidades bajas y fisiológicas de NO durante períodos cortos de tiempo, cumpliendo éste una función como la de neurotransmisor o participando en procesos fisiológicos, como en la relajación del músculo liso (Janakiram y Rao, 2012; Moncada y *col.*, 1997). La restante isoforma, corresponde a una NOS inducible (iNOS), independiente de calcio, también denominada de tipo II (NOS2), cuya expresión puede ser provocada en tipos celulares diferentes, tales como macrófagos, hepatocitos, neutrófilos, músculo liso y endotelio en respuesta a estímulos de carácter exógeno, como lipopolisacáridos o endotoxinas; o endógeno, como citoquinas (IFN- γ , TGF- β y TNF- α) y algunas interleucinas. Esta isoforma cataliza la producción de gran cantidad de NO, que puede ser tóxico en ciertas circunstancias o para ciertos grupos celulares (Moncada y *col.*, 1997; Salvemini y *col.*, 2013). Además, el NO puede funcionar como una molécula pro-inflamatoria, mediante la activación de las enzimas COX y con ello aumentar la producción de las PGs (Gilmore, 2006).

La actividad de iNOS está predominantemente regulada a nivel transcripcional y es responsable de la formación de NO (Luiking y *col.*, 2010; Reiber y *col.*, 2017). Este programa de activación es el más importante, pero no es el único. Se sabe que las células musculares lisas también contienen pequeñas cantidades de iNOS. La activación crónica de las células puede incrementar la síntesis de dicha isoforma e incrementar la síntesis total de NO (Gosgnach y *col.*, 2000)

La iNOS es sobreexpresada durante los procesos inflamatorios agudos o crónicos, y se diferencia de las variantes constitutivas por producir NO en grandes cantidades y de forma sostenida.

La participación del NO en la respuesta inflamatoria ha sido demostrada en modelos animales y en enfermedades inflamatorias humanas (Kawachi y *col.*, 1999), el rol de esta molécula durante el proceso inflamatorio es ambiguo y parece depender fundamentalmente de la concentración y el momento en que es sintetizado. Por una parte, el NO cumple un rol defensivo relevante ya que actúa como agente inmunoregulador y antimicrobiano, gracias a su capacidad para originar daños en el ADN, inhibir enzimas del metabolismo energético, oxidar proteínas y peroxidar lípidos de la membrana de los agentes patógenos. Sin embargo, en altas concentraciones el NO ejerce los mismos efectos sobre las células de los tejidos inflamados, exacerbando el daño y, en consecuencia, el proceso inflamatorio (Lo Faro y *col.*, 2014). Por otra parte, el NO ejerce sus funciones inflamatorias al producir vasodilatación, alteración de la permeabilidad vascular y extravasación de proteínas plasmáticas (Szabó y Dawson, 1998; Whittle, 1995). En una fase más tardía o crónica de la inflamación, la señal inflamatoria puede magnificarse mediante la producción de moléculas como el factor de transcripción nuclear kappa B (NF- κ B), TNF- α y el interferón gamma (IFN- γ); estos, promoverían la transcripción de la iNOS, generándose grandes cantidades de NO, mayor vasodilatación, edema y exudación plasmática; este NO puede sufrir procesos de transformación a productos altamente reactivos capaces de inducir daño por diversos mecanismos, siendo uno de los más importantes, el daño de la doble hélice del

DNA, con la consecuente muerte celular (Ridger y col., 1997; Szabó y Dawson, 1998).

Una producción exacerbada de NO se ha observado en una gran variedad de enfermedades de carácter crónico, como artritis reumatoidea, asma, osteoartritis, diabetes, etc. (Luiking y col., 2010; Lo Faro y col., 2014).

1.2.1.3. Medicamentos Antiinflamatorios

El principal objetivo de la terapia antiinflamatoria es aliviar los síntomas, particularmente la inflamación y el dolor asociado.

Los medicamentos antiinflamatorios constituyen un variado grupo de sustancias ampliamente utilizadas para el tratamiento de patologías que causan inflamación, dolor, fiebre y trombosis (Harirforoosh y col., 2013).

Los principales medicamentos antiinflamatorios son los glucocorticoides (GRs) y los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) los cuales se usan para tratar enfermedades agudas y crónicas, sin embargo, muchos son los daños que causa su consumo en altas dosis o por períodos prolongados (Brune y Patrignani, 2015).

➤ Antiinflamatorios no esteroideos

Los AINEs son los fármacos más extensamente utilizados, se los receta para molestias reumáticas y dolencias musculoesqueléticas, y con mucha frecuencia se los toma sin prescripción médica para dolores menores (Brune y Patrignani, 2015). Es un grupo de compuestos muy diverso estructuralmente, que comparten actividad antiinflamatoria y además la mayoría presentan efecto analgésico y antipirético.

Actualmente se puede clasificar a los AINEs en dos categorías: no selectivos y selectivos. El primer grupo corresponde a los antiinflamatorios que inhiben a las enzimas COX-1 y COX-2 mientras que el segundo grupo, corresponde a los fármacos que inhiben selectivamente una de estas enzimas: la COX-2.

Un inconveniente que presentan los AINEs tradicionales, es la gran variedad de efectos colaterales no deseados que trae aparejado su administración, durante períodos de tiempo prolongados, destacándose: fallo renal, hepatitis, anemia, reacciones anafilácticas y los de mayor frecuencia, los gastrointestinales como las úlceras y erosiones gastroduodenales, hemorragias digestivas y perforación. Estas reacciones adversas gastrointestinales, también pueden aparecer en tramos distales del tubo digestivo, así como inflamación y cambios en la permeabilidad del mismo (colitis, enfermedad inflamatoria intestinal) (Brune y Patrignani, 2015). La úlcera gástrica ha sido una de las principales razones de mortalidad y morbilidad, con una prevalencia de al menos el 10% de la población mundial (Raafata y col., 2019).

Esto ha llevado al desarrollo de fármacos selectivos de la enzima COX-2, los cuales causan menor toxicidad para el sistema digestivo. Sin embargo, estos fármacos alteran la función renal, así la enzima COX-2 se expresa principalmente en el riñón y al bloquearlo, se asocia con hiperpotasemia, edemas, hipertensión arterial e insuficiencia renal y también con problemas cardiovasculares, lo cual limita su empleo durante tiempos prolongados y en

pacientes con antecedentes de enfermedades cardiovasculares y cardiopatías (Bhala y col., 2013; Feria, 2003).

➤ **Antiinflamatorios esteroideos**

Los antiinflamatorios esteroidales o GRs son fármacos antiinflamatorios, antialérgicos e inmunosupresores derivados del cortisol o hidrocortisona, hormona producida por la corteza adrenal esencial para la adaptación al estrés físico o emocional, los cuales son ampliamente utilizados para tratar una gran variedad de desórdenes autoinmunes, inflamatorios y alérgicos, como la artritis reumatoidea, lupus eritematoso, inflamación intestinal, asma, entre otros (Vandewalle y col., 2018, Serra y col., 2012).

Los corticoides ejercen su efecto antiinflamatorio de diversas formas dependiendo del estadio de la inflamación. Así, estos agentes inhiben la vasodilatación y disminuyen la permeabilidad vascular en los inicios de la respuesta inflamatoria. Así mismo, afectan la diferenciación celular y reducen la migración de leucocitos al sitio afectado, así como también su distribución y muerte (Coutinho y Chapman, 2011).

Los corticoides presentan distintos mecanismos de acción:

- ✓ Actuando por un mecanismo genómico, activando los receptores glucocorticoide (GR) y el mineralocorticoide (MR), donde producen inhibición de genes proinflamatorios y activación de genes antiinflamatorios.
- ✓ Inhibiendo la acumulación de macrófagos y neutrófilos en focos inflamatorios, inhibición de la degranulación y respuesta de los mastocitos a la IgE (Barnes, 2010; Coutinho y Chapman, 2011; Serra y col., 2012).
- ✓ Un tercer mecanismo que consiste en modificaciones postranscripcionales, impidiendo la inactivación de ARNasas inhibiendo así, la expresión de genes que codifican para enzimas proinflamatorias (iNOS, FLA₂, COX y LOX) (Barnes, 2010).

A pesar de su amplio uso como antiinflamatorios, los GRs presentan una gran variedad de efectos adversos cuando son administrados por tiempo prolongado, como la disminución o detención del crecimiento en niños, úlceras pépticas, hiperglucemia con posible desarrollo de diabetes, insuficiencia suprarrenal, retención de sodio y agua, hipertensión, osteoporosis, trastornos en la cicatrización de heridas, entre otros. Además, pueden producir corticodependencia y corticorresistencia, y su acción inmunosupresora favorece la diseminación de infecciones y es por ello, que deben reservarse para aquellos casos en que otros fármacos son probadamente ineficaces o están contraindicados (Vandewalle y col., 2018; Serra y col., 2012).

El mejor entendimiento de la respuesta inflamatoria ha conllevado importantes avances en el desarrollo de diferentes fármacos para el tratamiento de enfermedades asociadas a desórdenes inflamatorios. Sin embargo, los tratamientos convencionales han demostrado no ser totalmente efectivos, ya que sus efectos son variables, en particular cuando el tratamiento es iniciado luego de que la enfermedad se ha establecido. En este caso las remisiones de la enfermedad no suelen ser a largo plazo, y presentan gran cantidad de efectos adversos (Tabas y Glass, 2013). Estos inconvenientes suelen empeorar cuando se trata de enfermedades crónicas complejas.

Al ser tan complejo el proceso de inflamación, un solo compuesto no puede actuar en todas las dianas farmacológicas que éste presenta, además

cada patología que, en su sintomatología presenta un proceso de esta naturaleza, revela otras características y factores asociados; sumado a esto, entre estos compuestos, existen algunos que generan efectos secundarios o acción limitada. Es por ello que es fundamental la búsqueda de compuestos antiinflamatorios que puedan ayudar a disminuir los efectos secundarios y aquellos asociados a la inflamación.

El creciente aumento de las enfermedades crónicas complejas que requieren largos períodos de tratamiento ha llevado al resurgimiento de las terapias alternativas que buscan paliar los síntomas de la enfermedad en sí misma o contrarrestar los efectos secundarios de las terapias tradicionales (Yang y col., 2014). El mayor inconveniente de las terapias con drogas sintéticas está asociada a sus diversos efectos adversos, los cuales, si bien son reducidos gracias a las menores concentraciones necesarias en estas terapias o al efecto contrarrestante de otro componente, siguen siendo un factor limitante para su utilización (RATHERA y col., 2013)

1.2.2. *Dolor*

El dolor es una experiencia subjetiva en la que intervienen diversos componentes sensoriales, afectivos y evaluativos, refiriéndose estos últimos a la magnitud de esta experiencia. Así, el dolor sería, una interpretación subjetiva de los impulsos nerviosos causados por un estímulo que está lesionando al organismo; dicha sensación se constituye como una experiencia vital para la supervivencia y la adaptación del individuo, por lo tanto, para la preservación de la especie.

La transmisión del dolor es un mecanismo que involucra interacciones muy complejas de las estructuras periféricas y cerebrales, desde la superficie de la piel hasta la corteza cerebral (Furst, 1999).

Además, el dolor se puede nombrar de acuerdo con el tipo de lesión y mediadores involucrados en "nociceptivo", "neurogénico", "neuropático" y "psicógeno", que se asocia, respectivamente, con una estimulación nociceptiva excesiva, lesión del tejido neural, disfunción nerviosa o factores psicológicos (Millan, 1999). Algunos trastornos ocurren comúnmente en pacientes que experimentan dolor, como hiperalgesia (sensibilidad exacerbada a un estímulo doloroso), alodinia (dolor en respuesta a un estímulo no doloroso) e hiperestesia (sensibilidad anormal a un estímulo sensorial) (Besson, 1999).

En términos de duración, un episodio doloroso puede ser transitorio, agudo o crónico. En el tipo transitorio, los nociceptores se activan en ausencia de daño tisular. En el dolor agudo, generalmente hay lesiones y activación de nociceptores en el sitio lesionado. El dolor crónico, por otro lado, generalmente es causado por una lesión o patología, que también puede perpetuarse por otros factores, además de las causas iniciales del dolor (Loeser y Melzack, 1999).

La comprensión de los mecanismos involucrados en la transmisión del proceso doloroso ha progresado en los últimos años, dado que hubo una mejor comprensión de los mecanismos involucrados en la fisiología de las fibras aferentes y del proceso de neurotransmisión en el asta dorsal de la médula espinal, progreso que fue obtenido mediante estudios con modelos animales, contribuyendo a generar alternativas de tratamiento, control y prevención del

dolor (Coderre y col., 1986; Hogan, 2002; Hough y col., 2004; Okon, 2007; Rodin y Kruger, 1984; Vos y col., 1994).

Este avance se logró dado que el dolor, tanto en los humanos como en los animales, tiene muchos aspectos en común y los estudios con animales que simulan las condiciones clínicas del dolor, han ayudado enormemente a entender los procesos que subyacen esta experiencia. Así, se lograron establecer los efectos favorables o desfavorables de una droga o de un procedimiento (Coderre y col., 1986; Vos y col., 1994). Sin embargo, a pesar de estos avances, los mecanismos exactos involucrados en la génesis y transmisión del dolor aún no han sido dilucidados completamente y hasta el momento, no se han desarrollado analgésicos eficaces y potentes, especialmente para el tratamiento del dolor crónico (Macfarlane y col., 1997).

Por otra parte, el dolor es considerado como un problema de Salud Pública en aumento, y a nivel mundial, dado que no solo afecta el bienestar normal de un individuo, sino también su salud y productividad (Wang y col., 2014). Esta situación conlleva a que los medicamentos analgésicos sean muy recetados en la actualidad, con un uso prolongado que produce efectos adversos potencialmente graves (Roth, 2013; Sam, 2008).

1.2.2.1. Procesos neurofisiológicos que participan en el dolor

Entre el lugar donde se produce la agresión y la percepción de dicho daño, ocurren una serie de procesos neurofisiológicos denominados nocicepción, que es el componente fisiológico del dolor y corresponde al proceso de *transducción, transmisión y modulación* de las señales nerviosas que se generan en respuesta a un estímulo nocivo, que son enviadas al sistema nervioso central (SNC), resultando así la *percepción* consciente del dolor (Guirimand, 2003). En una forma más compleja del sistema, puede haber comunicación con otras neuronas sensitivas y neuronas descendentes inhibitorias que provienen del cerebro medio y que son capaces de modular el estímulo doloroso (Lamont y col, 2000).

A continuación, veremos las distintas etapas indicadas.

➤ **Transducción**

El dolor fisiológico se inicia en las fibras sensoriales nociceptoras especializadas de los tejidos periféricos, activadas solo por estímulos nocivos. La afluencia sensorial generada por los nociceptores, activa las neuronas de la médula espinal que se proyectan al córtex por vía talámica, provocando dolor (Fig. 1.2). La señal del nociceptor también activa e incrementa el reflejo de retirada y la respuesta emocional, autonómica y neurohumoral.

La transducción se lleva a cabo en los receptores sensoriales, llamados nociceptores (abreviación del término noci-receptor) que son las terminaciones periféricas de las fibras aferentes sensoriales primarias.

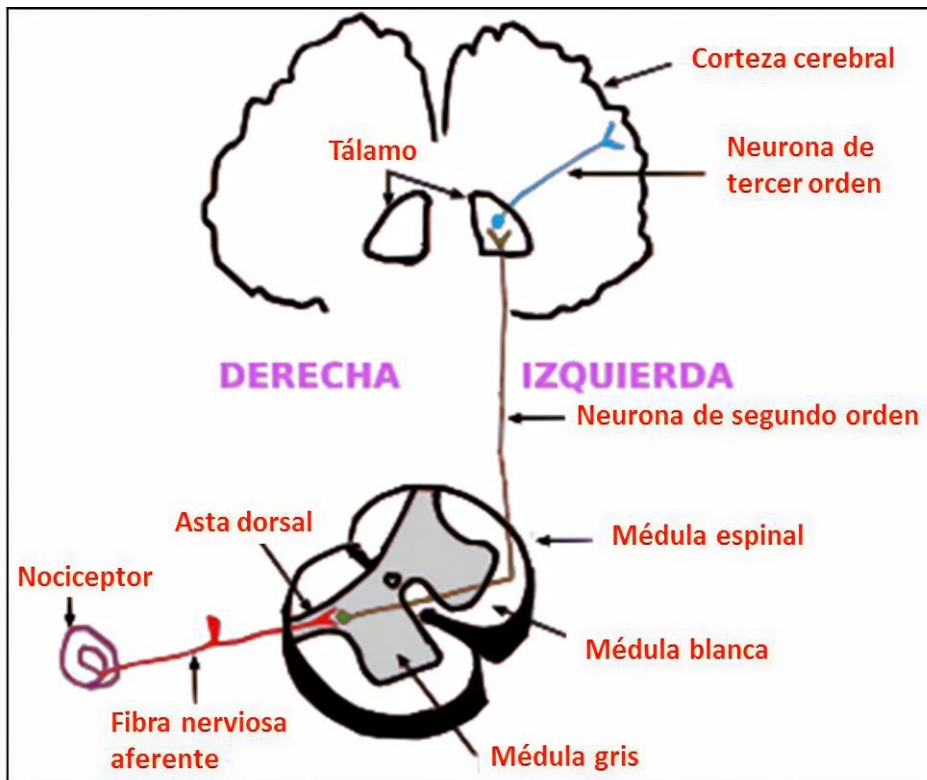


Fig. 1.2: Transmisión del dolor desde el receptor nociceptivo hasta la corteza cerebral (autor: Bettina Guebeli).

Los nociceptores tienen la capacidad de diferenciar estímulos inocuos y estímulos nocivos, dado que son capaces de activarse frente a estímulos de una determinada intensidad, mientras que no responden o responden irregularmente a estímulos de intensidad baja. A su vez, los nociceptores no suelen adaptarse al estímulo, sino que tienden a sensibilizarse, es decir, disminuyen el umbral a medida que el estímulo lesivo persiste, lo cual en parte explica el fenómeno de la hiperalgesia.

El umbral de estimulación de los nociceptores no es constante, sino que depende del tejido donde se encuentre el nociceptor.

En función de su localización y de sus distintas características, se distinguen tres tipos de nociceptores: cutáneos, musculares-articulares y viscerales, siendo los cutáneos, los más estudiados, por su accesibilidad. Estos, a diferencia de otros tipos de receptores, responden a diferentes modalidades de estímulos incluyendo el mecánico, calor, frío y químico, por lo que se denominan receptores polimodales. Sin embargo, se ha podido identificar tres clases de nociceptores en humanos, que responden exclusivamente a un tipo de estímulo, ya sea mecánico, térmico o químico, de tal manera debemos considerar que, por lo menos, no todos los nociceptores son polimodales (Dray y Perkins, 1997; Grubb, 1998).

El nociceptor se clasifica acorde al tipo de fibra que lo constituye:

- ✓ las fibras A δ , son mielinizadas y transmiten el impulso nervioso de un nódulo de Ranvier a otro (transmisión rápida).

- ✓ las fibras C, son no mielinizadas y el impulso nervioso se transmite de manera continua a lo largo del axón.

Dentro de los distintos tipos de nociceptores cutáneos, existe un grupo especial de nociceptores: los silentes o dormidos, que se encuentran en diferentes tejidos y se vuelven activos durante la inflamación, despolarizándose ante estímulos que normalmente no ocasionan dolor, como, por ejemplo, el mover una articulación inflamada, fenómeno que puede contribuir a la hiperalgesia.

Los estímulos específicos capaces de activar el nociceptor provocan dos tipos de procesos de transducción: la activación y la modificación de la sensibilidad del receptor, ambos se producen como consecuencia de cambios en la membrana neuronal en la conductancia al sodio, potasio y calcio, que pueden ser producidos por acción directa sobre el canal iónico, o mediante la apertura de canales iónicos asociados a receptores de membrana (Mitchell y col., 2000). La activación desencadena la estimulación del receptor y la generación de un potencial de acción, mientras que la modificación puede ser en dos sentidos: disminuyendo el umbral de excitación y aumentando el número de receptores, proceso denominado regulación hacia arriba o supra-regulación, o aumentando el umbral de excitación y disminuyendo el número de receptores, proceso denominado regulación hacia abajo infra-regulación.

En la figura 1.3 se muestran las diferentes sustancias provenientes de los tejidos, vasos sanguíneos, células inmunes y fibras nerviosas presentes en la zona lesionada, las cuales activan o sensibilizan a los nociceptores.

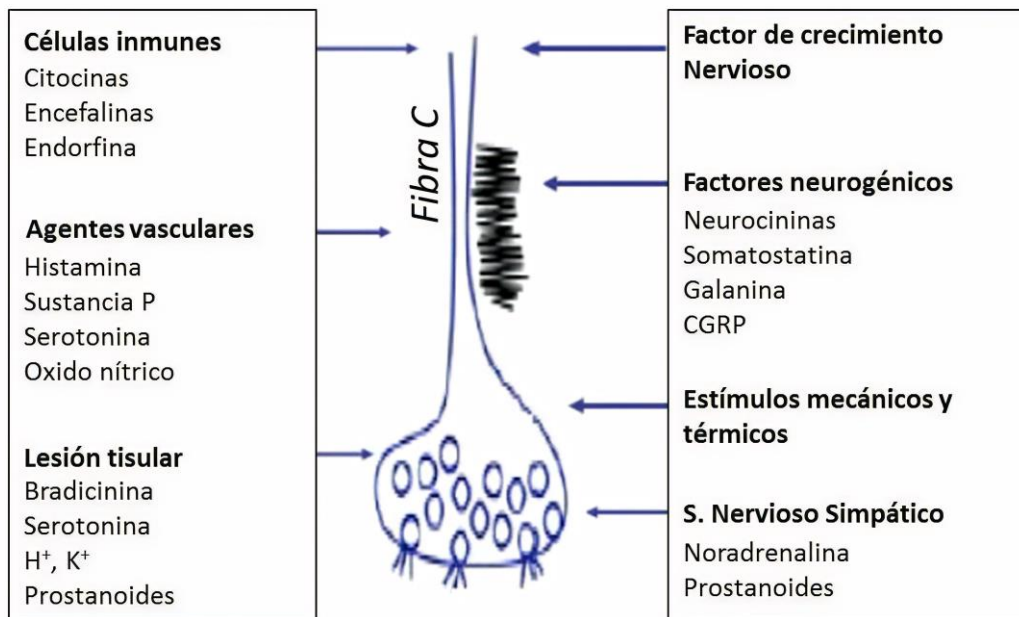


Fig 1.3: Mediadores químicos y otros factores implicados en la activación o sensibilización de nociceptores de fibras nerviosas periféricas (Modificado de Dickenson y col., 1997).

➤ Transmisión

Las fibras aferentes primarias que contienen los nociceptores periféricos, ingresan a la médula espinal por el surco posterolateral y a nivel del tracto de Lissauer, se ramifican hacia arriba y abajo y tras recorrer algunos

milímetros, se introducen en las láminas del asta posterior de la medula espinal (APME) terminando en la sustancia gris del asta posterior (Melzack y Wall, 1965).

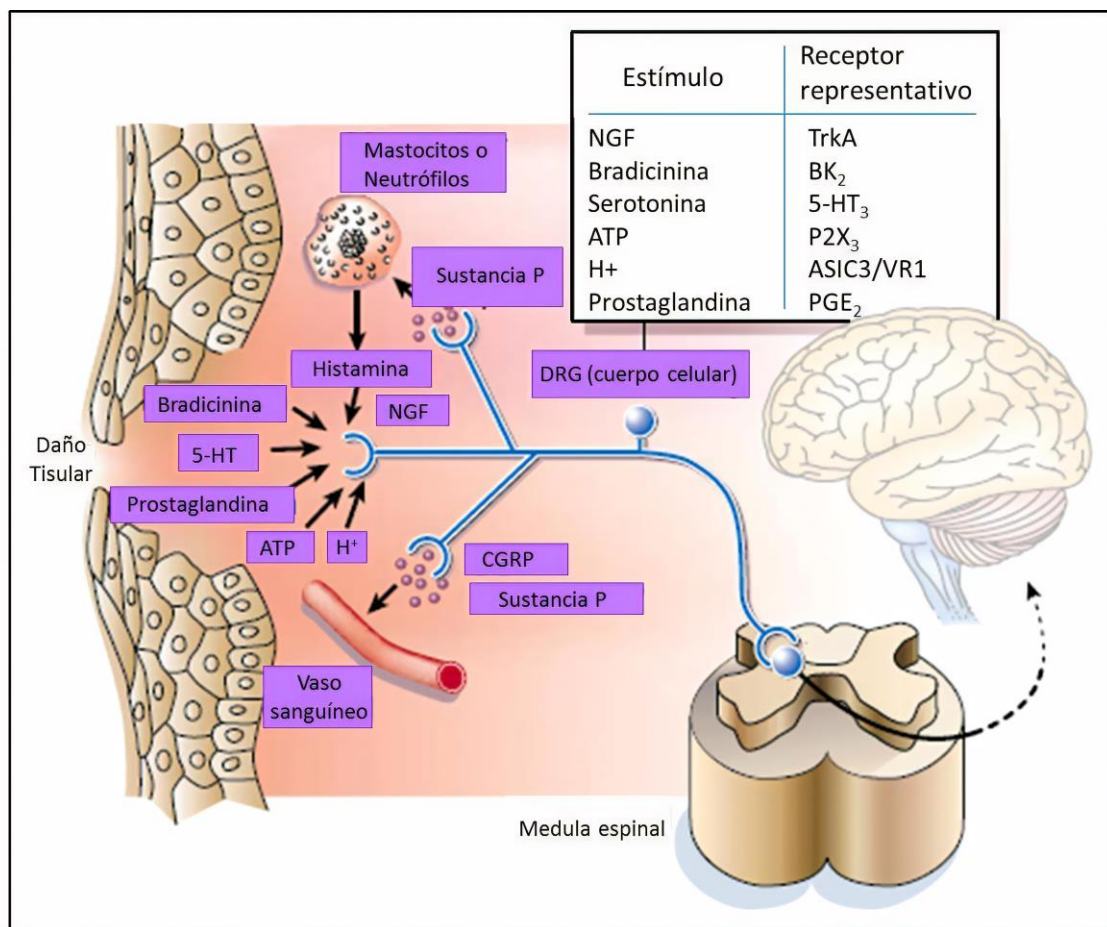


Fig. 1.4: Activación del nociceptor y transmisión del estímulo hacia la medula espinal por la neurona primaria. La complejidad molecular del nociceptor aferente primario se ilustra por su respuesta a los mediadores inflamatorios liberados en el sitio de la lesión tisular. Se muestran algunos de los componentes principales, incluidos péptidos (bradicinina), lípidos (prostaglandinas), neurotransmisores [serotonina (5-HT) y ATP y neurotrofinas (NGF)]. La naturaleza ácida de la respuesta inflamatoria también está indicada, así como sus receptores representativos (modificado de Julius y Basbaum, 2001).

Por lo tanto, la primera neurona de las vías de transmisión del dolor tiene una terminación en la periferia y la terminación central en el asta posterior de la médula espinal (Fig. 1.4).

Dependiendo del tipo de nociceptor (cutáneo, visceral o músculo-articular) y del tipo de fibra (A δ o C) que transmite el estímulo, las terminaciones centrales de la primera neurona sensorial inervan ciertas regiones de la sustancia gris de la medula espinal del APME (Julius y Basbaum, 2001). El APME tiene una extraordinaria importancia porque es un centro fundamental de integración de la información nociceptiva.

La gran mayoría de las neuronas del APME están constituidas por interneuronas, cuyos axones se extienden a corta distancia dentro de la médula espinal. Estas interneuronas pueden ser inhibitorias y excitatorias las que

juegan un papel homeostático en el mantenimiento y definición de los campos receptivos de las neuronas del APME.

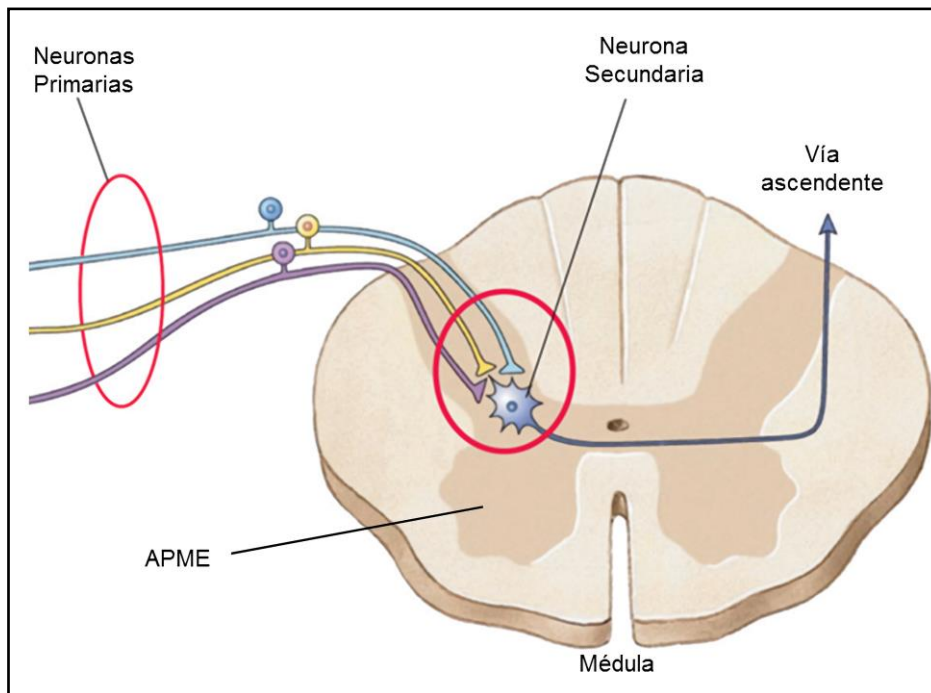


Fig. 1.5: Transmisión del estímulo nocivo en el APME (Tomado de Jesús A. Fernández-Tresguerres: Fisiología humana).

La transferencia sináptica de la información es comandada por la naturaleza y la cantidad de neurotransmisores (Nt) liberados por los aferentes primarios, la densidad e identidad de los receptores post-sinápticos (ionotrópicos y metabotrópicos), la cinesia de la activación del receptor, la abertura o cierre de los canales iónicos y los factores responsables de la recaptación o degradación de los Nt.

La idea central es que un estímulo nocivo desencadena una actividad pre-sináptica en la terminal central de la neurona primaria, dando lugar a la fusión de las vesículas sinápticas y la liberación de Nt excitatorios. Estos Nt actúan en los receptores de las neuronas del APME produciendo la despolarización de la membrana con la generación del potencial de acción post-sináptico. A continuación, este estímulo se transmite por las vías ascendentes nociceptivas (Fig. 1.5).

Los axones de las neuronas secundarias terminan en 6 diferentes regiones o núcleos del tálamo. En el tálamo, las neuronas de tercer orden emiten axones a través de la cápsula interna hacia la corteza cerebral donde se transmite este impulso nocivo, se activan diferentes regiones que corresponden a la percepción del dolor (Russo y Brose, 1998). Hasta el momento se han realizado estudios en los cuales se determinó que el estímulo nocivo activa el área cortical somatosensorial primaria, el área cortical somatosensorial secundaria, la ínsula, la región anterior del cíngulo, el hipotálamo, la amígdala y el cerebelo. Por lo tanto, no hay un área del dolor, esta compleja sensación parece producirse cuando muchas regiones corticales y subcorticales se activan simultáneamente.

La vía del dolor descrita anteriormente representa una ruta clásica, pero existen otras vías posibles que involucran diferentes estructuras nerviosas (Besson, 1999; Jabbur y Saadé, 1999).

➤ **Modulación**

La modulación es el proceso por el que la transmisión es atenuada en distintos niveles. Es un sistema analgésico endógeno, integrado por una serie de circuitos inhibitorios descendentes, que interviene en la modulación nociceptiva a nivel APME (Russo y Brosse, 1998). La analgesia que produce no es solo la interrupción de la transmisión nociceptiva, ésta es una función coordinada y altamente compleja que regula, controla y limita la transmisión nociceptiva para prevenir el caos y la inestabilidad que pudieran producirse si solo existieran mecanismos excitatorios (Miranda, 1992). Este sistema puede ser activado por diferentes estímulos (estrés, dolor, estimulación eléctrica o administración de opiáceos), y desde un punto de vista bioquímico consta de un primer componente opioide, integrado por las encefalinas y de un segundo constituyente, aminérgico, constituido por la noradrenalina y la serotonina (5-HT) del que se derivan efectos aditivos y sinérgicos (Kim y Cox., 1993).

En este sistema de analgesia fisiológico endógeno se establece un bucle o *feedback* negativo, de manera que un estímulo nociceptivo puede activar el sistema, el cual, a su vez, suprime la transmisión del impulso generado. El estrés, el miedo, la intensidad del estímulo o su duración, son factores que influyen decisivamente en la activación del sistema analgésico fisiológico endógeno mediado por endorfinas (EMAS) (Muriel y Madrid, 1994).

➤ **Percepción**

La experiencia del dolor solo puede ser definida en términos de conciencia humana y como toda experiencia sensorial, no hay forma de cuantificarla. Dolor no es igual que nocicepción, esta última es la respuesta a la estimulación de los nociceptores, si bien la nocicepción puede darnos una experiencia dolorosa, puede ocurrir en ausencia de dolor y el dolor puede estar presente en ausencia de nocicepción. Esto explica la existencia de términos como dolor no nociceptivo (ejemplo: dolor neuropático y psicógeno) y el dolor nociceptivo (ejemplo: dolor inflamatorio). El espectro de la experiencia dolorosa varía desde el dolor relacionado con un daño tisular y el dolor generado sin un impulso físico periférico.

Por lo cual, al llegar el estímulo a su punto final, el cerebro nos hace conscientes del dolor y al ser él consciente de cuál fue el punto de donde partió el estímulo, ejecuta la orden correspondiente, para en caso de ser posible, evitar la sensación desagradable. Por lo tanto, la nocicepción involucra los mecanismos neurofisiológicos que participan en la transmisión de la señal nociceptiva hasta el SNC, no involucra los factores subjetivos que participan en la percepción del dolor (Díaz-Reval, 1995).

Dicho de otra manera, la percepción del dolor es el proceso final de la transducción, transmisión y modulación. Es subjetiva y se percibe como dolor, la cual precisa de la participación del SNC y del sistema nervioso periférico (SNP). El dolor desencadena una serie de reacciones en ambos sistemas que permite la percepción del mismo, con la finalidad de disminuir la causa y limitar

las consecuencias. Los mensajes nociceptivos son transmitidos, modulados, e integrados en diferentes niveles del sistema nervioso (SN), que van desde la periferia por vía medular a centros superiores (Perena y col., 2000)

1.2.2.2. Tipos de dolor

El dolor se ha clasificado de diversas formas, algunos lo catalogan en base al lugar de origen: el dolor somático es aquel que se deriva de músculos y articulaciones; visceral, se origina en las vísceras y finalmente, el neuropático, aquel que es causado por el daño a fibras nerviosas (Muñoz-Martínez, 1998).

También ha sido clasificado de acuerdo a su curso temporal, es decir se le llama *agudo* cuando perdura desde 0 hasta 3 meses, que es el tiempo suficiente para que ocurra la reparación tisular, éste es debido a la participación y activación de las fibras mielínicas A δ , como por ejemplo en el caso de intervenciones quirúrgicas (Dickenson y col., 1997). El dolor denominado *crónico* es aquel que se desarrolla en períodos mayores de 6 meses e inclusive años, transmitido principalmente a través de las fibras amielínicas C, y no se diferencia únicamente por el tiempo, sino también por la imposibilidad del organismo de restablecer los mecanismos fisiológicos homeostáticos normales, aún después de concluir en tratamiento farmacológico (Loeser y Melzack, 1999).

Sin embargo, la clasificación más comúnmente encontrada es aquella en la que se les da énfasis a los mecanismos participantes, que, si bien aún no han sido completamente dilucidados, presentan una idea más clara de su comportamiento.

De manera general, el dolor se divide en dos grandes categorías: el dolor normal o adaptativo y el dolor anormal. Dentro de éstas existen subcategorías (Woolf, 2004). El dolor anormal es aquel en el que hay un mal funcionamiento en el SN, dado que existe un estado patológico en el mismo; el dolor neuropático es un claro ejemplo de dolor maladaptativo. Por otro lado, el dolor normal o adaptativo, es aquel que protege al organismo de un daño promoviendo su curación una vez que el mismo se manifestó (Scholz y Wolf, 2002; Woolf, 2004).

En este trabajo se estudiará el dolor normal, el cual se puede dividir en dolor nociceptivo y dolor inflamatorio.

➤ Dolor nociceptivo

El dolor nociceptivo, es aquel que protege al organismo ante los estímulos dañinos para el mismo, por ejemplo, golpes, quemaduras, cambios bruscos de temperatura (frío/calor extremo), eventos que se producen en una cirugía (cortes, pinchazos), entre otros estímulos (Fig. 1.6), sin embargo, mediante el uso tanto de analgésicos, como de anestésicos, se observa una inhibición de la transmisión de dicho dolor, evitando así su promoción (Woolf, 2004). Cualquier tipo de estímulo nocivo activará los nociceptores, con su posterior transmisión de la señal hacia la corteza, donde el dolor se percibe como tal (Scholz y Wolf, 2002).

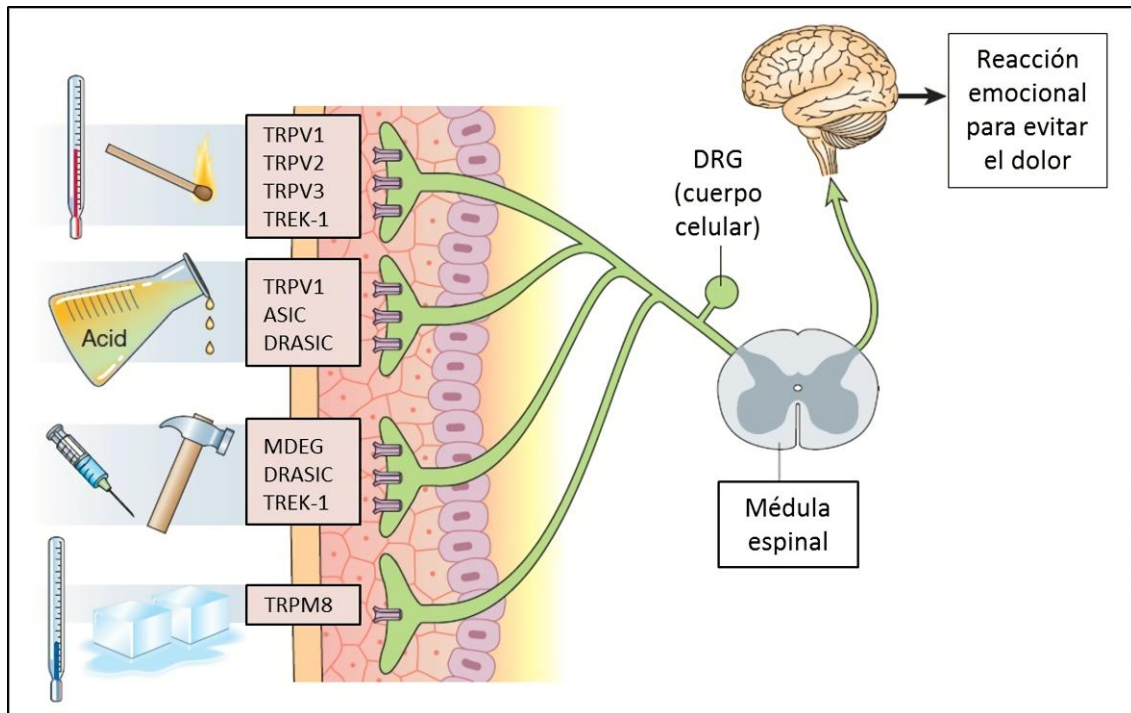


Fig. 1.6: El dolor nociceptivo se presenta cuando estímulos como pinchazos, golpes, quemaduras, entre otros, dañan al organismo. Canales iónicos como el receptor de potencial transitorio vanilloide 1 (TPRV1), canal iónico sensible a ácidos (ASIC), canal de K^+ de dos poros activado por estímulos mecánicos (TREK), canal iónico sensible a ácidos en el ganglio de la raíz dorsal (DRASIC), canal iónico sensible a ácidos 2a (MDEG o ASIC2a) y receptor de potencial transitorio familia M8 (TRPM8) son ejemplos de canales que participan en la conversión del estímulo en señal eléctrica para que se transmita hasta la corteza, donde es percibida esta señal como dolor. (Modificado de Scholz y Woolf, 2002).

