



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTINOCICEPTIVO DE EXTRACTOS ORGANICOS Y METABOLITOS ACTIVOS DE *Agastache mexicana* ssp. *xolocotziana* EN RATONES

T E S I S
M A N C O M U N A D A

PARA OBTENER EL TITULO DE

BIÓLOGO

P R E S E N T A N:

**ALEJANDRA CORTÉS ZAMORA
JAZMÍN VERANO BLAS**

DIRECTOR DE TESIS: DRA. MARÍA EVA GONZÁLEZ TRUJANO

ASESOR INTERNO: DRA. EVA AGUIRRE HERNÁNDEZ

MÉXICO, D.F.

2010



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México.

Por la formación académica en la Facultad de estudios superiores Zaragoza por ser nuestro segundo hogar y a cada uno de nuestros profesores las enseñanzas obtenidas.

Al Instituto Nacional de Psiquiatría Juan Ramón de la Fuente Muñiz.

Por la facilidades para usar instalaciones para la realización de este trabajo

Al laboratorio de Microdiálisis.

Por la oportunidad y el apoyo brindado para la realización de este trabajo

A CONACYT, PROBEI y PRONABES

Por las becas brindadas que ayudaron de gran manera para la culminación de este trabajo.

A Nuestros sinodales.

Por el tiempo dedicado y las observaciones realizadas para el mejoramiento de nuestro trabajo.

Alejandra Cortés Zamora agradece y dedica este trabajo a:

A **Dios** por haberme bendecido una y otra vez durante la travesía en la escuela.

A mi papa **Enrique** por haberse esforzado tanto en darme una carrera, una vida confortable y por haberme protegido siempre.

A mi mama **Socorro** por ser la mujer más importante en mi vida, por haber creído siempre en mí y jamás dejar que me derrotara a mí misma, por su fuerza, sus lagrimas, alegría, por ser una luchadora, por tener siempre un consuelo y esperanza en su corazón, por ser hermosa y porque es todo para mí.

A mi hermana **Rosalba** por ser un pilar en mi vida, por dejarme crecer junto a ella, por jamás perder la fe en mí, por ayudarme en todo, siempre apoyarme y por ser una magnífica mujer.

A mi hermano **Sergio** por su ejemplo y por su ayuda durante mi camino por la universidad.

A **Zenaida** por comenzar y acompañarme en esta aventura. Por su compañía, amistad, cariño, por tantas risas, momentos memorables y por compartir su adolescencia conmigo.

A **Víctor** por enseñarme a ser mejor persona, por hacer la diferencia y brindarme tantas cosas: cariño, amor, amistad, alegría. Pero sobre todo por llenar de cosas buenas mi travesía por la universidad.

A **Jazmín** por cumplir un sueño conmigo, por quererme, por ser mi amiga y por todo lo que me ha dado.

A **Gloria** y **Ricardo** por ser mis amigos y por tantas aventuras y buenos recuerdos que vivimos juntos.

A la Dra. **Eva González Trujano** y a la Dra. **Eva Aguirre Hernández** por ser ejemplos a seguir, por haberme brindado una oportunidad tan grande y haber compartido tantos conocimientos conmigo y Jazmín. Por inculcar en mí el amor a la investigación y la ciencia.

A la Dra. **Leonora Sánchez** por jamás poner límites en la investigación, por la disponibilidad y la enseñanza que confió en mí, por ser un ejemplo y una gran profesora.

A la Mtra. **Ana Laura Martínez Martínez** por ser una gran persona y por el apoyo brindado durante mi estadía en el laboratorio.

Gracias a todos sin ustedes no lo había logrado.

Jazmín Verano, agradezco y dedico este trabajo a:

A dios

Por haberme dado todo lo necesario para seguir adelante y nunca dejarme sola.

A mi hija *Avril*

Por la comprensión y amor que me brindas incondicionalmente, porque eres lo más hermoso que tengo en la vida y por ser ese motor que me impulsa día a día a ser mejor.

A mi madre

Por haberme dado la vida, por el infinito amor que siempre me has demostrado, por tu comprensión, paciencia y ayuda a lo largo de mi carrera, por siempre estar conmigo y porque nunca dejaste de creer en mí.

A mi padre

Porque siempre has sido para mí un ejemplo a seguir, por el gran amor que me has dado, por los consejos tan valiosos que siempre me das, por tu apoyo, comprensión y paciencia durante toda mi carrera.

A mis hermanos

Maximino, Primavera y su esposo Víctor, por su gran apoyo moral y económico, por el cariño que siempre me han demostrado y por estar conmigo a pesar de las adversidades, a Sahara y Aarón por su cariño, comprensión y ayuda que me han dado y para que sea un ejemplo a seguir durante su vida, sabiendo que con el cariño y apoyo que nos da la hermosa familia que tenemos podemos lograr cualquier cosa.

Los amo.

A la Dra. María Eva González Trujano y a la Dra. Eva Aguirre Hernández

Por su apoyo, confianza, comprensión, paciencia, los conocimientos transmitidos y por la oportunidad de pertenecer a su equipo de trabajo, por las recomendaciones brindadas que fueron vitales para la en la realización de este trabajo.

A mis amigos

Alejandra, por su confianza, comprensión y paciencia para realizar juntas este trabajo, a Mariel, Jesús, Recaredo y José W., por su amistad sincera y por su apoyo incondicional que me han brindado durante muchos años.

A la Mtra. Ana Laura Martínez Martínez

Por ser una excelente persona y compartir su conocimiento durante la estancia en el laboratorio de microdiálisis.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
2. MARCO TEÓRICO	3
2.1. Dolor	3
2.1.1. Epidemiología	3
2.1.2. Definición	4
2.1.3. Clasificación	4
2.1.4. Nocicepción	8
2.1.4.1. Nociceptores.....	10
2.1.5. Fármacos usados en el tratamiento del dolor.....	12
2.1.6. Modelos animales para el estudio del dolor.....	16
2.1.6.1. Prueba de estiramiento abdominal (“WRITHING TEST”)	18
2.2. La herbolaria en México.....	19
2.2.1. Botánica del género <i>Agastache</i>	21
2.2.1.1. Distribución del género <i>Agastache</i> en México.....	25
2.2.1.2. Usos medicinales del <i>Agastache mexicana</i>	26
2.2.1.3. Metabolitos secundarios aislados del género <i>Agastache</i>	27
3. JUSTIFICACIÓN.....	34
4. HIPÓTESIS.....	35
5. OBJETIVOS.....	36
5.1. Objetivo general	36
5.2. Objetivos particulares	36
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	37
6.1. Diagrama de flujo.....	37
6.2. Identificación y procesado del material vegetal.....	38
6.3. Obtención de extractos	38
6.4. Fraccionamiento del extracto activo.....	39
6.5. Purificación e identificación de los compuestos activos.....	40
6.6. Evaluación farmacológica.....	41
6.6.1. Animales utilizados	41
6.6.2. Preparación de extractos, subfracciones y/o compuestos o fármacos.....	41
6.6.3. Evaluación de la actividad antinociceptiva	42
6.7. Análisis estadístico.....	43
6.8. Determinación de la DL ₅₀	43
7. RESULTADOS	44
7.1. Obtención de los extractos.....	44
7.2. Fraccionamiento del extracto activo y purificación e identificación de los compuestos activos.....	44
7.3. Evaluación farmacológica.....	46
7.4. Determinación de la DE ₅₀	52
7.5. Determinación de la DL ₅₀	53
8. DISCUSIÓN.....	54
9. CONCLUSIÓN	59
10. PERSPECTIVAS	59
11. BIBLIOGRAFÍA.....	60

ABREVIATURAS

A	Acetina
AAS	Ácido acetilsalicílico
ABC	Área bajo la curva
AcOEt	Acetato de etilo
AE	Estándar de acetina
AINEs	Antiinflamatorios no esteroides
ANDEVA	Análisis de varianza
CC	Cromatografía en columna
CCF	Cromatografía en capa fina
AS	Ácido salicílico
COX	Ciclooxigenasa
DL ₅₀	Dosis letal cincuenta
DE ₅₀	Dosis efectiva cincuenta
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
GMPc	Monofosfato de guinina cíclico
Hex	Hexano
IASP	Asociación internacional para el estudio del dolor
ip	Intraperitoneal
MeOH	Metanol
ND	No determinado
ON	Oxido nítrico
P.F.	Punto de fusión
PgS	Prostaglandinas
SNC	Sistema nervioso central

S.S.	Solución salina
SW	Swiss webster
T/A	Mezcla de tilianina/acacetina
U/A	Mezcla de ácido ursólico/acacetina
UE	Estándar ácido ursólico

1. INTRODUCCIÓN

El empleo de las plantas medicinales con fines curativos es una práctica que se ha utilizado desde tiempo inmemorial. Durante mucho tiempo, los remedios naturales, y sobre todo las plantas medicinales, fueron el principal e incluso el único recurso de que disponían los médicos. Esto hizo que se profundizara en el conocimiento de las especies vegetales que poseen propiedades medicinales y ampliar sus experiencias en el empleo de los productos que de ellas se extraen.

Muchas de las especies vegetales utilizadas por sus virtudes curativas entre los antiguos egipcios, griegos y romanos pasaron a formar parte de la Farmacopea Medieval, que más tarde se vio enriquecida por el aporte de los conocimientos del Nuevo Mundo.

En México el uso de plantas medicinales del género *Agastache* ha sido muy popular, ya que se puede encontrar gran diversidad de especies. *Agastache mexicana* se divide en las dos subespecies: *A. mexicana* (H. B. K.) Lint & Epling *subsp. mexicana* Bye, Linares & Ramamoorthy, y *A. mexicana* (H. N. K.) Lint & Epling *subsp. xolocotziana* Bye, Linares & Ramamoorthy, conocidos en la medicina tradicional como “toronjil morado” y “toronjil blanco”, respectivamente (Bye et al., 1987).

Cabe mencionar que el “toronjil blanco” (*Agastache mexicana ssp. xolocotziana*) suele ser preparado en infusión sólo o junto con “toronjil morado” (*Agastache mexicana*). La infusión de ambas plantas suele combinarse con *Dracocephalum moldavica* L. (“toronjil azul”), dicha composición es llamada “los tres toronjiles” y es usada en la medicina tradicional mexicana para tratar afecciones del sistema nervioso (Linares et al., 1988; 1995).

A pesar del amplio uso en la medicina tradicional que se hace de estas especies, no existen estudios científicos que corroboren su actividad terapéutica y mucho menos que identifiquen los metabolitos secundarios involucrados en dicha actividad. En el presente proyecto de tesis se propone realizar la valoración de las propiedades terapéuticas de la especie *A. mexicana* ssp. "toronjil blanco" en un modelo experimental de dolor visceral. Además se identificarán algunos de los principales componentes activos mediante un fraccionamiento biodirigido del extracto con mayor actividad antinociceptiva.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Dolor

A través de los últimos cincuenta años, el tema del dolor y su tratamiento ha alcanzado un reconocimiento mundial, no solamente como una especialidad de la medicina, sino como un tema importante para la investigación científica y el análisis filosófico. Como consecuencia de dicho interés, su estudio y desarrollo ha sido considerado desde la perspectiva de diversas disciplinas, con el fin de progresar en el entendimiento científico y humanitario de esa condición y consecuentemente optimizar su tratamiento (Nava, 2008).

2.1.1. Epidemiología

El dolor crónico afecta a la salud física y psicológica del que lo padece, con repercusiones sobre las actividades diarias, autonomía, el empleo y el bienestar económico (Smith y Elliot, 2001; González y Condón, 2000). Un estudio mexicano señala que el 26% de la población sufre de alguna forma de dolor crónico (Breivik, 2006). La prevalencia del dolor crónico en Estados Unidos es del 35% (105 millones de habitantes), siendo principalmente problemas de origen osteoarticular, lumbalgias, migrañas y cáncer.

En el caso de México, tan sólo la población con dolor crónico que es atendida en la Clínica del Dolor y Cuidados Paliativos del Hospital General de México, de la ciudad de México, sumó más de 10 mil pacientes en el año 2003 (Barragan, 2005).

2.1.2. Definición

La enorme complejidad y multitud de aspectos y variantes que presenta el dolor hace difícil su definición. Todos sabemos perfectamente a qué nos referimos cuando hablamos de qué es el dolor, y sin embargo, no significa lo mismo para ninguno de nosotros (Timoneda, 1996). El dolor es la modalidad somestésica más importante para nuestra propia supervivencia, es un sistema de alarma que se dispara en situaciones de peligro y quizá por ello los mecanismos implicados en su procesamiento son muy variados y complejos. La definición más aceptada actualmente es la de la Asociación Internacional para el Estudio del Dolor (IASP): “dolor es una experiencia sensorial y emocional desagradable, asociada con un daño tisular, real o potencial, o descrita en términos de dicho daño”. (IASP, 1979).

2.1.3. Clasificación

Inicialmente, el dolor se ha dividido en dos clases principales: dolor agudo y dolor sordo. El dolor agudo se percibe alrededor de 0.1 segundos después de aplicar un estímulo doloroso, mientras que el sordo tarda 1 segundo o más en aparecer y luego aumenta lentamente de intensidad durante muchos segundos o incluso minutos. El dolor agudo recibe también otros nombres, como dolor intenso, dolor punzante y dolor eléctrico. El dolor agudo no se percibe en casi ningún tejido profundo del cuerpo. El dolor sordo también se conoce por otros muchos nombres, como dolor pulsátil, dolor nauseoso y dolor crónico. Esta clase de dolor suele acompañarse de destrucción de los tejidos y provoca a veces un sufrimiento prolongado e insoportable puede observarse en la piel y en casi todos los órganos o tejidos profundos (González y Condón, 2000).

La diferencia entre el dolor agudo y crónico se realiza más que en función del factor de tiempo en base a los distintos mecanismos fisiopatológicos que los originan. El dolor agudo es la consecuencia inmediata de la activación del sistema nociceptivo, generalmente por un daño tisular somático o visceral, desapareciendo habitualmente con la lesión que lo originó. El dolor crónico es aquel que persiste en ausencia de la lesión periférica inicial (González y Rodríguez, 2003; Villoria, 2002; Bardina y Martínez, 2003).

Además de su clasificación cronológica: Duración/Temporalidad como agudo o crónico. El dolor se puede clasificar de acuerdo a su topografía o localización; o bien, patogenia o causa desencadenante (Cassinello, 2004; González y Rodríguez, 2003; Bardina y Martínez, 2003).

Dolor según la topografía: Localización

- Dolor Somático

Se localiza con precisión, en general, aparece en el lugar donde produjo el daño tisular, superficial o profundo. Suele ser agudo y bien definido, de origen cutáneo o más profundo en zonas músculo-esqueléticas, huesos, cartílagos, vasos, pleura y peritoneo. El dolor óseo es el más frecuente en pacientes oncológicos.

- Dolor Visceral

Variedad de dolor profundo, deslocalizado, sordo, se irradia de forma difusa, a veces distante de la zona afectada original. El cuadro álgido oscila desde simples molestias a dolor muy intenso. Hay ocasiones en que grandes destrucciones de un órgano no se acompañen de dolor importante (pulmón). Puede ser también intermitente; en abdomen, en la obstrucción de víscera hueca, es frecuente el tipo cólico, en sacudidas, espasmódico. Se suele acompañar de cortejo vegetativo, respuestas reflejas respiratorias

o vasculares, contracturas y a veces desproporcionadas. Componente emocional intenso. Se precisan de estímulos potentes para ser percibidos como dolor. Se producen por activación de nociceptores (infiltración, compresión, distensión: estímulos mecánicos, por inflamación ó estimulación de quimiorreceptores). El dolor visceral responde bien a opioides (Cassinello y , 2004; Bardina, 2003; González y Rodríguez, 2003; Magazo y Murillo, 2006).

El dolor visceral se irradia o se refiere a otras áreas. Es difícil su localización, se acompaña de náuseas y síntomas autónomos (Villoria y Madrid, 1994). El dolor procedente de las distintas vísceras abdominales o torácicas es uno de los pocos criterios que se pueden utilizar para diagnosticar la inflamación, enfermedades u otras dolencias viscerales.

La víscera no posee receptores sensoriales para ninguna otra clase de sensaciones más que para el dolor (Fields y Martin, 1994). Cualquier estímulo que excite las terminaciones nerviosas del dolor en áreas difusas de la víscera produce dolor visceral. Estos estímulos son la isquemia del tejido visceral, las lesiones de naturaleza química de la superficie de la víscera, el espasmo de la musculatura lisa de una víscera hueca y la distensión de los ligamentos (Fields y Martin, 1994).

Todos los dolores viscerales verdaderos que se originan en la cavidad torácica y abdominal se transmiten fundamentalmente a través de las fibras nerviosas que conducen el dolor y que discurren con los nervios del sistema nervioso autónomo, sobre todo con los nervios simpáticos. Estas fibras nerviosas son fibras pequeñas de tipo C y, por tanto, pueden transmitir solamente el dolor de tipo crónico-sordo (lento) de sufrimiento (Fields y Martin, 1994).

Patogenia ó causa desencadenante:

A) *Dolor Nociceptivo*

Por estimulación anormal de nociceptores periféricos somáticos o viscerales (superficiales o profundos), por procesos inflamatorios diversos, se conducen por vías nerviosas específicas hasta alcanzar el tálamo y corteza cerebral (Cassinello, 2004; González y Rodríguez, 2003; Bardina, 2003; Magazo y Murillo, 2006).

B) *Dolor Neurogénico / Neuropático*

Estaría originado por una lesión, estímulo directo ó disfunción del SNC o de nervios periféricos. El dolor neurogénico suele ser continuo, lacerante, como sensación quemazón, torsión, arrancamiento. También se desarrollan paroxismos álgidos, episódicos, como descargas eléctricas. El dolor puede ser desencadenado por estímulos que habitualmente no lo producen. También el dolor se puede presentar de forma espontánea. Por otra parte, puede existir un dolor mantenido por el sistema simpático, conocido como distrofia simpática refleja, expresado como cambios vasomotores en una zona dolorosa y/o cambios tróficos (Cassinello, 2004; González y Rodríguez, 2003; Bardina y Matènez, 2003; Magazo y Murillo, 2006; Tojar y Sánchez, 2001; Díaz-Rubio y Casado, 2003; Sánchez y Cruz, 2003; Tres y Perez, 2003).

C) *Dolor Psicógeno*

Es un tipo de dolor complejo, mediatizados por la angustia, el miedo y la ansiedad del enfermo. Exploración física del paciente suele ser normal y las pruebas complementarias resultan negativas. El dolor no responde a tratamiento analgésico habitual y no existe ningún paralelismo entre dolor y lesión. Se denomina también como dolor psico-social, se caracteriza por un aumento constante de dosis analgésicas con escasa o nula eficacia.

Frecuentemente se detectan conflictos familiares sin resolver, soledad, miedos, inadaptación.

Suele ser un diagnóstico por exclusión, pero debe ser constatado por un examen psicopatológico significativo (Cassinello, 2004; González y Rodríguez, 2003; Bardina y Martínez, 2003; Sanz y Centeno, 2001).

D) Dolor Inflamatorio.

Después de cualquier lesión mayor que un daño menor, se produce dolor inflamatorio, el cual persiste hasta que la lesión sana. La aplicación de un estímulo que solo debiera ocasionar un dolor menor en el área lesionada produce una respuesta exagerada (hiperalgesia) y los estímulos que serían inocuos en condiciones normales, como el tacto, producen dolor (alodinia). La inflamación de cualquier tipo induce la liberación de muchas citocinas y de distintos factores de crecimiento en el área inflamada. Muchas de estas sustancias facilitan la percepción y transmisión en las áreas cutáneas y en el asta dorsal. Esto es lo que causa hiperalgesia y alodinia (Villoria y Madrid, 1994).

2.1.4 Nocicepción

En lo que se refiere a sensibilidad dolorosa, los receptores para el dolor se denominan nociceptores ya que la expresión fisiológica para decir dolor, es nocicepción. La nocicepción es el concepto fisiológico referido a la transducción (conversión de una energía determinada en un receptor específico convirtiéndola en un potencial generador) y conducción de la sensación dolorosa (Guyton, 1996).

La nocicepción refiere al potencial de un estímulo para producir una lesión del tejido y una reacción del organismo. Los sistemas sensoriales tienen el papel de informar al cerebro sobre el estado del ambiente externo y el ambiente interno del organismo. El término nocicepción fue introducido a principios del siglo XX, este término descende del latín “*nocere*” daño, dicho término tiene tres funciones: 1) advierte de la existencia de daño en los tejidos, 2) para advertir de la probabilidad de que ocurra algún daño en los tejidos, 3) advierte de daño general al individuo (Dennis y Melzack, 1983).

Es así que el fenómeno de detección, transducción y transmisión de un estímulo nocivo se denomina nocicepción. Los estímulos térmicos, mecánicos o químicos capaces de producir daño tisular, son captados por receptores específicos llamados nociceptores, que los transmiten en forma de impulsos nerviosos a la médula por medio de fibras nerviosas aferentes. Desde la médula ascienden vías que conducen la información a centros supraespinales y desde éstos hasta la corteza cerebral, donde la sensación dolorosa se hace consciente (Guyton, 1996).

En las diferentes fibras nerviosas que componen los nervios periféricos se pueden distinguir tres grupos: A, B y C en función de su diámetro, grado de mielinización y velocidad de conducción. Las de tipo A son fibras gruesas, mielínicas, de conducción rápida, que transportan sensaciones somáticas. Dentro de éstas, las del tipo A δ , son fibras mielínicas de pequeño diámetro que conducen a una velocidad de 12-30 m/s, y transportan las sensaciones de temperatura y dolor recogidas por los mecanorreceptores de alto umbral y los receptores térmicos. La estimulación de las fibras A δ , produce el dolor inicial, de carácter agudo, punzante, localizado y de inicio rápido (Cingolani y Houssay, 2000).

Las fibras de tipo C son amielínicas, de conducción lenta (0.2-2 m/s) y llevan sensibilidad al dolor y temperatura procedente de los nociceptores polimodales. Las fibras C median el denominado dolor lento, de carácter insidioso, difuso, mal localizado y que se prolonga más allá de la duración del estímulo. Las fibras A δ y C están presentes en la piel y en estructuras viscerales y somáticas profundas (Cingolani y Houssay, 2000).

2.1.4.1 Nociceptores

Todos los receptores del dolor son terminaciones nerviosas libres (nociceptores), su característica fundamental es que responden a estímulos que por su intensidad son capaces de lesionar los tejidos, pero no responden a estímulos de mediana o baja intensidad (Ganong, 2006). Se han encontrado nociceptores en las capas superficiales de la piel, en estructuras profundas como el periostio y superficies articulares, y en vísceras como el corazón o la vesícula biliar.

Existen tres tipos de nociceptores: mecanorreceptores de alto umbral, nociceptores térmicos y nociceptores polimodales. Los dos primeros, localizados en piel y mucosas, responden a un solo tipo de estímulo: mecánico intenso o térmico, respectivamente. Ambos transmiten la información a la médula por axones finamente mielinizados, que forman las fibras A δ . Los nociceptores polimodales responden a la presión, temperatura, estímulos químicos, etc; se encuentran en piel, tegumentos y paredes viscerales y transmiten los impulsos a través de fibras C amielínicas (Guyton, 1996).

Cuando el dolor se prolonga y se daña el tejido, se facilitan y reorganizan las vías centrales nociceptivas (Villoria y Madrid, 1994). Los nociceptores pueden ser excitados por medios mecánicos o químicos (Fields y Martin, 1994). Las sustancias que producen la sensación dolorosa, como la histamina o las cininas, estimulan directamente las terminaciones nerviosas, mientras que las prostaglandinas (Pgs) reducen el umbral del dolor al aumentar la sensibilidad de los receptores al estímulo (Breivik, 2006).

Por otro lado, a los nociceptores se les puede clasificar a su vez en cutáneos, viscerales, musculares y articulares. Los cutáneos son subdivididos en dos tipos:

A) Mecanonociceptores. Son terminaciones libres de fibras mielínicas finas tipo A δ . Responden a estímulos mecánicos muy intensos. No responden a estímulos térmicos o químicos salvo que hayan sido sensibilizados previamente.

B) Nociceptores polimodales. Son activados por varias clases de estímulos dolorosos: mecánicos, térmicos y químicos. Son terminaciones libres de fibras amielínicas finas tipo C (Ganong, 2006).

En lo que respecta a los nociceptores viscerales, musculares y articulares, se sabe que los receptores viscerales son también terminaciones libres (fibras A δ) que se ubican en las paredes de las vísceras huecas, en las fascias, alrededor de los vasos sanguíneos y en la duramadre. También hay receptores polimodales (fibras C) en algunas vísceras como el corazón (Ganong, 2006). En las articulaciones hay meconociceptores que se distribuyen en el periostio de los huesos, en la cápsula articular y de los tendones, ligamentos y fascias. Mientras que en los músculos se encuentran terminaciones libres de fibras tipo III (equivalentes a las A δ) y IV (equivalentes a fibras C) (Ganong, 2006).

2.1.5. Fármacos usados en el tratamiento del dolor

La farmacología es la ciencia que se encarga del estudio unificado de las propiedades de las sustancias químicas y de los organismos vivos y de todos los aspectos de sus interacciones, orientada en sí hacia el tratamiento, diagnóstico y prevención de las enfermedades. El enfoque del paciente con dolor debe ser holístico (multifactorial) y multidisciplinario, y debe hacer énfasis no sólo en el componente nociceptivo, sino también en el afectivo-emocional y conductual. Con independencia de que el tratamiento más eficaz es el etiopatogénico, y considerando que éste no va a ser posible en todos los pacientes, podemos establecer diversos tratamientos. Hay varias clases de tratamientos del dolor: cognitivo conductual, farmacológico, físico, quirúrgico, estimulación eléctrica y acupuntura (Vázquez et al., 2004).

La O.M.S. propone clasificar a los fármacos en tres grupos:

- Grupo 1: Analgésicos de acción periférica*
- Grupo 2: Analgésicos centrales débiles*
- Grupo 3: Analgésicos centrales fuertes* (Montoro et al., 2003).