➤ Dolor inflamatorio

Se describe al dolor inflamatorio, como aquel que a pesar de que el sistema nociceptivo está funcionando y ya se ha dado el daño tisular al tejido (Fig. 1.7), modifica sus umbrales de activación para protección del mismo organismo. Esta modificación de los umbrales hace que se incremente la sensibilidad del tejido haciendo que los estímulos no nocivos sean dolorosos, inhibiendo cualquier contacto con el tejido dañado o incluso el movimiento de dicho tejido. La función de este tipo de dolor es permitir que se lleve a cabo el proceso de recuperación (Woolf, 2004).

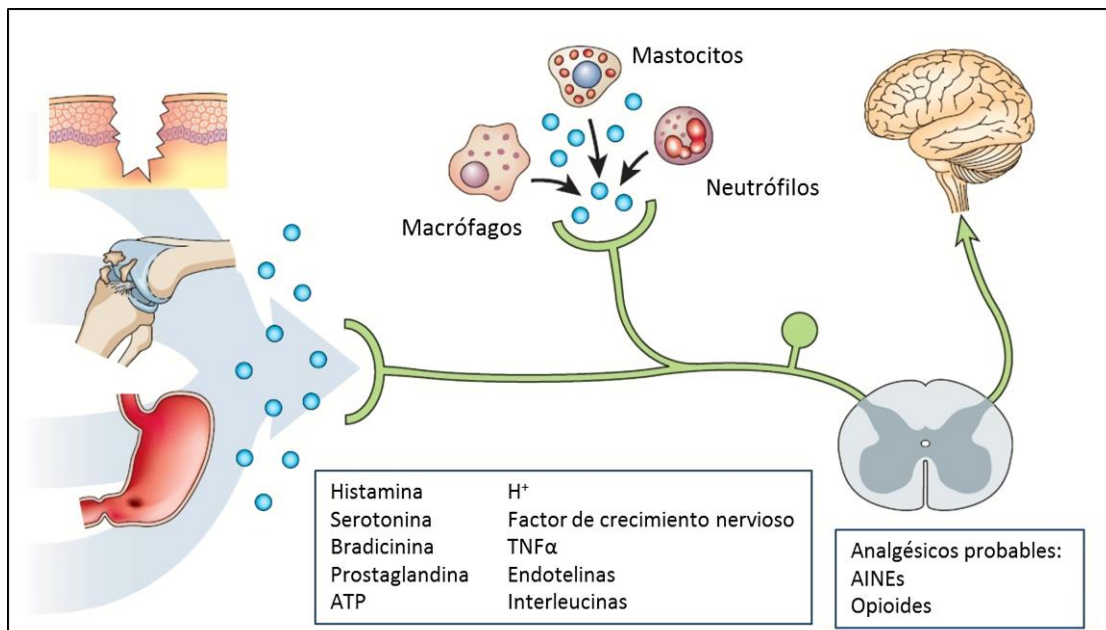


Fig. 1.7: El dolor inflamatorio se presenta cuando ya existe daño tisular, por ejemplo, por traumas o después de cirugías. Algunos de los mediadores que se liberan durante este tipo de dolor son Histamina, serotonina (5-HT), bradicinina, TNF α , Factor de crecimiento nervioso (NGF), interleucinas, entre otros. Analgésicos como opioides y AINEs son utilizados para su tratamiento. (Modificado de Scholz y Woolf, 2002)

1.2.2.3. Aspectos terapéuticos del dolor

A la disminución de la sensación dolorosa se la conoce como analgesia. Para que ésta se presente, se deben activar ciertos sistemas endógenos, que ayudan a que esos procesos dolorosos no interfieran con las funciones corporales normales (Lipp, 1991). Los fármacos empleados para alcanzar este fin se conocen como analgésicos. Ellos se pueden dividir en al menos tres categorías: aquellos que actúan preferentemente a nivel periférico, evitando la activación de terminaciones nociceptivas o inhibiendo la transmisión del impulso aferente; aquellos que alteran la transmisión dentro del SNC; y aquellos que alteran la percepción del dolor a nivel cortical (Kehlet y col., 1999; Weinstein y col., 1998).

Indudablemente, la búsqueda de nuevos fármacos con actividad analgésica sigue en aumento, con el objetivo final de encontrar medicamentos más eficaces que ayuden a mejorar la calidad de vida de aquellos que sufren de dolor. La búsqueda de analgésicos que pudieran controlar el dolor de una gran cantidad de condiciones patológicas es una tarea enorme y complicada, no solo por la diversidad de los mecanismos que ellos presentan, sino también por la ausencia de eficacia de algunos de ellos, para responder a los distintos tipos de dolor, sumado a esto, la aparición de efectos adversos, que pueden generar la discontinuidad del uso del fármaco seleccionado, o su limitación, como ocurre en la depresión respiratoria ocasionada por algunos opioides, como la morfina (Hunt y Mantyh, 2001).

Dentro de los analgésicos existen dos grupos importantes, que vienen siendo usados desde principios del siglo XIX: los AINEs, siendo el ácido acetilsalicílico (aspirina, Asp), uno de los representantes más conocidos y los

analgésicos opioides, con morfina como prototipo (Rang y Urban, 1995). Los AINEs tienen un uso generalizado y presentan numerosos efectos adversos, como úlceras, discrasias sanguíneas y alergias, entre otros; los opioides, son usados para tratar el dolor en estados patológicos como cáncer, siendo su aplicación limitada, debido a sus efectos adversos.

Existen otras drogas que también pueden modular la transmisión nociceptiva y así, controlar el dolor, como los antidepresivos tricíclicos, anticonvulsivos, bloqueadores de los canales de sodio, neurolépticos, esteroides, entre otros. Sin embargo, la efectividad de estos medicamentos varía ampliamente entre los individuos, al igual que otros tratamientos alternativos, a veces ineficaces, como la estimulación eléctrica del nervio cutáneo, la biorretroalimentación y la acupuntura, entre otros (Macfarlane y col., 1997, Loeser y Melzack, 1999).

➤ **Analgésicos antiinflamatorios no esteroideos**

De todos los grupos de fármacos antes citados, sin duda que los AINEs son los más usados en los diferentes tipos de dolor, tanto agudo como crónico, y por lo tanto también los más estudiados. Como ya mencionamos anteriormente en su uso como antiinflamatorio, estos fármacos presentan una serie de reacciones adversas que limitan su uso. Los AINEs han sido conocidos por muchos años por producir analgesia actuando preferentemente a nivel periférico (y en menor medida a nivel central), inhibiendo la síntesis de mediadores químicos del dolor, principalmente la producción de PGs, potentes mediadores hiperalgésicos, los cuales modulan múltiples sitios a lo largo de la vía nociceptiva e intensifican tanto el proceso de transducción: efecto de sensibilización periférica, como el de transmisión: efecto de sensibilización central (Burian y Geisslinger, 2005). Todos los AINEs son utilizados principalmente para el tratamiento del dolor leve a moderado (Hawkey, 1999).

Este grupo de fármacos, no solo actúa inhibiendo la COX a nivel del nociceptor, sino que también modulan la transmisión del impulso nociceptivo a nivel del SNC. Entre los mecanismos propuestos para explicar dicha acción están la inhibición de la síntesis de PGs a nivel espinal y cerebral, la activación de fibras serotoninérgicas descendentes y la acción a nivel de membranas celulares, interfiriendo la transducción de señales dependientes de las proteínas G.

➤ **Analgésicos opioides**

Los agonistas opioides continúan siendo hasta el momento los mejores analgésicos de los que disponemos, pero la presencia de efectos secundarios hace difícil su administración a las dosis requeridas para obtener una analgesia completa.

La OMS coloca en el último escalón el uso de los analgésicos opioides, dado que sugiere una farmacoterapia que utiliza un analgésico no opioide, como primera opción, indicando principalmente a los AINEs; si el dolor persiste o aumenta, se cambia a un opioide débil más un adyuvante y si, de igual forma el dolor persiste o incrementa, entonces se recomienda la utilización de un opioide fuerte. Esta escalera es utilizada principalmente para el tratamiento de pacientes que sufren dolor crónico severo como el causado por el cáncer. La

morfina es el fármaco de elección y hasta la fecha ningún otro opioide ni fármaco ha mostrado mayor efectividad que éste (Quigley, 2005).

Los efectos adversos presentados con los opioides incluyen náuseas, vómito, constipación, mareos, tolerancia, boca seca, retención urinaria, depresión respiratoria y dependencia (Quigley, 2005).

El efecto analgésico de estos fármacos es principalmente a través de la activación del sistema opioide endógeno, el cual está compuesto por receptores opioides y transmisores (péptidos opioides endógenos), ampliamente distribuidos en el SNC y SNP, en relación con las vías sensoriales que conducen la información nociceptiva.

1.3. Importancia del estudio de drogas vegetales como analgésicas y antiinflamatorias

Debido a la sensación desagradable producida en el organismo ya sea por la percepción del dolor debida a un daño en el tejido o por el dolor relacionado con el proceso inflamatorio, la población recurre a diferentes alternativas para contrarrestarlo. Una de ellas es el empleo de la medicina tradicional, que incluye el uso de preparados de plantas medicinales, recurso terapéutico siempre al alcance de la población (Bussmann y Sharon 2015).

El uso de algunas drogas vegetales proporciona alivio a varias patologías, lo que mejora la calidad de vida de las personas. De este modo, muchas veces pueden dar soluciones a sus problemas de salud minimizando costos, ya que se trata de una alternativa al alcance de la mayoría de la población y en muchos casos son mejor tolerados y aceptados que los tratamientos convencionales (OMS, 2002).

Debido a los efectos secundarios ya mencionados, es todo un reto para los investigadores buscar nuevos principios activos que tengan una potente actividad antiinflamatoria y analgésica y produzcan menos efectos adversos.

Las plantas medicinales están constituyendo un recurso terapéutico válido, por consiguiente, se hace fundamental evaluar el efecto terapéutico antiinflamatorio y analgésico de extractos obtenidos de especies vegetales nativas de la provincia de Córdoba.

CAPÍTULO 2

OBJETIVOS

2.1. Objetivo General

Realizar el estudio de nuestra flora nativa medicinal y validar científicamente su efecto terapéutico, direccionando las investigaciones hacia aquellas especies reportadas en la etnomedicina como analgésicas y antiinflamatorias, contribuyendo así al descubrimiento de extractos/productos naturales, con una actividad biológica científicamente comprobada.

2.2. Objetivos Específicos

Para cumplir con el objetivo general se plantearon una serie de objetivos específicos a saber:

- Evaluar la actividad biológica de los distintos extractos, obtenidos de las siguientes especies medicinales, informadas como analgésicas y antiinflamatorias: *Berberis ruscifolia* Lam., *Jodina rhombifolia* (Hook. & Arn.) Reissek, *Modiolastrum malvifolium* (Griseb.) K. Schum, *Sphaeralcea bonariensis* (Cav.) Griseb, *Araujia odorata* (Hook & Arn.) Fontella y Goyder y *Schinus fasciculata* (Griseb.) I.M. Johnst., mediante:
 - Ensayos en líneas celulares derivadas de macrófagos (J774), midiendo la inhibición del mediador NO y de la expresión proteica de la iNOS.
 - Ensayos *in vivo*, utilizando modelos animales de nocicepción: ensayo de contorsiones con ácido acético y formalina.
- Investigar el contenido químico de aquellos extractos activos.
- Evaluar la inhibición del NO y de la expresión proteica de la iNOS del o los PP.AA. de interés obtenidos de los extractos activos, en ensayos en líneas celulares
- Evaluar la actividad analgésica y posibles mecanismos de acción del o los PP.AA. obtenidos de los extractos activos, mediante ensayos *in vivo*.

CAPÍTULO 3

ESPECIES VEGETALES SELECCIONADAS

3.1. Selección de especies vegetales

Las especies vegetales estudiadas en el presente trabajo fueron recolectadas de distintas regiones de la provincia de Córdoba, Argentina y seleccionadas acorde a su uso popular, en la medicina tradicional, como analgésicas y antiinflamatorias. Las seis especies analizadas en el presente trabajo pertenecen a distintas familias: *Berberidaceae*, *Cervantesiaceae*, *Malvaceae*, *Apocyanaceae*, *Anacardiaceae*. A continuación se realizará una descripción botánica de las mismas, dando a conocer además su hábitat, antecedentes en su estudio químico-biológico y otros usos populares.

3.1.1. Hábitat, características botánicas, usos medicinales, antecedentes

3.1.1.1. Familia *Berberidaceae*: *Berberis ruscifolia*



Fig. 3.1: *Berberis ruscifolia* Lam.
(Tomado de Max Licher)

Berberis ruscifolia Lam. (Fig. 3.1) conocida por su nombre vulgar como “quebrachillo”, “calafate”, “palo amarillo”, “uvilla” o “*sacha uva*”, pertenece a la familia *Berberidaceae*. Esta familia tiene representantes arbustivos y herbáceos perennes, distribuidos por las regiones templadas de América, África, Europa y Asia. Los estudios taxonómicos y de campo han documentado casi 450 especies del género *Berberis* de todo el mundo (Landrum, 1999; Ahrendt, 1961). La mayoría de las especies se encuentran en el hemisferio norte,

excepto algunas reportadas para el hemisferio sur (Landrum, 1999). Del total de especies descritas en este género, solo el seis por ciento (6,0-6,5%) tiene reportes por sus usos etnobotánicos a nivel mundial, y sólo el 3-4% de las mismas, ha sido explorado en relación a su potencialidad en medicina tradicional y alopática (Khan y col., 2015). Por ello, nuestro interés se centró en el estudio de *B. ruscifolia*, especie originaria de América del Sur, que crece en Argentina, Brasil y Uruguay. En Argentina, se distribuye en las provincias de Buenos Aires, Catamarca, Chaco, Chubut, Córdoba, Corrientes, Entre Ríos, La Pampa, La Rioja, Neuquén, Santiago del Estero, Santa Fe y San Luis. Este vistoso arbusto nativo puede alcanzar una altura de 1 a 1,5 m, es perenne, con espinas trífidas de color pardo amarillento, rectas o curvas. Sus hojas brillantes poseen un diente espinoso a cada lado, son fasciculadas, elípticas con 1-3-4 dientes, en la mitad superior. A comienzos de la primavera da una abundante floración amarilla, en racimos, que luego de ser polinizada por insectos, da lugar a frutos negruzcos, carnosos (Barboza y col., 2006).

Popularmente se utilizan sus hojas y tallos como analgésico, antiinflamatorio, antimalárico, antibacteriano y digestivo; sus raíces son

utilizadas como antimalárico y antifebril (Arambarri y col., 2006; Barboza y col., 2006).

Algunos estudios en relación a la evaluación biológica de sus extractos fueron realizados. Se evaluó el extracto alcohólico obtenido de las hojas, el cual demostró un efecto antiespasmódico (Matera y col., 2016); también, se demostró el efecto antimicrobiano de los extractos acetónico y cloroformo-metanólico, obtenidos de las partes aéreas, en los cuales se determinó en forma cualitativa la presencia de alcaloides y flavonoides mediante reacciones químicas (Mattana y col., 2012).

Si bien existen algunos estudios científicos sobre esta especie, hasta el momento no se han reportado estudios de los extractos acuosos y etanólico con respecto a su composición química y estudios farmacológicos sobre su uso como analgésico y antiinflamatorio.

3.1.1.2. Familia Cervantesiaceae: *Jodina rhombifolia*



Fig.3.2: *Jodina rhombifolia* (Tomado de Greta A. Dettke, 2008)

Esta especie pertenece a la familia Cervantesiaceae, su nombre científico es *Jodina rhombifolia* (Hook. & Arn.) Reissek (Fig. 3.2) y se la conoce por su nombre vulgar como “sombra de toro”, “quebracho flojo” o “peje”. Es un árbol mediano de 3 a 6 m, de corteza muy rugosa, espinoso, de follaje persistente, verde oscuro brillante, hojas simples, rómbicas o romboides, con cada uno de sus tres vértices libres con una espina

punzante en el ápice y dos espinas en los laterales, alternas; pecíolo corto a subsésil, con 6-15 flores reunidas en glomérulos, con brácteas y bractéolas carnosas y pubescentes, aromáticas, apétalas, verdosa amarillentas, estrelladas, de 4-7 mm de largo, sésiles o poco pediceladas, en glomérulos axilares en bajo número. Fructifica en primavera, el fruto es una cápsula drupácea, roja, esférica, rugosa, de casi 1 cm diámetro y florece en invierno (Toursarkissian, 1980; Novara Lázaro, 2012). Es originaria de América del Sur; en Argentina se distribuye en Córdoba, Buenos Aires, Catamarca, Chaco, Corrientes, Entre Ríos, Jujuy, La Pampa, Mendoza, Río Negro, Salta, Santiago del Estero, Santa Fe, San Juan, San Luis, Tucumán y se encuentra entre los 500 y 1000 m.s.n.m. Se extiende además a países limítrofes como Uruguay, Brasil, Paraguay y Bolivia. Puede ser cultivada por semillas como ornamental.

La parte usada, según los datos etnofarmacológicos son las hojas y cortezas, empleadas como antiséptico tópico, aclarante de la piel, analgésico, antiinflamatorio, digestivo, antibacterial, hipolipemiante, antigripal e hipocolesterolemia (Barboza y col., 2006; Menseguez y col., 2007; Barboza y col., 2009).

Esta especie posee estudios previos realizados en nuestro grupo de trabajo. A partir de un extracto etanol/H₂O (1:1) de hojas, se realizó una marcha fitoquímica detectando cualitativamente la presencia de: taninos, saponinas,

flavonoides aglicones, fitoesteroides y alcaloides (entre ellos, alcaloides pirrolizidínicos saturados). Además, se demostró que ambos extractos, mostraron una interesante actividad inhibitoria de la producción de NO, en líneas celulares de macrófagos J774 (Lucero y col., 2007). En relación al contenido químico y actividad biológica, Montanha y col. (2009) evaluaron la actividad antiulcerosa de la infusión y el extracto hidroetanólico de partes aéreas de *J. rhombifolia*, sobre lesiones gástricas inducidas por HCl/etanol en ratas, demostrando que dicho extracto presentó inhibición de la formación de úlceras gástricas. El estudio fitoquímico de los mismos permitió identificar los flavonoides C-glicosilados: vicenina-2, vitexina, orientina y swertisina. Los resultados obtenidos en otro trabajo nos demuestran que la utilización conjunta del extracto acuoso de las hojas y de la corteza de *J. rhombifolia* producen un significativo efecto reductor del tránsito intestinal normal en el modelo *in vivo* (Teves y Wendel, 2016). Otras actividades biológicas fueron evaluadas en diferentes extractos obtenidos de partes aéreas (hojas y/o cortezas) de *J. rhombifolia*: antibacteriana, usando diferentes cepas ATCC y clínicas (Soberón y col., 2014); antifúngica (Carpinella y col., 2010; Lizarraga y col., 2006); inhibidora de tirosinasa (Chiari y col., 2010) diurética (Teves y col., 2018), que demostraron diferentes grados de actividad en los extractos estudiados.

Hasta el momento, no se han reportado estudios para los extractos acuosos y etanólico, en relación a ensayos farmacológicos que determinen efecto analgésico y/o antiinflamatorio.

3.1.1.3. Familia Malvaceae: *Modiolastrum malvifolium*



Fig.3.3: *Modiolastrum malvifolium*
(Tomado de Hernán Tolosa, 2014)

Modiolastrum malvifolium (Griseb.) K. Schum (Fig. 3.3), llamada comunmente “malva de campo”, pertenece a la familia Malvaceae. Es una hierba perenne, con raíces delgadas, rastrera. Los tallos son tendidos y miden hasta 2 mts. Las ramas floríferas son apoyantes, en ocasiones erectas. Las hojas son alternas, láminas de contorno suborbicular miden 6 por 5 cm, son glaucas, palmatinervias, de bordes profundamente crenados, ambas caras con pelos estrellados muy pequeños, esparcidos. Su pecíolo es de hasta 15 cm, las flores son solitarias y

axilares, los pétalos anaranjados a rojizos y florece en primavera y verano (Barboza y col., 2006; Novara Lázaro, 2012). Se encuentra en terrenos húmedos. Crece en claros de bosque ribereño, pajonales, orillas de caminos, veredas con pastos cortos y baldíos. Es oriunda del sur de Sudamérica, Paraguay, Brasil y Argentina. En nuestro país se la suele hallar en las provincias de: Buenos Aires, Chubut, Córdoba, Corrientes, Entre Ríos, Jujuy, La Pampa, La Rioja, Mendoza, Río Negro, Salta, Santa Fe y San Juan.

Según su uso tradicional, se utilizan las hojas y tallos como antiinflamatorio, analgésico, y antiofítico (Barboza y col., 2006).

Estudios previos, realizados sobre hojas y tallos de esta especie, se iniciaron en nuestro grupo. Mediante una marcha fitoquímica de reconocimiento cualitativo de metabolitos secundarios se determinó la presencia de taninos, saponinas y flavonoides (glicósidos y aglicones). Posteriormente, se cuantificó el contenido fenoles y flavonoides totales del extracto alcohólico, evaluando su actividad antioxidante: capacidad antioxidante total y actividad atrapadora de los radicales libres DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracilo) y ABTS (ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin)-6-sulfónico). En relación a la evaluación de actividad biológica, se determinó la inhibición de la producción de NO en líneas celulares derivadas de macrófagos, donde el extracto clorofórmico de hojas y tallos inhibió la producción de NO y la expresión de la enzima iNOS (Bustos y col., 2009; 2010).

Los antecedentes encontrados al momento, no reportan estudios que demuestren efecto analgésico y/o antiinflamatorios de sus preparados.

Sphaeralcea bonariensis



Fig. 3.4: *Sphaeralcea bonariensis*

Otra especie que pertenece a esta familia es *Sphaeralcea bonariensis* (Cav.) Griseb (Fig. 3.4), conocida vulgarmente como “malvavisco”, “malva del zorro”, “malva blanca” o “malva rosada”. Estas son plantas perennes, cubiertas de pelos estrellados en todos sus órganos, subarborescentes, con tallos muy ramificados desde la base, erectos o ascendentes, frecuentemente rojizos o violáceos, de 60 a 150 cm de altura. Sus hojas son alternas, con pecíolos de hasta 4 cm de largo y lámina romboidal o deltoide-romboidal, con el margen entero o trilobulado. Sus flores, pediceladas, cáliz acampanado, corola con pétalos rosados o violáceos de 1 cm de diámetro, en racimos vistosos. Sus tallos ramificados desde la base, son ascendentes, cubiertos de pelos estrellados. Sus hojas oblanceoladas hasta deltoides, son dentadas y sus tallos con pelos estrellados grisáceos (Barboza y col., 2006). Es una especie sudamericana, que se encuentra en Uruguay, Paraguay y desde el norte al centro de Argentina. Es una planta frecuente en sitios poco modificados y en cultivos, crece a orilla de los caminos y sendas urbanas. Puede hallarse como maleza secundaria en pasturas y menos frecuentemente en cultivos anuales de verano.

Sus hojas y raíces se utilizan como antiinflamatorio, analgésico y emoliente; las flores y hojas como antiemético, antihemorroidal, digestivo y las hojas como expectorante (Barboza y col., 2006; Hernández y col., 2009).

Esta especie no posee estudios previos sobre su uso popular y composición química.

3.1.1.4. Familia Apocyanaceae: *Araujia odorata*



Fig. 3.5: *Araujia odorata* (Tomado de Diego Cabral, 2009)

Araujia odorata (Hook & Arn.) Fontella y Goyder se la conoce popularmente por el nombre de “tasi” o “doca”. Es una hierba perenne, trepadora pubescente que alcanza una altura de 5 m y tiene abundante látex, con tallos volubles de color verde grisáceo, leñosos en la base. Sus hojas son pecioladas, opuestas, lanceolado-sagitadas hasta 13 cm de largo con un ápice afilado. Las inflorescencias son umbeladas, extra axilares y de pocas o muchas

flores, siendo estas perfumadas, de color blanco-verdoso. El fruto es un folículo ovoide de 5 a 10 cm de longitud, con superficie ondulada, pubescente, tienen 10-14 cm de largo y 4-9 cm de ancho, el cual tiene uso alimenticio. Se cultiva como ornamental por sus flores vistosas y de floración prolongada. Se reproduce con facilidad mediante semillas o gajos. Se distribuye ampliamente en la región sureste del centro de Sudamérica, que comprende el sureste de Bolivia, Paraguay, sur de Brasil, Uruguay y sur y centro de Argentina (Arenas, 1999).

A. odorata es una liana muy común en toda la región, que se presenta en todo tipo de cobertura forestal, desde bosques densos hasta matorrales, así como en entornos perturbados y en áreas de ocupación humana. Los indios de la región del Chaco de Argentina comen sus frutas crudas, cocidas o preparadas como dulces.

En medicina tradicional se dice que estas plantas son útiles para estimular la lactancia tanto en bovinos como en humanos, utilizando una infusión de hojas y frutos, el látex lechoso se usa en la preparación de ciertos tipos de quesos (Molfino, 1947). Su raíz es empleada como analgésica y antiinflamatoria (Barboza y col., 2006).

Al momento, no existen estudios que validen científicamente el efecto de sus preparados como analgésico y/o antiinflamatorio.

3.1.1.5. Familia Anacardiaceae: *Schinus fasciculata*



Fig. 3.6: *Schinus fasciculata*

El género *Schinus* pertenece a la familia Anacardiaceae y comprende 29 especies nativas de América del Sur, distribuidas en Perú, Bolivia, Chile, Argentina, Uruguay, Brasil y Paraguay (Murray y col., 2012). Varias especies de este género son empleadas en la medicina popular para diferentes patologías. *Schinus fasciculata* (Griseb.) I.M. Johnst, conocido como “moradillo”, “molle morado” o “molle de curtir”, es un arbusto espinoso que

puede medir de 6 a 8 m de altura con una copa que se ramifica desde la base, con ramas espinoscentes, de color grisáceo cuando está completamente desarrollado. Su tronco tortuoso es de color ceniciento oscuro; las ramas terminales finalizan en una espina. Sus hojas dimorfas, son membranosas o coriáceas; las de las ramas jóvenes, cortas y anchas, y en las ramas viejas, lanceoladas y largas. Sus flores amarillentas, se disponen en racimos y su fruto es una drupa esférica violácea. Esta especie sudamericana tiene una amplia distribución en Bolivia, Paraguay, norte y centro de Argentina (Jujuy y Salta hasta San Luis, Córdoba y Entre Ríos). Es muy común encontrarla en los cañadones interserranos formando bosquecitos, florece en primavera.

En la medicina popular se usan las hojas en infusión y decocción como analgésico, antiinflamatorio, antitusivo, purgante, antibacteriano, anticatarral y para el tratamiento de la disentería (Barboza y col., 2006; Scarpa, 2004; Toursarkissian, 1980), en cataplasmas contra úlceras, en buches como desinfectante de la boca y para fortalecer las encías. La resina es empleada externamente para el dolor de cabeza, como antiinflamatorio en emplastos (Vivot y col., 2012).

Estudios previos, informaron el contenido del aceite esencial de las partes aéreas (tallos, hojas y flores) de esta especie, con un rendimiento del 0,26%. A su vez, y mediante cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas, identificaron veintitrés compuestos, entre ellos, limoneno (10,90%), β -felandreno (6,16%) y α -felandreno (5,60%) fueron los principales terpenos, con un bajo contenido de monoterpenos (35,67%) y sin detectar sesquiterpenos. Otros compuestos como alcoholes (24,62%), aldehídos (9,78%), ésteres (3,26%) y cetonas (1,17%), fueron identificados (Murray y col., 2008). Posteriormente, se demostró que el aceite esencial posee actividad antioxidante por su capacidad atrapadora de radicales libres (DPPH) (Murray y col., 2008). El aceite esencial de los frutos de *S. fasciculata* mostró actividad antifúngica (Sampietro y col., 2014). Por último, se demostró que el extracto etanólico de las hojas presenta actividad antibacteriana (Vivot y col., 2012).

De los antecedentes encontrados, no se han reportado estudios relacionados al uso de sus preparados como analgésico y antiinflamatorio.

3.1.2. *Material Vegetal*

Las especies fueron recolectadas en época de su floración, en la Provincia de Córdoba, Argentina. Se preparó una muestra de herbario del material vegetal completo (tallos, hojas, flores y frutos), el cual fue depositado en el herbario CORD del Museo Botánico de la Universidad Nacional de Córdoba e identificado por personal perteneciente al Instituto Multidisciplinario de Biología Vegetal (IMBIV-CONICET). La parte de la planta utilizada para cada especie, fue desecada a la sombra, al abrigo de la luz y con buena aireación, en nuestro laboratorio. Posteriormente, el material vegetal fue procesado utilizando un molino a cuchillas con tamiz n° 5 y el material molido fue usado para la preparación de los extractos. En la tabla 3.1, se muestra el lugar de recolección de cada especie vegetal, su N° de CORD correspondiente y la parte empleada para su posterior extracción.

Tabla 3.1: Lugar de recolección de cada especie y su N° de CORD

Familia	Especie Vegetal	Lugar de recolección	N° CORD	Parte utilizada
Berberidaceae	<i>Berberis ruscifolia</i> Lam.	El Pueblito, Localidad de Salsipuedes. Dpto. Colón (31º 6' 28.44" de latitud Sur, 64º 18' 4.348" de longitud Oeste)	50822	hojas y tallos
Cervantesiaceae	<i>Jodina rhombifolia</i> (Hook. & Arn.) Reissek	El Pueblito, Localidad de Salsipuedes. Dpto. Colón (31º 6' 28.44" de latitud Sur, 64º 18' 4.348" de longitud Oeste)	50821	hojas y corteza
Malvaceae	<i>Modiolastrum malvifolium</i> (Griseb.) K. Schum	Rio Ceballos, Dpto. Colón (31º 9' 59.749" de latitud Sur, 64º 19' 50.919" de longitud Oeste)	50826	hojas y tallos
Malvaceae	<i>Sphaeralcea bonariensis</i> (Cav.) Griseb	Casas Viejas, Dpto. Colón (31º 2' 20.897" de latitud Sur, 64º 20' 1.78" de longitud Oeste)	50824	hojas y raíces
Apocyanaceae	<i>Araujia odorata</i> (Hook. & Arn.) Fontella & Goyder	Casas Viejas, Dpto. Colón (31º 2' 20.897" de latitud Sur, 64º 20' 1.78" de longitud Oeste)	50823	Raíces
Anacardiaceae	<i>Schinus fasciculata</i> (Griseb.)I.M. Johnst	El Pueblito, Localidad de Salsipuedes. Dpto. Colón (31º 6' 28.44" de latitud Sur, 64º 18' 4.348" de longitud Oeste)	50825	Hojas

3.2. Preparación de los extractos

Teniendo en cuenta el uso tradicional de las 6 especies recolectadas, se prepararon dos extractos acuosos: infusión y decocción, siguiendo a la Farmacopea Argentina VII edición, 2013.

Para la extracción por infusión, se agregó agua a temperatura de ebullición (100 °C) al material vegetal molido, en una proporción del 5% p/v, dejándolo reposar durante 20 minutos, para luego filtrar el extracto con embudo y papel de filtro, descartando el residuo vegetal. El filtrado se concentró a presión reducida, disminuyendo así parte del solvente de extracción, para lo cual se utilizó un evaporador rotatorio (BUCHI, Rotavapor R-114). Por último, y con el objetivo de preservar los componentes presentes en el extracto, se procedió a liofilizarlo en un equipo marca BIOBASE.

Para la decocción, el material vegetal molido fue colocado en un Erlenmeyer al que se le agregó agua en una proporción del 5% p/v, llevándose a calentamiento hasta ebullición sostenida por 20 minutos. Posteriormente, se realizaron los mismos pasos que para el caso de infusión.

Para la filtración de todos los extractos se utilizó papel de filtro y luego del proceso de liofilización, cada extracto se almacenó a temperatura ambiente en un desecador, siempre protegido de la luz.

Para todas las especies, el material vegetal empleado para la preparación de la infusión y decocción, acorde al uso tradicional (tabla 3.1), fue

procesado en forma conjunta a excepción de *J. rhombifolia*, obteniendo los extractos acuosos para cada parte (corteza y hojas).

3.3. Determinación cualitativa de metabolitos secundarios

3.3.1. Metodología

Los principales responsables de las propiedades farmacológicas de las plantas medicinales son por lo general, un conjunto de moléculas que son producto de su metabolismo secundario. Estos metabolitos son esenciales en los mecanismos de defensa y señalización (Osbourn y Lanzotti, 2009). Los metabolitos secundarios no están presentes en todas las partes del vegetal en igual concentración, ni de igual manera en todas las especies vegetales, y su producción suele estar acotada a un grupo taxonómico en particular (Pérez-Alonso y Jiménez, 2011).

A lo largo de los años se han desarrollado un gran número de técnicas que permiten detectar diferentes grupos de metabolitos rápidamente, en muestras de diversa naturaleza. Estos ensayos se basan principalmente en evidenciar los grupos funcionales característicos de cada familia de compuestos por medio de reacciones de óxido-reducción o por formación de complejos coloreados, los cuales pueden ser rápidamente observados sin necesidad de un instrumental especial (Savithramma y col., 2011).

Es por ello que como estudio preliminar, se realizó un screening fitoquímico cualitativo de todos los extractos obtenidos de las 6 especies vegetales a estudiar, para determinar la presencia de los principales grupos químicos, siguiendo procedimientos estandarizados (Harborne, 1973; Edeoga y col., 2005).

Todos los extractos a evaluar se prepararon con 3 g del liofilizado y se disolvieron en H₂O destilada hasta llegar a un volumen final de 50 ml. Luego del filtrado se realizaron los ensayos que se describen a continuación para determinar presencia o ausencia de cada grupo de metabolito secundario.

➤ **Determinación de taninos**

En tubo de ensayo se colocaron 2 ml de cada extracto, a esta solución se le adicionaron unas gotas de cloruro férrico al 10%. La aparición de coloración verde o azul-negro indicó la presencia de taninos condensados o hidrolizables, respectivamente (Adegboye y col., 2008).

➤ **Determinación de flavonoides**

En cada tubo de ensayo, 2 ml de cada extracto fueron colocados y se realizó una partición con éter etílico obteniéndose dos fases: una acuosa (determinación de la presencia de los flavonoides glicósidos) y otra etérea (de afinidad con los flavonoides aglicones) que fueron separadas. La fase etérea fue evaporada a sequedad y luego se agregó etanol para disolver el extracto. A cada tubo de ensayo, con su correspondiente fracción, se les adicionó unos fragmentos de viruta de magnesio y unas gotas de ácido clorhídrico al 10%

(Reacción de Shinoda), y posteriormente, 1 ml de butanol. El cambio de coloración (amarillo, naranja, rojo, magenta o rosa) en la fase orgánica fue indicativo de la presencia de distintas estructuras de flavonoides (Ganoza, 2000; Mojab y col., 2003).

➤ **Determinación de antraquinonas**

Se utilizó un volumen de 5 ml de cada extracto y se les adicionó 3 ml de benceno. La mezcla se agitó y se dejó reposar hasta completa separación de las fases (aproximadamente 15 min). En la fase bencénica, se realizó la reacción directa de Bortraeger, para ello se adicionó 1 ml de una solución de hidróxido de sodio al 10% y se observó la aparición de coloraciones entre amarillo y anaranjado en la fase acuosa, indicativo de la presencia de antraquinonas agliconas (Onwukaeme y col., 2007). A la fase acuosa, se le agregó 5 gotas de HCl (c) y se sometió a baño maría durante 30' con el fin de hidrolizar los glicósidos que pudiesen estar presentes. Se dejó enfriar y se extrajo con benceno. A 1 ml del extracto bencénico, se le añadió 1 ml de $\text{NH}_4(\text{OH})$. La aparición de coloración rosa-roja en la fase inferior fue indicativo de la presencia de glicósidos de antraquinonas (Bruneton, 2001).

➤ **Determinación de saponinas**

2 ml de extracto acuoso fueron agitados vigorosamente, dejando luego reposar durante 15 min. La presencia de saponinas se evidenció por la formación de una espuma persistente, luego de pasado ese tiempo (Ayoola y col., 2008).

➤ **Determinación de alcaloides**

Se utilizó un volumen de 5 ml de cada extracto, se llevó a sequedad, retomándose con HCl al 1% v/v. Posteriormente, se filtró y se agregó hidróxido de amonio hasta pH 10. El extracto alcalino fue particionado con cloroformo (la partición se realizó 3 veces), obteniendo un extracto clorofórmico y uno acuoso. Sobre ambos extractos se agregó un ml de Reactivo de Dragendorff. La presencia de alcaloides se consideró positiva al aparecer una coloración rojo ladrillo: en el extracto clorofórmico, la presencia de alcaloides secundarios o terciarios y en el extracto acuoso, la presencia de alcaloides cuaternarios (Adegboye y col., 2008).

➤ **Determinación de antocianinas y betacianinas**

A 2 ml de cada extracto, se le adicionó $\text{NH}_4(\text{OH})$ en gotas, un cambio de color de rojo a azul o a amarillo fue indicativo de la presencia de antocianinas o betacianinas, respectivamente (Adegboye y col., 2008).

➤ **Determinación de proantocianidinas**

Se utilizó un volumen de 2 ml de cada extracto y se agregó HCl (37% p/v) hasta pH 2, luego de someter a calentamiento, la reacción se consideró positiva al cambiar a coloración a rojiza, y con el agregado de n-butanol o

alcohol amílico, dicha coloración pasó a la fracción alcohólica (Adegboye y col., 2008).

➤ Determinación de fitoesteroides

Dos ml de cada extracto fueron evaporados a sequedad y fueron retomados con HCl al 1% v/v. Posteriormente, se filtró y se agregó hidróxido de amonio hasta llegar a pH 10. Se particióno con cloroformo, (la partición se realizó 3 veces), obteniendo un extracto clorofórmico y uno acuoso. Al extracto clorofórmico (1 ml) se le agregó igual volumen de anhídrido acético y posteriormente, 5 gotas de ácido sulfúrico concentrado. Una coloración verde azulada fue considerada como reacción fue positiva (Adegboye y col., 2008).

3.4. Resultados y Conclusiones

Los resultados del análisis fitoquímico cualitativo y semi-cuantitativo, son mostrados en la siguiente tabla (Tabla 3.2).

Tabla 3.2: Screening fitoquímico cualitativo de los extractos acuosos [infusión (I) y decocción (D)] de las especies vegetales seleccionadas

			METABOLITOS SECUNDARIOS						
Especie Vegetal	Parte de la planta utilizada	Extracto acuoso	Taninos	Flavonoides Aglicones	Flavonoides Glicósidos	Alcaloides	Sapoinas	Betacianinas	Proantocianidinas
<i>B. ruscifolia</i>	hojas y tallos	I	+++	+	+	+++	-	-	-
		D	+++	++	+	+++	-	-	-
<i>J. rhombifolia</i>	hojas	I	++	+	+	++	+	-	-
		D	+++	+	+	++	+	-	-
<i>J. rhombifolia</i>	corteza	I	++	-	-	++	-	+	-
		D	++	-	-	++	-	+	-
<i>A. odorata</i>	raíces	I	+	+	+	++	+	+	-
		D	+	+	+	++	+	+	-
<i>M. malvifolium</i>	hojas y tallos	I	++	+	++	+	-	-	-
		D	++	++	++	+	-	-	-
<i>S. bonariensis</i>	hojas y raíces	I	++	++	++	++	-	++	-
		D	++	+	+++	++	-	++	-
<i>S. fasciculata</i>	hojas	I	+++	+++	+++	+++	+	-	+
		D	+++	+++	+++	+++	+	-	+

Análisis cualitativo: + indica la presencia del metabolito analizado, - indica ausencia del metabolito analizado. +++: abundante, ++: moderada, +: débil.