Ello depende de los mecanismos de acción que se involucran en el efecto analgésico de estos fármacos en el organismo. Para los analgésicos de acción periférica se incluyen principalmente (Montoro et al., 2003):

- Inhibición de la síntesis de Prostaglandinas: Prostaglandinsintetasa ó cicloxigenasa
- Inhibición reversible/no reversible
- Isoformas de la cicloxigenasa (COX-1, constitutiva esencial; COX-2, inducible)
- Inhibición de la Fosfolipasa C, Lipoxigenasa (Fig. 1).

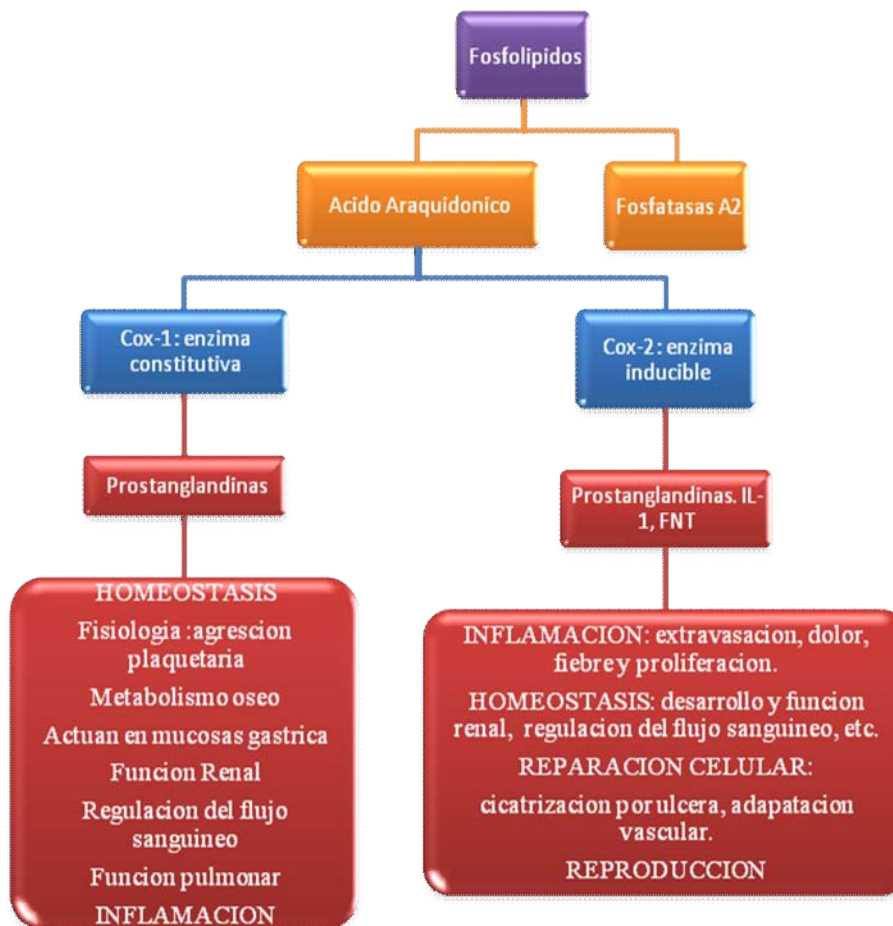


Figura 1. Función de los analgésicos de acción periférica (Montoro et al., 2003).

Entre los fármacos que producen efectos terapéuticos como analgésico, antiinflamatorio, antipirético, antiagregante plaquetario e inhibidor de la regulación, los más destacados son:

- Salicilatos: AAS, AS Lisina, Triflusal
- Pirazonas: Metamizol
- Paraminofenol: Paracetamol
- Indoles: Indometacina, Sulindac
- Acido Acético:
- Arilacético: Diclofenaco, Aceclofenaco
- Pirrolacético: Ketorolaco
- Fenamatos
- Acido Propiónico: Ibuprofeno, Naproxeno, Flurbiprofeno
- Oxicamas: Piroxicam

- Naftilalcanonas: Nabumetona
- Coxibs: Celecoxib, Etoricoxib, Parecoxib, Valdecoxib (Montoro et al., 2003).

Para los analgésicos centrales de tipo opioide, en su mecanismo de acción se consideran:

Interacción con los receptores específicos del SNC:

Mu: Analgesia supra-espinal, miosis, depresión respiratoria, dependencia física y euforia. (mu1: analgesia supra-espinal; mu2: depresión respiratoria)

Kappa: Analgesia espinal, ligera depresión respiratoria, miosis y sedación

Delta: Analgesia supra-espinal, actividad sobre músculo liso gastrointestinal

Épsilon: Aún no se han descrito las acciones que desencadena su activación

Sigma: Disforia, alucinaciones, estimulación respiratoria, y vasomotora.

Entre los opiáceos fuertes se puede mencionar a la morfina. Sin embargo, los efectos terapéuticos del dolor se asocian con efectos secundarios, tales como:

- Tolerancia: Descenso del efecto de un fármaco administrado a largo plazo.
Relevancia clínica: Es importante distinguir entre tolerancia a la analgesia y tolerancia a los efectos secundarios.
- Dependencia física: Adaptación fisiológica del organismo a la presencia de un opioide. Se relaciona con el desarrollo del síndrome de abstinencia cuando se discontinúan los opioides, se reduce súbitamente la dosis, o se administra un antagonista (Naloxona) o un agonista-antagonista (Buprenorfina).

- Adicción: la adicción es el uso compulsivo de drogas sin motivos médicos, y se manifiesta por un fuerte deseo de consumir drogas para inducir cambios de ánimo, no el alivio del dolor (Montoro et al., 2003).

Entre los *analgésicos centrales débiles u opiáceos débiles* se pueden mencionar:

Codeína

- Derivado de la morfina, menor potencia analgésica, menor depresora del SNC y ninguna capacidad de inducir farmacodependencia
- Efectos secundarios: Náuseas, vómitos, mareos, vértigo, somnolencia y estreñimiento

En el tratamiento del dolor de moderado a intenso se suelen utilizar:

- Codeína
- Dihidrocodeína
- Buprenorfina
- Tramadol (Montoro et al., 2003).

Coadyuvantes. Los medicamentos coadyuvantes o adyuvantes son usados para aumentar la eficacia analgésica de los opioides, también permiten adicionar ciertas drogas que actúan sobre el componente psicofísico que concierne al dolor. Los más utilizados son los siguientes:

- Antidepresivos (Amitriptilina)

- Benzodiazepinas (Diazepam, Bromazepan, Lorazepam, Clonazepam)
- Neurolépticos (Haloperidol, Clorpromazina, Prometazina)
- Anticonvulsivantes (Carbamacepina, Fenitoína, Gabapentina)
- Corticoides (Prednisona, Dexametasona) (Montoro et al., 2003).

2.1.6. Modelos animales para el estudio del dolor

La meta de los modelos animales es la comprensión del dolor agudo en seres humanos, haciendo referencia a través de experimentos análogos en diferentes animales. Estos modelos hacen necesario el uso de estímulos para provocar la sensación requerida, para que los estímulos sean confiables tienen que ser cuantificables, reproducibles y no muy invasivos (Le Bars et al., 2001).

En este sentido, un modelo de dolor es el procedimiento por el cual se valora la reacción de un animal ante un estímulo nocivo de naturaleza variada o situación patológica inducida que puede ser utilizado en circunstancias fisiológicas o patológicas (Ortega et al., 2002).

Existen una gran variedad de modelos experimentales de dolor como se puede observar en la tabla 1.

Tabla 1. Modelos experimentales de dolor.

-
-
1. Modelos de dolor con estímulos de corta duración (dolor fásico o agudo)
 - 1.1. Pruebas basadas en un estímulo térmico
 - 1.1.1. Prueba "Paw withdrawal"
 - 1.1.2. Prueba "Hot plate"
 - 1.1.3. Prueba "Cold plate"
 - 1.2. Pruebas basadas en un estímulo mecánico
 - 1.2.1. Métodos de presión constante
 - 1.2.2. Métodos de presión creciente
 - 1.3. Pruebas basadas en un estímulo eléctrico
 - 1.3.1. Pruebas que utilizan descargas eléctricas largas
 - 1.3.1.1. Cola
 - 1.3.1.2. Pata
 - 1.3.2. Pruebas que utilizan choque eléctricos o descargas eléctricas cortas
 - 1.3.2.1. Cola
 - 1.3.2.2. Pulpa dental
 - 1.3.2.3. En extremidades en animales descerebrados
 2. Modelos de dolor con estímulos de larga duración (dolor tónico o crónico)
 - 2.1. Estimulación a órganos huecos
 - 2.1.1. Colón
 - 2.1.1.1. Formalina en colón de rata
 - 2.1.1.2. Glicerol en colón de rata
 - 2.1.2. Útero
 - 2.2. Inyección intraperitoneal de sustancias irritantes o "Writhing test"
 - 2.2.1. Ácido acético
 - 2.2.2. Ácido etacrínico
 - 2.2.3. Adrenalina
 - 2.2.4. Benzoquinona
 - 2.2.5. p-Benzoquinona
 - 2.2.6. Cloruro de potasio
 - 2.3. Inyección intradermal
 - 2.3.1. Capsaicina
 - 2.3.2. EDTA
 - 2.3.3. Formalina
 - 2.3.4. Salina hipertónica
-
-

2.1.6.1 Prueba de estiramiento abdominal (“WRITHING TEST”)

En cuanto a la estimulación química, ésta involucra la administración de agentes químicos que representan un estímulo lento que a su vez este es progresista y de una duración más larga con un carácter ineludible una vez aplicado. Este tipo de estímulo marca su diferencia no solo en tiempo si no porque es uno de los más apegados al dolor clínico debido al umbral que presentan y también a su naturaleza física, un ejemplo de este estímulo es el modelo visceral, en el cual se realiza la inyección intraperitoneal de un agente irritante, prueba conocida como “writhing” (Le Bars et al., 2001).

La administración intraperitoneal en membranas serosas provoca un comportamiento muy estereotipado en el ratón, que se caracteriza por contracciones abdominales, movimientos del cuerpo como un todo (en especial de las patas traseras), la torsión de los músculos dorso-abdominales y una reducción en actividad motora y la coordinación motora. La prueba es a veces llamada la respuesta de constricción abdominal, o la prueba de estiramiento, pero lo más habitual es que se conoce como la prueba del "retuerce". Las mediciones del modelo son la incidencia por unidad de tiempo de los calambres abdominales que resultan de la inyección del agente químico (Le Bars et al., 2001).

Estas conductas se consideran reflejos y son prueba de dolor visceral. El número de calambres está sujeto a una gran variabilidad. Las variables que intervienen en este modelo dependen directamente del agente químico como son la temperatura, concentración que a su vez determinara los cambios del comportamiento del animal (Le Bars et al., 2001).

Estos métodos tienen la ventaja de permitir que las pruebas que se obtengan de los efectos producidos por los analgésicos débiles sean confiables y estadísticamente probables, por otra parte, carecen de especificidad. De hecho, estas pruebas suelen funcionar no sólo para detectar analgésicos débiles, sino también analgésicos mayores y menores (Le Bars et al., 2001).

2.2. La herbolaria en México

Las plantas se encuentran entre los recursos naturales que la humanidad ha empleado con fines terapéuticos desde la antigüedad. Su uso en general ha sido como ornato, materia prima para la elaboración de objetos, construcción, alimento, medicamento y muchos otros (Vargas y Casillas, 1993).

El uso de las plantas medicinales es universal. A lo largo de la historia del hombre, en el terreno de la curación de sus enfermedades, uno de los recursos naturales más socorridos han sido los provenientes del reino vegetal, aunque cada cultura ha seleccionado aquellas que son propias de su entorno o que se han adaptado a él (Vargas y Casillas, 1993). Por lo que el hombre ha buscado empíricamente en la flora de su hábitat la manera de contrarrestar enfermedades a través de la prueba y el error y ha aprendido a identificar sus propiedades, dosis y efectos adversos (Sanfilippo, 1993).

México se distingue por su larga tradición herbolaria. Posee una flora muy diversa debido a su orografía, la variedad climática y la edafología, así como por su situación intermedia en el continente americano. Dentro de esta flora las plantas medicinales han sido parte importante de la historia y cultura de los pueblos indígenas. Su uso y aplicaciones para el remedio de enfermedades constituyen un conocimiento que aún es transmitido en forma

oral de generación en generación como parte de las tradiciones heredadas (Linares et al., 1995).

La medicina popular en México tiene sus raíces en las antiguas culturas mesoamericanas, conocedoras de una vasta herbolaria medicinal. Como testimonio de ello se tienen los códices y los murales de Tepantitla, donde quedaron plasmadas las pinturas de especies medicinales autóctonas. El Códice Florentino escrito por Fray Bernardino de Sahagún, la obra de Martín de la Cruz traducida al latín por Juan Badiano denominada, "Libellus de Medicinalibus Indorum Herbis" popularmente conocido como Códice de la Cruz- Badiano y por último, la obra "Historia natural de la Nueva España" del médico naturista Francisco Hernández el cual contiene la descripción de 3076 plantas, en su mayoría medicinales (Aguilar y Martínez, 1993).

Se estima que las plantas medicinales usadas en el país ascienden a más de tres mil. La efectividad de muchas de ellas se ha probado empíricamente con base en prueba y error; pocas se han estudiado exhaustivamente, por lo que existe un vasto campo de trabajo para la investigación (Linares et al., 1995).

Por lo que el uso de remedios vegetales persiste aún en nuestro país, donde un porcentaje elevado de la población, recurre a la medicina herbolaria para resolver desde problemas de salud iniciales hasta enfermedades que son incurables con los tratamientos de la medicina moderna. Probablemente, el mejor testimonio de su eficacia y valor cultural radica en la presencia de plantas medicinales en los mercados del país. No obstante a pesar de la riqueza y la variedad de la flora medicinal mexicana, el porcentaje de las especies botánicas estudiadas desde un punto de vista fitoquímico es bajo y es menor el número de éstas que ha sido objeto de una evaluación farmacológica. En

consecuencia, el estudio de las plantas usadas en la medicina tradicional mexicana es una fuente vasta y prometedora de nuevos principios activos (Mata, 1993).

El estudio farmacológico de extractos crudos constituye una parte importante en la investigación de las propiedades terapéuticas de las plantas, ya que son la forma de preparado más cercana al producto usado habitualmente por la población. La detección de sus efectos biológicos, permite en cierta medida explicar y sustentar el uso medicinal atribuido al recurso herbolario, presumir cierto grado de toxicidad en algunos casos o bien detectar un efecto biológico no esperado, pero de relevancia (Meckes, 1993). Hacia la década de los setentas, del siglo pasado, la Organización Mundial de la salud dió un nuevo impulso a los estudios de los recursos herbolarios de la medicina tradicional en todo el mundo. Iniciándose así los primeros programas para la detección en la actividad biológica atribuida a las plantas medicinales (Meckes, 1993).

2.2.1. Botánica del género *Agastache*

En el reino vegetal se calcula que existen cerca de 250,000 especies de plantas superiores, de las cuales las angiospermas comprenden aproximadamente 220,000 especies (Balandrin et al., 1993). La clase Magnoliopsida (dicotiledónea) está representada por 165,000 especies de hierbas, arbustos y árboles. La subclase Asteridae comprende 11 ordenes, 49 familias y cerca de 60,000 especies e incluyen al orden Lamiales que abarcan 4 familias y 7,800 especies; en este orden se ubica la familia Lamiaceae con aproximadamente 3,200 especies (Cronquist, 1988), que alberga al género *Agastache* con 22 especies, entre ellas se ubica *Agastache mexicana* (Sanders, 1987). En su trabajo de 1987, Bye y cols. dividen a esta especie en dos subespecies: *Agastache mexicana* ssp. *mexicana* (Kunth) Lint & Epl. y *Agastache mexicana* ssp.

xolocotziana, Bye, Linares, Ramamoorthy, García, Collera, Palomino y Corona (Fig. 2). *Agastache mexicana* es una hierba perenne, de 1.5 m de altura, con rizomas rastreros, delgados y esparcidos; tallos erectos, ramificados, cuadrangulares, con vellosidades o pelos blancos. Hojas ovaladolanceoladas de 2-2.5 cm de largo por 1 a 2.1 cm de ancho; ápice agudo, margen crenado-serrado y diente cunonioide, base obtusa o cuneada con pecíolos de 0.5-1.5 cm de largo, son simples, siguen el patrón general descrito para las Lamiales (Hickey y Wolfe, 1975); inflorescencia en racimos terminales interrumpidos; flores bisexuales, zigomorfas; cáliz sin sépalo, de color verde a blanco, cilíndrico, 5-dentado, ligeramente bilabiado, de 7-8 mm de largo; corola simpétala, de color blanco, tubulada con vellosidades sobre su superficie; estambres 4, exertos; estilo bífidio en el ápice, saliente, ovario súpero, 4-lobulado; frutos mericarpos, de color pardo oscuro, de 1.5 a 2 mm de largo (Bye et al., 1987) (Fig. 2).



Figura 2. Ejemplares de referencia de Toronjil morado (A, No.1120) y Toronjil blanco (B, No. 1121) depositados en el herbario MEXU

Lint y Epling en 1945 dividen el género en dos secciones, *Brittonastrum* y *Chiastandra* esta última sección es propiamente llamada sección Agastache, de acuerdo a ellos la sección *Agastache* está formada por 8 especies y la sección *Brittonastrum* está formada por 14 especies (Lint y Epling, 1945). (Tabla 2).

Tabla 2. Enumeración del taxa de *Agastache* (Fuentes, 1998).

Sección <i>Agastache</i>	Sección <i>Brittonastrum</i>
<i>A. cusickii</i> (Greenm) Heller	<i>A. aurantiaca</i> (A. Gray) Lint & Epling
<i>A. foeniculum</i> (Pursh) Kuntze	<i>A. breciflora</i> (A. Gray) Epling
<i>A. nepetoides</i> (L) Kuntze	<i>A. cana</i> (W. J. Hooker) Lint & Epling
<i>A. occidentalis</i> (Piper) Heller	<i>A. coccinea</i> (Greene) Lint & Epling
<i>A. parvifoli</i> Easte.	<i>A. eplingiana</i> R. W. Sanders
<i>A. rugosa</i> (Fisher & Meyer) Kuntzze	<i>A. mearnsii</i> Wooton & Stand
<i>A. scrophulariifolia</i> (Brethman) Kuntze	<i>A. mexicana</i> (Humb. Bonpl. & Kunth) Lint & Epling
	<i>A. micrantha</i> (A. Gray) Wooton & Standi
	<i>A. palmery</i> (B.L. Robinson) Lint & Epling
	<i>A. pallida</i> (Lindl) Cory
	<i>A. pallidifora</i> (Heller) Rydberg
	<i>A. pringlei</i> (Briq.) Lint & Epling
	<i>A. rupestris</i> (Greene) Standley
	<i>A. wightii</i> (Greenm) Wooton & Standley

En su estudio biosistemático de la sección *Brittonastrum*, incluye tanto el toronjil morado como el blanco dentro de la misma especie (*Agastache mexicana*) considerando al toronjil blanco como una forma; sin embargo, los estudios morfológicos han permitido

establecer diferencias entre ambos taxa, otorgándoles el nivel de subespecie (Sanders, 1979) (Fig. 3-4).

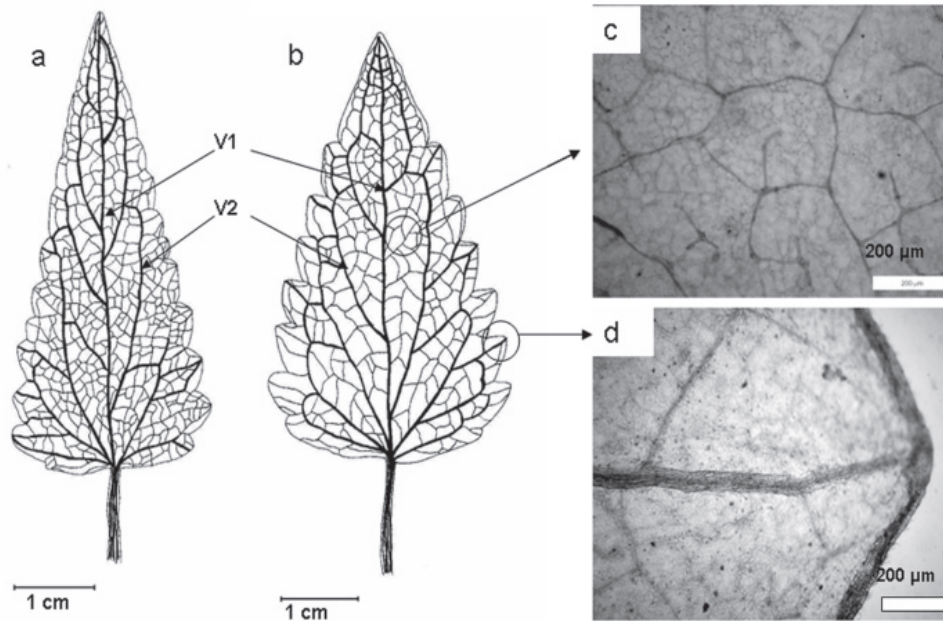


Figura 3. Hoja de *Agastache mexicana* con venación acródroma. **a**), toronjil morado (*A. mexicana* ssp. *mexicana*); **b**), toronjil blanco (*Agastache mexicana* ssp. *xolocotziana*); **c**), areolas de desarrollo imperfecto con vénulas simples y ramificadas una vez; **d**, margen con diente cunioide. Abreviaturas: V1: venas primarias y V2: venas secundarias.

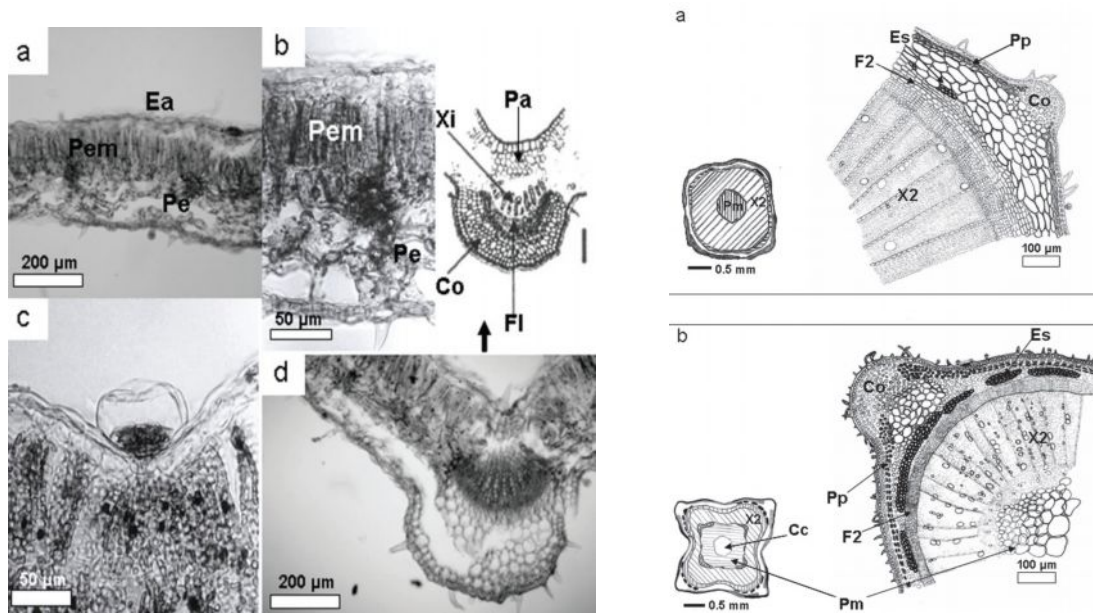


Figura 4. **Panel izquierdo.** Características microscópicas de hoja de *Agastache mexicana*. **a**, **b** y **d**, subespecie *mexicana*; **c**, subespecie *xolocotziana*. Abreviaturas: Ea = epidermis adaxial, Pem = parénquima en empalizada, Pe = parénquima esponjoso, Pa = parénquima, Co = colénquima, F1 = fl oema primario, Xi = xilema primario. **Panel derecho.** Sección transversal del tallo de *Agastache mexicana*. **a**) vista general y ángulo del tallo de toronjil morado, nivel basal con mayor crecimiento de xilema secundario; **b**), vista general y ángulo del tallo de toronjil blanco, nivel basal. Abreviaturas: Co = colénquima, F2 = fl oema secundario, X2 = xilema secundario, Pm = parénquima medular, Pp = parénquima con plastidios, Es = esclerenquima, Cc = canal central

Así, el toronjil morado corresponde a la subespecie *A. mexicana* (Kunth) Lint & Epl. ssp. *mexicana* mientras que el blanco corresponde a la subespecie *A. mexicana* ssp. *xolocotziana*, Bye, Linares, Ramamoorthy, García, Collera, Palomino y Corona (Bye et al., 1987).

Los caracteres microscópicos en las 2 subespecies de toronjil indica que la forma cuadrangular y la gran cantidad de colénquima en los ángulos de los tallos (Fig. 4, panel B), así como los estomas de tipo diacítico y el mesófilo bifacial formado por 2 estratos de parénquima en empalizada, 3 de parénquima esponjoso en las hojas y los tricomas glandulares y no glandulares, son típicos de las Lamiaceae, como lo registran Metcalfe y Chalk (1979) y Fisher (1985).

Las bandas de esclerénquima que se disponen en el cortex de los tallos de ambos toronjiles varían en tamaño, siendo mayores en el toronjil blanco. En el xilema secundario que se desarrolla en la parte basal del tallo hay diferencias, observándose que en el toronjil morado el diámetro de los vasos y la cantidad de xilema secundario es mayor que en el toronjil blanco; independientemente del tamaño de las plantas, estos contrastes fueron constantes entre ambas subespecies (Fig.4, panel A) (Santillan et al., 2008).

2.2.1.1. Distribución del género *Agastache* en México

La sección *Brittonastrum* contiene 14 especies distribuidas al suroeste de Estados Unidos hasta el Centro de México (Fig. 5). *Agastache mexicana* crece en climas templadas sub-húmedos, templados húmedos y semicálidos (Chávez, 1986). Se distribuye

principalmente al centro de la República Mexicana, localizándose en los siguientes estados: Distrito Federal, Hidalgo, Estado de México, Morelos, Puebla y Veracruz.