Estos datos permiten dar una idea clara de los principales metabolitos secundarios que contiene cada extracto y sirve de base para continuar en la

investigación de los compuestos que pudieran ejercer el efecto analgésico y/o antiinflamatorio indicado en el uso popular.

Estos ensayos preliminares permitieron dar a conocer el contenido cuali y semi-cuantitativo de metabolitos secundarios, dando un indicio sobre el tipo de constituyente químico que puede estar presente en las distintas especies vegetales a evaluar, siendo la presencia de taninos, flavonoides y alcaloides, notoria en la mayoría de los extractos evaluados. De este modo, se dará inicio al estudio de las actividades biológicas que permitan validar la eficacia de los preparados, obtenidos de las especies vegetales seleccionadas, empleadas como analgésicas y/o antiinflamatorias, tal como es informado en la medicina tradicional.

CAPÍTULO 4

*EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LOS
EXTRACTOS SOBRE LA INHIBICIÓN
DEL OXÍDO NÍTRICO Y DE LA EXPRESIÓN
PROTEICA DE LA ÓXIDO
NÍTRICO SINTASA INDUCIBLE, EN LÍNEAS
CELULARES*

4.1. Introducción

Para evaluar una determinada actividad farmacológica de un extracto o compuesto puro, los ensayos *in vivo* siguen siendo un requerimiento de relevancia para poder confirmar diferentes actividades biológicas. No obstante para evitar el sufrimiento y el uso de animales de experimentación y, sumado a ello, los elevados costos y grandes requerimientos de animales, además del espacio y tiempo necesarios para llevar a cabo los experimentos *in vivo*, se han desarrollado los ensayos en sistemas celulares y el uso de esta metodología, va en incremento. Así, los ensayos en líneas celulares resultan ser ventajosos, aportando información importante sobre la actividad biológica evaluada y el probable mecanismo de acción de un compuesto o un extracto bioactivo (Fina y col., 2013).

En función de utilizar modelos celulares, por sus reconocidos beneficios, dentro de los ensayos en líneas celulares que conducen a la evaluación de la actividad antiinflamatoria, se destaca el empleo de líneas celulares derivadas de macrófago de ratón J774A.1 (De Falco y col., 2016), siendo los macrófagos células esenciales para liberar mediadores proinflamatorios en respuesta a varios estímulos dañinos. El lipopolisacárido (LPS), componente principal de la membrana externa de las bacterias Gram negativas, es uno de los estímulos proinflamatorios que provoca fuertes señales celulares relacionadas con las respuestas inmunes innatas de los macrófagos (Guha y Mackman, 2001). Cuando los macrófagos son activados por LPS, se inicia la vía de señalización del receptor 4 tipo toll (TLR4), que implica la fosforilación de la proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK). Esto induce la producción de una variedad de mediadores proinflamatorios como el NO que es generado por la iNOS, enzima sobreexpresada frente a eventos inflamatorios tanto crónicos como agudos (Gosgnach y col., 2000; Reis y col., 2011).

Teniendo en cuenta las investigaciones científicas, las cuales indican que el NO es un signo fundamental de la respuesta inflamatoria, inhibir el NO excesivo se ha convertido en una estrategia eficaz para el tratamiento de enfermedades con componentes inflamatorios (Shadfar y col., 2015). De este modo, se pretende evaluar en este capítulo el efecto de los distintos extractos, obtenidos de las especies seleccionadas, sobre la inhibición del NO producido por la estimulación del LPS en línea celular derivada de macrófagos J774A.1 e indagar así un posible mecanismo de acción. Esto permitiría aportar información sobre la capacidad de los distintos extractos de las especies seleccionadas, de inhibir a un mediador que participa en el proceso inflamatorio: el NO.

Dichos resultados pretenden colaborar con avances en la medicina tradicional, ya que se estaría brindando información científica la cual se relaciona con el efecto antiinflamatorio de los extractos en estudio, actividad farmacológica informada por la medicina popular.

4.2. Objetivos

- ✓ Evaluar parámetros relacionados con el estudio de inhibición de NO. Para ello se plantean los siguientes ensayos:

- Determinar la máxima concentración no citotóxica (MCNC) de cada extracto sobre las líneas celulares derivadas de macrófagos J774A.1
- Medir la inhibición de los extractos sobre la producción de NO estimulado por el LPS.
- Para aquellos extractos activos, determinar su inhibición sobre la expresión proteica de la iNOS mediante la técnica de Western Blot.

4.3. Metodología

4.3.1. Líneas celulares derivadas de Macrófago J774 A.1

Para llevar a cabo el estudio de la capacidad de los extractos para inhibir la síntesis de NO y la expresión de la enzima iNOS, se emplearon las líneas celulares de macrófagos J774A.1, del Laboratorio de Cultivo Celular del Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Químicas, UNC. Durante el mantenimiento y la expansión del cultivo celular de los macrófagos, se empleó como medio de cultivo DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, SIGMA- ALDRICH, D6429) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB, Natocor) y 1% de antibióticos (estreptomina 100 µg/ml y penicilina 100 µg/ml, Klonal), se mantuvieron a 37°C en atmósfera controlada con 5% de dióxido de carbono (CO₂) y 95% de humedad. Para los ensayos realizados, se han empleado células con hasta 15 reemplazos de medio de cultivo.

Los experimentos se llevaron a cabo en el laboratorio de Productos Naturales, Instituto de Virología "Dr. J.M. Vanella", Facultad de Ciencias Médicas, UNC, cumpliendo con todas las condiciones de esterilidad adecuadas asegurando el buen desarrollo del experimento y evitando la contaminación de las células, bajo la supervisión de la Dra. Brenda Konigheim.

4.3.2. Preparación de los extractos

Para la preparación de cada uno de los extractos, se partió de una solución madre de 1 mg/ml, la cual se disolvió en el medio DMEM. A partir de esta solución se obtuvieron las diferentes concentraciones de los extractos empleando el mismo medio, para luego utilizarlas en los experimentos. Cada solución madre se preparó el mismo día en que se llevó a cabo el experimento.

4.3.3. Determinación de la viabilidad celular

Para la determinación de la viabilidad celular se empleó la técnica descrita por Mosmann (1983), que se basa en la reducción por parte de los macrófagos del 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-bromuro de tetrazolio (MTT), de color amarillo, a una sal de formazan de coloración violeta. Esta reacción ocurre en presencia de células viables, catalizada por la enzima succinildeshidrogenasa mitocondrial.

Para este ensayo, las células J774A.1 se sembraron en una microplaca de 96 pocillos hasta una densidad final de 1×10^5 células por pocillo, usando un volumen final de 100 μl y se incubaron a 37°C durante 24 h en atmósfera controlada con 5% de CO_2 y 95% de humedad. Pasado el tiempo de incubación, se eliminó el medio condicionado y se agregaron las distintas concentraciones de los diferentes extractos (7,8-500 $\mu\text{g/ml}$), obtenidas mediante diluciones seriadas 1/2. Luego de incubar por 24 h en las mismas condiciones, se extrajo el medio condicionado y se adicionaron a cada pocillo, 100 μl de MTT [5 mg/ml en buffer de sales de fosfato (PBS: buffer fosfato salino)], dejándose incubar por una hora (Fig 4.1). Una vez terminado el tiempo de incubación, se eliminó el sobrenadante de la placa y se agregó a cada pocillo 100 μl de dimetilsulfoxido (DMSO), agitándose a temperatura ambiente por 15 minutos para que disuelva los cristales de violeta de formazan formados.

La absorbancia se midió a 595 nm con un lector de microplacas (BioTek ELx800). El porcentaje de viabilidad celular se determinó con respecto al grupo control, el cual corresponde a los pocillos sin el agregado de cada extracto (100% de viabilidad). Cada concentración se evaluó por triplicado. Este ensayo permite calcular la MCNC, que es la concentración máxima de extracto a utilizar, donde las células se mantienen viables en un 90 %. Para determinar la MCNC, se realizaron gráficos de concentración-respuesta (software Origin 8.0), utilizando el % de viabilidad celular del extracto en función de las diferentes concentraciones evaluadas. La viabilidad de las células se calcula respecto del control, según la expresión matemática:

$$\% V = \frac{A_c - A_m}{A_c} \times 100$$

Siendo %V = porcentaje de viabilidad de las células, A_c = media de la absorbancia del control y A_m = valor de la absorbancia de la muestra.

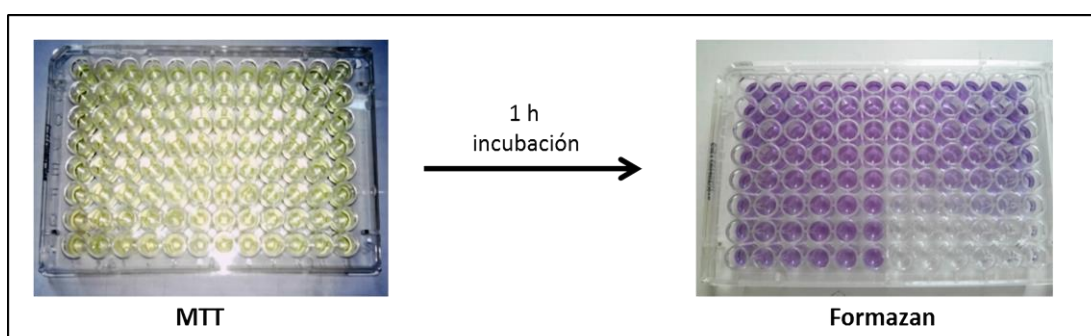


Fig. 4.1: Reducción del MTT (color amarillo) a formazan (color violeta) por la actividad metabólica mitocondrial de las células.

4.3.4. *Evaluación de la inhibición de la producción del óxido nítrico*

Las concentraciones de NO en los medios condicionados de las líneas celulares se determinaron como nitrito, usando un ensayo colorimétrico cuantitativo basado en la reacción de Griess (Coker y Laurent, 1998).

Se incubaron las células de macrófago J774A.1 en placas de 24 pocillos, en la cual se inocularon $2,5 \times 10^5$ células por pocillo, durante 24 h (Fig.4.2) a 37°C, en atmósfera controlada con 5% de CO₂ y 95% de humedad. Posteriormente, se eliminó el sobrenadante y se agregaron las diferentes MCNC de cada extracto, disueltas en el medio de cultivo. Se realizó una pre-incubación de 1 h, permitiendo el ingreso del extracto a las células y luego se agregaron 5 µl de LPS, 1 mg/ml. Las células se incubaron durante 24 h, bajo las condiciones anteriormente mencionadas. Al cabo de este tiempo, se determinó la cantidad de NO producido, empleando el reactivo de Griess [ácido sulfanílico 1%, en ácido fosfórico al 15% y N-(1-naftil)-etilendiamino 0,1%, 1:1]. Así, 100 µl del mismo se adicionaron a 100 µl de sobrenadante, y se determinó espectrofotométricamente en un lector de microplacas, la cantidad de cromógeno generado (color morado) a 540 nm (Granger y col., 1996).

El grupo control del experimento fueron las células sin tratar con los diferentes extractos y estimuladas con LPS, condición que corresponde a la máxima producción de NO en el experimento; el grupo experimental fueron las células tratadas con los diferentes extractos y estimuladas con LPS y el grupo blanco, fueron las células sin tratar y sin estímulo de LPS. Como control positivo del experimento, se utilizó quercetina (10 µg/ml), flavonoide con probado efecto como inhibidor del NO estimulado por LPS (Rao Manjeet y Ghosh, 1999).

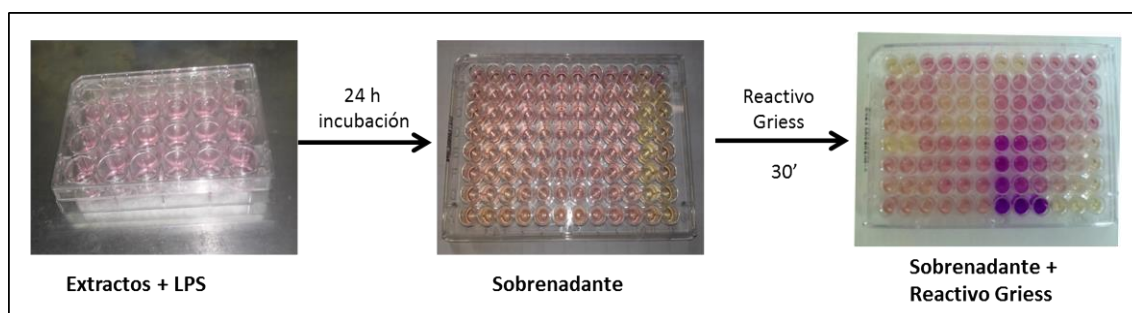


Fig. 4.2: Incubación de las células con diferentes concentraciones de extracto y LPS, con la posterior reacción del sobrenadante con el reactivo de Griess para la determinación del NO estimulado por LPS.

El porcentaje (%) de inhibición de NO estimulado, por parte de los diferentes extractos evaluados, se calculó según la siguiente fórmula:

$$\% \text{ inhibición de NO estimulado} = 100 - \left[\frac{A_m}{A_c} \times 100 \right]$$

Donde A_m , corresponde al valor de absorbancia de la muestra (grupo experimental) menos el valor de absorbancia del blanco (solo tiene agregado de medio) y A_c corresponde al valor de absorbancia del control (estimulado con LPS, sin agregado de extracto) menos el valor de absorbancia del control.

También se estimó la concentración inhibitoria media (CI₅₀), la cual se obtuvo utilizando el programa origin 8.0.

4.3.5. *Evaluación de la inhibición de la expresión proteica de la óxido nítrico sintasa inducible*

La determinación del nivel de expresión de la enzima iNOS se realizó mediante la técnica de Western blot. Para ello, en una microplaca de 6 pocillos se incubaron durante 24 h, 1×10^6 células de macrófagos J774A.1, se agregó la muestra utilizando dos concentraciones, la MCNC y la CI₅₀, incubándose durante una hora, para posteriormente agregar 2 μ l de LPS (1 μ g/ml), como blanco del experimento se agregó solo medio de cultivo y como máxima expresión de la iNOS se agregó LPS, sin la muestra. Concluido el tiempo de incubación, el medio condicionado fue extraído de cada pocillo, las células se lavaron dos veces con buffer PBS, y se levantaron con tripsina, colocándolas en tubos eppendorf, para luego llevar a cabo la lisis celular utilizando buffer RIPA en baño de hielo. El contenido proteico de cada muestra fue determinado mediante el ensayo de Bradford (Bradford, 1976) y las muestras fueron diluidas a iguales concentraciones en Sample Buffer SDS con 2-mercaptoetanol, colocándolas 1 min en agua hirviendo para desnaturalizar las proteínas. Para la corrida electroforética, se utilizó gel separador de acrilamida/bisacrilamida 10% de 1 mm de espesor y gel concentrador con acrilamida/bisacrilamida 4%. Se utilizó el equipo Mini PROTEAN R 3 cell de BioRad siguiendo las instrucciones del fabricante. Luego de la gelificación, se sembraron 3 μ l de marcador de peso molecular, 35 μ l de muestra conteniendo 30 μ g de proteínas por calle. La separación electroforética se realizó a 150 V (80-90 mA) durante 60 minutos utilizando Buffer de corrida pH 8,3. Finalizada la migración, las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa (BioRad Laboratories), utilizando el siguiente buffer de transferencia: Tri-Base 24,7 mM; glicina 0,19 M; metanol 200 ml; H₂O csp 1000 ml, pH 8,1-8,4. Las condiciones utilizadas para la transferencia fueron 100 V, con amperaje liberado durante 90 minutos. Finalizada la transferencia, se verificó el proceso por tinción de la membrana con rojo Ponceau, durante 5 minutos. Posteriormente fueron fijadas con ácido acético al 1%, y las membranas fueron lavadas con buffer TBS 1x (Tris HCl 0,02 M; NaCl 136,8 mM; H₂O csp 1000 ml, pH 7,6) hasta eliminar por completo el colorante. Inmediatamente, las membranas se bloquearon a temperatura ambiente durante 120 minutos con una solución de leche descremada en polvo al 5% en TBS-Tween 0,05%, con agitación. Se lavaron las membranas con TBS-Tween 0,05% y luego se incubaron con anticuerpo primario anti-iNOS (1:500) y anti- β -actina (1:5000) (Tabla 4.1), en TBS 1x/albumina 1,5%, durante la noche, a 4-10 °C, con agitación. Posteriormente, se lavaron las membranas y luego se incubaron con la solución del anticuerpo secundario anti-IgG de conejo (Tabla 4.1), conjugado con peroxidasa de rábano (1:10.000) en TBS 1x/albumina 1,5% durante 1 h, a temperatura ambiente, con agitación. Se realizaron lavados durante 60 minutos y los complejos proteína-anticuerpo se detectaron, usando el sistema de detección de quimioluminiscencia.

Las membranas se incubaron con la solución de revelado (Tris HCl 100 mM, luminol 250 mM, ácido cumárico 90 mM, H₂O₂) durante 30 segundos con agitación. El tiempo de revelado se ajustó según el anticuerpo a revelar según

Tabla 4.1. Actina fue utilizada como control de carga. Las señales se escanearon utilizando un software de análisis de imágenes (Gel Pro Analyzer 3.2 program) y las densidades fueron normalizadas a los valores de β -actina por muestra. Estos experimentos fueron realizados bajo la supervisión de las Dras. Pamela Bustos y Natalia Guiñazú, del laboratorio de Investigaciones Bioquímicas y Químicas del Ambiente, Centro de Investigaciones en Toxicología y Agrobiotecnología del Comahue (LIBIQUIMA-CITAAC).

Tabla 4.1: Listado de anticuerpos y condiciones utilizadas en las determinaciones

Anticuerpo	Marca	Peso Molecular (KDa)	Dilución del anticuerpo	Tiempo de revelado (minutos)
Anticuerpo policlonal de conejo anti-iNOS	Santa Cruz Biotechnology; (Dallas, Texas USA)	130	1:500	10
Anticuerpo policlonal de conejo anti-actina	Sigma (St. Louis, MO,USA)	43	1:5000	5
Anti IgG-conejo	Sigma (St. Louis, MO,USA)	123	1:10000	5-30

4.3.6. *Análisis estadísticos*

Todos los valores se expresaron como la media \pm error estándar. Los resultados se analizaron mediante análisis unidireccional de la varianza (ANOVA) seguido de la prueba de Tukey's para comparaciones múltiples utilizando GraphPad Prisma 6.1 (GraphPad Software, San Diego, CA, EE.UU.), $p < 0,05$ fue seleccionado como criterio de diferencia significativa.

4.4. *Resultados y Discusión*

4.4.1. *Determinación de la máxima concentración no citotóxica e inhibición del óxido nítrico por parte de los diferentes extractos en líneas celulares*

Previamente, se evaluó la citotoxicidad de todos los extractos acuosos sobre los macrófagos J774A.1 (Tabla 4.2) a fin de descartar las especies y las concentraciones que sean tóxicas para las células. La evaluación de la viabilidad celular de las D e I de las especies seleccionadas, en línea celular derivada de macrófagos J774A.1, fue realizada mediante el método colorimétrico de MTT, en donde se evalúa en forma indirecta cómo es afectada

la actividad mitocondrial de las células evaluadas, por la presencia del extracto de interés. De ese modo, se puede obtener la MCNC, concentración donde las células se encuentran viables en un 90%, ante la presencia del extracto evaluado, para ser utilizadas en el modelo de inhibición de la producción de NO. Así, 14 extractos de 6 especies reconocidas popularmente como analgésicas y/o antiinflamatorias, fueron evaluados. De acuerdo a los resultados obtenidos en el ensayo de MTT, se pudieron obtener diferentes MCNC que fueron desde 11 a 500 µg/ml, acorde al extracto y a la especie analizada. Los valores de concentraciones observadas indicaron que la I y la D de *B. ruscifolia* y *S. fasciculata* fueron los que generaron mayor cantidad de células viables en los ensayos evaluados, ya que trabajando a altas concentraciones de extracto (mayores a 200 µg/ml) se observó una viabilidad celular de 90%, comparado con los resultados obtenidos para la D e I de las otras especies (Tabla 4.2).

Luego de obtener la MCNC de cada extracto, se evaluó su capacidad de inhibir la producción de NO, estimulado por LPS, en células de macrófagos J774A.1, a dicha concentración. Como se puede observar en la Tabla 4.2, la mayoría de las decocciones e infusiones de las especies ensayadas fueron capaces de reducir, en diferentes porcentajes, la cantidad de NO producida por la estimulación del LPS. Los valores observados abarcan desde el 6 al 99% de inhibición, dependiendo del extracto evaluado. El único extracto no activo de todos los estudiados, fue la I de *M. malvifolium* (Tabla 4.2).

Tabla 4.2: Resultados de viabilidad celular e inhibición de NO estimulado por LPS.

Especie Vegetal					
Nombre Científico	Nombre Vulgar	Parte de la planta utilizada	Método de extracción	MCNC (µg/ml)	% inhibición de NO
<i>M. malvifolium</i>	Malva del Campo	Raíz y Hojas	Infusión	28±3	0
<i>M. malvifolium</i>	Malva del Campo	Raíz y Hojas	Decocción	11±3	27±6
<i>S. bonariensis</i>	Malvavisco	Raíz y Hojas	Infusión	64±2	19±5
<i>S. bonariensis</i>	Malvavisco	Raíz y Hojas	Decocción	38±1	6±2
<i>J. rhombifolia</i>	Sombra de toro	Hojas	Infusión	47,5±0,3	19±2
<i>J. rhombifolia</i>	Sombra de toro	Hojas	Decocción	16,5±0,5	9±2
<i>J. rhombifolia</i>	Sombra de toro	Corteza	Infusión	51,4±05	20±7
<i>J. rhombifolia</i>	Sombra de toro	Corteza	Decocción	44±1	53±4
<i>A. odorata</i>	Tasi	Raíz	Infusión	49,3±0,7	33±5
<i>A. odorata</i>	Tasi	Raíz	Decocción	54±4	45±5
<i>S. fasciculata</i>	Moradillo	Hojas	Infusión	500±1	49±7
<i>S. fasciculata</i>	Moradillo	Hojas	Decocción	500±2	48±10
<i>B. ruscifolia</i>	Quebrachillo	Hojas y Tallos	Infusión	245±1	99±1
<i>B. ruscifolia</i>	Quebrachillo	Hojas y Tallos	Decocción	238±1	89±1

• Inhibidor de referencia: Quercetina, % inhibición de NO de 95±1% a 10µg/ml.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, se decidió estimar la CI_{50} , concentración a la cual el extracto inhibe el 50% del NO, de aquellos extractos cuyo porcentaje de inhibición fuera mayor a 55%, a las concentraciones evaluadas (MCNC). Así, se seleccionaron la D e I de la especie *B. ruscifolia*, cuyos valores de inhibición fueron de 89 ± 1 y $99\pm 1\%$, respectivamente.

Dado que los extractos acuosos de *B. ruscifolia* fueron los más activos, estos fueron seleccionados para continuar los estudios planteados en los modelos de líneas celulares. Por otro lado, y considerando que otros solventes podrían generar un mayor rendimiento cuali-cuantitativo de metabolitos presentes en esta especie, se decidió seleccionar al etanol, por su capacidad extractiva.

Así, hojas y tallos de *B. ruscifolia* (50 g) fueron extraídos por Soxhlet, utilizando etanol (250 ml), hasta conseguir el agotamiento del material. El extracto resultante se filtró, y el alcohol se eliminó mediante un evaporador rotatorio (BUCHI) a presión reducida, luego se liofilizó para obtener el extracto etanólico (EE). El rendimiento del EE fue de $13\pm 1\%$. Luego de obtener el EE, se realizó la marcha fitoquímica en la cual se determinó la presencia de taninos, flavonoides y alcaloides, metabolitos que también fueron detectados en forma cualitativa en los extractos acuosos de *B. ruscifolia*. Además, se detectaron betacianinas, metabolitos que no se encontraban en los extractos acuosos.

En los ensayos biológicos, se evaluó la viabilidad celular del EE en las mismas líneas celulares, estimando su MCNC, que arrojó un valor de 70 $\mu\text{g/ml}$. Posteriormente se evaluó la inhibición de NO, en línea celular derivada de macrófago J774A.1, mostrando una inhibición del $97\pm 3\%$ a la MCNC. Analizando los resultados obtenidos, para los tres extractos (D, I y EE) de *B. ruscifolia*, es importante destacar que si bien los porcentajes de inhibición para los tres son similares, sus valores de MCNC son diferentes, dando un indicio que el EE, es el que mayor actividad presenta, dado que a una menor concentración (70 $\mu\text{g/ml}$), produce una inhibición del $97\pm 3\%$ de NO, mientras que la I, inhibió a una concentración de 245 $\mu\text{g/ml}$, el $99\pm 1\%$ de NO y la D, a una concentración de 238 $\mu\text{g/ml}$, inhibió el $89\pm 1\%$ de NO.

Se estimó la CI_{50} para los tres extractos, a diferentes concentraciones, por debajo de sus MCNC (EE: 5-70 $\mu\text{g/ml}$, I: 10-245 $\mu\text{g/ml}$ y D: 10-238 $\mu\text{g/ml}$). En los tres extractos evaluados, se observó una inhibición dependiente de la concentración ensayada, que puede observarse en la Fig. 4.3 y los valores de sus CI_{50} , son observados en la tabla 4.3, que fueron estimados, utilizando el ajuste no lineal de los datos de concentración-respuesta.

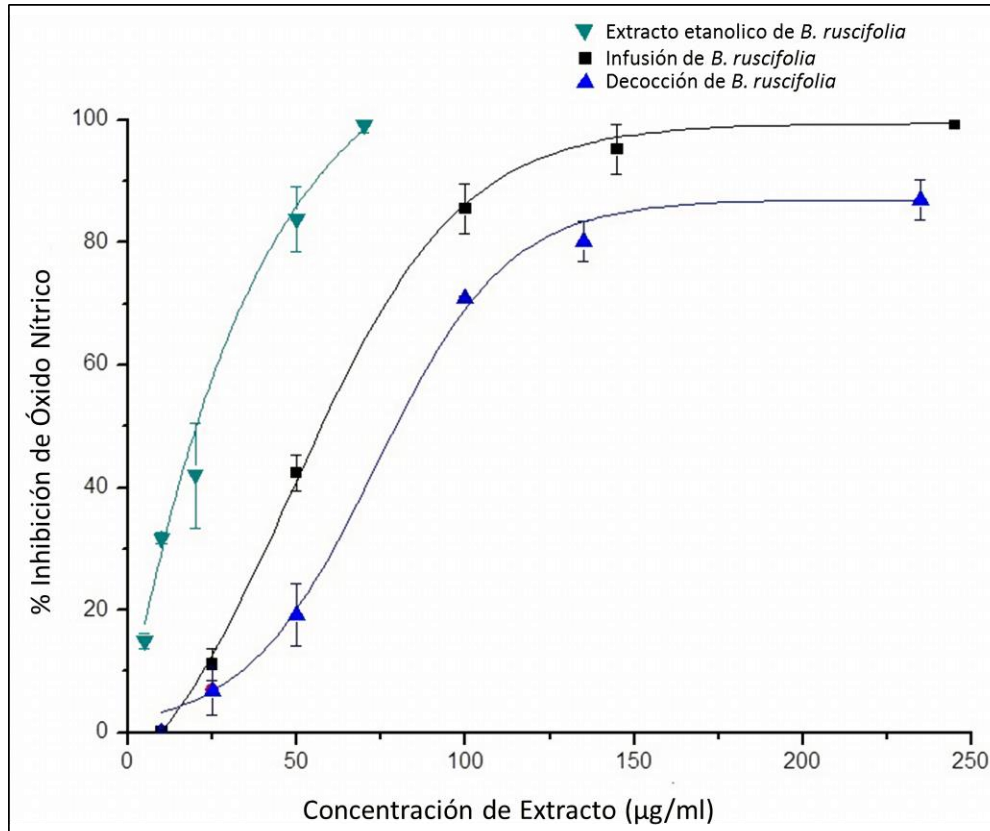


Fig.4.3: Curva concentración de extracto vs. % inhibición de NO de D, I y EE de *B. ruscifolia*.

Tabla 4.3: Valor de la CI_{50} de los extractos de *B. ruscifolia*

Extracto de <i>B. ruscifolia</i>	CI_{50} (µg/ml)
D	78±4
I	57±3
EE	27±1

El EE mostró la mayor actividad, presentando un menor valor en su CI_{50} (27±1) respecto a los obtenidos para la I (57±3) y la D (78±4). Esto permite inferir y posicionar al extracto alcohólico de *B. ruscifolia*, como el extracto que presenta una mayor actividad como inhibidor del NO estimulado, frente a los demás extractos evaluados.

Estos resultados, motivan la continuidad de los estudios biológicos que se pretenden realizar ya que los compuestos que inhiben la producción de NO son potencialmente útiles para el desarrollo de agentes terapéuticos para tratar la inflamación y los trastornos relacionados (Shadfar y col., 2015; Wang y col., 2018).

Así, se decidió evaluar, la inhibición de la expresión proteica de la iNOS, por parte del EE de *B. ruscifolia*, y con este experimento poder evaluar

uno de los mecanismos de acción por el cual este extracto muestra actividad antiinflamatoria, según el uso tradicional.

4.4.2. Efecto del extracto etanólico de *B. ruscifolia* sobre la inhibición de la expresión proteica de la óxido nítrico sintasa inducible

Dado que el extracto más activo sobre la inhibición de NO fue el EE obtenido de *B. ruscifolia*, se evaluó la inhibición de los niveles de expresión de la proteína iNOS provocada por el EE mediante la técnica de Western Blot (Fig. 4.4, A). Las concentraciones seleccionadas fueron su MCNC (70 $\mu\text{g/ml}$) y su Cl_{50} (27 $\mu\text{g/ml}$). El análisis densitométrico de la inhibición de los niveles de la expresión proteica de la iNOS (Fig. 4.4 B) permite observar que las diferentes concentraciones de EE, de manera independiente de la misma, disminuyen

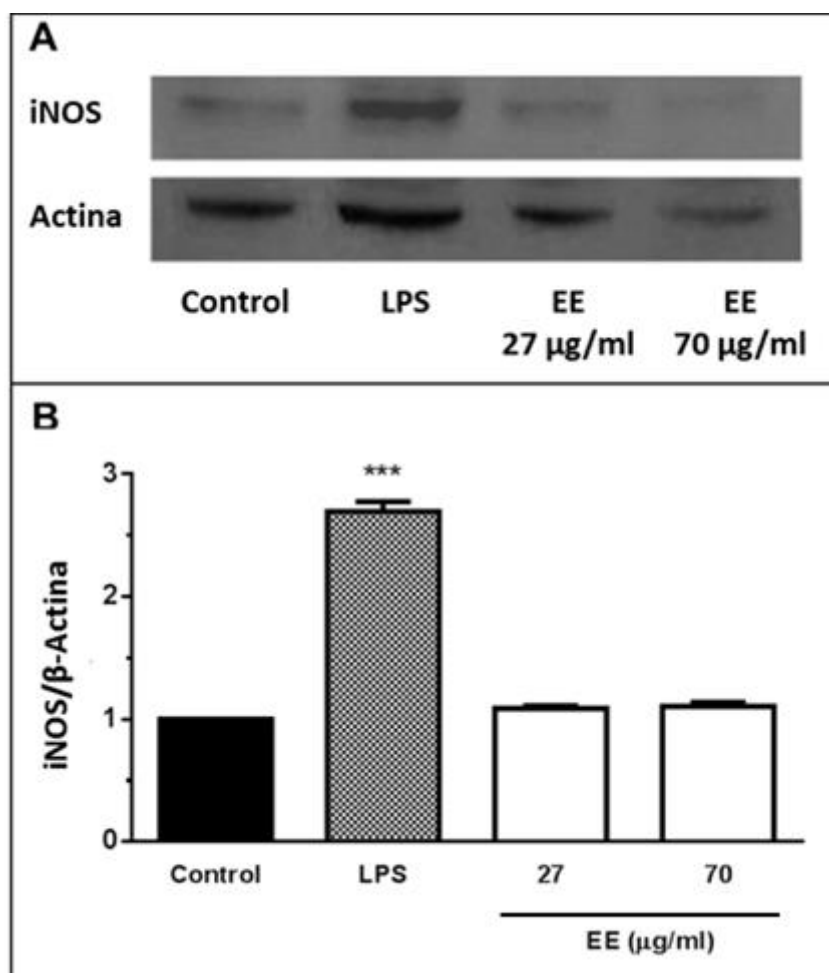


Fig. 4.4: Efecto del extracto etanólico de *B. ruscifolia* sobre la expresión de la enzima iNOS en macrófagos estimulados con LPS. A: Bandas de proteínas de la iNOS y la β -actina que se detectaron por Western blot. B: Análisis densitométrico de las bandas observadas por Western blot. Los resultados fueron analizados con ANOVA de una vía seguido del test de Tukey, se expresaron como la media \pm error estándar. *** $p < 0,001$ vs. Control.

significativamente sus niveles de proteínas, respecto a lo observado en células de macrófagos J774A.1 estimuladas con LPS, mostrando además que sus niveles proteicos no son diferentes, en forma significativa, respecto al control. (Fig. 4.4, B).

Esto indica que la inhibición de la producción de NO generada por el EE, es un resultado de la inhibición de los niveles de la expresión de la iNOS inducida por LPS en macrófagos, tal como se muestra en los resultados obtenidos en el presente experimento.

4.5. Conclusiones Parciales

Los resultados obtenidos en los diferentes experimentos en líneas celulares derivadas de macrófagos J774A.1, demostraron que los extractos acuosos de *B. ruscifolia* y *S. fasciculatus* fueron los que permitieron un mayor % de células de macrófagos J774A.1 viables, con respecto a los otros extractos, teniendo en cuenta las concentraciones obtenidas de sus MCNC.

Basándonos en los datos de inhibición de NO, en los diferentes extractos, se observó que los de la especie *B. ruscifolia* fueron los más activos. Si bien I, D y EE mostraron interesante inhibición sobre este mediador, fue el EE de *B. ruscifolia*, el que presentó mayor actividad. Los resultados confirmaron que el posible mecanismo por el cual el EE inhibe la producción de NO estimulado por LPS es, al menos en parte, por la inhibición de la expresión proteica de la iNOS, enzima que participa en la sobreproducción del NO durante la respuesta inflamatoria.

Estos resultados indicaron que *B. ruscifolia* tiene un valor medicinal potencial en enfermedades inflamatorias correlacionando así, el uso terapéutico como antiinflamatorio, en la medicina popular.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos hasta el momento, se decidió continuar con el estudio en ensayos *in vivo*, lo que permitiría corroborar y correlacionar los resultados obtenidos en el modelo de líneas celulares.

CAPÍTULO 5

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD

ANTINOCICEPTIVA IN VIVO

5.1. Introducción

El estudio y desarrollo del dolor, incluyen diversas disciplinas, con el fin de progresar en el entendimiento científico y humanitario de esta condición para consecuentemente optimizar su tratamiento (Sherrington, 1910; Wang y col., 2014).

La definición de “dolor” más ampliamente aceptada es sin lugar a dudas la provista por la Asociación Internacional para el Estudio del Dolor, conocida por sus siglas en inglés IASP (International Association for the Study of Pain):

“El dolor es una experiencia subjetiva compleja compuesta por la sensación real o potencial de daño tisular que se acompaña de un fuerte componente afectivo”.

En este contexto, el dolor constituye una alarma que, en última instancia, tiene el rol de ayudar a proteger el organismo: desencadena reacciones e induce conductas de evitación aprendidas, que pueden disminuir lo que sea que esté causando el dolor y, como resultado, pueden limitar consecuencias perjudiciales.

El dolor es un enorme problema mundial, ya que afecta a todas las poblaciones, independientemente de su edad, sexo, ingresos, raza u origen étnico. Se ha estimado que el 20% de los adultos (1 de cada 5) sufren dolor y otro 10% de los adultos (1 de cada 10) son diagnosticados recientemente con dolor crónico cada año (Goldberg y McGee, 2011).

Los medicamentos AINEs y los analgésicos narcóticos son los que se recetan con frecuencia para los síntomas del dolor. Pero, se sabe que la mayoría de los AINEs producen complicaciones gastrointestinales indeseables, como sangrado, úlceras pépticas, entre otros efectos no deseados. Se ha informado que los extractos de plantas medicinales de diversos géneros muestran un claro efecto antinociceptivo (Hishe y col., 2018; Rauf y col., 2014; Sultana y col., 2014). Por lo tanto, es lógico buscar nuevos agentes terapéuticos contra el dolor a partir de plantas medicinales utilizadas tradicionalmente.

La medicina tradicional Argentina menciona varias especies utilizadas como analgésicas que aún no han sido estudiadas. Por este motivo se evaluó en este capítulo el efecto analgésico de diferentes extractos usados en la medicina popular. De este modo estaremos aportando información que puede contribuir con la terapia del dolor, para mejorar la calidad de vida de las personas, y también colaborar para la búsqueda de nuevos PP.AA. que se encuentren en dichos extractos.

En este trabajo de tesis doctoral nos centramos en los modelos de nocicepción, se evaluará la respuesta del animal provocada por un breve estímulo nocivo y generado por un sistema nociceptivo que funciona normalmente dentro de sus límites fisiológicos. Existen distintos modelos o ensayos que emplean estímulos físicos o químicos, generando así la nocicepción, observando la respuesta del animal ante tal estímulo. Comúnmente son utilizados el test de la placa caliente o el de retirada de la cola, empleando en ambos un estímulo térmico, o el test de ácido acético o formalina, donde la nocicepción es realizada por un estímulo químico, entre otros ensayos (Ortega y col., 2002). Estos experimentos en animales conscientes a menudo se denominan "estudios de comportamiento", lo cual

significa que todas las respuestas, incluidos los simples reflejos de retirada, son parte del repertorio conductual de un animal. Las pruebas de comportamiento que se utilizan para estudiar la nocicepción (pruebas nociceptivas) constituyen sistemas de "entrada-salida". La entrada corresponde al estímulo aplicado por el científico y la salida la reacción del animal.

Dentro de los modelos de inducción de dolor, el modelo de nocicepción de contorsiones abdominales inducidas por ácido acético y el modelo de inducción de dolor por formalina, son ampliamente empleados para la evaluación *in vivo*. Estas metodologías se basan en estimar el dolor en los animales examinando sus reacciones (etogramas), dado que, los signos más confiables de dolor son los físicos. Si bien la investigación en humanos y animales se ha centrado en varios indicadores bioquímicos (catecolaminas, corticoides, opioides, etc.), estos carecerían de especificidad (Ichinose y *col.*, 1999). De ese modo, el estudio de las reacciones conductuales proporcionan el único indicador de la sensación desagradable percibida como resultado de un estímulo que es nocivo. Generalmente la metodología que involucra inducción de dolor por inyección de un compuesto químico, no tiene restricciones sobre el animal experimental, y esto permite que el dolor y la analgesia pueden ser observados en el contexto del comportamiento continuo del animal, obteniendo un resultado con un menor error (Trongsakul y *col.*, 2003).

La prueba de contorsiones inducida por ácido acético está bien establecida como método de prueba de compuestos analgésicos (Trongsakul y *col.*, 2003; Whittle, 1964). Retorcerse se usa aquí para denotar un síndrome que aparece después de la inyección de sustancias ligeramente irritantes en la cavidad peritoneal y ha sido descrito de diversas maneras como "estiramiento" por Koster y *col.* (1959), "calambres" por Murray y Miller (1960) y "retorcijones" por Hendershot y Forsaith (1959). El ácido acético causa contracción abdominal y es un protocolo conocido para evaluar el dolor debido a la liberación de mediadores endógenos del dolor (Ahmed y *col.*, 2007). En esta prueba, el ácido acético induce dolor generado por la activación de nociceptores quimiosensibles, o por la liberación de mediadores proinflamatorios viscerales como las PGs, citocinas (IL-8, TNF- α e IL-1 β), COX, LOX, 5-HT, Br e His en el líquido del tejido periférico. El aumento de los niveles de estos mediadores endógenos provoca que las neuronas nociceptivas periféricas entren en el asta dorsal del SNC (Ikeda y *col.*, 2001). Si bien esta prueba es suficientemente sensible para detectar el efecto analgésico del extracto/compuesto químico evaluado, tiene la desventaja de no ser específico ya que no permite diferenciar si los efectos están mediados por procesos centrales o periféricos (Figueiredo y *col.*, 2013).

Por esta razón, evaluamos las respuestas neurogénicas e inflamatorias al dolor usando la prueba de formalina. Actualmente, éste es uno de los modelos nociceptivos más utilizado, ya que algunos autores consideran que el modelo de la formalina refleja más fehacientemente estados de dolor clínico que otros que utilizan estímulos mecánicos o térmicos de corta duración (Tjolsen y *col.*, 1992; Sawynok y Liu., 2004).

La inyección intraplantar (i.pl.) de formalina provoca un dolor constante caracterizado por una reacción nociceptiva bifásica (Tjolsen y *col.*, 1992). La fase temprana (0-5 min) se relaciona con el dolor neurogénico nociceptivo agudo, a través de la activación directa de los nociceptores de las neuronas aferentes. Esta hipótesis se ha fundamentado en el hecho de que la inyección

local de formalina dentro, o inmediatamente adyacente del campo receptivo de nervios aislados en la pata trasera de la rata, produce una activación de fibras C y A δ en los primeros 10 minutos (Puig y Sorkin, 1996).

En cuanto a los mecanismos por los cuales la formalina activa los nervios sensoriales, se ha comprobado que la administración de antagonistas de Br, (Parada y col., 2001; Shibata y col., 1989) 5-HT e His, (Doak y Sawynok, 1997) y de trifosfato de adenosina (ATP) (Jarvis y col., 2001) pueden inhibir las respuestas de esta fase. También se ha demostrado que la formalina activa las neuronas sensoriales aferentes primarias mediante la acción específica y directa del receptor de potencial transitorio con repetición de anquirina (TRPA1), el cual es un canal no selectivo permeable a cationes, un miembro de la familia de los canales iónicos del potencial receptor transitorio (TRP) que está altamente expresado en una subpoblación de nociceptores de las fibras C (McNamara y col., 2007).

La fase tardía (15-30 min) parece ser dependiente de una reacción inflamatoria del tejido periférico, se ha comprobado que las respuestas conductuales son inhibidas por la administración de fármacos AINEs, los cuales interfieren con la producción de PGs, así como por inhibidores de otros mediadores inflamatorios (Br, 5-HT, His) (Abbott y col., 1996; Doak y Sawynok, 1997; Shibata y col., 1989).

En esencia, las drogas que afectan la vía periférica inhiben los mediadores de la fase tardía, mientras que las drogas de acción central suprimen a todos los mediadores en ambas fases (Dubuisson y Dennis, 1977; Fasmer y col., 1985; Hunskaar y col., 1985; Hunskaar y Hole, 1987).

Basándonos en los resultados descritos en el capítulo 4, se profundizará el estudio *in vivo* de los diferentes extractos obtenidos de la especie *B. ruscifolia*, con el objetivo de evaluar científicamente el efecto terapéutico dado por la medicina tradicional, mediante el empleo de dos modelos confiables en animales de laboratorio, el test de formalina y el de ácido acético. Alternativamente, y a modo de generar un screening biológico, se probarán otros extractos de plantas seleccionadas en el presente estudio.

5.2. *Objetivos*

- ✓ Evaluar los diferentes extractos bajo estudio, seleccionados acorde a resultados previos obtenidos en modelo en líneas celulares, empleando los siguientes modelos de nocicepción *in vivo*:
 - Modelo de nocicepción inducido por ácido acético.
 - Modelo de nocicepción inducido por formalina.

5.3. *Metodología*

5.3.1. *Animales*

En estos experimentos se emplearon ratones albinos machos, cepa suizo ICR (25–35 g, n=8), obtenidos del Bioterio Central de la Universidad Federal de Santa Catarina (UFSC, Florianópolis, SC, Brasil).

Los animales fueron alojados en grupos y mantenidos bajo condiciones estándar de laboratorio (temperatura ambiente: 22 ± 2 °C, humedad relativa: 60–80 %, ciclo de luz/oscuridad de 12 h), con comida y agua a voluntad. Los animales se aclimataron en la sala del laboratorio 1 h antes de realizar el experimento.

Cada animal, fue utilizado una vez y seleccionado de forma aleatoria. En todos los experimentos se emplearon tres grupos de animales: grupo control, grupo en estudio y grupo de referencia (control positivo), a los que se les administró solución salina, diferentes dosis de los extractos a evaluar y compuesto de referencia, respectivamente. Se usaron distintos controles positivos, acorde al experimento a evaluar.

Todas las observaciones durante el experimento fueron efectuadas a doble ciego. Todos los experimentos realizados cuentan con la aprobación del Comité de Ética para la Investigación Animal de la Universidad Federal de Santa Catarina (número de protocolo de CEUA/UFSC: PP00745), de acuerdo con las pautas actuales para el cuidado de animales de laboratorio y las pautas éticas para las investigaciones de dolor experimental en animales conscientes (Zimmermann, 1983). El número de animales y la intensidad de los estímulos nocivos utilizados, fueron los mínimos necesarios para demostrar los efectos constantes del tratamiento farmacológico. Inmediatamente después de la prueba se sacrificaron por asfixia con CO₂.

5.3.2. *Preparación de muestras para los experimentos in vivo*

La I y la D fueron reconstituidas en solución salina (NaCl al 0,9 %). El extracto etanólico, fue disuelto en solución salina/Tween 80 (95:5 %). La vía de administración fue oral, empleando una cánula adecuada.

5.3.3. *Actividad antinociceptiva*

5.3.3.1. *Prueba de nocicepción inducida por ácido acético*

Inicialmente, el efecto antinociceptivo de los extractos obtenidos de *B. ruscifolia* se verificó mediante el ensayo de contorsiones abdominales, que, aunque es un modelo de nocicepción simple e inespecífico, permite evaluar la actividad antinociceptiva de sustancias que actúan tanto a nivel central como periférico. La respuesta nociceptiva fue inducida por inyección intraperitoneal de una solución de ácido acético (0,6% en solución salina al 0,9%), y verificada por su etograma, que consiste en la contracción de la musculatura esquelética abdominal junto a la extensión de las patas traseras, acorde al método descrito por Bentley y col., 1981.

Luego de la administración por vía oral (v.o.) de las diferentes dosis de los extractos o de la solución salina, deben transcurrir 60 minutos para luego comenzar con el ensayo. Veinte min antes de iniciar el test, los animales fueron ubicados en cajas acrílicas transparentes rectangulares (13x10x9 cm) para ambientarlos a las condiciones del experimento. Posteriormente, por vía intraperitoneal (i.p.), se administraron 450 µl de solución de AcOH a cada animal, el cual fue colocado nuevamente en la caja acrílica y se cuantificó el

número total de contorsiones abdominales que generó cada ratón, durante un período de 20 min (Nascimento y col., 2010) (Fig.5.1). Como control positivo, se empleó Asp a una dosis de 400 mg/kg.

La actividad antinociceptiva se determinó sobre la base de la inhibición del número de contorsiones abdominales de animales pretratados con extractos o con Asp, en comparación con el número de contorsiones abdominales, de los animales control.

Cada ratón se usó en una ocasión solamente. Las pruebas o el registro de datos fueron realizados por un observador que desconocía el tratamiento farmacológico en cada experimento.

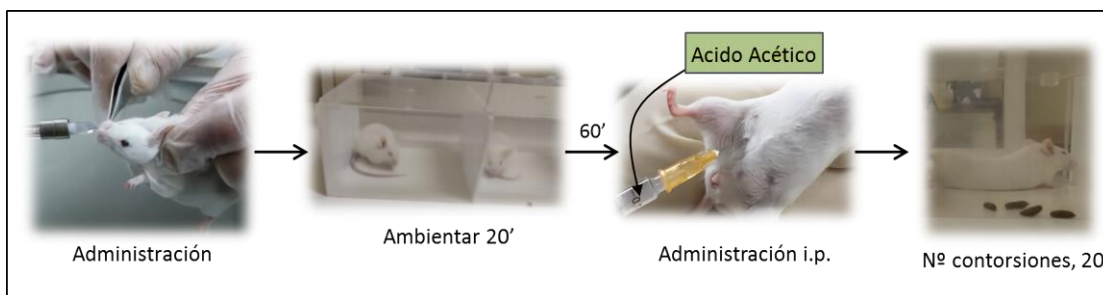


Fig. 5.1: Procedimiento realizado en el test de contorsiones inducidas por administración intraperitoneal de ácido acético.

5.3.3.2. Prueba de nocicepción inducida por formalina

Para confirmar el efecto antinociceptivo de los extractos, se utilizó la prueba de dolor inducida por inyección intraplantar (i.pl.) de formalina.

Los animales recibieron mediante i.pl., 20 μ l de formalina al 2,5% (0,92% de formaldehído en solución salina) en la región plantar de la pata trasera derecha. Posteriormente, fueron colocados individualmente en una caja de acrílico, junto a un espejo, para una fácil observación. Se evaluó el comportamiento de lamida, sacudida y mordida de la pata inyectada (etograma), el cual es una medida de la nocicepción generada por la formalina.

Este modelo muestra dos fases de sensibilidad nociceptiva, luego de la inyección de formalina: la primera (dolor neurogénico) que ocurre durante los primeros 5 minutos y se debe a la activación directa de los nociceptores. La segunda fase (dolor inflamatorio), sucede entre los 15 y 30 minutos, representa el dolor debido a una respuesta inflamatoria relacionada con la liberación de mediadores inflamatorios (Hunskaar y Hole, 1987).

Los distintos grupos de animales recibieron por v.o. las distintas dosis de los extractos a evaluar, y solución salina (grupo control), transcurridos 40 min, fueron ubicados en cajas acrílicas transparentes rectangulares (13x10x9 cm), dejándolos ambientar por 20 min, antes de iniciar el test (Fig. 5.2).

Como control positivo se administró a un grupo Asp a una dosis de 400 mg/kg por v.o. y a otro grupo, morfina (Morf) a una dosis de 5 mg/kg por vía i.p. Después del tratamiento previo y pasada 1 h para el caso de la administración oral y 30 min para la administración intraperitoneal, a los ratones se les inyectó formalina en la superficie plantar de la pata trasera derecha y se mantuvieron en cubículos de acrílico transparentes durante 30 min (Nucci y col., 2012).

Se registró, con un cronómetro, el tiempo total que los animales transcurren realizando los comportamientos de lamida, mordida o sacudida de la pata inyectada. Durante los primeros 5 min del experimento se registró el tiempo total que el animal realizó el comportamiento mencionado, el cual corresponde a la primera fase. Luego se esperó 10 min y se volvió a cronometrar el comportamiento del animal durante 15 min, evaluando de este modo la segunda fase del experimento (Fig. 5.2).

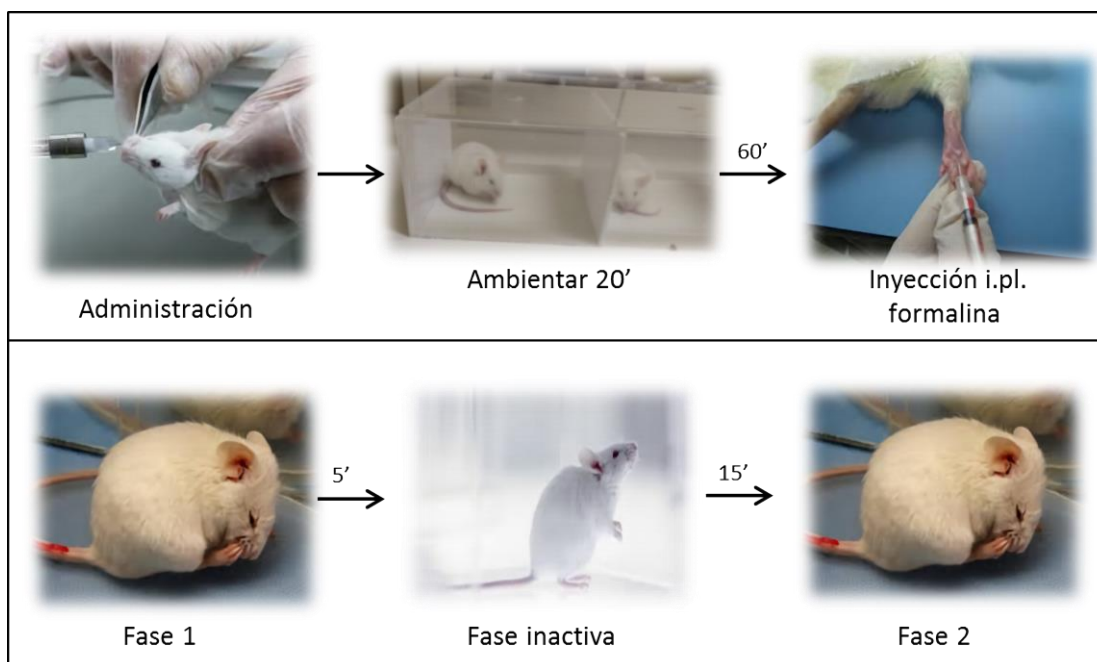


Fig. 5.2: Procedimiento realizado en el test de nocicepción inducida por inyección i.pl. de formalina.

El efecto antinociceptivo se determinó sobre la base de la inhibición del tiempo que emplea en dicho comportamiento, en cada una de las fases, en animales pretratados con extractos y con los controles positivos, en comparación con los animales control.

Además, en este experimento se evaluó si el extracto tenía efecto antitérmico y antiedematoso. Las mediciones del edema y temperatura de la pata se realizaron según lo descrito por Nucci y *col.* (2012). Para lo cual se midió a los grupos tratados y al grupo control, la temperatura (temperatura inicial) y el espesor de la pata del animal (espesor inicial) antes de recibir la inyección i.pl. de formalina, al terminar el tiempo total del experimento se volvió a medir a cada animal la temperatura (temperatura final) y el espesor de la pata (espesor final) que recibió la inyección de formalina. Para medir la temperatura de la pata del animal se utilizó un termómetro infrarrojo (Philco BK8005) y para medir el espesor se utilizó un calibre digital (Crossmaster).

El efecto antitérmico se determinó sobre la diferencia de la temperatura inicial con la temperatura final (Δ de temperatura, en $^{\circ}\text{C}$), el valor obtenido para el grupo control se lo consideró como el 0% de inhibición de temperatura.

El efecto antiedematoso se determinó sobre la diferencia del espesor inicial con el espesor final (Δ en el espesor de la pata, en milímetros), al valor obtenido para el grupo control se lo consideró como el 0% de inhibición de edema.

5.3.4. Análisis estadístico

Ver sección 4.3.6

5.4. Resultados y Discusión

5.4.1. Efecto de extractos de *Berberis ruscifolia* en la nocicepción inducida por ácido acético

La prueba de contorsión abdominal se realizó para analizar la eficacia que presentan los extractos en el alivio el dolor. Los ratones se trataron con ácido acético para inducir el retorcimiento abdominal y se contó el número de contorsiones o estiramientos abdominales realizados por los ratones, durante 20 minutos.

Se probaron diferentes dosis (10; 30; 100; 300 y 1000 mg/kg) acorde a los distintos extractos a evaluar: D, I y EE de *B. ruscifolia*. Los resultados obtenidos para los tres extractos muestran una inhibición de las contorsiones abdominales inducidas por inyección de ácido acético en comparación con el control.

Se obtuvo a una dosis de 1000 mg/kg, una inhibición del 53±6% para la D (Fig. 5.3) y del 44±6% para la I (Fig. 5.4), mientras que el EE mostró su mayor inhibición a una dosis de 300 mg/kg, con un valor del 63±6% (Fig. 5.5).

Como control positivo de los experimentos *in vivo* se utilizó Asp a una dosis de 400 mg/kg mediante administración oral, la cual demostró una media de inhibición del 80±3 %. Podemos inferir que el EE es el más potente de los tres extractos evaluados, ya que a la dosis de 300 mg/kg, el EE demostró significativamente un mayor % de inhibición del comportamiento nociceptivo generado por el ácido acético.

Fig. 5.3: Efecto antinociceptivo de la D de *B. ruscifolia* administrada por vía oral en relación con contorsiones abdominales inducidas por la inyección de ácido acético. Cada grupo representa un promedio de 8 animales. Los resultados fueron analizados con ANOVA de una vía seguido del test de Tukey, se expresaron como la media± error estándar. *p<0,05; ***p<0,001 vs. Control.

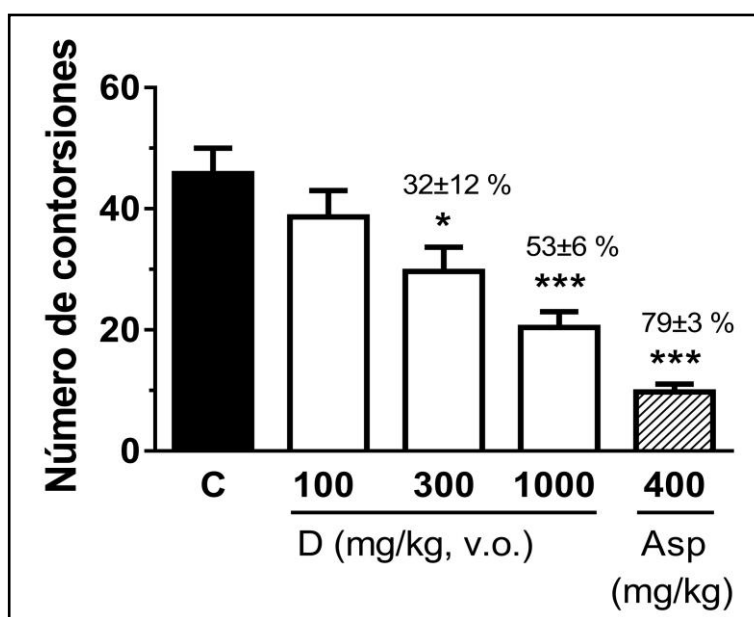


Fig. 5.4: Efecto antinociceptivo de la I de *B. ruscifolia* administrado por vía oral en relación con contorsiones abdominales inducidas por la inyección de ácido acético. Cada grupo representa un promedio de 8 animales. Los resultados fueron analizados con ANOVA de una vía seguido del test de Tukey, se expresaron como la media± error estándar. *p<0,05 vs. Control.

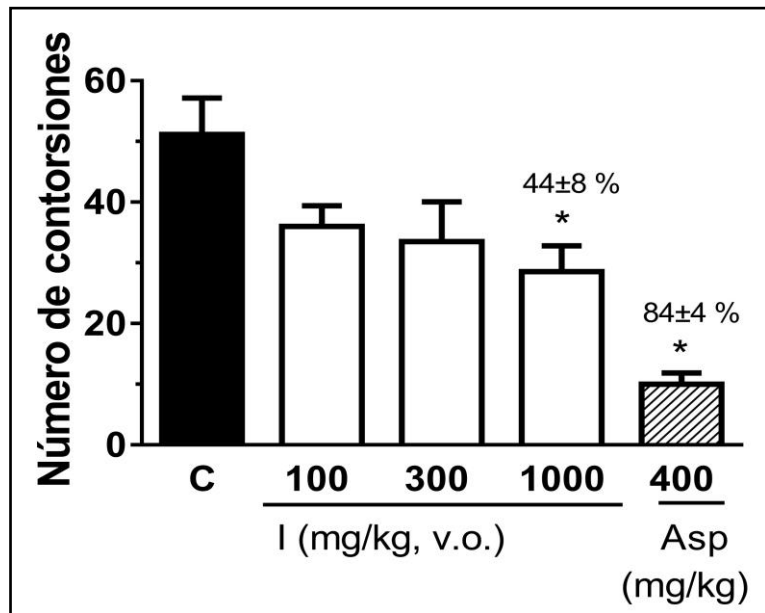
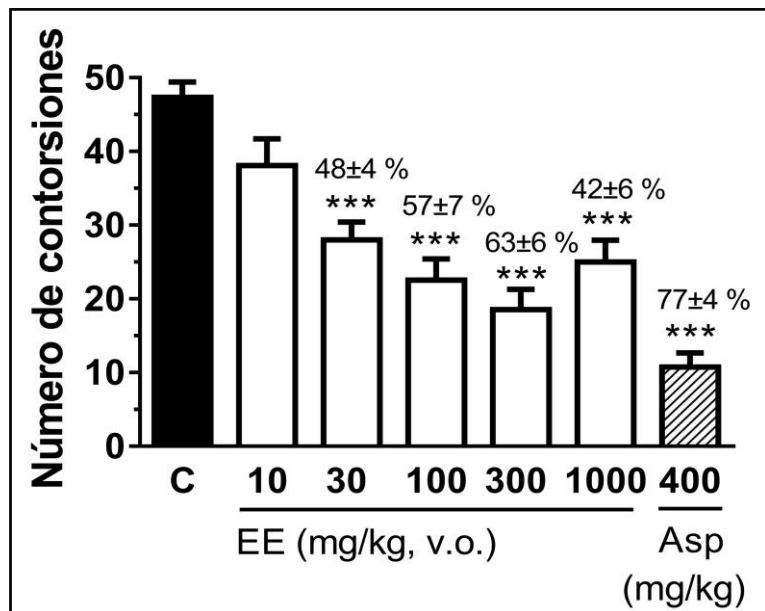


Fig. 5.5: Efecto antinociceptivo del EE de *B. ruscifolia* administrado por vía oral en relación con contorsiones abdominales inducidas por la inyección de ácido acético. Cada grupo representa un promedio de 8 animales. Los resultados fueron analizados con ANOVA de una vía seguido del test de Tukey, se expresaron como la media±error estándar. ***p<0,001 vs. Control.



5.4.2. Efecto de extractos de *Berberis ruscifolia* en la nocicepción inducida por formalina

Este ensayo permite confirmar no solo el efecto antinociceptivo observado para los extractos de *B. ruscifolia* en la prueba de nocicepción inducida por ácido acético, sino además, evaluar dos etapas de nocicepción, una que corresponde al dolor neurogénico y la otra, al dolor inflamatorio.

Como control positivo se utilizó Morf a una dosis 5 mg/kg, vía i.p., y Asp, administrada por v.o., a una dosis de 400 mg/kg. Otro parámetro evaluado fue el efecto antiedematoso y antitérmico que los extractos pueden tener, los cuales son signos que se manifiestan en el proceso inflamatorio.

En el gráfico de la Fig. 5.6, se muestra el efecto de la D en el modelo inducido por el dolor con formalina. Si bien este extracto no muestra actividad

inhibitoria en la fase 1 (Fig. 5.6 A), en la fase 2 (Fig. 5.6 B), se observa una inhibición significativa del $44\pm 5\%$, a una dosis de 1000 mg/kg. A su vez, este extracto no presenta efecto en la disminución del edema y la temperatura, a las dosis evaluadas, comparando con el control (Fig. 5.7). Con respecto a los resultados obtenidos para la I, se observa que a la dosis de 1000 mg/kg, tanto en la fase 1 como en la 2, reporta una inhibición del $31\pm 5\%$ y del $54\pm 6\%$, respectivamente, ambas diferentes significativamente al control (Fig.5.8 A y B, respectivamente). Este extracto, tampoco mostró un efecto antitérmico ni antiedematoso (Fig. 5.9).

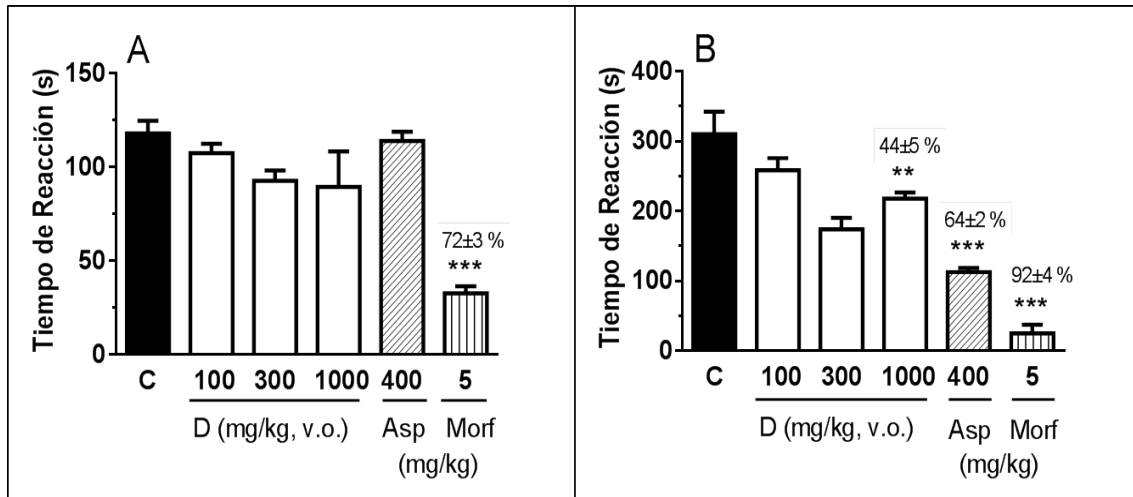


Fig 5.6: Efecto de la D de *B. rusCIFolia* administrada por vía oral en relación a la primera (Fig. 5.6 A) y la segunda (Fig. 5.6 B) fase del dolor inducido por formalina. Cada grupo representa la media de 8 animales. Los resultados fueron analizados con ANOVA de una vía seguido del test de Tukey, se expresaron como la media±el error estándar. **p<0,01; ***p<0,001 vs. Control (C).

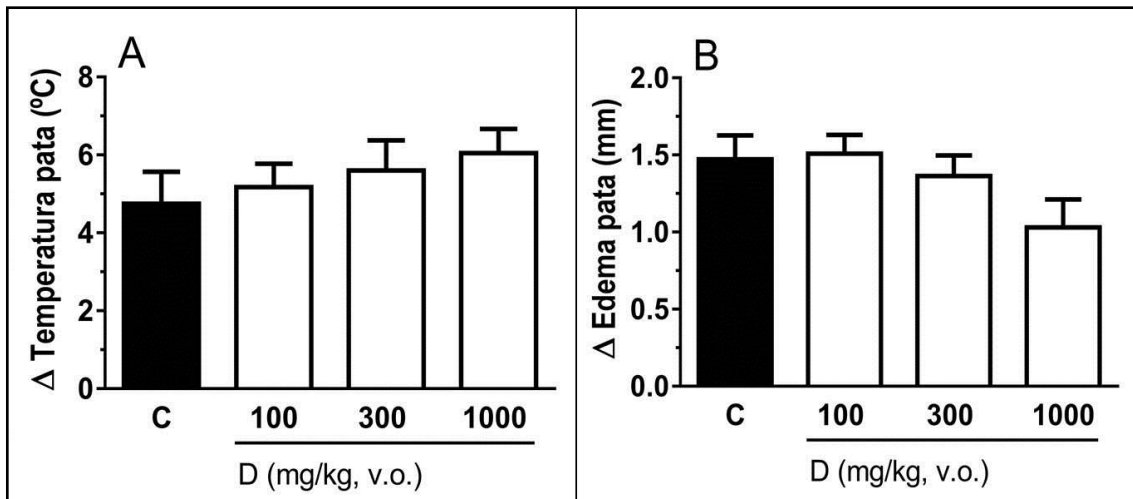


Fig 5.7: Resultados de la D de *B. rusCIFolia* administrado por vía oral en relación a la inhibición de temperatura (Fig. 5.7 A) y a la inhibición de formación de edema (Fig. 5.7 B) en la pata trasera inyectada con formalina. Cada grupo representa la media de 8 animales.

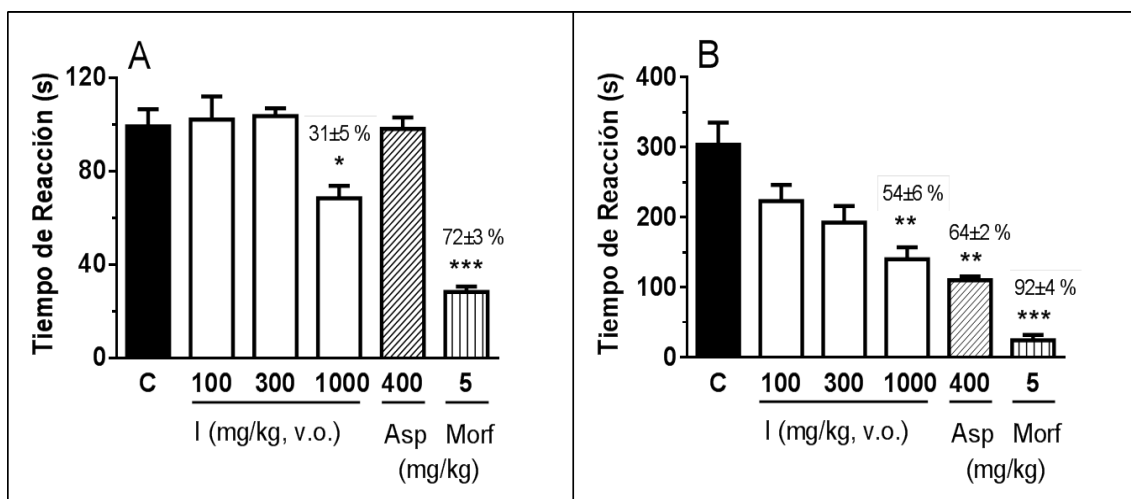


Fig 5.8: Efecto de la I de *B. ruscifolia* administrada por vía oral en relación a la primera (Fig. 5.8 A) y la segunda (Fig. 5.8 B) fase del dolor inducido por formalina. Cada grupo representa la media de 8 animales. Los resultados fueron analizados con ANOVA de una vía seguido del test de Tukey, se expresaron como la media ± el error estándar. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ vs. Control (C).

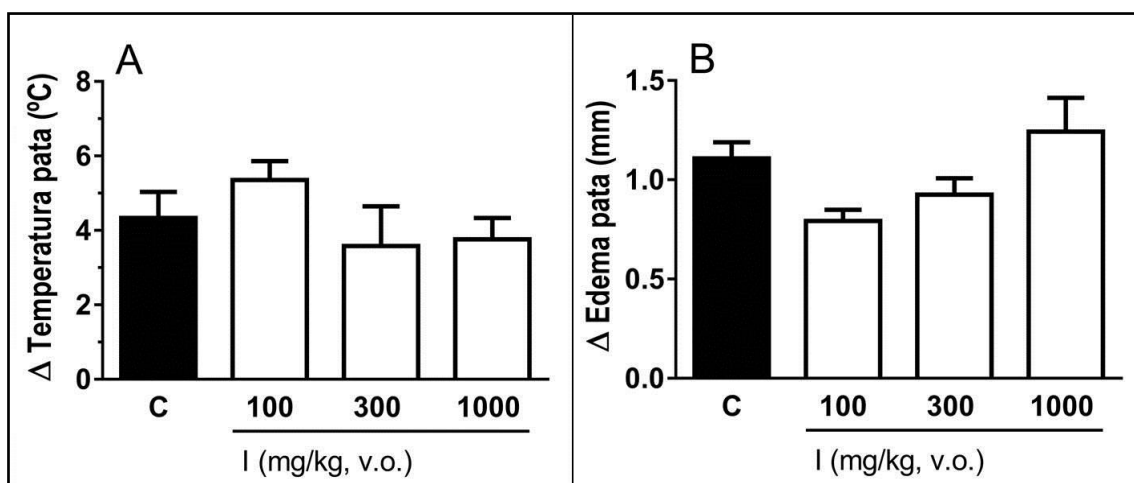


Fig 5.9: Resultados de la I de *B. ruscifolia* administrada por vía oral en relación a la inhibición de temperatura (Fig. 5.9 A) y a la inhibición de formación de edema (Fig. 5.9 B) en la pata trasera inyectada con formalina. Cada grupo representa la media de 8 animales.

Por último, el EE causó una reducción significativa en ambas fases del dolor inducido por la inyección i.pl. de formalina. A la máxima dosis evaluada (300 mg/kg) este extracto mostró una inhibición del $35 \pm 3\%$ para la fase 1, significativamente diferente al control, presentando una inhibición en la fase neurogénica, la cual se debe a la activación directa de los nociceptores, respuesta que es inhibida por Morf, tal como puede observarse en la Fig. 5.10 A. En la fase 2, el EE mostró una inhibición del $63 \pm 2\%$, a la dosis de 300 mg/kg (Fig. 5.10 B), no presentando diferencia significativa con el % de inhibición del control positivo Asp a una dosis de 400 mg/kg. Por ende, se podría inferir que el EE demostró el mismo % de inhibición que Asp, pero a una dosis menor. Este extracto no demostró una inhibición en la temperatura y en la formación de edema de la pata inyectada con formalina, al comparar con el control (Fig. 5.11).

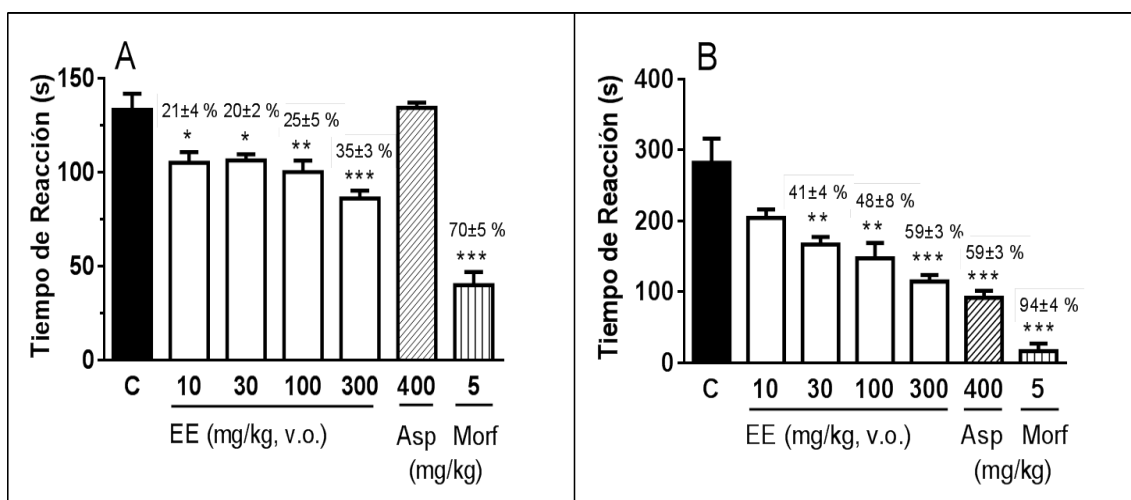


Fig 5.10: Efecto del EE de *B. ruscifolia* administrado por vía oral en relación a la primera (Fig. 5.10 A) y la segunda (Fig. 5.10 B) fase del dolor inducido por formalina. Cada grupo representa la media de 8 animales. Los resultados fueron analizados con ANOVA de una vía seguido del test de Tukey, se expresaron como la media±error estándar. * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$ vs. Control (C).

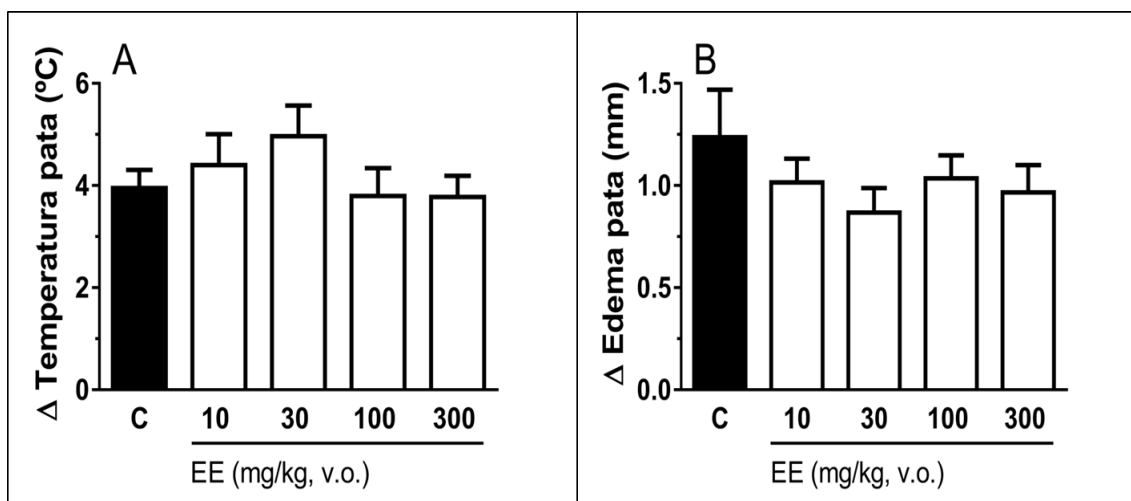


Fig 5.11: Resultados del EE de *B. ruscifolia* administrado por vía oral en relación a la inhibición de temperatura (Fig. 5.11 A) y a la inhibición de formación de edema (Fig. 5.11 B) en la pata trasera inyectada con formalina. Cada grupo representa la media de 8 animales.

De este modo, los resultados indican que el EE de *B. ruscifolia*, es el extracto que presenta el mayor efecto antinociceptivo de todos los extractos evaluados en esta especie, tanto inhibiendo el dolor neurogénico como el inflamatorio.

5.4.3. Efecto de extractos acuosos de otras especies vegetales en la nocicepción inducida por formalina

Si bien se profundizó en el estudio de la actividad antinociceptiva de los extractos de *B. ruscifolia*, otros extractos acuosos, obtenidos de especies nativas que son empleadas popularmente como analgésicas y antiinflamatorias

en la medicina tradicional, formaron parte del estudio a realizar en esta tesis doctoral. Se determinó la actividad antinociceptiva de la I y la D de *A. odorata* (raíz), *J. rhombifolia* (hojas y corteza, en forma separada), *M. malvifolium* (hojas y tallos), *S. bonariensis* (raíz y hojas) y *S. fasciculata* (hojas), a una sola dosis (300 mg/Kg), en el ensayo de formalina. Los resultados obtenidos (Tabla 5.1), mostraron diferentes porcentajes de inhibición en ambas fases por parte de los extractos acuosos evaluados, que fueron desde un 12,5 hasta 51% en la 1° fase (dolor neurogénico) y desde el 20 al 56 %, en la 2° fase (dolor inflamatorio). Así, se destaca la actividad presentada por la decocción de *A. odorata* (2° Fase: 56±5 %), la I de corteza de *J. rhombifolia* (2° fase: 50±4%) y la D de *S. bonaerensis* (1° Fase: 51±5% y 2° Fase: 51±9%), que mostraron porcentajes de inhibición en una o ambas fases, a la dosis evaluadas. Si bien estos resultados surgen de una evaluación preliminar de distintos extractos frente a la actividad evaluada, muestran la potencialidad que podrían tener los mismos en la continuidad de sus estudios. Nuevas investigaciones deberán ser realizadas sobre estos extractos, con el objetivo de confirmar los resultados obtenidos en este ensayo.