Es una planta no muy abundante, crece en bosques de coníferas, encinos o mixtos. Actualmente *Agastache mexicana* ssp. *mexicana* y *A. mexicana* ssp. *xolocotziana* son cultivadas en el Estado de México, Morelos, Puebla y Veracruz (comunicación personal de las personas que la cultivan) (Fig. 5).



Figura 5. Mapa de distribución geográfica de *Agastache mexicana* y *Agastache mexicana* ssp. *xolocotziana* (Bye, 1983; Bye, 1987; Instituto Nacional Indigenista (INI), 1994; Alonso, 1999).

2.2.1.2. Usos medicinales del *Agastache mexicana*

Hernández (1942), comenta que el Atochyetl (nombre antiguo para *Agastache mexicana*) cura la parálisis y es remedio contra las disenterías y otras enfermedades ocasionadas

por el frío. Posteriormente menciona que la raíz espolvoreada cura las úlceras, mitiga el dolor y la fiebre y sirve para la evacuación de tumores (Hernández, 1942).

Por su parte, Gregorio López en el siglo XVII relata que las hojas bebidas con vino y aplicadas como emplasto son contra mordeduras de perro rabioso y picaduras de alacrán. Las hojas son útiles a los que no pueden resollar y si son aplicadas con sal, purifican llagas, mitigan el dolor de juntas y son útiles al estómago (Hernández, 1942).

Alfonso Herrera describe como antiespasmódico al toronjil mexicano (*Agastache mexicana*) y al toronjil europeo (*Melissa officinalis*). Posteriormente, Maximino Martínez la refiere como antiespasmódico. Luis Cabrera cita que es antirreumático, diaforético, digitálico, eupéptico. Finalmente, la Sociedad Farmacéutica de México en el siglo XIX consigna su uso como antiespasmódico, diaforético, estimulante y eupéptico (Herrera, 1921).

La infusión de los “tres toronjiles” es utilizada para enfermedades gastrointestinales, nerviosas y cardiovasculares (Linares, 1988), y a nivel cultural es utilizada para el “espanto” y “susto” (Argueta, 1994). Entre mixes, zapotecas y totonacas se le utiliza para mal de ojo, caída de mulleras, dolor intestinal, empacho, cólicos menstruales, insomnio, diabetes y venteados y contra la diarrea (Cano, 1997).

2.2.1.3. Metabolitos secundarios aislados del género *Agastache*

Los metabolitos secundarios son compuestos químicos sintetizados por las plantas para realizar determinadas funciones, dispersión de semillas, defensa frente a determinadas

agresiones o la captación de los insectos polinizadores, son un elemento importante y necesario ya que en el reino vegetal representan una ventaja competitiva. Cada familia de plantas utiliza precursores químicos comunes originando diferentes resultados (Simmonds, 2001).

Algunas especies de la familia Lamiaceae tienen importancia económica por su contenido de aceites esenciales. Éstos son utilizados en la elaboración de perfumes, licores, cosméticos, detergentes, etc. Otros poseen propiedades medicinales y son recomendados en el tratamiento de problemas digestivos, afecciones hepáticas, afecciones urinarias, antiespasmódicos, arterioesclerosis, cefaleas, colesterol, etc. (Simmonds, 2001). Los estudios de la composición de aceites esenciales de plantas han revelado la presencia de un gran número de metabolitos secundarios, siendo los más frecuentes los monoterpenos y sesquiterpenos.

Algunos ejemplos de plantas de la familia Lamiaceae importantes por su contenido de aceites esenciales pertenecen a los géneros *Mentha*, *Salvia*, *Thymus*, *Origanum*, *Rosmarinus*, *Melissa*, *Nepeta* y *Ocimum* (Rodríguez y Cardenas, 1999). Los terpenos forman parte de los aceites esenciales de las plantas, estos son pequeñas moléculas orgánicas que tienen una inmensa diversidad de estructuras (Mc Murry, 1996). Formados por unidades de isopentenil pirofosfato (C_5). El geranil pirofosfato es el precursor de los monoterpenos (C_{10}), el farnesil pirofosfato de los sesquiterpenos (C_{15}), el geranilgeranil pirofosfato de los diterpenos (C_{20}). La formación de triterpenos (C_{30}) resulta de la unión de 2 unidades de farnesil pirofosfato ($2 \times C_{15} = C_{30}$) (Bruneton, 1999). El análisis de los aceites esenciales en especies del género *Agastache* reveló la presencia del metil chavicol como componente mayoritario en *Agastache rugosa*, *Agastache foeniculum* y *A. mexicana*

ssp. *mexicana* (Chales et al., 1991; Weyerstahl et al. 1992; Mazza y Kiehn 1992; Tirillini et al. 1997; Fuentes et al., 2000; Estrada-Reyes et al., 2004).

El δ -cadinol es uno de los mayores constituyentes en *Agastache nepetoides* (Charles et al., 1991), la isomentona en *Agastache scrophulariaefolia* (Lognay, 2002) y la pulegona en *A. formosana* y *A. mexicana* ssp. *xolocotziana* (Estrada-Reyes et al., 2004). De *Agastache rugosa* se han aislado los diterpenos: dehidroagastol, agastol y la agastoquinona (Kyu-Lee et al., 1995). En 1995, Kyu-Lee y cols. Aislaron de raíces de *Agastache rugosa* triterpenos como el acetato 3-O-aritrodiol, 3-O-acetil oleanílico aldehído, 3-O-acetil ácido oleanólico y ácido maslínico. De *Agastache mexicana* ssp. *xolocotziana* se aislaron el ácido corosólico y el ácido maslínico (Estrada-Reyes et al., 2004).

Además de terpenoides, se han identificado metabolitos de naturaleza flavonoide. El análisis químico de los extractos acuosos de algunas especies de esta familia indica la presencia de una importante cantidad de flavonoides glicosídicos, a los que se les ha atribuido diversas propiedades farmacológicas, como son sus efectos antiinflamatorios, antibacteriales y en el tracto gastrointestinal o en el sistema respiratorio (Barberán y Gil, 1986). Algunos metabolitos secundarios identificados en *Agastache mexicana* y en otras especies con aplicación en el tratamiento del dolor se mencionan en la tabla 3.

Flavonoide (de latin *Flavus*, "amarillo") es el término genérico con que se identifica a una serie de metabolitos secundarios de las plantas. Estos compuestos fueron descubiertos por el premio Nobel Szent-Gyorgy, quien en 1930 aisló de la cáscara de limón una sustancia, la citrina, que regulaba la permeabilidad capilar. Los flavonoides se

denominaron en un principio vitamina P por su permeabilidad y también vitamina C por presentar propiedades similares a la vitamina C (Singleton, 1981).

Tabla. 3. Metabolitos secundarios con efectos antinociceptivos y otras actividades aislados de plantas.

Especie	Metabolito secundario	Actividad antinociceptiva	Otra actividad	Referencia
<i>Leucas aspera</i>	acacetina, apigenina	antinociceptiva	antiinflamatoria	Kumar et al., 2003
<i>Agastache rugosa</i>	tilianina		antiinflamatoria	Nam et al., 2006
<i>Agastache rugosa</i>	acacetina		induce apoptosis	Hsu et al., 2004
<i>Agastache mexicana</i>	tilianina, ácido ursólico		antihipertensivo y vasorelajante	Hernández et al., 2009
<i>Cestrum laurifolium</i>	ácido ursólico		anticancerígeno, antiinflamatorio, antimicrobiano y antiviral	Ferrer et al., 2005
<i>Ocimum tenuiflorum L.</i>	ácido ursólico		antiinflamatorio	Barzaga et al., 2004
<i>Astianthus viminales</i>	ácido ursólico, ácido oleanólico y fenilpropanoides		hipoglucemiante y antihiperoglucemiante	Meckes et al., 2001
<i>Amaranthus spinoso</i>	rutina, quercetina, luteolina	antinociceptiva		Galati et al., 1994
<i>Danae racemosa</i>	quercetina y kaempferol	antinociceptiva		Maleki et al., 2007
<i>Ilex paraguariensis</i>	rutina, kaempferol y quercetina	antinociceptiva		Carretero, 2001
<i>Pneumus boldus</i>	kaempferol	antinociceptiva		Villar y Gómez, 2006

Los flavonoides pertenecen al grupo de los compuestos fenólicos con dos anillos aromáticos. Este grupo comprende las flavonas, isoflavonas, flavonoles. Todos los flavonoides contienen una unidad de diarilpropano ($C_6-C_3-C_6$) (Fig.6) y se clasifican según la estructura del compuesto unido a la molécula en C_3 (Barberán y Gil, 1992). Los anillos de benzeno se denominan A y B; el anillo A, que generalmente responde al modelo hidroxilo del floriglucinol, forma un anillo de pirano con una unidad C_3 en las antocianidinas, y un anillo de pirona en la flavonas, etc. (Davies et al. , 1969). En la familia Lamiaceae se han identificado 147 estructuras diferentes de flavonoides libres: flavonas (60%), flavononas (20%), flavonoles (16%), dihidroflavonoles (2%) y chalconas (2%) (Barberán y Gil, 1992).

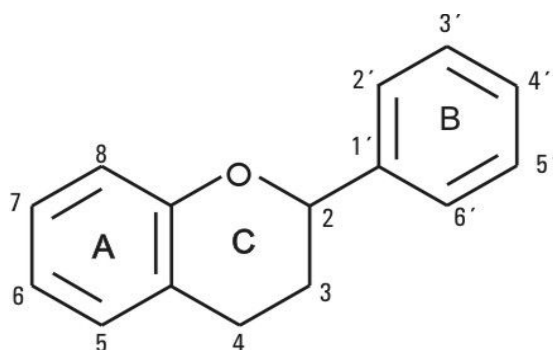


Figura 6 .Esqueleto base de las flavonas ($C_6-C_3-C_6$).

Asimismo, se conocen alrededor de 140 estructuras de glicósidos de flavonoides: flavonas glicosídicas (75%), flavononas (13%), flavonoles (10%), dihidroflavonoles (1%) y chalconas (1%) (Middleton et al., 2000; Timberlake y Henry, 1986) (Fig. 7).

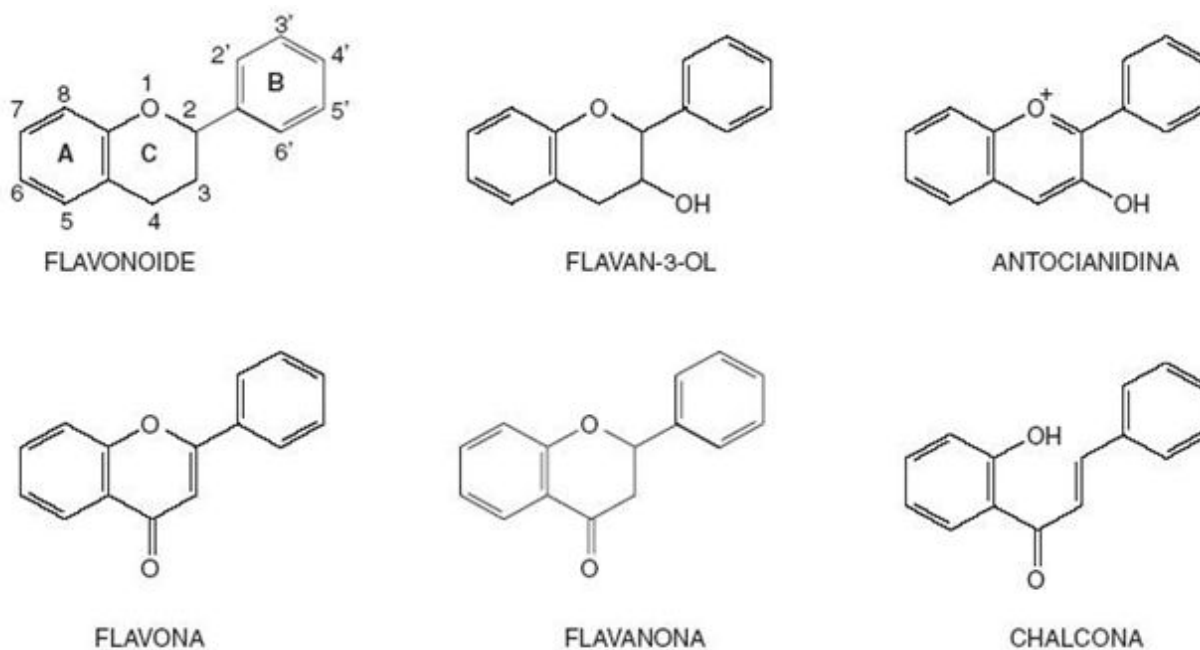


Figura 7. Estructuras químicas de las subclases de flavonoides más común.

Dentro de género *Agastache* se han aislado flavonas y flavonoles, así como varios de sus glicósidos. Así, tenemos que en 1979 Chang y cols. Aislaron de *Agastache pallidiflora* el kaenferol, la quercetina 3-ramnósido, el kaenferol 3-galactósido, la 7-O-glucosil diosmetina, la acetina y la 7-O-glucosil acetina (Chang et al., 1979). En 1980, Sanders y cols. aislaron de *Agastache micrantha* a la salvigenina, acetina, y apigenina, y sus respectivos glucósidos: la 6-metoxiluteolina 7-metil éter, la luteolina 4"-metil éter 7-glucósido y el 7-O-glucosil luteolina (Sanders, 1980). Exner y cols. en 1981 aislaron de la parte aérea de *Agastache arantiaca*: la apigenina, la 7-glucosil apigenina, la acetina, la 7-glucosil acetina, la 6-metoxiapigenina 7-metil éter, la luteolina, la 7-glucosil luteolina, la luteolina 4"-metil éter y el 6-metoxiluteolina 7-metil (Exner et al., 1981).

En las partes aéreas de *Agastache rugosa* se aislaron la acacetina, la 7-O-glucosil acacetina (tilianina), el isoagastachosido (2-O-acetil tilianina) y el agastachin (di-6"-malonato de tilianina) (Itokawa et al, 1981). De *Agastache mexicana ssp. xolocotziana* se aislaron la acacetina, la 7-O-glucosil acacetina (tilianina) y el isoagastachosido (2-O-acetil acacetina) (Estrada-Reyes et al., 2004).

3. JUSTIFICACIÓN

Una de las disciplinas de la Biología es la botánica: estudio de las plantas. México se caracteriza por su gran biodiversidad por lo cual la medicina tradicional tiene gran importancia tanto biológica, ecológica, farmacológica, cultural, y económica. La efectividad de dicha medicina es sobresaliente en nuestros tiempos y debido a esto, los estudios farmacológicos han tomado fuerza actualmente. En nuestro país existen varias especies utilizadas en medicina tradicional para el tratamiento del dolor, de las cuales pocas se han estudiado para corroborar su uso, aún cuando muchas de ellas han sido estudiadas químicamente. *Agastache mexicana ssp. xolocotziana* es una planta de uso medicinal que otras aplicaciones está su uso para tratar enfermedades gastrointestinales y como antiespasmódico. Sin embargo, no existen estudios científicos que corroboren sus propiedades terapéuticas; por lo anterior, en este proyecto de tesis se propone comprobar el efecto antinociceptivo de los extractos orgánicos de esta especie en un modelo experimental para reforzar su uso alternativo para el tratamiento del dolor visceral, así como la búsqueda de sustancias activas.

4. HIPÓTESIS

Si la infusión preparada con flor de “toronjil blanco” disminuye el dolor visceral, entonces se espera que extractos polares y/o sus componentes obtenidos de dicha planta produzcan efecto antinociceptivo en un modelo experimental de nocicepción visceral en ratones.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Evaluar el efecto antinociceptivo de diferentes extractos y metabolitos secundarios activos de *Agastache mexicana* ssp. *xolocotziana* en el modelo experimental de dolor visceral (“writhing”) en ratones.

5.2. Objetivos particulares

1. Realizar la colecta de *A. mexicana* ssp. *xolocotziana* y obtener los extractos orgánicos hexánico, acetato de etilo y metanólico.
2. Evaluar el efecto antinociceptivo de los diferentes extractos de *A. mexicana* ssp. *xolocotziana* mediante el uso del modelo experimental de dolor visceral “writhing” en ratones y seleccionar el más activo.
3. Determinar la dosis letal (DL₅₀) producida por la administración vía intraperitoneal de los extractos más activos.
4. Aislar e identificar metabolitos secundarios presentes en el extracto más activo de *Agastache mexicana* ssp. *xolocotziana* mediante fraccionamiento biodirigido y métodos de separación y purificación correspondientes.
5. Evaluar el efecto antinociceptivo de al menos un metabolito secundario.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Diagrama del procedimiento.



6.2. Identificación del material vegetal

El material vegetal de *Agastache mexicana ssp. xolocotziana* se obtuvo de huertas localizadas en San José Tlacotitlán, Ozumba, Edo. de México, en septiembre de 2009. Se prepararon ejemplares de herbario comprobatorios que fueron identificados por el Dr. Robert Bye y la M.C. Edelmira Linares y depositados en el Herbario Nacional del Instituto de Biología (MEXU), con el número de registro 1121.

6.3. Obtención de extractos

Del material recolectado, las flores se separaron del resto de la planta y se secaron a temperatura ambiente. Después del secado, las flores secas se molieron en un molino de mano y se colocaron en matraces previamente etiquetados para someterlas a maceración con disolventes de polaridad creciente (hexano, acetato de etilo y metanol).

El disolvente se eliminó mediante evaporación a presión reducida y los extractos crudos libres de disolvente se pesaron para obtener el rendimiento final con respecto al peso seco del material vegetal.

6.4. Fraccionamiento del extracto activo

El fraccionamiento del extracto activo se realizó mediante cromatografía en columna (CC) convencional con gel de sílice (Fig. 8), utilizando como disolvente hexano (100%) y polaridad creciente con acetato de etilo, hasta eluir con acetato de etilo (100%) y posteriormente con metanol (100%). Se obtuvieron fracciones de 100 ml cada una, las cuales se reunieron en subfracciones denominadas “pool” de acuerdo con la similitud en el perfil de cromatografía en capa fina.



Figura 8. Fraccionamiento del extracto activo por medio de columna con gel de sílice

6.5. Purificación e identificación de los compuestos activos

Las subfracciones de menor complejidad, identificadas como “pools” se purificaron mediante técnicas de cristalización, recrystalización y cromatografía en capa fina (CCF) para la identificación de los metabolitos secundarios, esencialmente aquellos previamente reportados para la especie dependiendo del extracto crudo. Se utilizó sulfato cérico como revelador considerando que los componentes aislados se han asociado con actividad terapéutica para el dolor. Compuestos puros se utilizaron como referencia para la identificación de los metabolitos activos (Fig. 9).

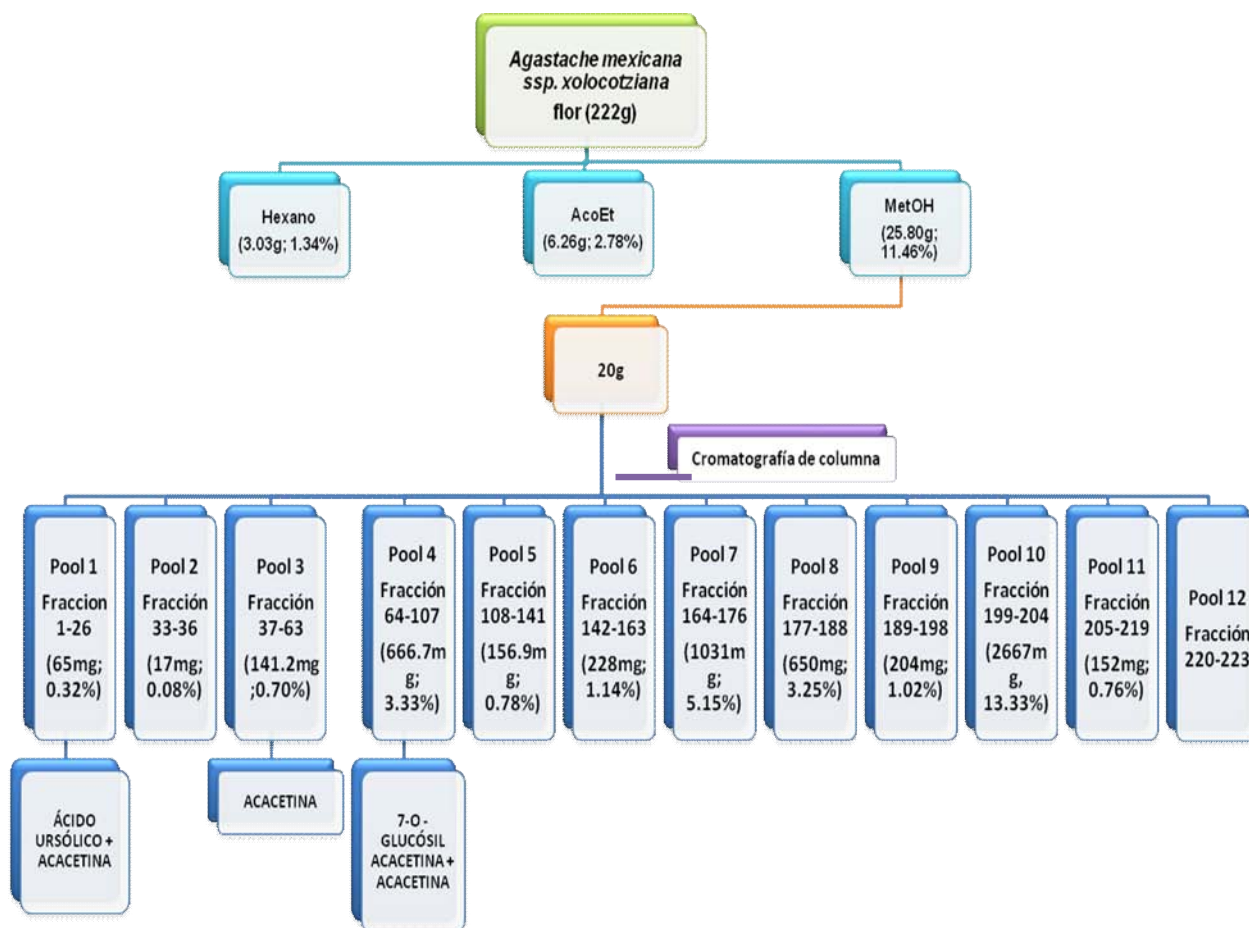


Fig. 9. Fraccionamiento cromatográfico del extracto metanólico de *Agastache mexicana ssp. xolocotziana*.

6.6. Evaluación farmacológica

6.6.1. Animales utilizados

Ratones hembras adultas de la cepa SW se utilizaron con un peso de 20-30 g. Antes de iniciar los experimentos, los animales se colocaron en cajas de acrílico en grupos de al menos 6 ratones, sin restricción de alimento y agua y mantenidos a una temperatura controlada de 22 °C con ciclo de luz/oscuridad de 12 horas.

Todo el protocolo experimental siguió las recomendaciones del “Comité de Investigación y Ética de la Asociación Internacional para el Estudio del Dolor” (publicadas en: Pain 9, 1980) y de los Lineamientos y Estándares Éticos para la Investigación del Dolor Experimental en Animales, así como de los Comités de Investigación y Bioética del Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz.

6.6.2. Preparación de extractos, subfracciones y/o compuestos o fármacos.

Las sustancias administradas se suspendieron en el vehículo que consistió en tween 80 al 0.5% en solución salina o s.s. sola. Los extractos crudos hexano y acetato de etilo se resuspendieron en el vehículo para su administración por vía intraperitoneal (i.p.), mientras que el extracto crudo metanólico se resuspendió en s.s. sola.

El fármaco de prueba: Tramadol (Grünenthal de México, S.A. de C.V.) se preparó a partir de una solución de 100 mg/ml diluido con s.s. y se administró por vía intraperitoneal. Las soluciones se administraron siempre de reciente preparación y se administraron en un volumen de 0.1 ml/10 g para cada ratón.

6.6.3. Evaluación de la actividad antinociceptiva

Para la evaluación del efecto antinociceptivo se utilizó el modelo de estiramiento abdominal inducido con la administración intraperitoneal de ácido acético al 1% en ratones (“writhing”). La prueba consiste en inducir nocicepción en el ratón por la administración de ácido acético vía i.p. en un volumen de 10 mg/kg. El número de estiramientos abdominales se contabiliza en un tiempo máximo (20 minutos) y los datos se analizan cuantitativamente, evaluando el número de estiramientos que ocurren cada 5 min durante los 20 min.

En los experimentos se utilizaron grupos de al menos 6 ratones. El grupo control recibió administración vía intraperitoneal de tween 80 al 0.5% en s.s. o s.s. sola, mientras que el grupo tratamiento recibió diferentes dosis del extracto, fracción o compuesto activo o fármaco de referencia. Transcurridos 20 minutos se les administró el ácido acético al 1% e inmediatamente se registró el tiempo para conocer la latencia a la primera contracción abdominal (Fig. 10).

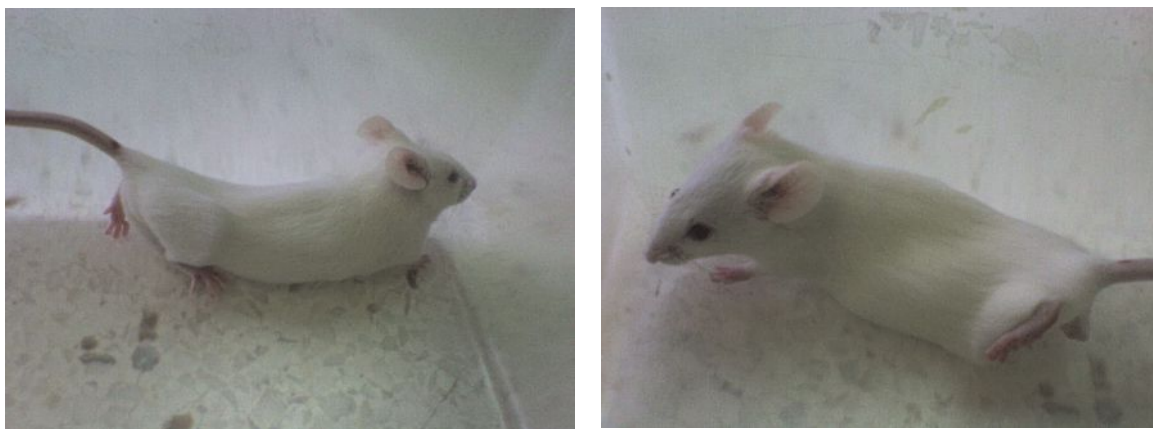


Figura 10. Modelo “writhing”

Los grupos de ratones tratados con los diferentes extractos crudos recibieron primero una dosis de 100 mg/kg i.p. y se realizó la inducción de la nocicepción para identificar el extracto más activo. Después del fraccionamiento del extracto crudo activo, cada pool obtenido se evaluó en una dosis de 10 mg/kg i.p. y de estas subfracciones activas se

purificaron los compuestos más abundantes, con los cuales se realizó una curva dosis-respuesta en un rango de 1 a 100 mg/kg vía i.p. para la determinación de la dosis efectiva 50 (DE₅₀), parámetro que se tomó para comparar la potencia antinociceptiva de los compuestos identificados en *Agastache mexicana ssp. xolocotziana* y fármacos de referencia previamente reportados por nuestro laboratorio (Carballo et al., 2010; González-Trujano et al., 2006).