Tabla 5.1: Resultados del efecto de los extractos acuosos de especies vegetales administrados por vía oral, en relación a la primera y la segunda fase del dolor inducido por formalina, a una dosis de 300 mg/kg. Cada grupo representa la media de 8 animales.

Tratamiento	Fase 1 (% inhibición)	Fase 2 (% inhibición)
Control	0	0
Infusión de <i>A. odorata</i> (Tasi)	27±3	35±6
Decocción de <i>A. odorata</i> (Tasi)	47±4	56±5
Infusión de <i>S. fasciculata</i> (Moradillo)	32±3	44±8
Decocción de <i>S. fasciculata</i> (Moradillo)	42±4	46±7
Infusión de <i>J. rhombifolia</i> (Sombra de Toro, Corteza)	27±2	50±4
Decocción de <i>J. rhombifolia</i> (Sombra de Toro, Corteza)	38±4	49±3
Infusión de <i>S. bonariensis</i> (Malvavisco)	33±5	46±4
Decocción de <i>S. bonariensis</i> (Malvavisco)	51±5	51±9
Infusión de <i>J. rhombifolia</i> (Sombra de Toro, Hojas)	0	20±5
Decocción de <i>J. rhombifolia</i> (Sombra de Toro, Hojas)	0	20±5
Infusión de <i>M. malvifolium</i> (Malva)	12±5	30±6
Decocción de <i>M. malvifolium</i> (Malva)	12±5	0

- % de inhibición de: Aspirina (400 mg/kg, v.o.), Fase 1: inhibición nula, Fase 2: 66±4 %.
Morfina (5 mg/kg, vía i.p.), Fase 1: 76±4 %, Fase 2: 90±2 %.

5.5. Conclusiones Parciales

Se analizó el efecto antinociceptivo, dependiente de la dosis, de los distintos extractos acuosos y alcohólico de *B. ruscifolia*, utilizando dos modelos *in vivo* de nocicepción. El efecto de los extractos se comparó con los fármacos de referencia Morf y Asp.

Con respecto a la prueba de retorcimiento inducida por ácido acético se demostró una disminución en el número de contorsiones realizadas por ratones tratados con distintas concentraciones de los extractos, siendo el EE, el que demostró mayor actividad antinociceptiva.

En relación al test de formalina, la I y el EE disminuyeron significativamente el número de lamidas, mordeduras y sacudidas de la pata trasera derecha del animal, inducidas por la formalina, tanto en la fase neurogénica como en la fase inflamatoria del estudio, mientras que la D solo inhibió en la fase 2 del experimento. De todos ellos, el EE fue el más potente ya que su % de inhibición fue mayor a una dosis menor (300 mg/kg), en comparación con las dosis activas de los extractos acuosos (1000 mg/kg), infiriendo así, que éste es el extracto que presenta una mayor actividad analgésica.

Estos resultados *in vivo*, sumados a los obtenidos en líneas celulares, respaldan la continuidad en el estudio de esta especie, focalizando la investigación en su composición química con el objetivo de dar con el/los metabolitos que producen el efecto observado, así también plantear el estudio de probables mecanismos de actividad biológica que puedan relacionar la actividad nociceptiva y antiinflamatoria observada, tanto en líneas celulares como en los ensayos *in vivo*.

Cabe destacar que otros extractos acuosos de especies nativas empleadas en medicina tradicional (*A. odorata*, *S. bonariensis* y *J. rhombifolia*), que fueron involucradas en el estudio de esta tesis doctoral, mostraron eficacia en cuanto a su efecto antinociceptivo. Estudios posteriores deberán ser realizados para profundizar los estudios químicos y de actividad biológica de las especies mencionadas.

CAPÍTULO 6:

ANÁLISIS QUÍMICO DE

DE LA ESPECIE

Berberis ruscifolia

6.1. Introducción

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos hasta el momento, sobre los ensayos biológicos realizados en extractos de la especie *B. ruscifolia*, y sabiendo que hasta el momento no hay reportes sobre su composición química, se decidió profundizar los estudios fitoquímicos, con el fin de identificar el o los compuestos químicos que puedan tener participación en la acción biológica demostrada por los extractos y posteriormente, evaluar su actividad, mediante los mismos ensayos realizados a los extractos en líneas celulares e *in vivo*.

Existen estudios fitoquímicos sobre otras especies del género *Berberis*, donde se ha demostrado la presencia de flavonoides, taninos y alcaloides (Upwar y col., 2010), metabolitos secundarios con probadas actividades biológicas y beneficios para la salud (Nunes y col., 2014, Prasain y col., 2010). Una de las características más notables sobre el género *Berberis*, es la presencia de alcaloides isoquinolínicos, los cuales derivan biogenéticamente del amino-ácido tirosina, con estructuras novedosas como berbinas, aporfinas, bencilisoquinolinas, proaporfinas, protopinas, (bis) benciltetrahydroisoquinolinas y dimeros (bis) bencilisoquinolínicos, entre otros, los cuales presentan un amplio rango de acción farmacológica, motivo por el cual varias especies pertenecientes a este género son utilizadas en la medicina tradicional (Moreno-Murillo y col., 1995).

Los alcaloides tienen dos cualidades adicionales: poseen estructuras moleculares complejas y actividad farmacológica importante. Muchos ejemplos de alcaloides conocidos y de aplicación farmacológica pueden ser mencionados, entre ellos, la colchicina, la atropina, la quinina y la morfina, en algunos casos con usos restringidos por su potente actividad biológica. Considerando esto, decidimos enfocarnos en investigar la presencia de alcaloides isoquinolínicos, de los cuales berberina (Berb) es uno de los representantes que ha sido informado en numerosas especies del género *Berberis* como: *Berberis aristata* DC, *Berberis vulgaris* L., *Berberis petiolaris* Wall. ex G. Don, *Berberis buxifolia* Lam, *Berberis darwinii* Hook, *Berberis heterophylla* Juss, *Berberis ilicifolia* Forst, *Berberis linearifolia* Phil, *Berberis lycium* Royle, *Berberis microphylla* Forst, *Berberis nervosa* Pursh, *Berberis serrata* Koehne y *Berberis trifoliata* Moric (Imanshahidi y Hosseinzadeh, 2008).

A su vez, en los últimos años, Berb ha despertado interés para ser estudiada, debido los notables efectos farmacológicos demostrados: como antimicrobiana (Amin y col., 1969), antiviral (Hayashi y col., 2007), antidiarreica (Takase y col., 1993), anticancerígena (Diogo y col., 2011), hipolipidémica (He y col., 2016), antidiabética (Geng y col. 2016; Pirillo y Catapano, 2015) y antiinflamatoria (Kuo y col., 2004, Yeşilada y Küpeli, 2002). Estas propiedades farmacológicas, específicamente la última, nos ha llevado a profundizar el estudio de la búsqueda de este alcaloide en los extractos de *B. ruscifolia*.

6.2. Objetivos

Indagar sobre el contenido cuali y cuantitativo de alcaloides isoquinolínicos presentes en la I, la D y el EE de *B. ruscifolia*, focalizando sobre

la presencia de Berb en los mismos, mediante el empleo de las técnicas de cromatografía líquida de alta resolución y espectrometría de masas.

6.3. Metodología

6.3.1. *Identificación del alcaloide berberina en los extractos de Berberis ruscifolia por cromatografía líquida de alta resolución y espectrometría de masas*

Con el objetivo de identificar la presencia de alcaloides isoquinolínicos, focalizando en la búsqueda de Berb, en los extractos obtenidos para la especie *B. ruscifolia*, se desarrolló un análisis cualitativo mediante el uso de cromatografía líquida de alta resolución (del inglés HPLC: High Performance Liquid Chromatography) con detector Ultravioleta-Visible (UV-Vis) con arreglo de diodos (DAD) y asociada a un espectrómetro de masas de alta resolución (del inglés HRMS: High Resolution Mass Spectrometer).

Se utilizó un cromatógrafo Agilent Technologies (1200 series, EEUU), equipado con una bomba de gradiente (Agilent G1312B SL Binary), un desgasificador de solventes (Agilent G1379 B) y un inyector automático (Agilent G1367 D SL + WP). El sistema de HPLC está conectado a un detector DAD (Agilent G1315 C Satarlight), el cual está acoplado a un espectrómetro de masa-masa (MS-MS, serie micrOTOF-Q11, Bruker), con una fuente de ionización por electro spray (del inglés ESI: Electron Spray Ionization) y un analizador de triple cuadrupolo y tiempo de vuelo (del inglés QTOF: Quadupole Time of Fly). Para la separación cromatográfica, se utilizó una columna HPLC de fase reversa, (C18-Microsorb MV-100-5: 250 x 4,6 mm, Agilent, Holanda), mantenida a 25 °C.

Los parámetros empleados para realizar la identificación de Berb en cada extracto, fueron el tiempo de retención (t_R) del cromatograma y su patrón de fragmentación, comparándolos con los obtenidos para el compuesto de referencia, Berb (Merck, grado de pureza 94 %) (Wang y col., 2017). Las condiciones cromatográficas fueron seleccionadas acorde a reportes bibliográficos (Wang y col., 2017), con algunas modificaciones.

La fase móvil (FM) estuvo compuesta por dos soluciones: ácido fórmico 0,1% (ajustado a pH 4,5 con acetato de amonio) (A) y Acetonitrilo (AcN)- ácido fórmico 0,1% (B). El gradiente de elución fue de un flujo constante de 0,4 ml/min (se muestra en la Fig. 6.1), el volumen de inyección fue de 5 μ l, los espectros UV-Vis se registraron de 200 a 600 nm. Después de la separación cromatográfica, el eluyente se introdujo en el espectrómetro de masas a través de una fuente de iones de ionización por electropulverización (ESI), el detector DAD se utilizó a 269 y 346 nm. Los espectros de masas se registraron en modo de ionización positiva para la detección de Berb, utilizando una relación masa/carga (m/z) 50 a 1000. Las condiciones de trabajo para la fuente de ionización fueron las siguientes: voltaje capilar 4,5 KV; nebulizador de presión de gas 4,0 bares; velocidad del flujo de gas de secado 8,0 l/min y temperatura del gas de secado 180 °C. Se utilizaron nitrógeno y argón como nebulizador y gases de colisión, respectivamente. Los datos se obtuvieron usando exploración simultánea a una energía de colisión de 15 eV. La adquisición y el

procesamiento de datos se realizaron utilizando el software Compass Version 3.1 y Data Analysis Version 4.1, respectivamente (Bruker Daltonics GmbH, EEUU).

Gradiente de elución	
Tiempo (min)	%B
0	0
15	20
25	50
40	70
41	90
48	20

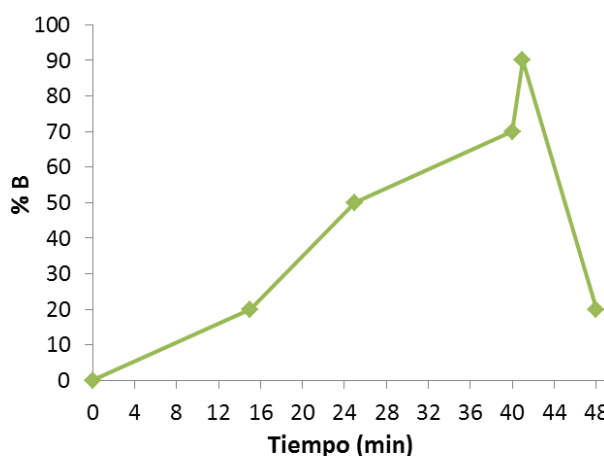


Figura 6.1. Gradiente de fase móvil utilizada en el análisis por HLPC-DAD-ESI-QTOF, expresado como porcentaje de fase móvil B (AcN- ácido fórmico 0,1 %) en el tiempo.

Los extractos acuosos y Berb, fueron disueltos con los solventes de la FM A-B (80/20, v/v), mientras que el extracto etanólico, se disolvió con 50% de metanol y 50% de solución A. Todos los solventes utilizados fueron de grado HPLC (Sintorgan).

La concentración de la I y la D de *B. ruscifolia* fue de 18 mg/ml, la del extracto etanólico fue de 9 mg/ml y la de Berb fue de 5 µg/ml. Las muestras se filtraron a través de una membrana de 0,22 µm antes de la inyección (sistema de micro-filtración).

6.3.2. *Cuantificación del alcaloide berberina en los extractos de Berberis ruscifolia por cromatografía líquida de alta resolución*

Los análisis cuantitativos se realizaron utilizando un cromatógrafo Varian Pro Star (modelo 210, 04171 serie, EEUU), equipado con un detector ultravioleta-visible (UV-Vis). El detector UV-Vis se fijó a 346 nm. El volumen de inyección manual fue de 25 µl. El análisis de los datos se realizó mediante el software Star Chromatography Workstation 6.41 (Varian, EEUU). La columna y las condiciones de la FM, fueron exactamente las mismas que las empleadas en el ensayo cualitativo, descrito en el punto 6.3.1.

La identificación de Berb en cada extracto, fue realizada por comparación del t_R obtenido en cada uno de ellos, en las condiciones cromatográficas realizadas, con el testigo de Berb (Merck). Esta solución testigo, fue preparada a una concentración de 5 µg/ml, disuelta en la FM (80/20, v/v). Los valores de t_R de Berb se expresaron como la media ± error estándar de tres inyecciones para cada muestra (Berb, I, D y EE).

La cuantificación se realizó por el método de calibración externa, empleando Berb como estándar (94-96% pureza según HPLC). Para ello, se prepararon tres soluciones stock de 5 µg/ml de Berb, disuelta en la FM A-B (80/20, v/v), y a partir de cada una de ellas, se realizó una curva de calibración, en días consecutivos. Las concentraciones de Berb para la curva de calibración fueron de: 12,5; 25; 50; 75 y 100 µg/ml. La I y D fueron preparadas a la concentración de 10 mg/ml, y disueltas en la FM A-B (80/20, v/v), mientras que EE se preparó a una concentración de 2,5 mg/ml, empleando 50% de metanol y 50% de FM A. Todas las soluciones obtenidas (Berb, I, D y EE) fueron filtradas utilizando membrana de 0,22 µm antes de la inyección (sistema de micro-filtración) y almacenadas a -20 °C, en oscuridad. Los solventes empleados fueron de grado HPLC (Sintorgan). Los resultados del contenido de Berb, son expresados como mg de Berb/gramo de extracto evaluado.

6.4. Análisis estadísticos

Ver sección 4.3.6

6.5. Resultados y Discusión

6.5.1. Identificación de Berberina en los extractos de *Berberis ruscifolia*

Mediante metodología HPLC-DAD-ESI-QTOF con detección UV (346 nm) y MS (en el modo de ionización positiva) y empleando testigo de Berb (Fig. 6.2), se detectó su presencia en los tres extractos evaluados, obtenidos de la especie *B. ruscifolia*. El cromatograma de Berb testigo (Fig. 6.3 A.) muestra un t_R de $28,7 \pm 0,2$ min para la Berb. Su espectro de masas (EM, Fig 6.3 B) muestra la fragmentación característica para este compuesto: un ion molecular ($[M]^+$) de relación masa/carga (m/z) de 336,1301 y a su vez, el ion $[M]^+$ mostró fragmentos en m/z 337,1322; m/z 321,1050; m/z 320,6909 y m/z 292,1028; que son coincidentes con bibliografía, cuyas vías de fragmentación propuestas para Berb se muestran en la Fig. 6.4. (Wang y col., 2017).

En la Fig. 6.5 A, C y E se muestran los cromatogramas de I, D y EE, respectivamente. Analizándolos, se observa la presencia de un pico correspondiente a un t_R de 28,7 min en los tres extractos evaluados. Posteriormente, al analizar la fragmentación del EM del pico a 28,7 min, presente en cada extracto, se observa un m/z 336,13, coincidente al $[M]^+$ y tres fragmentos en m/z 337,1322; m/z 321,1050; m/z 320,6909 y m/z 292,1028 (Fig. 6.5 B, D y F).

Teniendo en cuenta el t_R obtenido en el cromatograma y los fragmentos de masas para cada uno de estos picos presentes en la I, la D y el EE, podemos confirmar la presencia de Berb en los tres extractos analizados, ya que tanto el t_R , el $[M]^+$ con los fragmentos del espectro de masas, coinciden con los obtenidos con el testigo.

Del análisis de los cromatogramas de cada extracto, y teniendo en cuenta las concentraciones de cada extracto, resulta llamativo observar que en el perfil cromatográfico de EE, la presencia de Berb es mayoritaria en relación a otros picos que presenta este extracto, mientras que en el perfil observado para

la I y la D, es similar y no tan preponderante como para EE. De ese modo se decidió cuantificar el contenido de Berb, en cada uno de ellos.

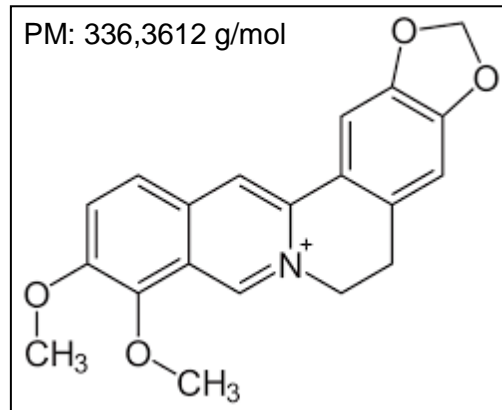


Fig. 6.2: Estructura química de Berberina con su peso molecular.

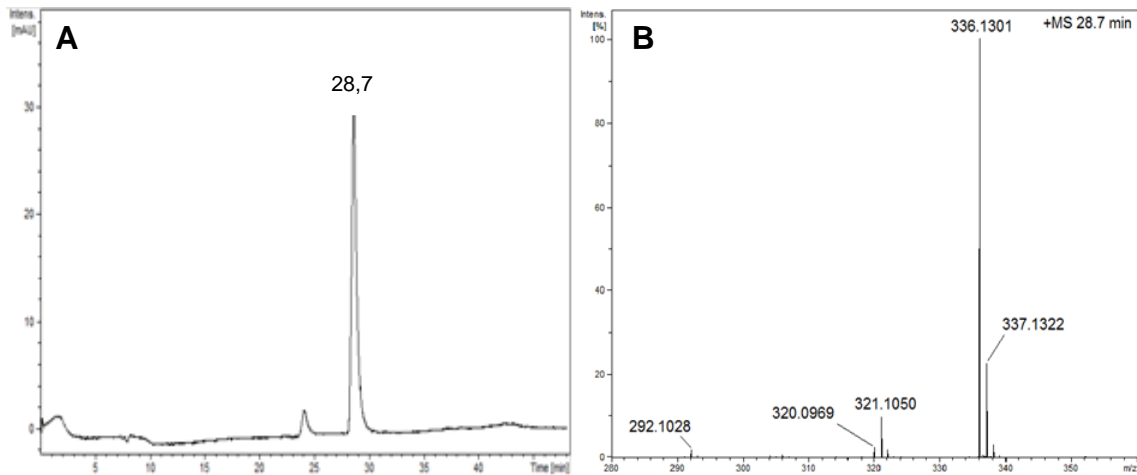


Fig.6.3: Cromatograma de berberina testigo, a 346 nm ($28,7 \pm 0,2$ min, 5ppm) (Fig. 6.3. A) y su patrón de fragmentación por espectro de masas (Fig. 6.3 B).

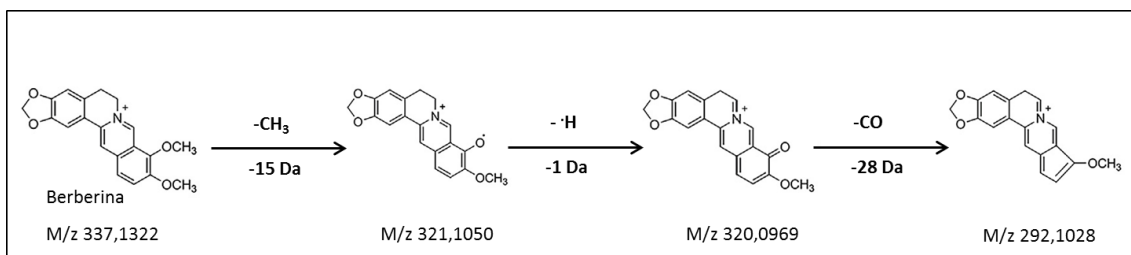


Fig. 6.4: Fragmentación de berberina (Tomado de Wang y col., 2017)

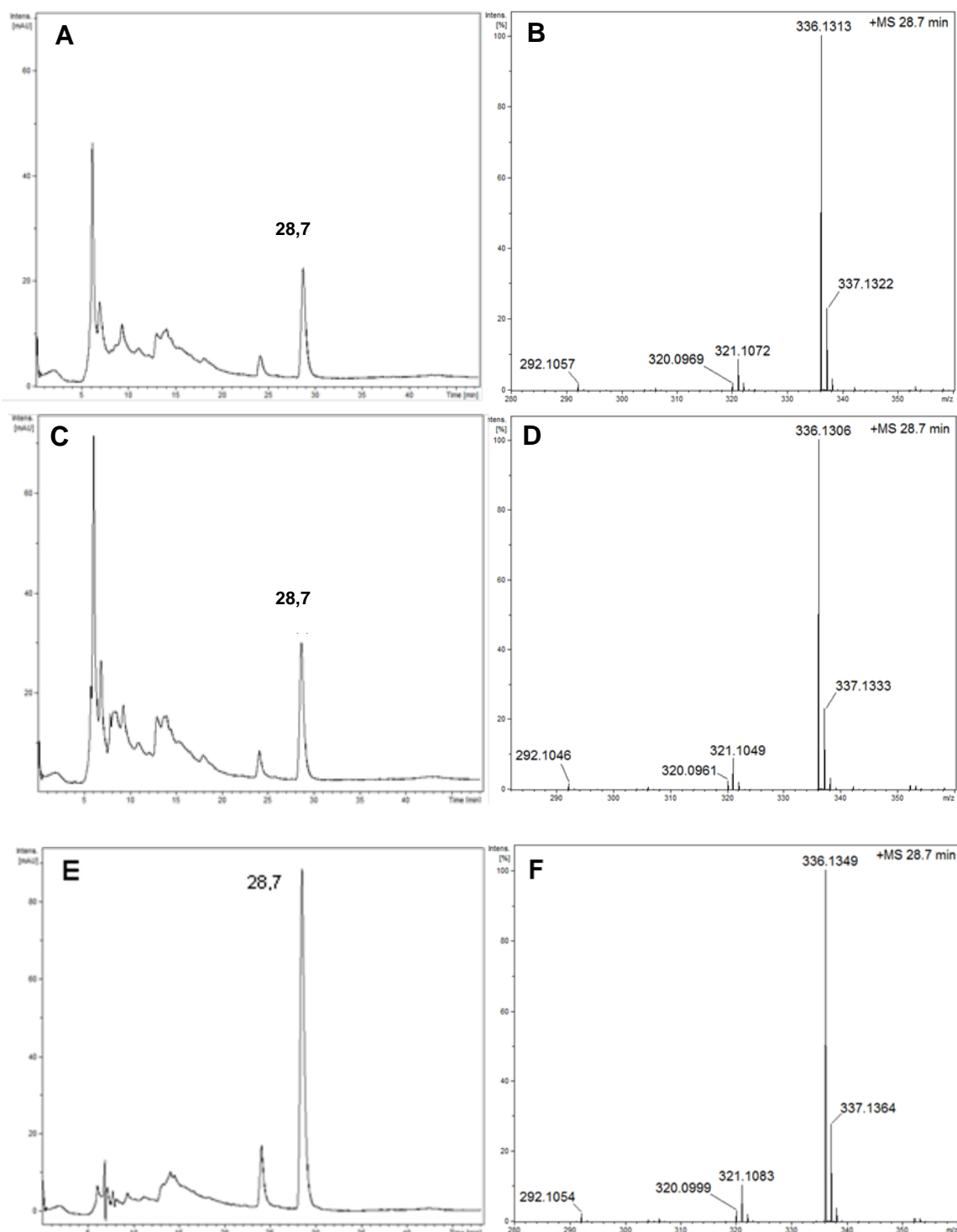


Fig. 6.5: Identificación de berberina en los diferentes extractos de *B. ruscifolia*. Cromatograma (Fig 6.5: A, C y E) y patrón de ruptura (Fig 6.5: B, D y F) del pico a 28,7 min en la Infusión (A y B), Decocción (C y D) y Extracto Etanólico (E y F). $\lambda=346$ nm. Concentración utilizada: 18 mg/ml para la I y la D y 9 mg/ml para el EE.

6.5.2. *Cuantificación de berberina en los extractos de Berberis ruscifolia*

Berb fue identificada y cuantificada en los tres extractos evaluados. Los t_R de Berb y su contenido en la D, la I y el EE, fueron expresados en min y como mg de Berb por gramo de extracto, respectivamente (Tabla 6.1). Todos los ensayos fueron realizados por triplicado.

El contenido cuantitativo, calculado a partir de la ecuación de regresión lineal $y=1494340 \cdot X+7759490$, obtenida de la curva de calibración de Berb, que mostró un rango lineal de concentración dentro de 12,5 $\mu\text{g/ml}$ a 100 $\mu\text{g/ml}$ con un coeficiente de correlación de 0,996, permitió mostrar que el EE presenta el mayor contenido de berberina, comparado al contenido cuantificado para I y D.

Tabla 6.1: Datos sobre el tiempo de retención de Berb en cada extracto con su desviación estándar correspondiente.

Muestra analizada	t_R (min)
Berberina	28,7 \pm 0,2
D	28,7 \pm 0,3
I	28,7 \pm 0,4
EE	28,7 \pm 0,2

EE presenta un contenido de Berb 10 veces mayor (21 \pm 1 mg/g de extracto evaluado), en relación al contenido encontrado para la I y la D, que a la vez son semejantes entre sí (1,9 \pm 0,1 y 2,27 \pm 0,02 mg/g de extracto evaluado, respectivamente) (Tabla 6.2). Este resultado nos permite seleccionar al EE, como el mejor extracto a la hora de continuar los estudios posteriores de ensayos farmacológicos.

Tabla 6.2: Contenido de berberina expresada en mg/g de extracto. Análisis estadístico: una vía ANOVA-tukey, *** $p < 0,001$, D, I vs.EE

Extracto de <i>B. ruscifolia</i>	Concentración de Berberina, mg/g de extracto
D	1,9 \pm 0,1
I	2,27 \pm 0,02
EE	21 \pm 1***

6.6. Conclusiones Parciales

El análisis químico de los tres extractos de la especie *B. ruscifolia*, mostró la presencia de Berb en los mismos, siendo el metabolito preponderante en el extracto etanólico. A su vez, su contenido demostró ser el 2% del EE, mientras que, en los I y D, la Berb está presente en un 0,2%. Es de destacar, que estos resultados aportan importantes conocimientos no reportados hasta el momento, en relación a la composición química de extractos de *B. ruscifolia*.

Por otro lado, estos resultados sugieren que Berb puede tener participación en las actividades biológicas evaluadas, tanto en los ensayos de línea celular como en los modelos *in vivo* de nocicepción estudiados, siendo el EE el más activo, y el que posee Berb como el metabolito secundario principal o en mayor concentración. Por todos estos antecedentes, Berb será evaluada mediante los mismos ensayos que se realizaron con los extractos.

CAPÍTULO 7:

*EVALUACIÓN DEL EFECTO DE BERBERINA
SOBRE LA INHIBICIÓN
DEL OXÍDO NÍTRICO Y DE LA DE LA
EXPRESIÓN PROTEICA ÓXIDO
NÍTRICO SINTASA INDUCIBLE, EN LÍNEAS
CELULARES*

7.1. Introducción

Dado que nuestros resultados obtenidos hasta el momento, identificaron a Berb en los extractos de *B. ruscifolia*, es de relevancia correlacionar si su presencia tiene implicancia en los ensayos biológicos estudiados en el presente trabajo. Así, decidimos centrar nuestro estudio de actividad biológica sobre este alcaloide. Berb, representa uno de los alcaloides de protoberberina naturales más estudiados (Mazzini y col., 2003), se han descrito diversos efectos farmacológicos y terapéuticos beneficiosos para la salud, incluidos los efectos antiinflamatorios.

Numerosos estudios relacionados al efecto antiinflamatorio de Berb, han sido realizados, en diferentes líneas celulares. Existen trabajos que demuestran dicho efecto, al modular las vías del factor nuclear kappa B (NF- κ B) en línea celular de macrófagos RAW264, la cual es responsable de la producción de mediadores de la inflamación, activando la vía de señalización de las MAPK a nivel transcripcional (Pandey y col., 2008; Rebholz y col., 2008).

Asimismo, en otro trabajo de investigación, empleando líneas celulares de queratinocitos humanos (HaCaT) y células de monocitos humanos (THP-1), demostraron que el tratamiento con Berb disminuyó significativamente la IL-6, la cual es una citocina proinflamatoria que participa en el proceso inflamatorio (Lang y col., 2017).

Kuo y colaboradores (2004) demostraron que en la línea celular de cáncer oral de células OC2 y KB, el tratamiento con Berb redujo la producción de prostaglandina E2 (PGE₂) de forma dependiente de la dosis, expresada endógenamente e inducida por 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA, 10 nM). Este efecto inducido por la Berb, se produjo como resultado de la reducción específica de la enzima COX-2, mediante la inhibición de unión al ADN de la proteína activadora 1 (AP-1), la cual es un factor de transcripción clave en la inflamación y la carcinogénesis (Kuo y col., 2004; Li y col., 2014). Estos resultados sugieren que Berb probablemente causará menos efectos secundarios, como la irritación del revestimiento del estómago y los efectos tóxicos en el riñón, efectos que suelen observarse para aquellos inhibidores de la enzima COX-1, durante el uso de antiinflamatorios a largo plazo.

Basándonos en la información que se tiene hasta el momento sobre este alcaloide y teniendo en cuenta nuestros resultados, consideramos de relevancia el profundizar el estudio de Berb, en los modelos de líneas celulares.

Se decidió evaluar la inhibición del NO y la expresión de la enzima iNOS, para confirmar que Berb es uno de los metabolitos secundarios que participa de la actividad biológica antiinflamatoria que demostró el EE de *B. ruscifolia* en las líneas celulares derivadas de macrófagos J774A.1.

7.2. Objetivos

- ✓ Evaluar parámetros relacionados con el estudio de inhibición de NO. Para ello se plantean los siguientes ensayos:
- Determinar la MCNC de Berb sobre las líneas celulares derivadas de macrófagos J774A.1

- Medir la inhibición de Berb sobre la producción de NO estimulado por el LPS.
- Determinar la inhibición de Berb sobre la expresión proteica de la iNOS mediante la técnica de Western Blot.

7.3. Metodología

7.3.1. Ensayos en Líneas celulares derivadas de Macrófago J774A.1

Para el estudio de la inhibición del NO y de la expresión proteica de la iNOS por parte de Berb, se emplearon las mismas líneas celulares que las utilizadas en los experimentos anteriores y se trabajó bajo las mismas condiciones (ver sección 4.3.1).

7.3.2. Preparación de la solución de berberina

Se partió de una solución madre de 0,5 mg/ml de Berb, la cual se disolvió en el medio DMEM y se agregó 1% de DMSO para disolver. A partir de esta solución se obtuvieron las diferentes concentraciones de Berb mediante dilución con medio DMEM, para luego utilizarlas en los experimentos. Cada solución madre se preparó el mismo día de llevar a cabo el experimento.

7.3.3. Determinación de la viabilidad celular en presencia de berberina

Las condiciones de trabajo para este experimento y la evaluación de la viabilidad celular en presencia de Berb, fueron similares a las informadas anteriormente (Sección 4.3.3). Se probaron distintas concentraciones de Berb (0,78; 1,56; 3,12; 6,25; 12,5; 25 y 50 µg/ml), obtenidas mediante diluciones seriadas uno en dos (1/2).

7.3.4. Evaluación de la inhibición de la producción de óxido nítrico

Las condiciones experimentales y la evaluación de la inhibición de NO por parte de Berb, fueron similares a las informadas anteriormente (Sección 4.3.4). Se probaron diferentes concentraciones de Berb, menores a su MCNC.

7.3.5. Evaluación de la inhibición de la expresión proteica de la óxido nítrico sintasa inducible

La determinación del nivel de expresión de la enzima iNOS se realizó acorde a lo informado en el capítulo 4 (Sección 4.3.6.). Berb fue evaluada a su MCNC y a su CI₅₀.

6.3.6. Análisis estadístico

Ver Sección 4.3.6.

7.4. Resultados y Discusión

7.4.1. Determinación de la Máxima Concentración No Citotóxica e inhibición del óxido nítrico por parte de berberina en líneas celulares

La MCNC de Berb fue determinada mediante la técnica indirecta de MTT, mostrando un valor de $1,50 \pm 0,01$ $\mu\text{g/ml}$. Posteriormente, se evaluó su capacidad de inhibir la producción de NO, en línea celular derivada de macrófagos J774A.1, estimuladas con LPS, a su MCNC, mostrando una inhibición del $97 \pm 3\%$ (Quercetina, $95 \pm 1\%$ a 10 $\mu\text{g/ml}$). Así, se estimó su CI_{50} , con interesantes resultados que demostraron que Berb suprimió significativamente la producción de NO inducida por LPS, de una manera dependiente de la concentración (Fig. 7.1), con un valor de CI_{50} de $0,42 \pm 0,06$ $\mu\text{g/ml}$. Teniendo en cuenta los valores de las CI_{50} estimadas, tanto para los extractos (D, I y EE) como para Berb, se destaca la relevante actividad que manifiesta Berb, confirmando su participación en la inhibición de NO estimulado por LPS, que fue observado en I, D y EE, obtenidos de *B. ruscifolia*. Es destacable que, de los tres extractos, el EE fue el que demostró una mayor actividad en la inhibición del NO estimulado con LPS, resultado que se relaciona con el mayor contenido de Berb comparado con los extractos acuosos.

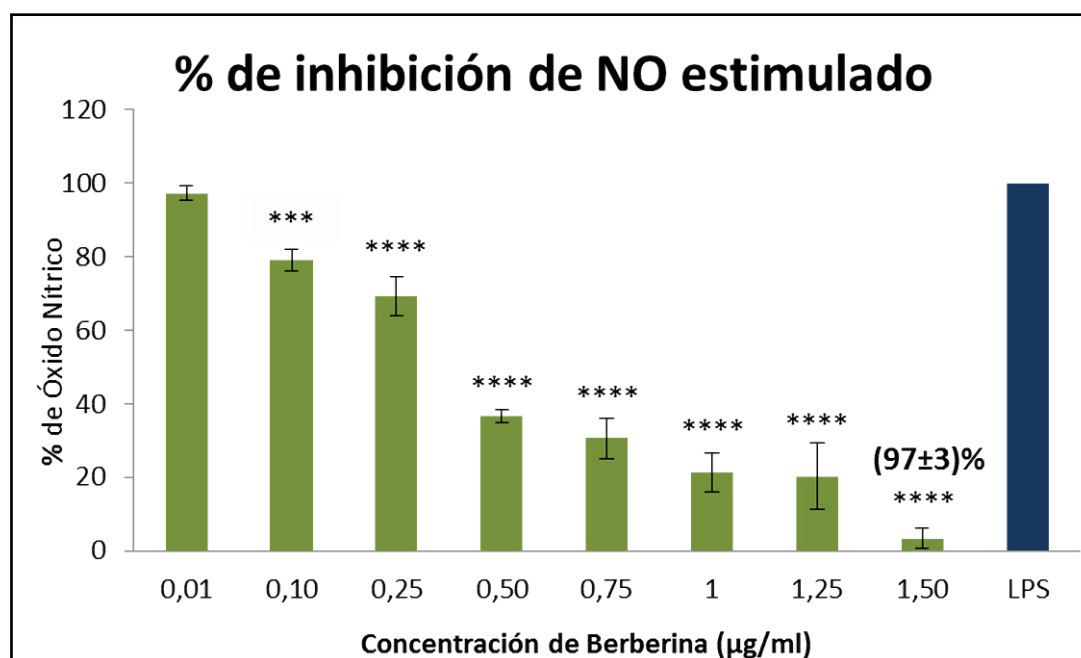


Fig. 7.1: Efecto del alcaloide berberina sobre la inhibición de producción de óxido nítrico estimulado por LPS, en líneas celulares de macrófagos. Los resultados fueron analizados con ANOVA de una vía seguido del test de Tukey, se expresaron como la media \pm error estándar, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ vs. Control (LPS).

7.4.2. Efecto de berberina sobre la inhibición de la expresión proteica de la óxido nítrico sintasa inducible

Dado que Berb inhibe la producción de NO inducida por LPS, de una manera dependiente de la concentración, se decidió evaluar su influencia en la expresión de la iNOS, usando transferencia Western Blot. Para este ensayo, se evaluaron dos concentraciones: la MCNC (1,5 $\mu\text{g/ml}$) y la CI_{50} (0,42 $\mu\text{g/ml}$). Como se muestra en la Fig. 7.2 A, el tratamiento con Berb, a las dos concentraciones evaluadas, inhibió completamente la expresión de iNOS inducida por LPS, comparados con el control. La densidad de las bandas correspondientes a la proteína iNOS (Fig. 7.2 B) es menor para las concentraciones de Berb, comparada con la densidad de la banda del LPS. Como se demuestra en la Fig. 7.2, los dos tratamientos con Berb inhibieron la expresión de la enzima iNOS al valor del control, ya que mediante el análisis estadístico obtenido al escanear las bandas demuestra que los valores obtenidos de las dos concentraciones de Berb no presentaron diferencia significativa, con el valor del control.

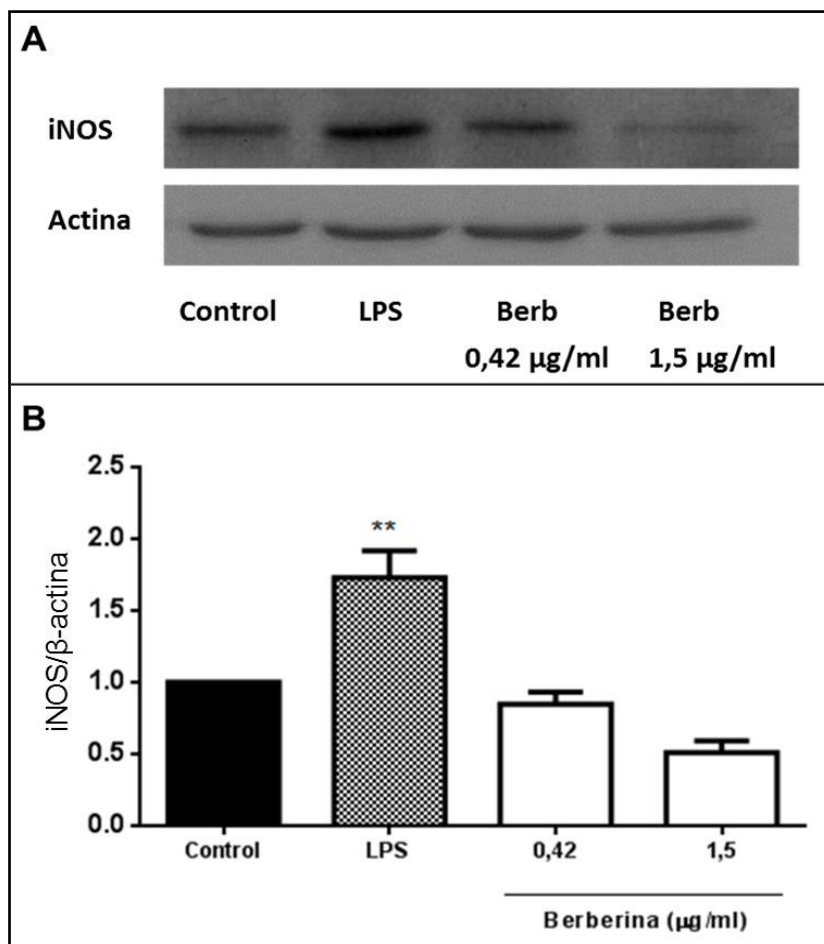


Fig. 7.2: Efecto del alcaloide berberina sobre la expresión de la enzima iNOS en macrófagos estimulados con LPS. A: Bandas de las proteínas iNOS y β -actina que se detectaron por Western blot. B: Análisis densitométrico de las bandas observadas por Western blot. Los resultados fueron analizados con ANOVA de una vía seguido del test de Tukey, se expresaron como la media \pm error estándar. ** $p < 0,01$ vs. LPS.