6.7. Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó con el programa Sigma Stat, versión 3.0. Todos los experimentos se realizaron con al menos 6 repeticiones y los resultados se expresaron como la media \pm error estándar. Las diferencias entre los datos obtenidos en el modelo con los tratamientos y el grupo control o el extracto activo se analizaron mediante análisis de varianza (ANADEVA) seguido de la prueba t de Dunnett para un nivel de significancia $p < 0.05$.

6.8. Determinación de la DL₅₀.

La dosis letal 50 (DL₅₀) para una vía i.p. se determinará siguiendo el método descrito por Lorke, 1983. El método consiste en la distribución de los ratones en grupos aleatoriamente (n=3) para recibir cada lote una dosis diferente del extracto metanólico de *Agastache mexicana ssp. Xolocotziana*. En la primera etapa se probarán dosis de 10, 100 y 1000 mg/kg. Al no observar mortalidad en ninguna de estas dosis, una segunda etapa consistirá en administrar dosis de 2600 y 5000 mg/kg. Los animales serán observados durante una hora después de la administración y después durante 14 días para registrar efectos generales de toxicidad como incoordinación motora o cambio en la coloración de las extremidades o caída del pelo, así como el número de muertes.

7. RESULTADOS

7.1. Obtención de los extractos

El rendimiento de los extractos crudos hexánico, acetato de etilo y metanólico de *Agastache mexicana* ssp. *xolocotziana* se calculó en base al peso seco de las inflorescencias, el extracto metanólico fue el extracto del cual se obtuvo el mayor rendimiento (11.46%) y por tanto se seleccionó para el fraccionamiento biodirigido.

Tabla 4. Rendimiento de los extractos crudos hexano, acetato de etilo y metanol obtenidos de la flor de *A . mexicana* ssp. *xolocotziana*.

Cantidad en peso seco y Rendimiento	Hexano	Acetato de Etilo	Metanol
<i>A . mexicana</i> ssp. <i>xolocotziana</i> 222 g	3.03 g 1.34 %	6.26 g 2.78 %	25.80 g 11.46%

7.2. Fraccionamiento del extracto activo y purificación e identificación de los compuestos activos

El fraccionamiento del extracto metabólico de flores en CC permitió obtener tres fracciones que al probarse en los ratones presentaron la mayor actividad. De acuerdo con datos previos reportados en la literatura (Aguirre-Hernández, 2001; Estrada-Reyes et al., 2004) y al análisis en CCF (Fig. 11) y punto de fusión (Tabla 5), éstas fracciones fueron reunidas por presentar el mismo perfil cromatográfico y corresponden a la mezcla ácido ursólico/acacetina (pool 1), acacetina (pool 3) y 7-O-glucósido acacetina/acacetina (pool 4) (Tabla 5).

Tabla 5. Rendimiento de las fracciones obtenidas en el fraccionamiento en cromatografía en columna del extracto metanólico crudo de *A. mexicana* ssp. *xolocotziana* flor.

Pool	Fracción	Peso (g)	Componente	Rendimiento (%)	P.F (°C)	P.F. (°C) Referencia
1	25-32	65 mg	Acido Ursólico + Acacetina	0.325 %	222-228	292/270
2	33-36	17 mg	ND	0.085 %	----	----
3	37-63	141.2 mg	Acacetina	0.706 %	268-270	270
4	64-107	666.7 mg	7-O-glucósido acacetina/ Acacetina (pool 4)	3.333 %	233-244	*230-233
5	108-141	156.9 mg	ND	0.784 %	----	----
6	142-163	228 mg	ND	1.14 %	----	----
7	164-176	1031 mg	ND	5.155 %	----	----
8	177-188	650 mg	ND	3.25 %	----	----
9	189-198	204 mg	ND	1.02 %	----	----
10	199-204	2667 mg	ND	13.33 %	----	----
11	205-219	152 mg	ND	0.76 %	----	----
12	220-223		ND		----	----

ND No determinado

* Aguirre-Hernández, 2001.

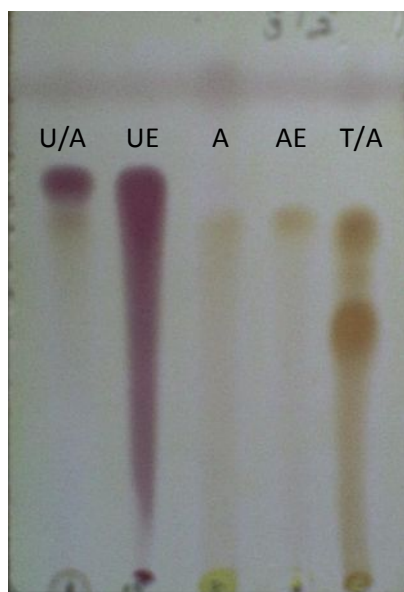


Figura 11. Identificación de metabolitos del extracto metanólico de *Agastache mexicana* ssp. *xolocotziana*, en donde se observan una mezcla de ácido ursólico y acacetina (U/A) en el pool 2, ácido ursólico estándar (UE), Acacetina (A) en el pool 3, Acacetina estándar (AE), y la mezcla de 7-O-glucosil acacetina/acacetina (T/A) en el pool 4.

7.3. Evaluación farmacológica

En lo que respecta a la evaluación farmacológica, la figura 12 muestra el curso temporal del efecto de la administración de 100 mg/kg vía i.p. de los diferentes extractos crudos obtenidos de la flor *A. mexicana* ssp. *xolocotziana*, los cuales se evaluaron en la nocicepción inducida con ácido acético al 1% (panel A). La evaluación se realizó cada 5 min mediante el conteo de los estiramientos abdominales los cuales alcanzan un máximo de 25 a 30 estiramientos transcurridos los 10 min y se mantienen hasta que finaliza la prueba a los 20 min. La administración de los extractos produjo una reducción en la conducta nociceptiva de los ratones ya que a los 10 min se produjeron para el extracto hexánico y metanólico un máximo de 15 ± 1 estiramientos, mientras que para el acetato de etilo el máximo fue de 5 ± 1 estiramientos y éste se observó hasta transcurridos los 15 min.

En la figura 12 (panel B) se representa el área bajo la curva de la nocicepción observada en los ratones por un periodo de 0-20 min, donde la administración de 100 mg/Kg de los diferentes extractos produjo una reducción significativa ($F_{3,27}=19.99$, $P < 0.001$) en la conducta nociceptiva. El extracto de acetato de etilo mostró la mayor actividad antinociceptiva seguida por la actividad del extracto hexánico y metanólico que no fueron diferentes entre sí.

Considerando que el extracto más polar es el metanólico y éste presenta actividad antinociceptiva significativa, así como el mayor rendimiento como extracto crudo, se procedió a realizar un fraccionamiento en columna abierta. De éste se obtuvieron 223 fracciones, las cuales se reunieron de acuerdo con un perfil cromatográfico similar

determinado en placas cromatográficas de capa fina y a partir del cual se formaron sólo 12 subfracciones denominadas como “pools”.

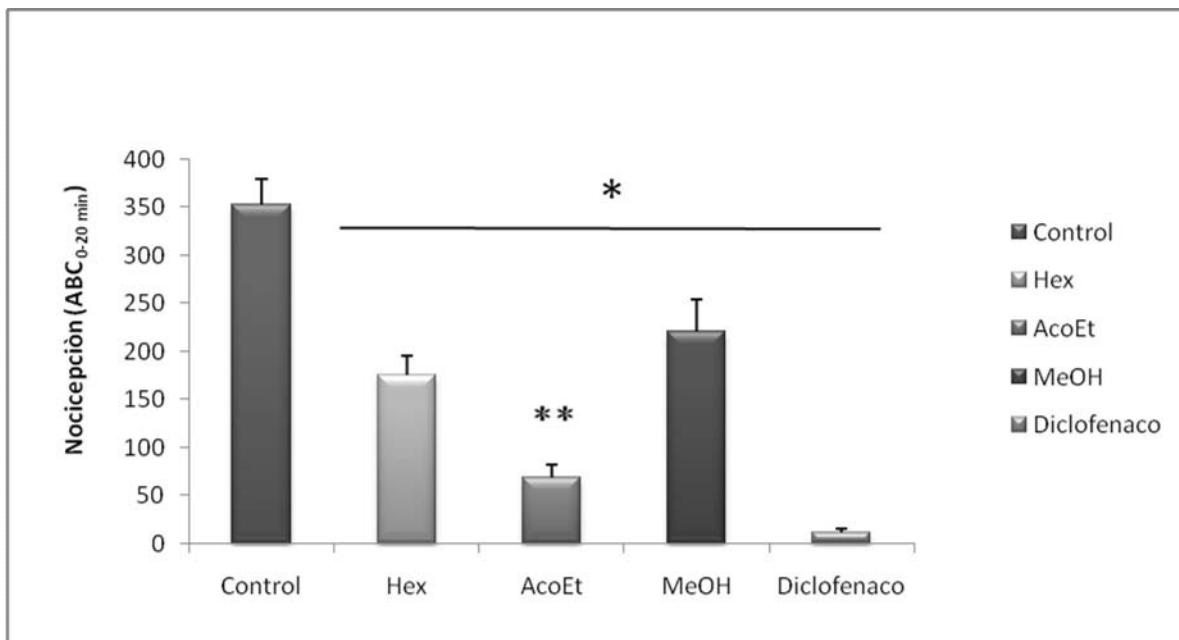
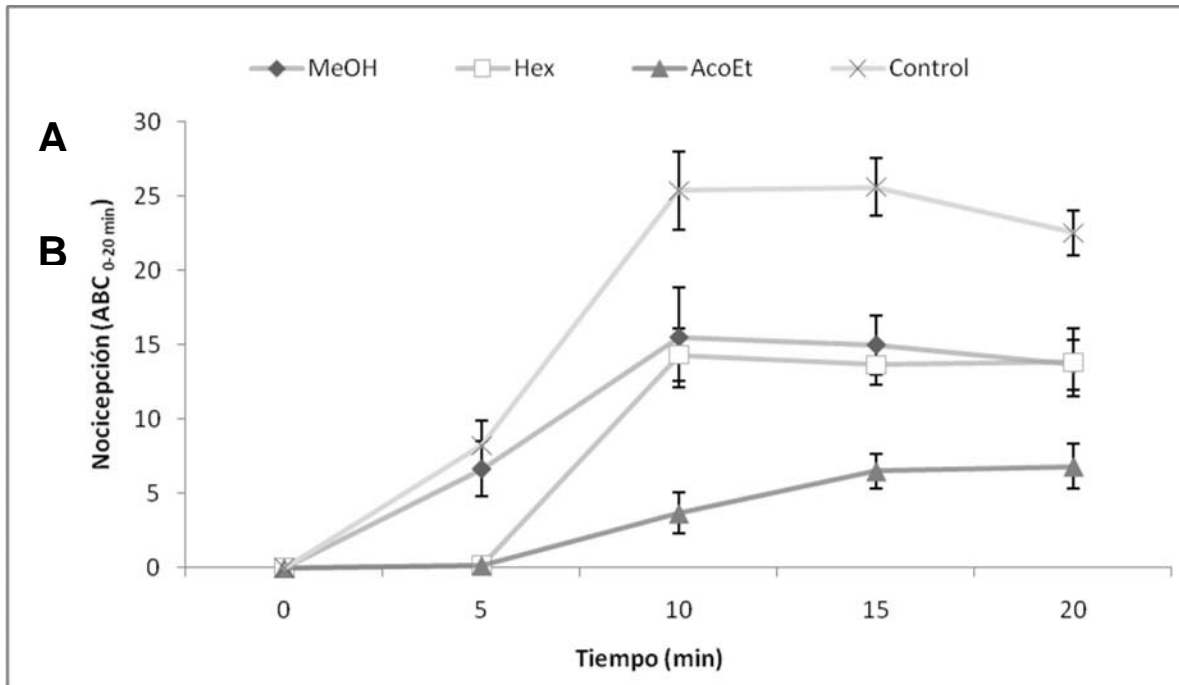


Figura 12. Curso temporal del efecto antinociceptivo de los extractos hexánico (Hex), acetato de etilo (AcoEt) y metanólico (MeOH) de *A. mexicana* ssp. *xolocotziana* (100 mg/kg i.p.) en los estiramientos abdominales inducidos con ácido acético al 1% (panel A), representado como nocicepción en área bajo la curva (ABC) de un periodo de 0-20 min (panel B). Cada grupo representa la media \pm S.E.M. de 6 animales. $F_{3,27}=19.99$, * $P<0.001$ vs control. **extracto de AcoEt vs extracto MeOH.