Existen evidencias que Berb inhibe la producción de NO y la expresión proteica de la iNOS, en otra línea celular derivada de macrófagos RAW 264.7 (Shin y col., 2016). No obstante, las concentraciones ensayadas para Berb, en dicha línea celular, que fueron similares a la MCNC y CI_{50} usadas en este trabajo, no lograron disminuir los niveles de expresión proteica de iNOS a los niveles basales de control, como observamos en nuestro estudio. Estos resultados denotan una diferencia en la sensibilidad de Berb sobre estas líneas celulares, que justifican el empleo de diferentes líneas que permitan corroborar la capacidad de Berb para inhibir la producción de un mediador relacionado a eventos inflamatorios como es el NO.

En resumen, los resultados obtenidos de Berb, sugieren que la capacidad antiinflamatoria de este alcaloide está mediada en parte por su capacidad de regular negativamente la producción de NO, relacionado con la inhibición de la expresión proteica de la iNOS.

7.5. Conclusiones Parciales

En este estudio, el aumento en los niveles de NO y la expresión proteica de la iNOS, inducidas por el LPS, fueron reducidas significativamente por el pre tratamiento con Berb.

Estos resultados coinciden con los obtenidos para el EE en relación a la inhibición del NO, implicando a Berb como uno de los compuesto que participa de la actividad demostrada por el extracto etanólico en su efecto antiinflamatorio.

Teniendo en cuenta que los resultados en líneas celulares obtenidos de Berb se relacionan con los obtenidos para los extractos de *B. ruscifolia*, se decidió continuar con la misma metodología y evaluar si Berb presenta efecto antinociceptivo como el demostrado por los diferentes extractos de *B. ruscifolia* en el capítulo 5.

CAPÍTULO 8

*EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD
ANTINOCICEPTIVA DE BERBERINA Y LAS
VÍAS IMPLICADAS EN SU ACTIVIDAD
BIOLÓGICA*

8.1. Introducción

Como ya se describió en el capítulo 1, la transmisión del dolor es un mecanismo que involucra interacciones muy complejas de las estructuras periféricas y cerebrales, desde la superficie de la piel hasta la corteza cerebral (Furst, 1999). Aunque hay disponible un número considerable de medicamentos antinociceptivos, los PN obtenidos de la flora nativa, son un material interesante por su originalidad, para el desarrollo de nuevos agentes analgésicos. Además, podrían contribuir a nuestra comprensión actual de las vías de señalización nociceptivas para mejorar el tratamiento de afecciones dolorosas, si demostrasen dichas actividades.

A continuación, se describen brevemente algunas de las vías de señalización de las moléculas que contribuyen a la detección de estímulos nocivos (Julius y Basbaum, 2001). Entre ellos, el potencial de receptor transitorio, especialmente el receptor de potencial transitorio vanilloide (TRPV1) y el TRPA1, varios mediadores inflamatorios (PGE_2 , His y Br) y el neurotransmisor excitatorio Glutamato (Glu). Estos, parecen ser puertas moleculares en el sistema sensorial que contribuyen a provocar señales nociceptivas, así como para promover la hiperalgesia y la alodinia, conocidas colectivamente como hipersensibilidad (Julius y Basbaum, 2001).

➤ **Mediadores y moléculas implicados en la transmisión nociceptiva**

En una situación en la que se daña un tejido, o en un estado de dolor crónico o inflamatorio, se emite información nociceptiva continuamente desde la periferia mediante fibras aferentes finas tipo C y A δ hacia el asta dorsal, entonces en respuesta, la propia neurona envía desde su soma, vesículas que liberan en la periferia principalmente sustancia P, así como el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP). Una vez liberados se unen a sus receptores en las células relacionadas con el proceso inflamatorio, como neutrófilos, mastocitos y basófilos, causando la liberación de distintas sustancias pro-inflamatorias o mediadores del dolor, como, citocinas, His, Br, entre otros (Goicoechea y Martin, 2006). Además, se favorece la síntesis de otros compuestos, como por ejemplo las enzimas COX, que a su vez promueven la síntesis de PGs y eicosanoides. También se liberan factores tróficos, como el factor de crecimiento nervioso (NGF) (Fig. 1.4 sección 1.2.2.1).

Algunos de ellos, son conocidos como mediadores inflamatorios debido a su participación como tales, influyendo así en la percepción de un dolor más intenso, al desarrollarse un estado de hiperalgesia (Rang y Urban, 1995). Todos estos mediadores a su vez producen cambio de pH, liberación de ATP de las células que han sido dañadas, así como síntesis y liberación de NO.

La activación del nociceptor también inicia el proceso de inflamación neurogénica. Esta es una función eferente del nociceptor por la cual la liberación de Nt, especialmente la sustancia P y CGRP, desde el terminal periférico, induce vasodilatación y extravasación plasmática (fuga de proteínas y líquido de las vénulas poscapilares), así como la activación de muchas células no neuronales, incluidos los mastocitos y los neutrófilos (Fig.1.4 sección

1.2.2.1). Estas células a su vez aportan elementos adicionales a la respuesta inflamatoria.

En este sentido, la nocicepción es única porque las neuronas sensoriales primarias individuales de la "vía del dolor" tienen la notable capacidad de detectar una amplia gama de modalidades de estímulo, incluidas las de naturaleza física y química.

Al mismo tiempo, los estímulos marcadamente diferentes como son los estímulos químicos o físicos, pueden excitar a los nociceptores activando un solo receptor, permitiendo que la célula integre información y responda a cambios complejos en el entorno fisiológico. Algunos componentes generados por el daño tisular o la inflamación (por ejemplo, protones, ATP, 5-HT o lípidos) pueden alterar la excitabilidad neuronal directamente al interactuar con los canales iónicos en la superficie del nociceptor, mientras que otros (por ejemplo, Br, His o NGF) se unen a los receptores metabotrópicos y median sus efectos a través de las cascadas de señalización del segundo mensajero (Woolf y Salter, 2000).

Aunque se han establecido muchos mecanismos moleculares involucrados a nivel central, los mecanismos de sensibilización periférica aún no han sido dilucidados completamente. Sin embargo, el conocimiento de la biología molecular del receptor ha permitido un progreso extraordinario en la comprensión del mecanismo de acción de varios Nt y fármacos implicados en la modulación de la nocicepción central y periférica. El mecanismo de transducción del dolor neuroquímico generalmente implica la interacción de mediadores con canales iónicos operados por el receptor (como por ejemplo, receptor NMDA y receptor colinérgico nicotínico), con receptores asociados a tirosina quinasa (NGF), o receptores de membrana que generalmente están acoplados con proteínas reguladoras llamadas proteínas G, como con los receptores de PG, His y Br, entre otros (Calixto y col., 2000a), también existen los canales iónicos de membrana dependiente del voltaje (canales de sodio, potasio y calcio), los cuales se abren o cierran, dependiendo de la variación de voltaje del potencial de membrana.

Los principales sistemas de receptores efectores activados por mediadores inflamatorios están representados por adenilato ciclasa (AC), guanilato ciclasa, fosfolipasa C (PLC- β), PLA₂, tirosina quinasa, proteína quinasa A, C y G y canales iónicos (Millan, 1999). Los receptores de PG, Br, His, 5-HT y adenosina (A₂) están acoplados a la proteína G, pero a diferentes sistemas efectores. Los mediadores inflamatorios que interactúan con dichos receptores activan sus sistemas efectores al promover la regulación funcional de los receptores, que incluyen, dependiendo del estímulo, aumentar o disminuir su regulación.

En otras situaciones, puede haber una mayor regulación por parte de ciertos mediadores inflamatorios que, cuando se liberan, como el NGF y las citocinas, promueven la expresión de genes que codifican la síntesis de novo de proteínas del receptor o del canal, desencadenando una respuesta de estímulo nociceptivo más intensa (Calixto y col., 2000 a).

Finalmente, la actividad de algunos de estos receptores puede ser regulada por las proteínas quinasas A y C (PKA y PKC, respectivamente), que sensibilizan o amplifican sus respuestas mediante la fosforilación de residuos claves en sus estructuras, así como de otras proteínas implicadas en vías de señalización nociceptiva en neuronas sensoriales (Premkumar y Ahern, 2000).

A continuación, se explicará brevemente como actúan en la transmisión del estímulo doloroso algunos mediadores y compuestos químicos.

➤ **Mediadores y Vías implicados en la transmisión nociceptiva**

▪ **Prostaglandina E₂**

La mayoría de los estudios indican que la PGE₂ contribuye a la sensibilización periférica al unirse a receptores acoplados a proteínas G que aumentan los niveles de adenosín monofosfato cíclico (AMPc) dentro de los nociceptores. Los nociceptores expresan una subclase específica de canal de sodio dependiente de voltaje que es resistente al bloqueo por tetrodotoxina (Baker y Wood, 2001), llamados canales TTX-R. PGE₂ aumenta la excitabilidad de las neuronas del ganglio de la raíz dorsal (DRG), en parte al cambiar la dependencia del voltaje de la activación del canal TTX-R dependiente de Na⁺ en la dirección de hiperpolarización.

Los estudios farmacológicos y bioquímicos indican que la modulación dependiente de PGE₂ de la corriente de Na⁺ mediante el canal TTX-R implica la fosforilación de la proteína del canal por la PKA, dependiente de AMPc, la cual es activada por la cascada de señalización, al activarse el receptor de PGE₂, llamado EP (England y col. 1996) (Fig. 8.1).

Por otro lado, la PGE₂ indirectamente puede sensibilizar y estimular TRPV1 mediante la activación de PKA (Premkumar y Ahern, 2000; Tominaga y col., 2001). Así, esta serie de cascadas de señalización, permitirían manifestar la sensación dolorosa (Fig. 8.1).

▪ **Bradicinina**

El daño tisular promueve la liberación o producción de péptidos bioactivos de células no neurales y proteínas plasmáticas en el sitio de la lesión. El principal de ellos es la Br peptídica, que produce en la membrana inmediata la despolarización y sensibilización a otros estímulos nocivos o incluso, inocuos (Burgess y col., 1989; Calixto y col., 2000 b). La actividad de la Br depende de su rápida degradación por las enzimas proteolíticas y la rápida disminución de la regulación de los receptores de Br.

Si bien existen dos receptores de Br (BK₁ y BK₂), las respuestas nociceptivas inducidas por ésta se producen a través del receptor BK₂ (Chuang y col., 2004; Tang y col., 2004), que, al ser activado en las neuronas sensoriales, se genera una serie de reacciones que provocan la activación de PLC (Estacion y col., 2001) (Fig. 8.1), formando segundos mensajeros. Uno de ellos, diacilglicerol (DAG), activa la PKC (Millan, 1999), de gran importancia, ya que se asocia con una mayor permeabilidad de los iones de membrana, especialmente los iones de sodio. Además, se ha informado que la estimulación del receptor BK₂ sensibiliza al receptor TRPV1 y TRPA1 y esto ocurre a través de PKC (Harteneck y col., 2000; Premkumar y Ahern, 2000; Tominaga y col., 2001). Estas condiciones generan respuestas relacionadas a un estímulo nocivo.

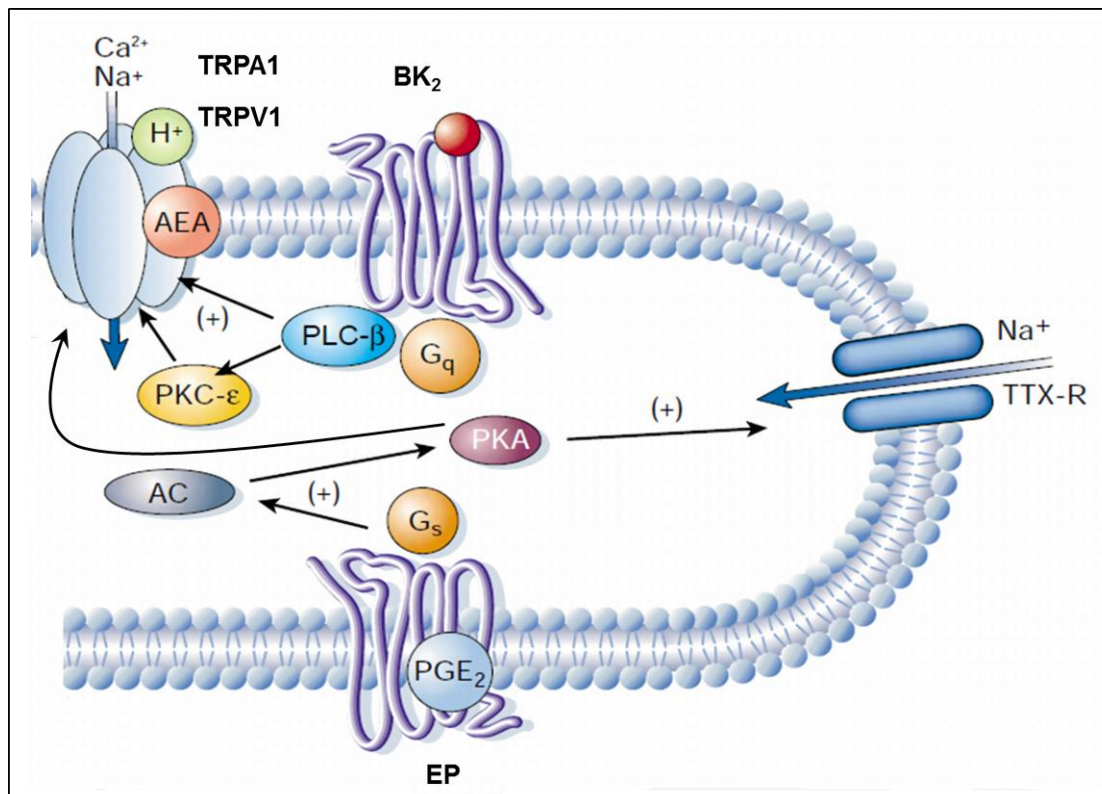


Fig. 8.1: La figura destaca el receptor de potencial transitorio vanilloide, al receptor de potencial transitorio con repetición de anquirina y los canales de sodio dependientes de voltaje resistentes a la tetrodotoxina (TTX-R). Las respuestas de TRPV1 al calor pueden potenciarse mediante la interacción directa del canal con protones extracelulares (H^+) o metabolitos lipídicos, como la anandamida (AEA). La actividad TRPV1 y TPRA1 pueden aumentarse mediante agentes como bradisinina, que se unen a sus propios receptores de la superficie celular (BK) para estimular las vías de señalización de la fosfolipasa C (PLC- β). Esto, a su vez, conduce a la hidrólisis de los lípidos de la membrana plasmática y la posterior estimulación de las isoformas de la proteína quinasa C, como la PKC- ϵ . Ambas acciones se han propuesto para potenciar la función de TRPV1 y TRPA1. Las prostaglandinas (PGE₂) y otros productos inflamatorios que activan la adenilil ciclasa (AC) a través de receptores acoplados a G también aumentan la excitabilidad de los nociceptores. Esto ocurre, en parte, por una fosforilación dependiente de la proteína quinasa (PKA) dependiente de AMP cíclico al canal de Na^+ y en parte por la fosforilación por PKA a los canales TRPV1 y TPRA1 (modificado de Julius y Basbaum, 2000).

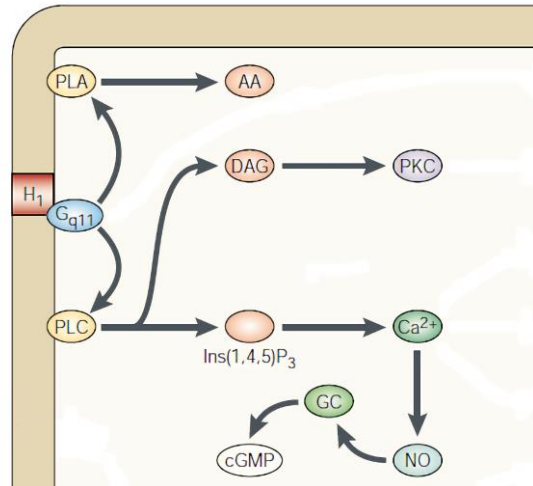
▪ Histamina

La His es uno de los primeros mediadores liberados durante el proceso inflamatorio, almacenándose principalmente en mastocitos y basófilos (Mota, 1994). En el proceso inflamatorio, la His se libera por la desgranulación de mastocitos promovida por diversos estímulos, incluida la sustancia P, interleucina-1 (IL-1) y NGF. Una vez liberada, al actuar sobre los receptores H₁, genera numerosos eventos relacionados al proceso inflamatorio (vasodilatación en las arteriolas, metarteriolas y vénulas, mayor permeabilidad vascular, entre otros) colaborando en la formación y cronicidad del proceso inflamatorio.

Los Receptores H₁ se acoplan a proteínas G (Fig. 8.2), que al ser activadas estimulan la acción de la fosfolipasa C (PLC- β), generando los mensajeros de trifosfato de inositol (IP₃) y DAG (Esbenshade y col., 2003). IP₃

se une a receptores promoviendo así la liberación de Ca^{2+} de los depósitos intracelulares cuyo vaciamiento, genera la apertura de canales catiónicos situados en la membrana celular, permitiendo la entrada de Ca^{2+} del medio extracelular y produciendo la síntesis de NO (Haas y Panula, 2003). A su vez, el DAG activa a la PKC, dependiente de Ca^{2+} y fosfolípidos, lo que conlleva a la fosforilación de receptores TRPA1 y TRPV1, desencadenando las respuestas al estímulo nocivo (Hough, 2001).

Fig. 8.2: Vías de señalización activadas por receptor de histamina (H_1). El receptor de histamina y su acoplamiento a las proteínas G se muestran a la izquierda. AA, ácido araquidónico; DAG, diacilglicerol; corriente de Ca^{2+} intracelular; $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$, inositol-1,4,5-trifosfato; NO, óxido nítrico; PKC, proteína quinasa C; PLA, fosfolipasa A; PLC, fosfolipasa C. (modificado Haas y Panula, 2003).



▪ Glutamato

El Glu es un neurotransmisor excitador en el SNC. Además, se ha demostrado que Glu juega un papel fundamental en la transmisión nociceptiva periférica (Carlton, 2001). Las investigaciones sobre el Glu sugieren que en la periferia actúa como mediador químico de la nocicepción, produciendo una acción excitadora. Los estudios en modelos animales de nocicepción demuestran que este aminoácido periférico está involucrado en la transmisión nociceptiva y que la modulación de los receptores de glutamato periféricos reduce los comportamientos de dolor y la actividad nociceptiva (Lawand y col., 1997).

Los receptores de Glu (GluR) se clasifican en GluR ionotrópicos (iGluRs: NMDA, AMPA y kainato) y GluR metabotrópicos (mGluRs: mGlu del grupo I, II y III) (Fig.8.3). Hay evidencias de que prácticamente todas las células DRG, así como sus terminales centrales y periféricas, están marcadas positivamente para iGluRs (Sato y col., 1993) y mGluRs (Carlton y Hargett, 2007).

La activación de los mGluRs (Sugiyama y col. 1987), estimula la producción de IP_3 , liberando Ca^{2+} del interior celular, mientras que DAG estimula la translocación y activación de la PKC, fosforilando proteínas de sustrato específicas que contribuyen a diversos procesos celulares, incluida la liberación y transducción de Nt (Nishizuka, 1986). Al mismo tiempo la activación de PKC activa los canales del receptor NMDA, aumentando el ingreso de iones Ca^{2+} al interior de la célula, favoreciendo la transmisión nociceptiva (Fig. 8.3).

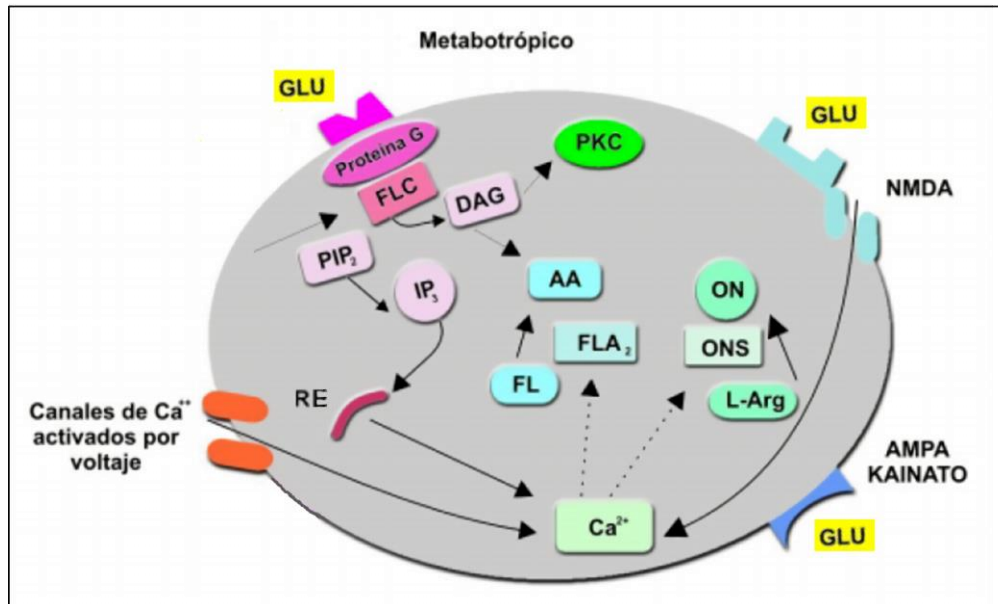


Fig. 8.3: Esquema que indica los posibles mecanismos por los cuales puede actuar el Glutamato luego de una estimulación dolorosa o daño tisular contribuyendo a la transmisión nociceptiva. PLC: Fosfolipasa C, IP₃: trifosfato de inositol, DAG: diacil glicerol, AA: ácido araquidónico, PLA₂: fosfolipasa A₂, PKC: proteína quinasa C, NO: óxido nítrico, NOS: óxido nítrico sintasa (modificado de Codere y *col.*, 1992).

La activación de los iGluR, ya sea por Glu liberado endógenamente durante una lesión o inflamación (Omote y *col.*, 1998), o Glu o agonistas aplicados de manera exógena (Follenfant y Nakamura-Craig, 1992; Lawand y *col.*, 1997; Zhou y *col.*, 1996), causan un comportamiento de dolor.

▪ Agonista del receptor TRPV1: Capsaicina

El receptor TRPV1 es un canal de catión de membrana plasmática no selectivo que posee una dependencia de temperatura muy pronunciada y un umbral de activación térmica de ~ 43 °C. Pertenece a la familia más grande de canales de receptor de potencial transitorio (TRP), cuya estructura transmembrana central se asemeja a la de los canales de potasio dependientes de voltaje o de nucleótidos cíclicos, que controlan varias respuestas fisiológicas relevantes, entre ellas, las respuestas a estímulos dolorosos (Harteneck y *col.*, 2000).

Además del calor y los protones, algunas otras sustancias pueden activar al TRPV1 (Julius y Basbaum, 2001). Una de ellas es la capsaicina (Caps), un PN obtenido de especies vegetales del género *Capsicum*. Se ha demostrado que ésta induce la despolarización de la membrana y el aumento de la entrada de cationes (Na⁺ y Ca²⁺), conllevando a un estímulo nocivo (Julius y Basbaum, 2001). Así, la entrada de Ca²⁺ provoca además, la liberación de otros Nt y neuromoduladores desde las terminales periféricas de las fibras sensoriales (Gamse, 1982; Holzer, 1988) y transmite información nociceptiva, a través de la activación de la PKC y PKA (Calixto y *col.*, 2005). La fosforilación inducida por PKC y PKA sensibiliza TRPV1 a sus ligandos,

generando una respuesta incrementada al dolor (Fig. 8.1) (Tominaga y col., 2001).

▪ **Agonista del receptor TRPA1: Cinamaldehído**

Los canales TRPA1 se expresan en un subconjunto de neuronas sensoriales nociceptivas donde se coexpresan con TRPV1. Éste es un canal no selectivo permeable a los cationes, donde TRPA1 se ha caracterizado como un termorreceptor expresado en subconjuntos de neuronas DRG activadas por el frío nocivo (menor a 10°C) (Story y col., 2003).

Diferentes mediadores inflamatorios (entre ellos, Br), pueden producir la estimulación de TRPA1, a través de la producción de DAG y de metabolitos de ácido araquidónico (Bandell y col., 2004), generando la producción de dolor.

Además de estos estímulos, los canales TRPA1 también son activados por algunos PN, como el cinamaldehído (Cin, componente principal aislado del aceite esencial de canela obtenido de la corteza de *Cinnamomum zeylanicum* Blume). Se ha demostrado que la inyección i.pl. de ratones con cinamaldehído, induce comportamientos evidentes relacionados con el dolor, lo que proporciona evidencia del papel de TRPA1 en la señalización del dolor (Bandell y col., 2004).

▪ **Modulación de PKC y PKA: acción de inhibidores**

La evidencia también sugiere que la modulación PKC o PKA desempeña un papel importante durante la lesión tisular, ya que los inhibidores de PKC o PKA bloquean la sensibilización TRPV1 y TRPA1 producida por varios mediadores inflamatorios, incluidos Br, ATP, Glu y PGE₂ (Premkumar y Ahern, 2000; Tominaga y col., 2001; Ferreira y col., 2004).

Está claramente definido que la inyección i.pl. de forbol-12-miristato-13-acetato (PMA) induce la translocación de PKC, desde el citosol hacia la membrana, provocando una respuesta nociceptiva frente a dicho estímulo, implicando así la participación de esta vía (Ferreira y col., 2004). Por otro lado, los niveles de AMPc aumentan mediante la activación de AC, que puede activarse con forskolina (FSK), y los altos niveles de AMPc están asociados con la activación de PKA (Tasken y Aandahl, 2004), donde el PKA es capaz de sensibilizar otros receptores, como el receptor TRPV1 y TRPA1 lo cual es responsable de la transmisión del estímulo nociceptivo.

Teniendo en cuenta la información indicada precedentemente, en este capítulo, y considerando los resultados obtenidos del efecto antinociceptivo demostrado por los extractos de la especie *B. ruscifolia*, en los cuales se identificó al alcaloide Berb, que además presentó una buena actividad en los experimentos en líneas celulares, se decidió evaluar la posible acción antinociceptiva de Berb en modelos químicos de nocicepción en ratones.

También se planteó evaluar si Berb puede inhibir algunas o varias de las vías implicadas en la transmisión del dolor utilizando modelos de nocicepción en ratones.

8.2. Objetivos

- ✓ Evaluar el efecto de Berb en diferentes modelos de nocicepción *in vivo* a saber:
 - Modelo de nocicepción inducido por ácido acético.
 - Modelo de nocicepción inducido por formalina.
- ✓ Determinar el efecto de Berb sobre las distintas vías que se relacionan con la transmisión del estímulo nocivo hacia el SNC, activadas por diferentes mediadores y compuestos químicos (PGE₂, Br, His, Glu, Caps, Cin, PMA y FSK) mediante ensayos de nocicepción *in vivo*.

8.3. Metodología

8.3.1. Animales

Todas las condiciones de manejo de animales empleadas en estos experimentos fueron las indicadas en la sección 5.3.1.

8.3.2. Preparación de las muestras para los experimentos *in vivo*

Las diferentes muestras de Berb (Merck) para los ensayos *in vivo* fueron preparadas, acorde a la dosis a emplear en cada experimento, disolviéndolas en solución salina (NaCl al 0,9 %) y Tween 80 para lograr su completa disolución.

La concentración final de Tween 80 no superó el 5%. Las muestras se administraron por v.o. a los animales usando una cánula adecuada. Cada muestra se preparó el mismo día que se llevó a cabo el experimento.

8.3.3. Actividad antinociceptiva

8.3.3.1. Prueba de nocicepción inducida por ácido acético

Con el objetivo de evaluar el efecto antinociceptivo de Berb, se realizó la misma prueba de nocicepción informada en el capítulo 5 (ver sección 5.3.3.1.)

8.3.3.2. Prueba de nocicepción inducida por formalina

Para evaluar el efecto antinociceptivo de Berb, se usó la misma metodología de nocicepción inducida por formalina que en el capítulo 5, sección 5.3.3.2. También fue realizado el ensayo de evaluación del efecto antitérmico y antiedematoso, acorde a lo informado en la misma sección.

8.3.4. Estudio del mecanismo de acción antinociceptivo de berberina

Con el objetivo de investigar el efecto de la Berb sobre diferentes mediadores que participan en la modulación periférica de la transmisión nociceptiva, y obtener así información sobre su mecanismo de acción, se evaluó su efecto antinociceptivo, luego de la inyección i.pl. de Br, PGE₂, His, Glu, Cin, Caps, PMA y FSK.

Todos los mediadores químicos utilizados fueron de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Las drogas se disolvieron en solución de NaCl al 0,9 %, con la excepción de Cin, que se disolvió en etanol al 1,6% y Tween 80 al 0,01% en solución salina. En ambas condiciones, las soluciones finales que contienen etanol no causaron ningún efecto nociceptivo.

8.3.4.1. Prueba de nocicepción inducida por los diferentes compuestos

Para evaluar el efecto de Berb sobre algunas vías nociceptivas, se usó la metodología del test de formalina (sección 5.3.3.2) con algunas modificaciones, principalmente relacionadas al compuesto químico que se administra mediante inyección i.pl. y al registro del tiempo del etograma del animal.

La dosis utilizada de Berb fue la mínima inactiva y la máxima activa evaluada en el test de inducción de contorsiones de ácido acético. La administración fue por v.o., 60 minutos antes de la inyección i.pl. de cada uno de los compuestos químicos, en la superficie ventral de la pata trasera derecha. Posteriormente, a los animales se los dejó ambientar en cajas acrílicas durante 20 minutos antes de comenzar con el experimento. Transcurridos los 60 minutos después del tratamiento con Berb o vehículo (solución fisiológica), los ratones recibieron, una inyección de 20 µl i.pl. del compuesto químico a evaluar, en cada uno de estos experimentos. Se registró con un cronómetro el tiempo que pasó el animal lamiendo, mordiendo y sacudiendo la pata inyectada y se consideró indicativo de nocicepción, utilizándose para cada dosis de Berb y el grupo control (vehículo) un n=8. Cada sustancia química mediadora de la nocicepción fue inyectada a una concentración ya establecida y el tiempo de evaluación se registró sin la existencia de distintas fases. En la Tabla 8.1 se muestran las concentraciones y tiempo de evaluación de cada ensayo.

Tabla 8.1: Los diferentes compuestos utilizados en los experimentos con su concentración y tiempo de evaluación.

Compuesto Químico	Concentración ^a	Tiempo de evaluación ^b
Bradicinina	3 nmol/pata	15
PGE ₂	3 nmol/pata	15
Histamina	100 nmol/pata	60
Glutamato	10 μmol/pata	15
Cinamaldehído (agonista TRPA1)	10 nmol/pata	5
Capsaicina (agonista de TRPV1)	2,5 nmol/pata	5
Forskolina	50 nmol/pata	10
PMA	500 pmol/pata	30

a: Concentración en los 20 μl de inyección intraplantar.

b: Tiempo de observación expresado en minutos.

8.3.5. *Análisis estadístico*

Ver Sección 4.3.6.

8.4. *Resultados y Discusión*

8.4.1. *Nocicepción inducida por ácido acético*

Considerando los resultados positivos obtenidos en los experimentos *in vivo* para el EE de *B. ruscifolia*, como así también los observados en líneas celulares para dicho extracto y para Berb, componente mayoritario en el mismo, se decidió profundizar la investigación del efecto antinociceptivo *in vivo* para este alcaloide. Como se informó en el capítulo 5, esta prueba, en la cual se inducen contorsiones abdominales mediante la inyección i.p. de ácido acético, se realizó con el objetivo de evaluar el efecto de Berb para aliviar el dolor.

En estos experimentos se evaluaron dos vías de administración para Berb: vía i.p. y la v.o., dado que existían reportes bibliográficos que informaban una baja absorción de dicho alcaloide por esta última vía (Diogo y col., 2011). Los resultados obtenidos muestran una inhibición del retorcimiento abdominal inducida por inyección de ácido acético en comparación con el control, por ambas vías. Berb, administrada por vía i.p. (10 mg/kg), 30 minutos antes de la prueba, produjo una inhibición significativa del 95±5% de las contorsiones abdominales inducidas por ácido acético en ratones, mientras que su administración 60 minutos antes por v.o. (30 mg/kg) causó una inhibición

significativa del 70±8% de la nocicepción inducida por ácido acético (Fig. 8.4 A). Si bien Berb fue menos eficaz y potente para prevenir la nocicepción causada por el ácido acético, al ser administrada por v.o., posiblemente por su menor disponibilidad por esta vía (Diogo, y col., 2011), presentó una actividad mucho mayor que la obtenida para el EE. Esto, junto al hecho de que ésta es la vía empleada en el consumo popular de los preparados obtenidos de *B. ruscifolia*, se decidió continuar empleándola para todos los experimentos posteriores.

De ese modo, se probaron dosis de 3 y 30 mg/kg de Berb, mostrando a la máxima dosis evaluada (30 mg/kg), una inhibición significativa del 70±8% y a la mínima dosis administrada (3 mg/kg), ningún efecto antinociceptivo (Fig. 8.4 B). El control positivo de los experimentos *in vivo*, Asp, a una dosis de 400 mg/kg, v.o., mostró una media de inhibición del 81±3%.

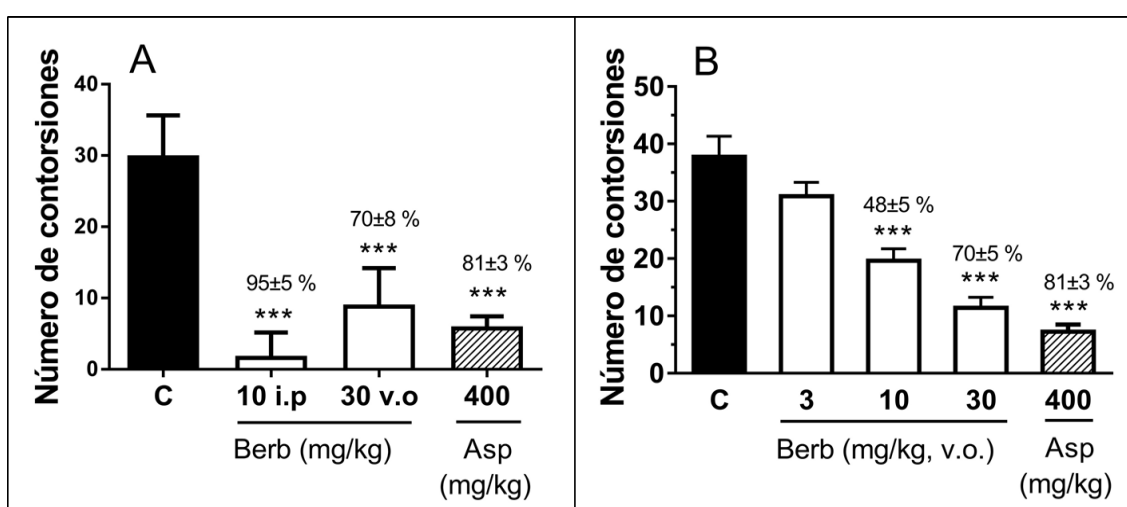


Fig. 8.4: Efecto antinociceptivo de Berberina en relación al n° de contorsiones abdominales inducidas por la inyección de ácido acético. En la Fig. 8.4 A, se muestra la administración i.p. y la administración oral, en la Fig. 8.4 B se muestran los efectos de Berberina a diferentes dosis por v.o. Cada grupo representa un promedio de 8 animales. Los resultados fueron analizados con ANOVA de una vía seguido del test de Tukey, se expresaron como la media ± error estándar. ***p<0,001 vs. Control (C).

Se destaca que Berb presentó una buena actividad antinociceptiva a su dosis de 30 mg/kg, comparada con el EE que en el mismo experimento generó una inhibición significativa del 63±6%, a una dosis de 300 mg/kg (ver Fig. 5.5).

8.4.2. Nocicepción inducida por formalina

En estos experimentos, se emplearon como controles positivos Morf (5 mg/kg, vía i.p.) y Asp (400 mg/kg, v.o). Además de evaluar el efecto antinociceptivo de formalina, en ambas fases (neurogénica e inflamatoria), se evaluó el efecto antiedematoso y antitérmico, que presentaría Berb.

Se probó la dosis máxima efectiva (30 mg/kg) y la dosis mínima no efectiva (3 mg/kg) obtenidas en el experimento de contorsiones inducidas por ácido acético.

Los gráficos de barra (Fig. 8.5) muestran el efecto de Berb en el modelo de dolor inducido por formalina, observando una inhibición de la

nocicepción a las dos dosis ensayadas y en las dos fases del experimento, confirmando su efecto antinociceptivo, tanto en la inhibición del dolor neurogénico como en el dolor inflamatorio. Tanto en la fase 1 (Fig. 8.5 A) como en la fase 2 (Fig. 8.5 B), a una dosis de 30 mg/kg, Berb inhibió en un $44\pm 4\%$ y $49\pm 5\%$, el dolor neurogénico e inflamatorio, respectivamente, mostrando un mayor efecto inhibitorio que el presentado por el EE, a la misma dosis (ver Fig. 5.10).

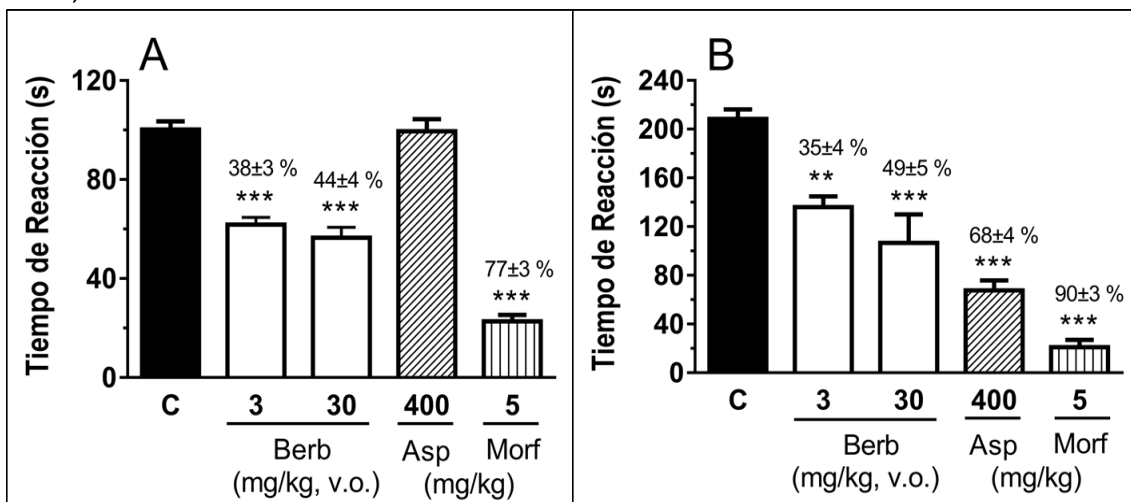


Fig. 8.5: Efecto de Berberina administrada por vía oral en relación a la primera (Fig 8.5 A) y la segunda (Fig. 8.5 B) fase del dolor inducido por formalina. Cada grupo representa la media de 8 animales. Los resultados fueron analizados con ANOVA de una vía seguido del test de Tukey, se expresaron como la media \pm error estándar, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ vs. Control (C).

Berb mostró además, un efecto antiedematoso (Fig. 8.6), con un $34\pm 10\%$ de inhibición de la formación de edema a la máxima dosis ensayada, comparada con el grupo control, actividad que no fue observada con ninguno de los extractos de *B. ruscifolia*. Por otro lado, Berb no demostró ningún efecto antitérmico.

Estos resultados permiten indicar que Berb contribuiría en el efecto antinociceptivo, observado en ambas fases, manifestado por el EE de *B. ruscifolia*. Hay que destacar que solamente Berb presentó efecto antiedematoso, actividad que condice con el efecto antiinflamatorio demostrado por Berb en los ensayos de líneas celulares (sección 7.4.1, 7.4.2 y 7.4.3). Así, este efecto antiedematoso demostrado por Berb, es otro de los mecanismos por los cuales Berb posee actividad antiinflamatoria.

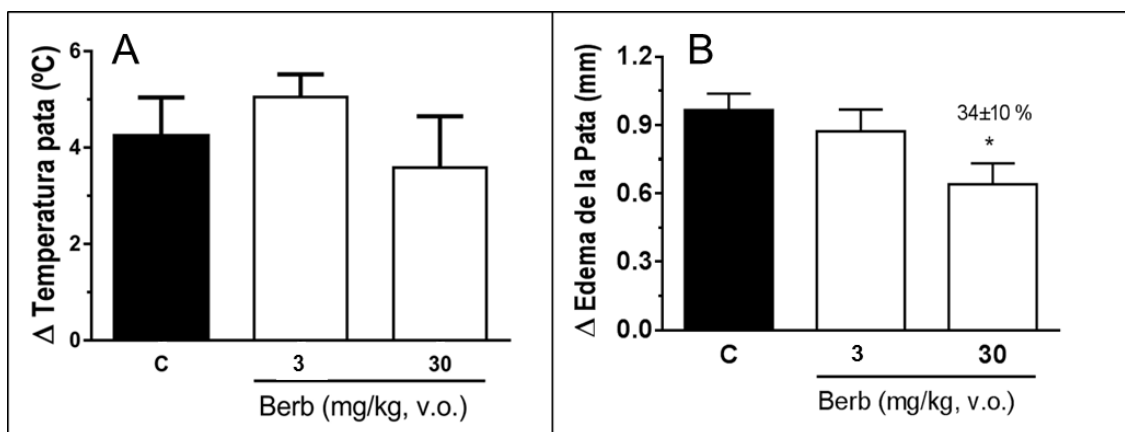


Fig 8.6: Efecto de Berberina administrada por vía oral en relación a la inhibición de de temperatura (Fig. 8.6 A) y a la inhibición de formación de edema (Fig. 8.6 B) en la pata trasera inyectada con formalina. Cada grupo representa la media de 8 animales. Los resultados fueron analizados con ANOVA de una vía seguido del test de Tukey, se expresaron como la media±error estándar, *p<0,05, vs. Control (C).

8.4.3. Evaluación de mecanismos de acción de Berberina

8.4.3.1. Nocicepción inducida por prostaglandina E₂, Bradicinina e Histamina

Para evaluar mecanismos de acción del efecto farmacológico estudiado, se realizó el ensayo de nocicepción empleando distintos mediadores involucrados en el efecto nociceptivo del dolor. El tratamiento de animales con Berb (3 y 30 mg/kg, v.o.) produjo una inhibición del dolor dependiente de la dosis, causada por la inyección i.pl. de PGE₂ (3 nmol/pata), Br (3 nmol/pata) e His (100 nmol/pata), en cada uno de los experimentos.

Cuando este dolor es inducido por PGE₂, se observa una respuesta nociceptiva en los animales del grupo control, cuya acción es revertida por Berb, a 3 y 30 mg/kg, v.o., de manera dependiente de la dosis, con un valor de 46±6% y 78±4%, respectivamente (Fig. 8.7 A).

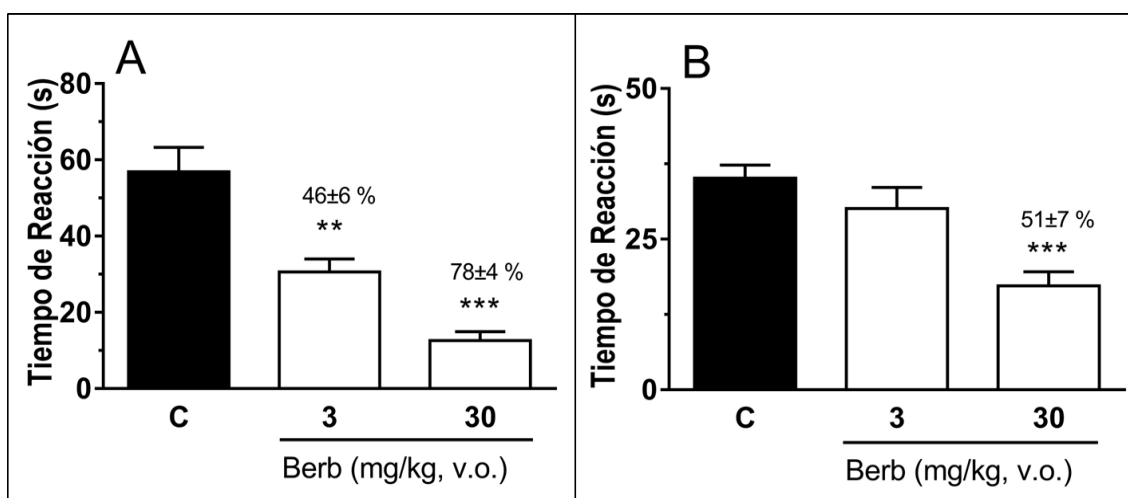


Fig. 8.7: Efecto de la administración oral de Berberina sobre la nocicepción causada por la inyección intraplantar de PGE₂ (Fig. 8.7 A) y Bradicinina (Fig. 8.7 B). Los resultados fueron analizados con ANOVA de una vía seguido del test de Tukey, se expresaron como la media ± error estándar, **p<0,01, *** p<0,001 vs. Control (C).

Estos resultados indican que Berb actúa inhibiendo algún paso de la vía de señalización por la cual la PGE₂ participa en la transmisión nociceptiva, que podría involucrar la activación de PKA, mediador responsable de fosforilar canales catiónicos que provocan la despolarización de la membrana, generando el impulso nervioso (England y col. 1996). Por lo tanto, podemos inferir, según los datos obtenidos, que Berb demostró efecto antinociceptivo al inhibir en algún punto la cascada de señalización de PGE₂.

Analizando los resultados obtenidos para el test de inyección i.pl. con Br, podemos confirmar que Berb posee propiedades antinociceptivas contra la nocicepción causada por Br, dado que a una dosis de 30 mg/kg, Berb inhibió la nocicepción inducida por este mediador, con un 51±7% de significancia, comparado con el grupo control, que solo recibió solución fisiológica (Fig. 8.7 B). Estos resultados indican que Berb presenta además, un efecto antinociceptivo inhibiendo la vía de señalización de Br, lo cual es interesante, ya que la activación de los receptores BK₂ por este mediador genera segundos mensajeros, responsables de la activación de los receptores TRPV1 y TRPA1 (Ferreira y col., 2004; Bautista y col., 2006), infiriendo que Berb, al inhibir la vía de acción de Br, también estaría implicada en la inactivación de ambos receptores.

En relación al comportamiento nociceptivo inducido por His, como se ilustra en la Fig. 8.8, la inyección i.pl. de His produjo un marcado comportamiento nociceptivo en ratones (control), el cual fue inhibido por Berb a las dos dosis ensayadas, mostrando una inhibición del 75±6% y del 66±10% para la dosis de 3 mg/kg y de 30 mg/kg, respectivamente, que no fueron diferentes estadísticamente. Esta respuesta puede deberse a la inhibición de la señalización nociceptiva provocada por la His, mediador que participa en los mecanismos periféricos y centrales de la respuesta nociceptiva mediante la activación de su receptor que lleva a segundos mensajeros, responsables de sensibilizar el nociceptor y de transmitir el impulso nervioso, siendo una de las vías de señalización la relacionada a PKC (Carstens, 1997). La PKC también actúa sensibilizando los receptores TRPA1 y TRPV1, cuyas vías de activación son las responsables de la transmisión del dolor.

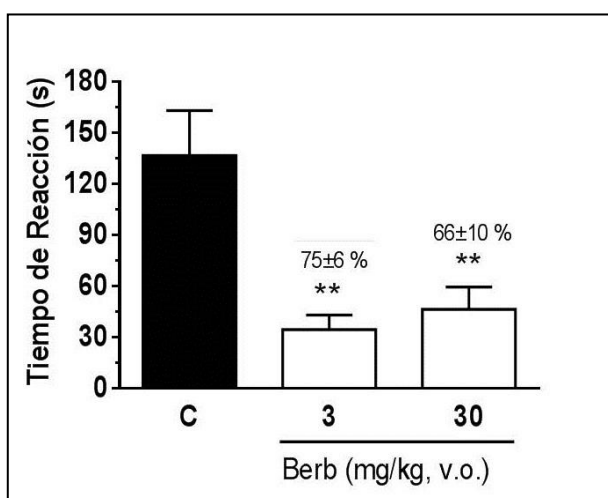


Fig. 8.8: Efecto de la administración oral de Berberina sobre la nocicepción causada por la inyección intraplantar de Histamina. Cada grupo representa la media de 8 animales. Los resultados fueron analizados con ANOVA de una vía seguido del test de Tukey, se expresaron como la media ± error estándar, **p<0,01 vs. Control (C).

8.4.3.2. Nocicepción inducida por Glutamato

En la prueba de nocicepción inducida por Glu, en la cual se evaluó si Berb tiene actividad en la inhibición de esta vía, a las dos dosis ensayadas, no mostró efecto antinociceptivo generado por la inyección i.pl. de Glu, comparado con el control (Fig. 8.9). Estos resultados indican que Berb no participa en la inhibición de la vía del Glu, infiriendo así que la acción antinociceptiva demostrada por la Berb en el test de formalina y del ácido acético, no está asociada con la inhibición de la nocicepción generada por Glu.

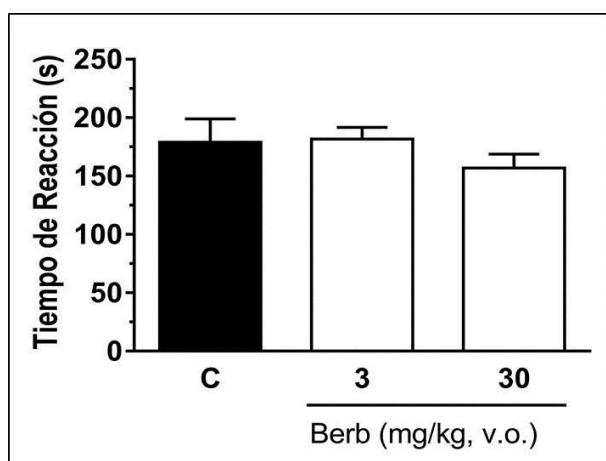


Fig. 8.9: Efecto de la administración oral de Berberina sobre la nocicepción causada por la inyección intraplantar de Glutamato. Cada grupo representa la media de 8 animales. Los resultados fueron analizados con ANOVA de una vía seguido del test de Tukey, se expresaron como la media±error

8.4.3.3. Nocicepción inducida por Capsaicina y Cinamaldehído

A fin de evaluar la inhibición de la transmisión nociceptiva mediante la participación específica TRPV1 y el TRPA1, receptores que son activados por Caps y Cin, respectivamente, se administraron dosis de 3 y 30 mg/kg, v.o. de Berb.

Para el ensayo de nocicepción inducida por Caps, se observó una inhibición significativa del 52±10% (3 mg/kg) y del 68±4% (30 mg/kg) (Fig. 8.10 A), a cada dosis administrada, comparadas al control. También se observó una inhibición, respecto del control del 54±6% (3mg/kg) y del 57±5% (30 mg/kg), cuando en la nocicepción estuvo involucrado el Cin (Fig. 8.10 B). Los % de inhibición observados para cada experimento, a las dos dosis ensayadas, no presentaron diferencia significativa.

Estos resultados permiten inferir que Berb reduce la nocicepción inducida por la inyección i.pl. de Caps, un agonista del receptor TRPV1 (Calixto y col., 2005) y de Cin, un agonista de los receptores TRPA1 (Meotti y col., 2006), por lo cual Berb posee también actividad antinociceptiva relacionada con la vía de inhibición de los receptores TRPV1 y TRPA1.

Particularmente, este experimento permitió además evidenciar que el efecto antinociceptivo que fuera observado para Berb en la prueba de formalina, y teniendo en cuenta que la formalina activa las neuronas sensoriales aferentes primarias a través de la acción específica y directa en TRPA1 (McNamara y col., 2007), está relacionado con la activación de esta vía.

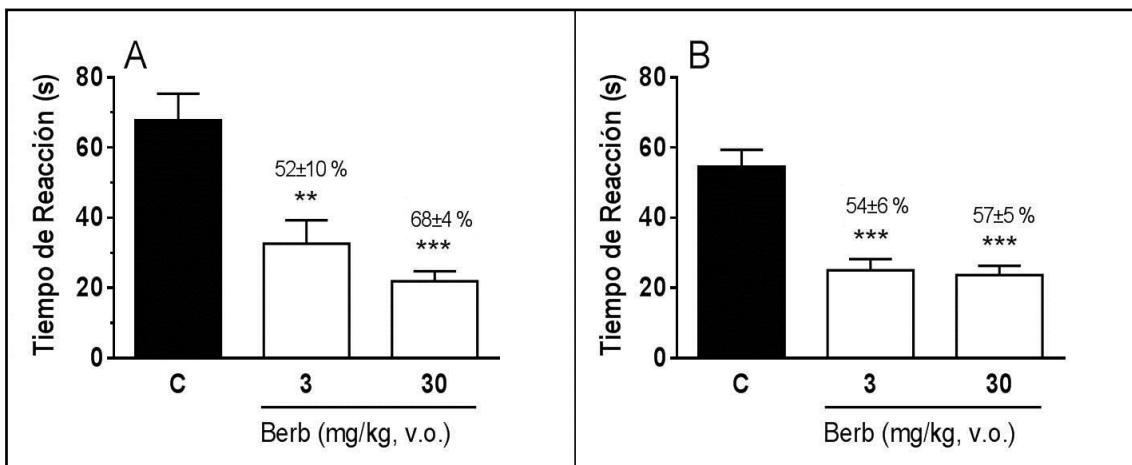


Fig. 8.10: Efecto de la administración oral de Berberina sobre la nocicepción causada por la inyección intraplantar de Capsaicina (Figura 8.10 A) y Cinamaldehido (Figura 8.10 B). Cada grupo representa la media de 8 animales. Los resultados fueron analizados con ANOVA de una vía seguido del test de Tukey, se expresaron como la media \pm error estándar. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ vs. Control (C).

8.4.3.4. Nocicepción inducida por PMA y Forskolina

En relación con los resultados que se obtuvieron de Berb, la cual mostró inhibición del efecto nociceptivo generado por la inyección i.pl. de PGE₂, His, Br, Caps y Cin, se decidió evaluar si esta actividad antinociceptiva se debe en parte a la inhibición de la PKC y PKA, vías que pueden ser activadas por la inyección i.pl. de PMA y FSK, respectivamente.

Como se muestra en el Fig 8.11, la Berb demostró tener actividad antinociceptiva en los dos experimentos evaluados.

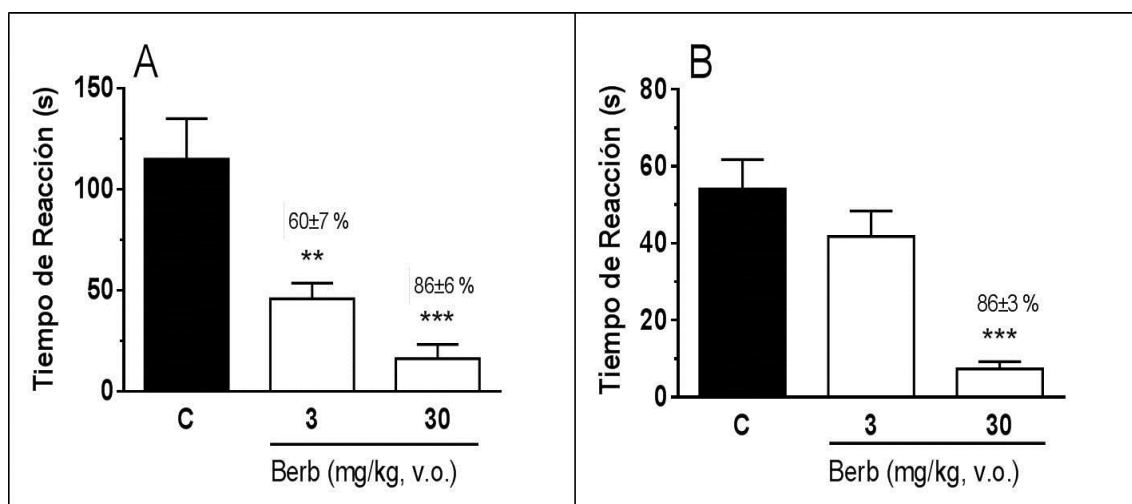


Fig. 8.11: Efecto de la administración oral de Berberina sobre la nocicepción causada por la inyección intraplantar de PMA (Fig. 8.11 A) y Forskolina (Fig. 8.11 B). Cada grupo representa la media de 8 animales. Los resultados fueron analizados con ANOVA de una vía seguido del test de Tukey, se expresaron como la media \pm error estándar. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ vs. Control (C).

Con respecto a la inhibición de la activación de PKC (Fig. 8.11 A), en la cual se inyecta PMA (i.pl.) en la pata trasera del animal, se observó una inhibición del $60\pm 7\%$ para la dosis de 3 mg/Kg y del $86\pm 6\%$, para la dosis de 30mg/Kg, ambas comparadas al control.

Los resultados actuales muestran que Berb administrada por v.o. fue capaz de prevenir la activación de PKC en la nocicepción inducida por PMA. Por lo tanto, la capacidad de Berb para interactuar con PKC podría explicar, al menos parcialmente, su efecto antinociceptivo sobre las respuestas nociceptivas inducidas por His, Br, Caps y Cin. Además, se ha demostrado que los inhibidores de PKC previenen la fosforilación de TRPV1 y TRPA1, reduciendo la sensibilización de este receptor sensible a la Caps y Cin, respectivamente, lo que hace que sea menos sensible a la acción agonista (Ferreira y col., 2004; Calixto y col., 2005).

En cuanto al experimento de nocicepción inducida por inyección i.pl. de FSK, Berb presentó un efecto antinociceptivo a la dosis de 30 mg/Kg administrada por v.o., con un $86\pm 3\%$ de inhibición nociceptiva, con respecto al control (Fig. 8.11 B), indicando que los datos obtenidos de Berb en relación a la inhibición de la nocicepción inducida por FSK se debe en parte a la vía de señalización de PKA. Este efecto es otro contribuyente a la propiedad antinociceptiva de Berb en la nocicepción inducida por Caps y Cin ya que un aumento en los niveles intracelulares de PKA produce una activación de los canales de TRPV1 (Caps agonista) y TRPA1 (Cin agonista).

Considerando que la nocicepción de la pata trasera inducida por PGE₂ en ratones está mediada por la activación de receptores EP acoplados a la proteína G específicos, con la participación de las vías de señalización PKA (Kassuya y col., 2007), podemos decir que el efecto antinociceptivo que se observó en el test de PGE₂ está relacionado con la inhibición de la vía activada por FSK.

8.5. Conclusiones Parciales

En el presente capítulo, demostramos que Berb presenta importantes efectos antinociceptivos en las pruebas de nocicepción inducido por el ácido acético y por la formalina, a su vez y en relación al experimento de formalina, que presenta dos fases, Berb demostró disminución de la nocicepción tanto en el dolor neurogénico (Fase 1) como en el dolor inflamatorio (Fase 2), lo cual confirma su efecto analgésico *in vivo*.

Berb demostró tener actividad antiedematosa mediante la inhibición de formación de edema por la inyección de formalina, lo cual es un resultado importante ya que ninguno de los extractos de *B. ruscifolia* evaluados presentaron este efecto. Por lo que se puede relacionar este efecto con la posible participación de Berb en la permeabilidad capilar, la vasodilatación y la infiltración de células inflamatorias, procesos responsables en la generación de edema luego de un daño en el tejido.

Además, Berb probablemente podría inhibir el efecto nociceptivo observado en el test de formalina y ácido acético mediante la inhibición de las vías de activación de PKC y PKA las cuales son responsables de la sensibilización y activación de los nociceptores periféricos TRPV1 y TRPA1 a través de la fosforilación intracelular por parte de PKC y PKA.

Por otro lado, también podemos concluir que la inhibición de estas dos vías de señalización (PKA y PKC) producen al menos en parte el efecto antinociceptivo que demostró Berb en los ensayos de nocicepción inducidos por His, Br y PGE₂. Podemos proponer entonces que la inhibición de las vías de señalización de PKC y PKA son importantes en el efecto analgésico demostrado por Berb.

Berb no presentó actividad antinociceptiva en el test de inducción por Glu, lo cual permite inferir que actúa a nivel de la inhibición de la cascada de las PKC y PKA que se relacionan con la activación de segundos mensajeros, mediante los canales metabotrópicos, por lo tanto, Berb no tiene capacidad para inhibir la nocicepción del Glu generada por la activación de los canales ionotrópicos (principalmente NMDA y PMA).

En conclusión, los resultados de este trabajo proporcionan importante evidencia que indica que Berb, metabolito secundario presente en los extractos acuosos y etanólico de *B. ruscifolia*, participa en generar los efectos antinociceptivos que ellos demostraron, produciendo antinocicepción sistémica cuando se evalúa en modelos químicos de nocicepción en ratones.

Nuestros resultados indican que los mecanismos a través de los cuales Berb ejerce su acción se deben en parte al bloqueo de las vías de PKC y PKA los cuales explican el efecto antinociceptivo de Berb.

Estos resultados son de relevancia e interés, dado que hasta el momento no se había evaluado el efecto analgésico de Berb mediante estas vías de señalización.

CAPÍTULO 9

CONCLUSIONES GENERALES

Y

PROYECCIONES

9.1. Conclusiones Generales

El presente trabajo de tesis doctoral estuvo orientado principalmente a la validación del efecto de plantas medicinales utilizadas en la medicina tradicional como analgésicas y antiinflamatorias, con el fin de aportar información científica sobre los posibles mecanismos moleculares que subyacen a los efectos terapéuticos antes mencionados, lo cual resultaría en potenciales nuevas alternativas respecto a los fármacos que se utilizan en la actualidad, para dicho efecto terapéutico.

De las 6 especies seleccionadas, basadas en reportes de su utilización en la medicina tradicional como analgésicas y antiinflamatorias, los extractos de la especie *B. ruscifolia* demostraron ser los más activos, en los ensayos en líneas celulares.

Si bien los tres extractos de esta especie: D, I y EE fueron activos, el EE fue el más potente en la inhibición del NO estimulado por LPS, en líneas celulares derivadas de macrófagos J774A.1. Su mecanismo de acción se relacionó a la inhibición de la expresión proteica de la iNOS.

Posteriormente, los ensayos *in vivo* mostraron que los tres extractos de *B. ruscifolia* manifestaron actividad antinociceptiva, evaluada mediante los ensayos de nocicepción inducida por ácido acético vía i.p. y de formalina, vía i.pl. Nuevamente EE fue el extracto que generó una mayor actividad biológica, en ambos ensayos.

En relación a la composición química de *B. ruscifolia*, se demostró la presencia de Berb, un alcaloide informado por primera vez en esta especie con un mayor contenido en el EE, acorde a lo obtenido de su cuantificación.

Para poder evaluar la participación de Berb en las actividades biológicas observadas por los extractos de *B. ruscifolia*, se diagramaron ensayos en líneas celulares que permitieron demostrar que Berb inhibió el NO con una CI_{50} mucho menor que la que se obtuvo para el EE, inhibiendo además la expresión proteica de la enzima (iNOS). Los ensayos *in vivo*, mostraron que Berb fue capaz de inhibir la nocicepción en los dos modelos evaluados y su efecto inhibitorio fue más efectivo que el obtenido para el EE.

Estos datos confirman que Berb es uno de los metabolitos que participa en la producción del efecto farmacológico demostrado por los tres extractos de *B. ruscifolia* en los ensayos en líneas celulares e *in vivo*. Berb también produjo un efecto antiedematoso evaluado en el test de formalina, cuyo efecto biológico es de destacar, dado que es una característica que un antiinflamatorio debe poseer.

Con respecto a la evaluación de las vías por las cuales Berb produce el efecto antinociceptivo, ésta demostró tener efecto inhibitorio en la nocicepción generada por PGE_2 , Br, His y la vía de activación de los receptores TRPV1 y TRPA1, resultados que indican que la inhibición de nocicepción demostrada por Berb mediante el test de formalina y ácido acético se debe a la inhibición de la transmisión del dolor generada por dichos mediadores. Con el fin de profundizar sobre el mecanismo de acción antinociceptivo a nivel periférico de Berb, se demostró que Berb generó una buena inhibición en la activación de PKC y PKA. Tanto la PKA y la PKC son responsables, al menos en parte, mediante la generación de cascadas de fosforilación intracelular, de la transmisión nociceptiva generada por PGE_2 , Br y His y también de la activación

y sensibilización de los receptores TRPV1 y TRPA1. En resumen, se determinó que la inhibición de una u otra vía de señalización de PKC y PKA es importante en el efecto antinociceptivo mostrado por Berb. De este modo pudimos demostrar y brindar información sobre los posibles mecanismos por los cuales Berb genera su efecto farmacológico en esta actividad.

Podemos concluir que la presencia de Berb en los extractos de *B. ruscifolia*, es en parte responsable del efecto antiinflamatorio y analgésico adjudicado por la medicina tradicional a esta especie vegetal. Por lo tanto, estos resultados abren nuevas perspectivas para el uso de extractos obtenidos de *B. ruscifolia* en el tratamiento del dolor, y también pueden contribuir a explicar su efecto antiinflamatorio, pero el mismo debe ser confirmado en modelos *in vivo*.

Estos avances en el conocimiento científico ayudarían al desarrollo de nuevas terapias alternativas para enfermedades relacionadas con procesos inflamatorios y de dolor, aportando además nueva información que respalda no sólo las propiedades atribuidas a la especie, sino también su uso potencial como parte de formulaciones en medicamentos herbarios para el tratamiento de patologías asociadas a procesos inflamatorios y de dolor. Adicionalmente, estos estudios contribuyen al conocimiento y valorización la flora nativa de Argentina.

9.2. Proyecciones

Los resultados obtenidos en el presente trabajo de tesis doctoral, dieron nuevas perspectivas de investigación con respecto a la evaluación de la actividad analgésica y antiinflamatoria de extractos provenientes de plantas medicinales nativas.

Por un lado, para complementar los estudios realizados *in vivo* de Berb sobre los mecanismos de inhibición de la transmisión nociceptiva, sería interesante evaluar si este alcaloide actúa como antagonista de los nociceptores: BK₂, H1, EP, TRPV1 y TRPA1. Por otro lado se plantea evaluar si el efecto analgésico demostrado por Berb se debe también a que actúa a nivel de la medula espinal y del SNC.

Con respecto a los datos obtenidos en la inhibición de las vías de PKC y PKA, también sería interesante evaluar si actúa inhibiendo la vía de ERK (quinasa regulada por señales extracelulares) que es activada por PGE₂, permitiendo una mayor comprensión del efecto antinociceptivo demostrado.

En relación al mecanismo de acción antinociceptivo de Berb, también es relevante profundizar los estudios estableciendo si este alcaloide actúa inhibiendo la expresión de algún gen responsable de la síntesis de proteínas que participan en la transmisión del estímulo nocivo.

En relación a la investigación del efecto antiinflamatorio, resulta importante analizar si el EE tiene capacidad de inhibir o disminuir la migración celular mediante ensayos *in vivo* para poder confirmar su actividad antiinflamatoria, lo cual es necesario para validar el efecto terapéutico que le dan en la medicina tradicional. Por otro lado, sería interesante evaluar la capacidad del EE para inhibir la expresión de otras enzimas o mediadores que participan en la respuesta inflamatoria. Este interés se hace extensivo para

Berb, pero específicamente sobre enzimas y mediadores no investigados aún, para este metabolito.

Con el propósito de avanzar en un futuro hacia la elaboración de un medicamento herbario para el caso del EE o una especialidad medicinal para el caso de Berb, se precisa determinar la seguridad mediante experimentos *in vivo* de toxicidad crónica que permitan obtener información en relación a los efectos secundarios que se relacionan con los analgésicos y antiinflamatorios, aportando datos importantes para la industria farmacéutica.

Finalmente, la investigación de extractos de plantas medicinales de uso popular como antiinflamatorios y analgésicos permite una gran contribución hacia nuevas terapias con PN que beneficien la salud de la población y contribuir así a descubrir nuevos PP.AA. que no se encuentran en el mercado, que pudieran ser más efectivos en relación a su actividad terapéutica y con menores efectos secundarios no deseados.

CAPÍTULO 10

BIBLIOGRAFÍA

10.1. Bibliografía

- Abbott, F.V., Hong Y., Blier, P. 1996. Activation of 5-HT_{2A} receptors potentiates pain produced by inflammatory mediators. *Neuropharmacology*, 35: 99-110.
- Adegboye, M.F., Akinpelu, D.A., Okoh, A. 2008. The bioactive and phytochemical properties of *Garcinia kola* (Heckel) seed extract on some pathogens. *African Journal of Biotechnology*, 7 (21): 3934-3938.
- Ahmed, F., Shahid, I.Z., Biswas, U.K., Roy, B.A., Das, A.K., Choudhuri, M.S.K. 2007. Antiinflammatory, antinociceptive, and neuropharmacological activities of *Clerodendron viscosum*. *Pharmaceutical Biology*, 45: 587-593.
- Ahrendt, L.W.A. 1961. Berberis and Mahonia: a taxonomic revision. *Journal of Linnaean Society of London, Botany*, 57: 1-410.
- Akerele, O. 1993. Las plantas medicinales: un tesoro que no debemos desperdiciar. *Foro Mundial de la Salud*, 14: 390-395.
- Albornoz, A. 1993. Medicina Tradicional Herbaria (Guía de Fitoterapia). Instituto Farmacoterápico Latino. Caracas, Venezuela, 564.
- Amin, A., Subbaiah T., Abbasi, K. 1969. Berberine sulfate: antimicrobial activity, bioassay, and mode of action, *Can. Journal of Microbiology*, 15 (9): 1067-1076.
- Arambarri, A.M, Freire, S.E., Colares, M.N., Bayón, N.D., Novoa, M.C., Monti, C., Stenglein, S.A. 2006. Leaf anatomy of Medicinal Shrubs and Trees from Gallery Forests of the Paranaense Province (Argentina). Part 1. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica*, 41 (3-4): 233 - 268.
- Arenas, P. 1999. *Morrenia odorata* (Asclepiadaceae), an edible plant of the gran Chaco. *Economic Botany*, 53 (1): 89-97.
- Argentina. Disposición 5418 / 2015. ANMAT, Ministerio de salud. Drogas vegetales. Fecha de sanción 07-07-2015. Publicada en el Boletín Nacional del 14 de Julio de 2015.
- Ayoola, G.A., Coker, H.A.B., Adesegun, S.A., Adepoju-Bello, A.A., Obaweya, K., Ezennia, E.C., Atangbayila, T.O. 2008. Phytochemical screening and antioxidant activities of some selected medicinal plants used for Malaria therapy in southwestern Nigeria. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 7 (3): 1019-1024.
- Babini, J. 2000. Historia de la Medicina. Barcelona. España. Ed. Gedisa, 172.
- Baker, M.D., Wood, J.N. 2001. Involvement of Na⁺ channels in pain pathways. *Trends in Pharmacological Sciences*, 22: 27-31.
- Bandell, M., Story, G.M., Hwang, S.W., Viswanath, V., Eid, S.R., Petrus, M.J. y col. 2004. Noxious cold ion channel TRPA1 is activated by pungent compounds and bradykinin. *Neuron*, 41: 849-857.
- Barboza, G.E., Cantero, J.J., Nuñez, C.O., Espinar, A. L. 2006. Flora medicinal de la Provincia de Córdoba (Argentina): Pteridófitas y antófitas silvestres o naturalizadas. Museo Botánico de Córdoba. Córdoba, Argentina.
- Barboza G, Cantero J, Nuñez C, Pacciaroni A, Espinar L. 2009. Medicinal plants: A general review and a phytochemical and ethnopharmacological screening of the native Argentine Flora. *Kurtziana*, 34 (1-2): 7-365.

- Barnes, P.J. 2010. Mechanisms and resistance in glucocorticoid control of inflammation. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 120: 76-85.
- Bautista, D.M., Jordt, S.E., Nikai, T., Tsuruda, P.R., Read, A.J., Poblete, J. Yamoah, E.N., Basbaum, A. I., Julius, D. 2006. TRPA1 mediates the inflammatory actions of environmental irritants and proalgesic agents. *Cell*, 124: 1269-1282.
- Bentley, G.A., Newton, S.H.; Starr, J. 1981. Evidence for an action of morphine and enkephalin on sensory nerve endings in the mouse peritoneum. *British Journal of Pharmacology*, 73: 325-333.
- Besson, J.M. 1999. The neurobiology of pain. *The Lancet*, 353: 1610-1615.
- Bhala, N., Emberson, J., Merhi, A., Abramson, S., Arber, N., Baron, J.A., Bombardier, C., y col. 2013. Vascular and upper gastrointestinal effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs: meta-analyses of individual participant data from randomised trials. *The Lancet*, 382 (9894): 769–779.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254.
- Brune, K., Patrignani, P. 2015. New insights into the use of currently available non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Journal of Pain Research*, 8: 105–118.
- Bruneton, J. 2001. Farmacognosia, Fitoquímica y Plantas Medicinales. 2^{da} Ed. Editorial Acribia S.A. Zaragoza, España.
- Burgess, G.M., Mullaney, I., McNeill, M., Dunn, P.M., Rang, H.P. 1989. Second messengers involved in the mechanism of action of bradykinin in sensory neurons in culture. *Journal of Neuroscience*, 9: 3314–3325.
- Burian, M., Geisslinger, G. 2005. COX-dependent mechanisms involved in the antinociceptive action of NSAIDs at central and peripheral sites. *Pharmacology and Therapeutics*, 107:139-154.
- Bussmann, R.W., Sharon, D. 2015. Plantas medicinales de los Andes y la Amazonía-La flora mágica y medicinal del Norte de Perú. St. Louis: William L. Brown Center.
- Bustos, P.S., Saragusti A., Chiabrando, G., Cabrera, J.L., Ortega, M.G., 2009. Estrategia Biológica Para La Búsqueda De Drogas Antioxidantes Y Antiinflamatorias A Partir De Especies Autóctonas Bioactivas. XVII Jornadas De Jóvenes Investigadores Asociación De Universidades Grupo Montevideo (AUGM). Concordia, Entre Ríos, Argentina.
- Bustos, P.S., Saragusti A., Chiabrando, G., Cabrera, J.L., Ortega, M.G. 2010. Screening de especies de la medicina folclórica argentina para la búsqueda de drogas antioxidantes y antiinflamatorias. X Simposio Argentino y XIII Latinoamericano de Farmacobotánica. Córdoba, Argentina.
- Calixto, J.B.; Beirith, A., Ferreira, J., Santos, A.R.S., Cechinel Filho, V.; Yunes, R.A. 2000 a. Naturally-occurring antinociceptive substances from plants. A review. *Phytotherapy Research*, 14:1-18.
- Calixto, J.B., Cabrini, D.A., Ferreira, J., Campos, M.M. 2000 b. Kinins in pain and inflammation. *The Journal of Pain*, 87: 1-5.
- Calixto, J.B., Kassuya, C.A. L., André, E., Ferreira, J. 2005. Contribution of natural products to the discovery of the transient receptor potential (TRP)

- channels family and their functions. *Pharmacology and Therapeutics*, 106 (2):179–208.
- Carlton, S.M. Peripheral excitatory amino acids. 2001. *Current Opinion in Pharmacology*, 1:52–56.
- Carlton, S.M., Hargett, G.L. 2007. Colocalization of metabotropic glutamate receptors in rat dorsal root ganglion cells. *The Journal of Comparative Neurology*, 501:780–789.
- Carpinella, M.C., Ruiz G., Palacios, S.M. 2010. Screening of native plants of central Argentina for antifungal activity. *Allelopathy Journal*, 25 (2): 423-432.
- Carstens, E. 1997. Responses of rat spinal dorsal horn neurons to intracutaneous microinjection of histamine, capsaicin, and other irritants. *Journal of Neurophysiology*, 77: 2499-2514.
- Castiglioni, A. 1941. Historia de la Medicina. Ed. Salvat, 906. Barcelona. España.
- Chiari, M.E., Joray, M.B., Ruiz, G., Palacios, S.M., Carpinella, M.C. 2010. Tyrosinase inhibitory activity of native plants from central Argentina: Isolation of an active principle from *Lithrea molleoides*. *Food Chemistry*, 120 (1): 10-14.
- Chuang, H.H., Prescott, E.D., Kong, H., Shields, S., Jordt, S.E., Basbaum, A. I., Chao, M. V., Julius, D. 2004. Bradykinin and nerve growth factor release the capsaicin receptor from PtdIns (4, 5) P2-mediated inhibition. *Nature*, 4: 957-962.
- Coderre, T.J., Grimes, R.W., Melzack, R. 1986. Deafferentation and chronic pain in animals: An evaluation of evidence suggesting autonomy is related to pain. *Pain*, 26: 61-84.
- Coker, R.K., Laurent, G.J. 1998. Pulmonary fibrosis: cytokines in the balance. *The European Respiratory Journal*, 11:1218-1221.
- Cook, J.M., Deem, T.L. 2005. Active participation of endothelial cells in inflammation. *Journal of Leukocyte Biology*, 77 (4): 487-95.
- Coutinho, A.E., Chapman, K.E. 2011. The anti-inflammatory and immunosuppressive effects of glucocorticoids, recent developments and mechanistic insights. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 335: 2-13.
- Crowley, L.V. 2010. Capítulo 4: Inflammation and repair, en: An introduction to human disease: Pathology and pathophysiology correlations. 8^{va} Edición. Jones and Bartlett Publishers (Ed). USA.
- De Falco, F., Di Giovanni, C., Cerchia C., De Stefano, D., Capuozzo, A., Irace, C., Iuvone, T., Santamaria, R., Carnuccio, R., Lavecchia, A. 2016. Novel Non-Peptide Small Molecules Preventing IKK_β/NEMO Association Inhibit NF-κB Activation in LPS-Stimulated J774 Macrophages. *Biochemical Pharmacology*, 104: 83-94.
- Díaz-Reval, M.I., 1995. Disfunción y analgesia en el modelo experimental pifir en las diferentes fases del ciclo extral de rata. Tesis de Licenciatura. FES Zaragoza México.
- Dickenson, A.H., Chapman, V., Green, G.M. 1997. The pharmacology of excitatory and inhibitory aminoacid-mediated events in the transmission and modulation of pain in the spinal cord. *General Pharmacology*, 228: 636-638.

- Diogo, C.V., Machado, N.G., Barbosa, I.A., Serafim, T.L., Burgeiro, A., Oliveira, P.J. 2011. Berberine as a promising safe anticancer agent, is there a role for mitochondria? *Current Drug Targets*, 6 (12): 850-859.
- Doak, G.J., Sawynok, J. 1997. Formalin-induced nociceptive behavior and edema: involvement of multiple peripheral 5-hydroxytryptamine receptor subtypes. *Neuroscience*, 80: 939-49.
- Dray, A., Perkins, M. 1997. Kinins and pain. In: FARMER, S.G. The handbook of immunopharmacology: The kinin system. Academic Press: London: 157-172.
- Dubuisson, D., Dennis, S.G., 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.
- Edelsztein, V. 2011. Los remedios de la abuela: Mitos y verdades de la medicina casera. Siglo Veintiuno Editores Ed. Colección Ciencia que Ladra. Buenos Aires, Argentina. 64-65,102.
- Edeoga, H.O., Okwo, D.E., Mbaebie, B.O. 2005. Phytochemical constituents of Nigerian medicinal plants. *African Journal of Biotechnology*, 4: 685-688.
- England, S., Bevan, S., Docherty, R.J. 1996. PGE₂ modulates the tetrodotoxin-resistant sodium current in neonatal rat dorsal root ganglion neurones via the cyclic AMP-protein kinase A cascade. *The Journal of Physiology*, 495: 429-440.
- Esbenshade, T.A., Kang, C.H., Krueger, K.M., Miller, T.R., Witte, D.G., Roch, J.M., Masters, J.N., Hancock, A.A. 2003. Differential activation of dual signaling responses by human H1 and H2 histamine receptors. *Journal of Receptors and Signal Transduction*, 23 (1): 17-31.
- Estacion, M., Sinkins, W.G., Schilling, W.P. 2001. Regulation of *Drosophila* transient receptor potentiallike (TrpL) channels by phospholipase C-dependent mechanisms. *The Journal of Physiology*, 530: 1-19.
- Farmacopea Argentina, 2013. Comisión Permanente para la Farmacopea Argentina. Ministerio de Salud de la Nación. Formas farmacéuticas. (7^a Ed). Buenos Aires. Argentina.
- Fasmer, O.B., Berge, O.G., Hole, K. 1985. Changes in nociception after lesions of descending serotonergic pathways induced with 5,6dihydroxytryptamine. Different effects in the formalin and tail-flick tests, *Neuropharmacology*, 24: 729-734.
- Feria M. 2003. Fármacos analgésicos, antitérmicos y antiinflamatorios no esteroideos artríticos. En: Flórez, J., Armijo, J.A., Mediavilla, A., editores. Farmacología humana. 4^o ed. Barcelona.375-408.
- Ferreira, J., Da Silva, G.L., Calixto, J.B. 2004. Contribution of vanilloid receptors to the overt nociception induced by B2 kinin receptor activation in mice. *British Journal of Pharmacology*, 141: 787-794.
- Figueiredo, G.S., Zardo, R.S., Silva, B.V., Violante, F.A., Pinto, A.C., Fernandes P.D. 2013. Convolutamydine A and synthetic analogues have antinociceptive effects. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 103:431-439.
- Fina, B.L, Lombarte, M., Rigalli, A. 2013. Investigación de un fenómeno natural: ¿estudios in vivo, in vitro o in silico? *Actualizaciones en Osteología*. 9 (3): 294-9.

- Follenfant, R.L., Nakamura-Craig, M. 1992. Glutamate induces hyperalgesia in the rat paw. *British Journal of Pharmacology*, 106:49
- Furst, S. 1999. Transmitters involved in antinociception in the spinal cord. *Brain Research Bulletin*, 48: 129-141.
- Gamse, R. 1982. Capsaicin and nociception in the rat and mouse. Possible role of substance P. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 320: 205– 216.
- Ganoza, M. 2000. Fundamentación química de las reacciones de coloración y precipitación en la identificación de metabolitos secundarios de plantas medicinales. Trujillo–Perú .
- Geng, F.H., Li, G.H., Zhang, X., Zhang, P., Dong, M.Q., Zhao, Z.J., Zhang, Y., Dong, L., Gao, F. 2016. Berberine improves mesenteric artery insulin sensitivity through up-regulating insulin receptor-mediated signaling in diabetic rats, *British Journal of Pharmacology*, 173: 1569–1579.
- Gilmore, T.D. 2006. Introduction to NF- κ B: players, pathways, perspectives. *Oncogene*, 25: 6680-6684.
- Goicoechea, C. Martin, M.I. 2006. Mecanismos periféricos y centrales del dolor. *Reumatología Clínica*, 1:5-9.
- Goldberg, D.S, McGee, S.J. 2011. Pain as a global public health priority. *BMC Public Health*, 11: 770.
- Gosgnach, W., Messika–Zeitoun, D., Gonzalez, W., Philipe, M., Michel, J.B. 2000. Shear stress induces iNOS expression in cultured smooth muscle cells: role of oxidative stress. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 279 (6): 1880-1888.
- Granger, D.L., Taintor, R.R., Boockvar, K.S., Hibbs, J.J.B. 1996. Measurement of nitrate and nitrite in biological samples using nitrate reductase and Griess reaction. *Methods in Enzymology*, 268: 142-151.
- Grubb, B.D. 1998. Peripheral and central mechanisms of pain. *British Journal of Anaesthesia*, 81: 8-11.
- Guha, M., Mackman, N. 2001. LPS induction of gene expression in human monocytes. *Cell Signal*, 13 (2): 85–94.
- Guirimand, F. 2003. Recent data on the physiology of pain. *Nephrologie*, 7:401-407.
- Gurib-Fakim, A. 2006. Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Molecular Aspects of Medicine*, 27: 1-93.
- Haas, H., Panula, P., 2003. The role of histamine and the tuberomammillary nucleus in the nervous system. *Nature Neuroscience*, 4: 121–130.
- Harborne, J. 1973. Phytochemical methods. Chapman and Hall Ltd. (Ed). London: 1-50.
- Harirforoosh, S., Asghar, W., Jamali, F. 2013. Adverse effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs: an update of gastrointestinal, cardiovascular and renal complications. *Journal of Pharmaceutical Science*, 16 (5): 821-847.
- Hart, M.N., Loeffler, A.G. 2012. Introduction to human disease: Pathophysiology for health professionals. Quinta Edición. Jones and Bartlett Learning (Ed). Estados Unidos.
- Harteneck, C., Plant, T.D. Schultz, G. 2000. From worm to man: three subfamilies of TRP channels. *Trends in Neurosciences*, 23: 159–166.
- Hawkey, C.J., 1999. COX-2 inhibitors. *Lancet*, 353 (9149): 307-314.
- Hayashi, K., Minoda, K., Nagaoka, Hayashi, T., Uesato, S. 2007. Antiviral activity of berberine and related compounds against human

- cytomegalovirus. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 17 (6): 1562–1564.
- He, K., Kou, S.M., Zou, Z.Y., Hu, Y., Han, B., Li, X., Ye, X. 2016. Hypolipidemic effects of alkaloids from rhizoma coptidis in diet-induced hyperlipidemic hamsters. *Planta Medica*, 82: 690–697.
- Hendershot, L.C., Forsaith, J. 1959. Antagonisms of the frequency of phenylquinone-induced writhing in mice by weak analgesics and nonanalgesics. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 125: 237-24.
- Hernández, M.P., Colares, M.N., Civitella, S.M. 2009. Plantas utilizadas en medicina popular en un sector del Partido de Berisso, Buenos Aires, Argentina. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*. 8 (5); 435-444.
- Hishe, H.Z., Ambech, T.A., Hiben, M.G., Fanta, B.S. 2018. Anti-nociceptive effect of methanol extract of leaves of *Senna singueana* in mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 217: 49–53.
- Hogan, Q. 2002. Animal pain models. *Regional Anesthesia and Pain Medicine*, 27 (4): 385-401.
- Holzer, P. 1988. Local effector functions of capsaicin-sensitive sensory nerve endings: involvement of tachykinins, calcitonin gene-related peptide and other neuropeptides. *Neuroscience*, 24: 739– 768.
- Hough, L.B. 2001. Genomics meets histamine receptors: new subtypes, new receptors. *Molecular Pharmacology*, 59 (3): 415-419.
- Hough, S.W., Goudas, L.C., Carr, D.B. 2004. Anesthetic interventions in cancer pain. En: Warfield C. A, Bajwa Z. H, (Eds.) Principles and Practice of Pain Medicine. 2nd ed. New York: McGraw-Hill.
- Hunskar, S., Fasmer, O.B., Hole, K. 1985. Formalin test in mice, a useful technique for evaluating mild analgesics. *Journal of Neuroscience Methods*, 14: 69-76.
- Hunskar, S., Hole, K. 1987. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. *Journal Pain*, 30:103-114.
- Hunt, S.P., Mantyh, P.W. 2001. The molecular dynamics of pain control. *Journal Nature Reviews Neuroscience*, 2:83-89.
- Ichinose, F., Miyazaki, M., Goto, T., Takahashi, H., Terui, K., Niimi, Y., Uezono, S, Morita, S., Yanagida, H. 1999. Electroencephalographic responses to the formalin test in rats. *Pain*, 80:251–256.
- Ikeda, Y., Ueno, A., Naraba, H., Oh-ishi, S. 2001. Involvement of vanilloid receptor VR1 and prostanoids in the acid-induced writhing responses of mice. *Life Sciences*, 69: 2911–2919.
- Imanshahidi, M., Hosseinzadeh, H. 2008. Pharmacological and therapeutic effects of *Berberis vulgaris* and its active constituent, berberine. *Phytotherapy Research*, 22 (8): 999–1012.
- Jabbur, S.J., Saadé, N.E. 1999. From electrical wiring to plastic neurons: evolving approaches to the study of pain. *Pain*, 6: 87-92.
- Janakiram, N.B., Rao, C.V. 2012. iNOS-selective inhibitors for cancer prevention: promise and progress. *Future Medicinal Chemistry*, 4 (17): 2193–2204.
- Jarvis, M.F, Wismer, C.T, Schweitzer, E., Yu, H., van Biesen, T., Lynch, K.J, y col. 2001. Modulation of BzATP and formalin induced nociception: attenuation by the P2X receptor antagonist, TNP-ATP and enhancement

- by the P2X(3) allosteric modulator, cibacron blue. *British Journal of Pharmacology*, 132:259-69.
- Julius, D., Basbaum, A.I. 2001. Molecular mechanisms of nociception. *Nature*, 413: 203-210.
- Kassuya, C.A., Ferreira, J., Claudino, R.F., Calixto, J.B. 2007. Intraplantar PGE2 causes nociceptive behaviour and mechanical allodynia: the role of prostanoid E receptors and protein kinases. *British Journal of Pharmacology*, 150: 727–737.
- Kawachi, S., Cockrell, A., Laroux, F.S., Gray, L., Granger, D.N., Van der Heyde, H.C., Grisham, M.B. 1999. Role of inducible nitric oxide synthase in the regulation of VCAM-1 expression in gut inflammation. *American Physiological Society*, 277 (3): G572-G576.
- Kehlet, H., Werner, M., Perkins, F. 1999. Balanced analgesia. What is it and what are its advantages in postoperative pain. *Journal Drugs*, 58 (5): 793-797.
- Kelly, K. 2009. History of medicine. New York: Facts on file, 29-50.
- Khan, T., Khan, I.A., Rehman, A. 2015. A composite review of Berberis in service of humanity-in-trouble: an ethnopharmacological and pharmacognosic perspective. *Journal of Biodiversity and Environmental Sciences*, 5 (6): 21-33
- Kim, K.W., Cox, B.M.1993. Inhibition of norepinefrine release from rat cortex slices by opioids: differences among agonist in sensitivities to antagonist suggest receptor heterogeneity. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 267: 1153 – 1160.
- Koster, R., Anderson, M., De Beer, E.J. 1959. Acetic acid for analgesic screening. *Federation Proceedings*, 18: 412.
- Kumar, V., Cotran, R.S., Robbins, S.L. 2003. Robbins Basic Pathology, Seventh Edition. New York: Saunders.
- Kuo, C.L., Chi, C.W., Liu, T.Y. 2004. The anti-inflammatory potential of berberine in vitro and in vivo. *Cancer Letters*, 203: 127–137.
- Kuruppu, A.I., Paranagama, P., Goonasekara, C., 2019. Medicinal plants commonly used against cancer in traditional medicine formulae in Sri Lanka. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 27: 563–565.
- Lamont, L.A, Tranquilli, W.J., Mathews, K.A. 2000. Adjunctive analgesic therapy. *Journal Management of Pain*, 4 (30): 805-813.
- Landrum, L.R. 1999. Revision of *Berberis* (Berberidaceae) in Chile and adjacent southern Argentina. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 793-834.
- Lang, S., Popp, T., Kriegs, C.S., Schmidt, A., Balszuweit, F., Menacher, G., Kehe, K., Thiermann, H., Gudermann, T., Steinritz, D. 2017. Anti-apoptotic and moderate anti-inflammatory effects of berberine in sulfur mustard exposed keratinocytes. *Toxicology Letters*, 293: 2-8.
- Lawand, N.B., Willis, W.D, Westlund, K.N. 1997. Excitatory amino acid receptor involvement in peripheral nociceptive transmission in rats. *European Journal of Pharmacology*, 324: 169–77.
- Li, Z., Geng, Y.N, Jiang, J.D., Kong, W.J. 2014. Antioxidant and anti-inflammatory activities of berberine in the treatment of diabetes mellitus. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 264-289
- Lipp, J. 1991. Possible mechanisms of Morphine analgesia. *Clinical neuropharmacology Review*, 14 (2): 131-147.

- Lizarraga, E., de Allori, C.G., de Castillo, M.C., Abdala, L.R. 2006. Antibacterial and inhibitory activity of biofilm for major phenolic compounds of *Jodina rhombifolia* Hook & Arn (Santalaceae). *Molecular Medicinal Chemistry*, 11: 12-14.
- Loeser, J.D., Melzack, R. 1999. Pain: an overview. *The Lancet*, 353: 1607-1609.
- Lo Faro, M.L., Fox, B., Whatmore, J.L., Winyard, P.G., Whiteman, M. 2014. Hydrogen sulfide and nitric oxide interactions in inflammation. *Nitric Oxide* 41: 38-47.
- Lucero, I., Saragusti, A., Chiabrande, G., Cabrera, J.L., Ortega, M.G. 2007. Caracterización fitoquímica y validación biológica de *Jodina rhombifolia* (sombra de toro). XVI Congreso Italo-Latinoamericano de Etnomedicina. La Plata, Bs. As.
- Luiking, Y.C., Engelen, M.P.K.J, Deutz, N.E.P. 2010. Regulation of nitric oxide production in health and disease. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, 13 (1): 97–104.
- Macfarlane, B.V., Wright, A., O'callaghan, J., Benson, H.A.1997. Chronic neuropathic pain and its control by drugs. *Pharmacology and Therapeutics*, 75: 1-19.
- Majno, G., Joris, I. 2004. Cells, Tissues, and Disease, Second Edition. Oxford: Oxford University Press.
- Martínez, G. J. 2008. Medicinal Plants Used by the Criollos of Calamuchita to Treat Blood, Cardiovascular, and Neuroendocrinous Diseases. *Journal of Herbs, Spices and Medicinal Plants*, 13 (3): 55-82.
- Mattana, C.M., Satorres, S.E., Juan, V., Cifuentes, D., Tonn, C, Laciari, A.L. 2012. Antibacterial activity study of single and combined extracts of *Berberis ruscifolia*, *Baccharis sagittalis*, *Euphorbia dentata* and *Euphorbia schikendanzii*, native plants from Argentina. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 11 (5): 428 – 434.
- Matera, S., Bruno, F., Bayley, M., Pérez, V., Querini, C., Ragone, M.I., Consolini, A.E. 2016. Intestinal antispasmodic effects of three argentinian plants: *Hypericum connatum*, *Berberis ruscifolia* and *Cecropia pachystachya*: mechanisms of action and comparison with the effects of *Brugmansia arborea*. *Journal Pharmacology Online*, 2: 91-99.
- Mazzini, S., Bellucci, M.C., Mondelli, R. 2003. Mode of binding of the cytotoxic alkaloid berberine with the double helix oligonucleotide D(AAGAATTCTT). *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 11: 505–514.
- McNamara, C.R., Mandel-Brehm, J., Bautista, D.M., Siemens, J., Deranian, K.L., Zhao, M., y col. 2007. TRPA1 mediates formalin-induced pain. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 104:13525-13530.
- Medzhitov, R. 2010. Inflammation: New adventures of an old flame. *Cell*, 140: 771-776.
- Melzack, R., Wall, P.D. 1965. Pain mechanisms: a new theory. *Journal Science*, 50: 971-979.
- Menseguez, P., Galetto, L., Anton, A.M. 2007. El uso de plantas medicinales en la población campesina de El Puesto (Córdoba, Argentina). *Kurtziana*, 33 (1). Volumen especial de Etnobotánica: 89-102.
- Meotti, F.C, Luiz, A.P., Pizzolatti, M.G., Kassuya, C.A., Calixto, J.B. Santos, A.R. 2006. Analysis of the antinociceptive effect of the flavonoid myricitrin:

- evidence for a role of the l-arginine–nitric oxide and protein kinase C pathways. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 316: 789-796.
- Millan, M.J. 1999. The induction of pain: an integrative review. *Progress in Neurobiology*, 57:1-164.
- Ministerio de Salud. 2013. Resolución N° 1817/2013. Buenos Aires, Argentina.
- Miranda, A. 1992. Dolor postoperatorio. 1ª ed., Barcelona: Jims.
- Mitchell, S., Cooper, C., Martyn, C., Coggon, D. 2000. Sensory Neural Processing in Work-related Upper Limb Disorders. *Occupational Medicine*, 50 (1): 30–32.
- Mojab, F., Kamalinejad, M., Ghaderi, N., Vahidipour, H.R. 2003. Phytochemical screening of some species of Iranian plants. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 2 (2): 77-82.
- Molfino, J.F. 1947. Las especies Argentinas de "tasi" o "doca". Apreciadas plantas galactógenas. *La Chacra* 16 (197): 74-75.
- Moncada, S., Palmer, R.M., Higgs, E.A. 1989. Biosynthesis of nitric oxide from l-arginine: a pathway for the regulation of cell function and communication. *Biochemical Pharmacology*, 38: 1709-1715.
- Moncada, S., Higgs, A., Furchgott, R. 1997. XIV International Union of Pharmacology Nomenclature in Nitric Oxide Research. *Pharmacological Reviews*, 49 (2): 137-142.
- Montanha, J.A., Schenkel, E.P., Cardoso-Taketa, A.T., Dresch, A.P. Langeloh A., Dallegrave, E. 2009. Chemical and anti-ulcer evaluation of *Jodina rhombifolia* (Hook. and Arn.) Reissek extracts. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 19 (1A): 29-32.
- Morales, R. 1996. Farmacología y Farmacognosia como Fuentes de Validación y Contraste en Etnobotánica. Monografías del Jardín Botánico ed. Córdoba 3: 93–98.
- Moreno-Murillo, B., De Morgensztern, C.M., Luque, J.E.Z., Fajardu, V.M. 1995. Alcaloides bisbencilisoquinolinicos aislados de la especie nativa *Berberis glauca* (hbk) y evaluación de su actividad anti alimentaria. *Rev. Colombiana de Química Bogotá*, 1 (24): 25-37.
- Mosmann T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65:55-63.
- Mota, I. 1994. The discovery of the relationship between mast cells, histamine and IgE. *Immunology Today*, 15: 242–245.
- Munford, R.S. 2006. Severe sepsis and septic shock: the role of gram-negative bacteremia. *Annual Review of Pathology*, 1 (1): 467-96.
- Muñoz-Martínez, E.J. 1998. Fisiología células, órganos y sistemas. Ediciones Científicas Universitarias. Secretaria de Salud. UNAM CINVESTAV México.
- Muriel, C., Madrid, J.L. 1994. Estudio y tratamiento del dolor agudo y crónico. 1ª ed. Madrid.
- Murray, W.J., Miller, J.W. 1960. Oxytocin-induced "cramping" in the rat. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 128: 372-379.
- Murray, A.P., Rodríguez, S.A., Murray, M.G. 2008. Antioxidant activity and chemical composition of essential oils from *Schinus fasciculata* (Griseb.) I.M. Johnston and *S. praecox* (Griseb.) Speg. *Natural Product Communications*, 3 (9): 1551–1556.

- Murray, A.P., Rodriguez S., Alza, N.P. 2012. Chemical Constituents and Biological Activities of Plants from the Genus *Schinus*. *Recent Progress in Medicinal Plants: Ethnomedicine and Therapeutic Validation*. Ed. J.N. Govil. Studium Press L. L. C. Houston, T. X, USA. 32(12): 261- 287.
- Najera, M.T. 1983. La herboristería en la República Argentina. *Acta Farm. Bonaerense* (2) 1: 55-9.
- Nascimento, F.P., Figueredo, S.M., Marcon, R., Martins, D.F., Macedo-Junior, S.J., Lima, D.A.N., Almeida, R.C., Ostroski, R.M., Rodrigues, A.L.S., Santos, A.R.S. 2010. Inosine reduces pain-related behavior in mice: involvement of adenosine A1 and A2A receptor subtypes and protein kinase C pathways. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 334: 590–598.
- Nathan, C., Ding, A. 2010. Nonresolving inflammation. *Cell*, 140: 871–882.
- Newman, D., Cragg, G., Snader, K. 2003. Natural products as sources of new drugs over the period 1981–2002. *Journal of Natural Products*, 66: 1022–1037.
- Nishizuka, Y. 1986. Studies and perspectives of protein kinase C. *Science*, 233: 305-312.
- Novara Lázaro, J. 2012. Herbario MCNS. Facultad de Ciencias Naturales. Universidad Nacional de Salta, Argentina 13 (2).
- Nucci, C., Mazzard M., L., Stramosk, J., Brethanha, L. C., Pizzolatti, M.G., Santos, A.R., Martins, D.F. 2012. Oleaginous extract from the fruits *Pterodon pubescens* Benth induces antinociception in animal models of acute and chronic pain. *Journal of Ethnopharmacology*, 143: 170–178.
- Nunes, B.C., dos Santos Garcia, J.B., Sakata, R.K. 2014. Morphine as first medication for treatment of cancer pain. *Brazilian Journal of Anesthesiology*, 64 (4): 236–240.
- Nworu, C.S., Akah, P.A. 2015. Anti-inflammatory medicinal plants and the molecular mechanisms underlying their activities. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 12: 52-61.
- Ody, P. 2017. *The complete medicinal herbal: A practical guide to the healing properties of herbs*. Skyhorse Publishing, New York, Estados Unidos.
- Okon, T. 2007. Ketamine: an introduction for the pain and paliative medicine physician. *Pain Physician*, 10 (3): 493-500.
- Omote, K., Kawamata, T., Kawamata, M., Namiki, A. 1998. Formalin-induced release of excitatory amino acids in the skin of the rat hindpaw. *Brain Research*, 787: 161–164.
- Organización Mundial de la Salud. 2002. Estrategia de la OMS sobre Medicina Tradicional 2002-2005. WHO/EDM/TRM/ 2002.1.Ginebra.
- Organización Mundial de la Salud. (2013). Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2014-2023.
- Ortega, A., Roca, A., Micó, J.A. 2002. Modelos animales de dolor. Una visión crítica. *Revista Sociedad Español del Dolor*, 9: 447-453.
- Osborn, A.E., Lanzotti, V. 2009. *Plant-derived natural products: synthesis, function, and application*. Springer (Ed.), New York, Estados Unidos.
- Onwukaeme, D.N., Ikuegbvweha, T.B., Asonye, C.C. 2007. Evaluation of phytochemical constituents, antibacterial activities and effect of exudate of *Pycnanthus Angolensis* Weld. Warb. (Myristicaceae) on corneal ulcers in rabbits. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 6 (2): 725-730.

- Pandey, M.K., Sung, B., Kunnumakkara, A.B., Sethi, G., Chaturvedi, M.M., Aggarwal, B.B. 2008. Berberine Modifies Cysteine 179 of I κ B α Kinase, Suppresses Nuclear Factor- κ B–Regulated Antiapoptotic Gene Products, and Potentiates Apoptosis. *Cancer Research*, 68(13): 5370–5379.
- Parada, C.A., Tambeli, C.H., Cunha, F.Q., Ferreira, S.H. 2001. The major role of peripheral release of histamine and 5-hydroxytryptamine in formalin-induced nociception. *Neuroscience*, 102: 937-944.
- Perena, M.J., Perena, M.F., Rodrigo-Royo, M.D., Romera, E. 2000. Neuroanatomy of pain. *Revista de la Sociedad Española del Dolor*, 7 (2): 5-10.
- Pérez-Alonso, N., Jiménez, E. 2011. Producción de metabolitos secundarios de plantas mediante el cultivo *in Vitro*. *Biotecnología Vegetal*, 4 (11): 195-211.
- Petrey, A.C., De la Motte, C.A. 2014. Hyaluronan, a crucial regulator of inflammation. *Frontiers in Immunology*, 5 (101): 1-13.
- Petrovska, B.B. 2012. Historical review of medicinal plants' usage. *Pharmacognosy Reviews*, 6 (11): 1–5.
- Pirillo A., Catapano, A.L., 2015. Berberine, a plant alkaloid with lipid- and glucose-lowering properties: from in vitro evidence to clinical studies. *Atherosclerosis*, 243: 449–461.
- Pirttila, T., Wilcock, G., Truyen, L., Damaraju, C.V. 2004. Long-term efficacy and safety of galantamine in patients with mild-to-moderate Alzheimer's disease: Multicenter trial. *European Journal of Neurology*, 11 (11): 734–741
- Pochettino, M.L. 2015. Botánica económica. Las plantas interpretadas según tiempo, espacio y cultura. Corrientes. Argentina. *Sociedad Argentina de Botánica*, 448.
- Prasain, J.K., Carlson, S.H., Wyss, J.M. 2010. Flavonoids and age-related disease: Risk, benefits and critical windows. *Maturitas*, 66 (2): 163–171.
- Premkumar, L.S, Ahern, G.P. 2000. Induction of vanilloid receptor channel activity by protein kinase C. *Nature*, 408: 985–990.
- Puig, S., Sorkin, L.S. 1996. Formalin-evoked activity in identified primary afferent fibers: systemic lidocaine suppresses phase-2 activity. *Pain*, 64: 345-55.
- Quigley, C. 2005. Clinical Review, The role of opioids in cancer pain. *British Medical Journal*, 331: 825-829.
- Raafata, K., El-Darrab, N., Saleh, F.A. 2019. Gastroprotective and anti-inflammatory effects of *Prunus cerasus* phytochemicals and their possible mechanisms of action. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, 4 (10): 345-353.
- Ragonese, A.E., Milano, V. 1984. Vegetales y sustancias tóxicas de la Flora Argentina. Enciclopedia Argentina de Agricultura y Jardinería. 2ª ed. Tomo II. Fascículo, 8-2. Ed. Acme.
- Rang, H.P., Urban, L. 1995. New molecules in analgesia. *British Journal of Anaesthesia*, 75: 145-156.
- Rao Manjeet, K., Ghosh, B. 1999. Quercetin inhibits LPS-induced nitric oxide and tumor necrosis factor- α production in murine macrophages. *International Journal of Immunopharmacology*, 21: 435-443.

- Rathera, M.A., Bhata, B.A., Qurishi, M.A. 2013. Multicomponent phytotherapeutic approach gaining momentum: Is the “one drug to fit all” model breaking down? *Phytomedicine*, 21: 1– 14.
- Rauf, A., Khan, R., Khan, H., Ullah, B., Pervez, S., 2014. Antipyretic and antinociceptive potential of extract/fractions of *Potentilla evestita* and its isolated compound, acacetin. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 14: 448.
- Rebholz, B., Kehe, K., Ruzicka, T., Rupec, R.A. 2008. Role of NF- κ B/RelA and MAPK Pathways in Keratinocytes in Response to Sulfur Mustard. *Journal of Investigative Dermatology*, 128(7): 1626–1632.
- Regal, L.M., Borges, A.A., García, J.A., Alvarado, M.L., Cedeño, V.J, Cuesta del Sol, J. 2015. Respuesta inflamatoria aguda. Consideraciones bioquímicas y celulares. *Revista Finlay* [revista en Internet]. [citado 2015 Abr 21]; 5(1):[aprox. 15 p.]. Disponible en: <http://revfinlay.sld.cu/index.php/finlay/article/view/329>
- Reiber, C., Brieger, A., Engelhardt, G., Hebel, S., Rink, L., Haase, H. 2017. Zinc chelation decreases IFN- β -induced STAT1 upregulation and iNOS expression in RAW 264.7 macrophages. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 44: 76–82.
- Reis, J., Guan, X.Q., Kisselev, A.F., Papasian, C.J., Qureshi, A.A., Morrison, D. C., Van Way, C.W., Vogel, S.N., Qureshi, N. 2011. LPS-induced formation of immuno- proteasomes: TNF- α and nitric oxide production are regulated by altered composition of proteasome-active sites. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 60: 77–88.
- Ridger, V.C., Greenacre, S.A., Handy, R. L., Halliwell, B., Moore, P.K., Whiteman, M., Brain, S.D. 1997. Effect of peroxynitrite on plasma extravasation, microvascular blood flow and nociception in the rat. *British Journal of Pharmacology*, 122 (6): 1083-1088.
- Rodin, B. E., Kruger, L. 1984. Deafferentation in animals as a model for the study of pain: An alternative hypothesis. *Brain Research Review*, 7: 213-228.
- Rodríguez, N.F., Pérez, J.A., Iglesias, J.C., Gallego R.M., Veiga B.L., Coteló, N. V. 2015. Actualidad de las plantas medicinales en terapéutica. *Acta Farmacéutica Portuguesa*, 4 (1): 42-52.
- Roth, S.H., 2013. Coming to terms with non-steroidal anti-inflammatory drug gastropathy. *Drugs*, 72: 873–879.
- Russo, C.M., Brose, W.G. 1998. Chronic pain. *Annual Review of Pathology*, 49: 123-133.
- Salvemini, D., Kim, S.F., Mollace, V. 2013. Reciprocal regulation of the nitric oxide and cyclooxygenase pathway in pathophysiology: relevance and clinical implications. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Complementary Physiology*, 304: R473–R487.
- Sam, R., 2008. Integrated pain management: using omega 3 fatty acids in a naturopathic model. *Techniques in Regional Anesthesia and Pain Management*, 12: 105–108.
- Sampietro, D.A., Belizan, M.M., Terán Baptista, Z.P., Vattuone, M.A., Catalán, C.A. 2014. Essential Oils from *Schinus* Species of Northwest Argentina: Composition and Antifungal Activity. *Natural Product Communications*, 9 (7): 1019–1022.

- Sato, K., Kiyama, H., Park, H.T., Tohyama, M. 1993. AMPA, KA and NMDA receptors are expressed in the rat DRG neurones. *Neuroreport*, 4: 1263–1265.
- Savithramma, N., Linga Rao, M., Suhurulatha, D. 2011. Screening of medicinal plants for secondary metabolites. *Middle-East Journal of Scientific Research*, 8 (3): 579-584.
- Sawynok, J., Liu, X.J. 2004. The formalin test: characteristics and usefulness of the model. *Reviews in Analgesia*, 7: 145-63.
- Scarpa, G.F. 2004. Medicinal plants used by the Criollos of Northwestern Argentine Chaco. *Journal of Ethnopharmacology*, 91(1): 115–135.
- Serra, H.A., Roganovich, J.M., Rizzo, L.F. 2012. Glucocorticoides: paradigma de medicina traslacional de lo molecular al uso clínico. *Medicina*, 2 (72): 158-170.
- Scholz, J., Woolf, C.J. 2002. Can we conquer pain? *Review Nature Neuroscience*, 5: 1062-1067.
- Sewell, R.D.E., Rafieian-Kopaei, M. 2014. The history and ups and downs of herbal medicines usage. *Journal of Herb Med Pharmacology*, 3 (1): 1-3.
- Shadfar, S., Hwang, C.J., Lim, M.S. y col. 2015. Involvement of inflammation in Alzheimer's disease pathogenesis and therapeutic potential of anti-inflammatory agents. *Archives of Pharmacal Research*, 38: 2106–2119.
- Sherrington, C.S. 1910. Flexion-reflex of the limb, crossed extension-reflex and reflex stepping and standing. *The Journal of Physiology*, 40: 28–121.
- Shibata, M., Ohkubo, T., Takahashi, H., Inoki, R. 1989. Modified formalin test: characteristic biphasic pain response. *Pain*, 38:347-352.
- Shin, J.S., Choi, H.E., Seo, S.H., Choi, J.H., Baek, N.I., Lee, K.T. 2016. Berberine decreased iNOS mRNA stability through negative regulation of HuR in LOS-induced macrophages. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 358 (1): 3–13.
- Serhan, C.N., Ward, P.A., Gilroy, D.W. 2010. Capítulo 1: Acute and chronic inflammation, en: *Fundamentals of inflammation*. Cambridge University Press (Ed.). New York, USA.
- Soberón, J.R., Sgariglia, M.A., Dip Maderuelo, M.R., Andina, M.L., Sampietro, D.A., Vattuone, M.A. 2014. Antibacterial activities of *Ligaria cuneifolia* and *Jodina rhombifolia* leaf extracts against phytopathogenic and clinical bacteria. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 5 (118): 599-605.
- Story, G.M., Peier, A.M., Reeve, A.J., Eid, S.R., Mosbacher, J., Hricik, T.R., y col. 2003. ANKTM1, a TRP-like channel expressed in nociceptive neurons, is activated by cold temperatures. *Cell*, 112: 819–829.
- Sugiyama, H., Ito, I., Hirono, C. 1987. A new type of glutamate receptor linked to inositol phospholipid metabolism. *Nature*, 325: 531-533.
- Sultana, S., Asif, H.M., Akhtar, N., Ahmad, K. 2014. Medicinal plants with potential antipyretic activity: a review. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 5 (1): 202–208.
- Szabó, C., Dawson, V.L. 1998. Role of poly (ADP-ribose) synthetase in inflammation and ischaemia reperfusion. *Trends in Pharmacological Sciences*, 19 (7): 287-298.
- Tabas, I., Glass, G.K. 2013. Anti-Inflammatory therapy in chronic disease: Challenges and opportunities. *Science*, 339: 166-172.
- Tasken, K., Aandahl, E.M. 2004. Localized effects of cAMP mediated by distinct routes of protein kinase A. *Physiological Reviews*, 84: 137–167.

- Takase, H., Yamamoto, K., Ito, K., Yumioka, E. 1993. Pharmacological studies on antidiarrheal effects of berberine and geranii herba, *Nihon yakurigaku zasshi. Folia Pharmacologica Japonica*, 102 (2): 101–112.
- Tang, H.B., Inoue, A., Oshita, K., Nakata, Y. 2004. Sensitization of vanilloid receptor 1 induced by bradykinin via the activation of second messenger signaling cascades in rat primary afferent neurons. *European Journal of Pharmacology*, 498: 37–43.
- Teves, M.R., Wendel, G.H. 2016. Actividad de los extractos acuosos liofilizados de hojas y corteza de *Jodina rhombifolia* (Hook. & Arn.) Reissek (Santalaceae) sobre el tránsito intestinal en ratones. *Spei Domus* 12 (25): 1-8.
- Teves, M.R., Pacheco, P.H., Bazán, C., Wendel, G.H. 2018. Diuretic activity of methanolic extracts from *Jodina rhombifolia* aerial parts on Wistar rats. *Journal of Pharmacy and Pharmacognosy Research*, 6(5): 402-411.
- Tjolsen, A., Berge, O.G., Hunskar, S., Rosland, J.H., Hole, K. 1992. The formalin test: an evaluation of the method. *Pain*, 51: 5-17.
- Tominaga, M., Wada, M., Masu, M. 2001. Potentiation of capsaicin receptor activity by metabotropic ATP receptors as a possible mechanism for ATP-evoked pain and hyperalgesia. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A*, 98: 6951– 6956.
- Toursarkissian, M. 1980. Plantas medicinales de la Argentina. Ed. Hemisferio Sur, Buenos Aires, Argentina: 116 - 178.
- Trongsakul, S., Panthong, A., Kanjanapothi, D., Taesotikul, T. 2003. The analgesic, antipyretic and anti-inflammatory activity of *Diospyros variegata* Kruz. *Journal of Ethnopharmacology*, 85: 221–225.
- Upwar, N., Patel, R., Waseem, N., Mahobia, N. 2010. Pharmacognostic Evaluation of stem of *Berberis aristata* DC. *Pharmacognosy Journal*, 17 (2): 5-9.
- Vandewalle, J., Luypaert, A., De Bosscher, K., Libert, C. 2018. Therapeutic mechanisms of glucocorticoids. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 29 (1): 42-54.
- Vignale, N.D., Pochettino, M.L. 2009. La investigación etnobotánica en la prospección de plantas medicinales in: Vignale, N.D. y M. L. Pochettino (eds.). 2009. Avances sobre plantas medicinales andinas. CYTED-RISAPRET. San Salvador de Jujuy. 9-21.
- Villar del Fresno, A.M^a. 1999. Farmacognosia General. Editorial Síntesis: España.
- Vivot, E.P., Sánchez, C., Cacik, F., Sequin, C. 2012. Actividad antibacteriana en plantas medicinales de la flora de Entre Ríos (Argentina). *Ciencia, Docencia y Tecnología*. Universidad Nacional de Entre Ríos, 23 (45): 165-185.
- Vos, B.P., Strassman, A.M., Maciewicz, R.J. 1994. Behavioral evidence of trigeminal pain following chronic constriction injury to the rat's infraorbital nerve. *Journal of Neuroscience*, 14: 2708-2723.
- Wang, Z.G., Chen, Z., Yang, S., Wang, Y., Huang, Z., Gao, J., Tu, S., Rao, Z., 2014. Berberine ameliorates collagen-induced arthritis in rats associated with anti-inflammatory and anti-angiogenic effects. *Inflammation*, 37: 1789-1798.
- Wang, K., Chaia, L., Fenga, X., Liua, Z., Liub, H., Dingb, L., Qiu, F. 2017. Metabolites identification of berberine in rats using ultra-high performance

- liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 139: 73–86.
- Wang, P., Yang, X., Liu, F., Liang, Y., Su, G., Tuerhong, M., Guo, Y. 2018. Nitric oxide inhibitors with a spiro diterpenoid skeleton from *Scutellaria formosana*: Structures, NO inhibitory effects, and interactions with iNOS. *Bioorganic Chemistry*, 76: 53–60.
- Weinstein, N.D., Rothman, A.J., Sutton, S.R. 1998. Stage theories of health behavior: Conceptual and methodological issues. *Health Psychology*, 17 (3): 290–299.
- Whittle, B.A. 1964. The use of changes in capillary permeability in mice to distinguish between narcotic and non-narcotic analgesics. *British Journal of Pharmacology and Chemotherapy*, 22: 246–253.
- Whittle, B.J. 1995. Nitric oxide in physiology and pathology. *Histochem Journal*, 27 (10): 727–37.
- Woolf, C.J. 2004. Pain: moving from symptom control toward mechanism-specific pharmacologic management. *Annals of Internal Medicine*, 140: 441–451.
- Woolf, C.J., Salter, M.W. 2000. Neuronal plasticity: increasing the gain in pain. *Science*, 288: 1765–1769.
- Yang, Y., Zhang, Z.Q., Li, S.P., Ye, X.L., Li, X.G., He, K. 2014. Synergy effects of herb extracts: Pharmacokinetics and pharmacodynamic basis. *Fitoterapia*, 92: 133–147.
- Yarla, N.S., Satyakumar, K., Srinivasu, D., Aliev, G., Dharmapuri, G., Putta, G.R.S., Jagarlapoodi, S., Bheeram, V., Sadu, S.P., Duddukuri, G.R. 2015. Phospholipase A2: A potential therapeutic target in inflammation and cancer (*in silico*, *in vitro*, *in vivo* and clinical approach). *Journal of Cancer Science and Therapy*, 7 (7): 249–252.
- Yeşilada, E., Küpeli, E. 2002. *Berberis crataegina* DC. root exhibits potent anti-inflammatory, analgesic and febrifuge effects in mice and rats. *Journal Ethnopharmacology*, 79: 237–248.
- Zhou, S., Bonasera, L., Carlton, S.M. 1996. Peripheral administration of NMDA, AMPA or KA results in pain behaviors in rats. *Neuro. Report*, 7: 895–900.
- Zimmermann, M. 1983. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain*, 16:109–110.