Los pools con mayor rendimiento (Tabla 5) se evaluaron para identificar el más activo que fue el pool 3, seguido en orden decreciente de actividad por el pool 4, 1, 11, 9, 8, 7 y 6 (Fig. 13 A y B). Estos pools mostraron una actividad antinociceptiva significativa ($F_{9,57}=10.16$, $P<0.001$) evaluados en la dosis de 10 mg/kg, la cual fue similar a la previamente observada con la dosis de 100 mg/kg del extracto metanólico. Como se observa en el panel A, el máximo del número de estiramientos observados en el control a los 10 min se reduce con la administración de éstos pools. Solo el pool 3 desplazó el tiempo en el cual se observa un máximo de nocicepción, que fue a los 15 min. En el panel B se observa como el área bajo la curva de nocicepción es reducida principalmente por el pool 3.

Después de observar que los pools 1, 3 y 4 fueron los más activos, los cuales además se obtuvieron con mayor pureza, se identificaron con estándares de referencia con CCF como: ácido ursólico/acacetina, acacetina y 7-O-glucósido acacetina (pool 4) (Tabla 5), respectivamente, lo cual concuerda con datos previos (Estrada-Reyes et al., 2004). Se realizó entonces una curva dosis-respuesta tanto de la acacetina como del glucósido en un rango de dosis de 1-100 mg/kg en un curso temporal (Fig. 14 y 15 panel A) y posteriormente los datos se calcularon como área bajo la curva. En ambos casos los efectos fueron significativos ($F_{5,37}=27.72$, $P<0.001$) a partir de la dosis de 1 mg (Fig. 14 y 15 panel B).

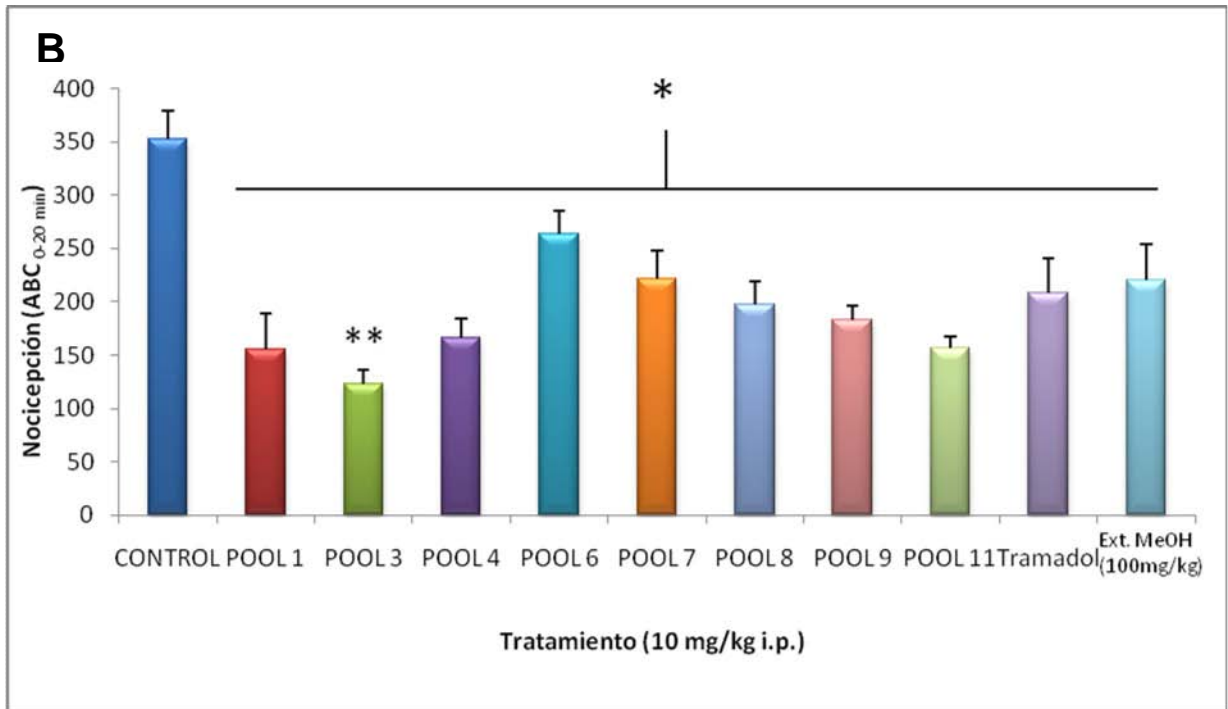
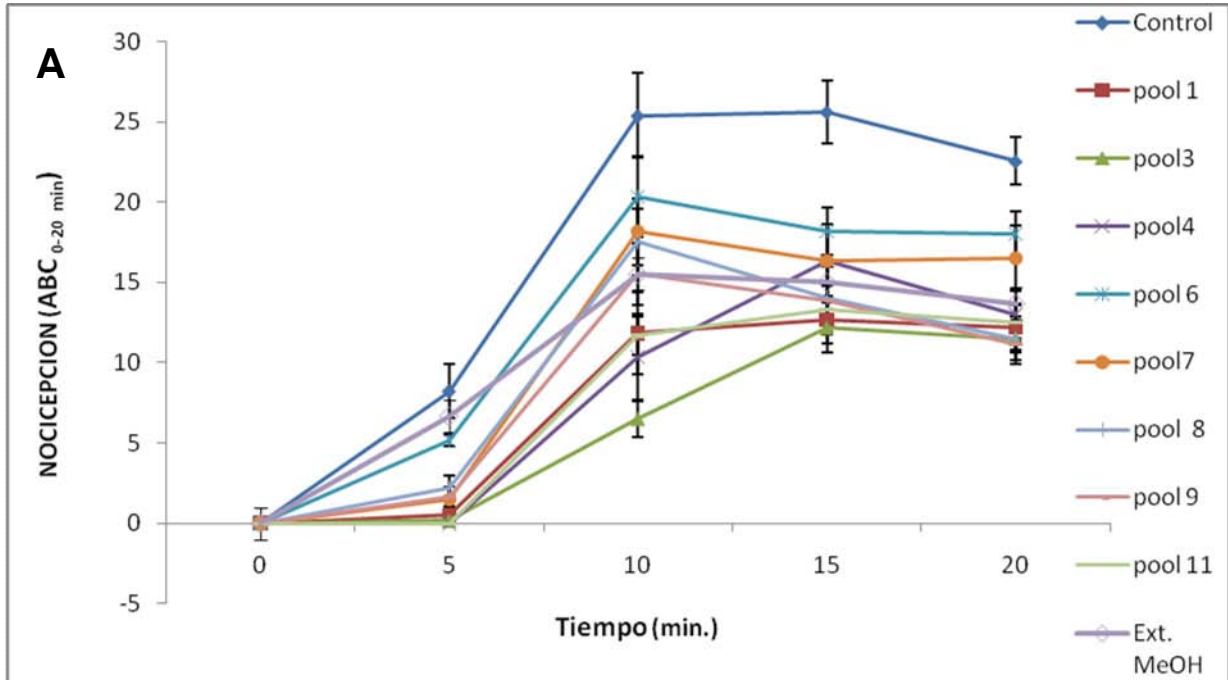


Figura 13. Curso temporal del efecto antinociceptivo de las diferentes fracciones (10 mg/kg i.p.) del extracto metanólico (MeOH) de *A. mexicana* ssp. *xolocotziana* en los estiramientos abdominales inducidos con ácido acético al 1% (panel A), representado como nocicepción en área bajo la curva (ABC) de un periodo de 0-20 min (panel B). Cada grupo representa la media \pm S.E.M. de 6 animales. Cada grupo representa la media \pm S.E.M. de 6 animales. $F_{9, 57}=10.16$, $*P<0.001$ vs control, $**F_{8, 45}= 4.10$ vs extracto MeOH.

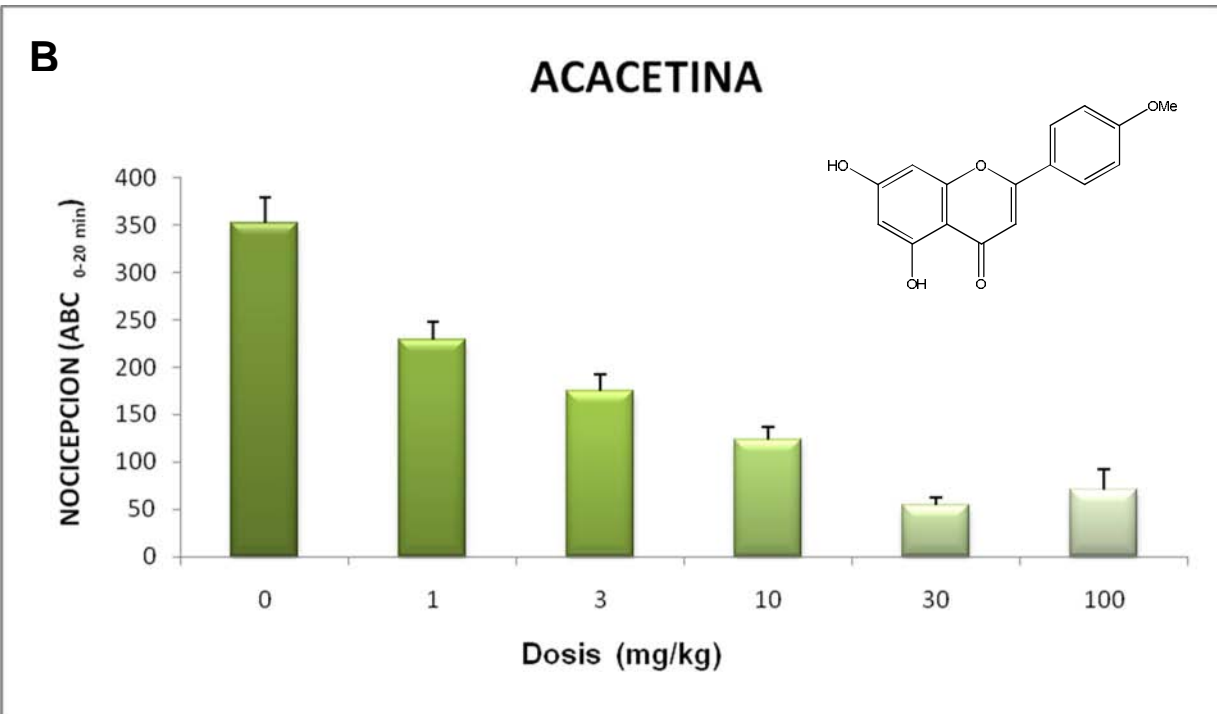
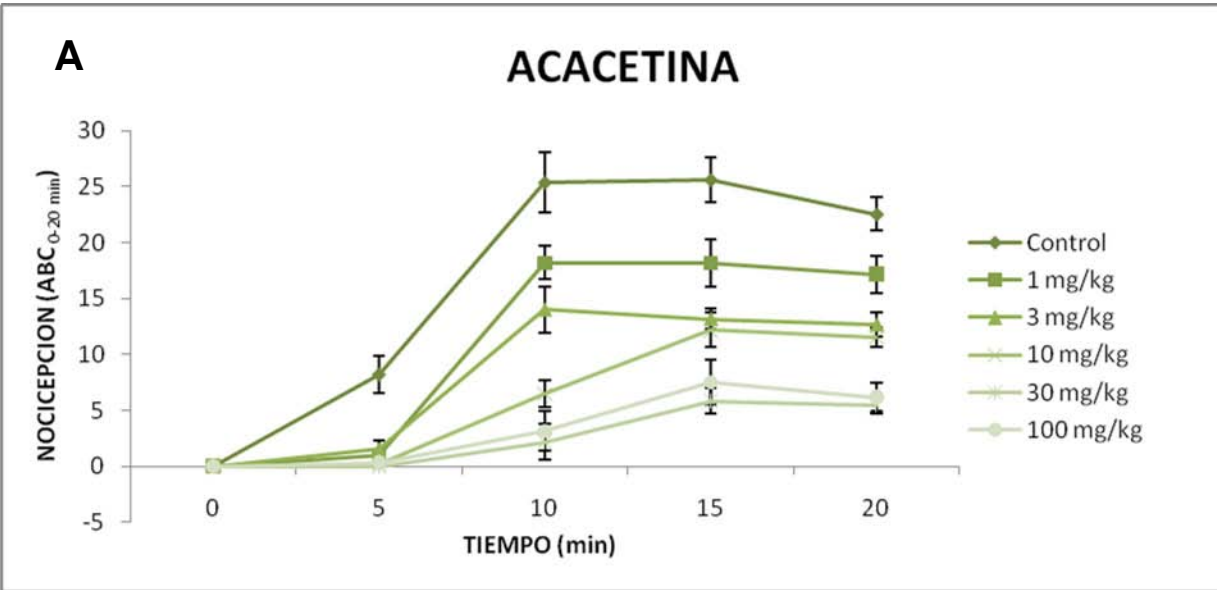


Figura 14. Curso temporal del efecto antinociceptivo de acacetina (pool 3) en los estiramientos abdominales inducidos con ácido acético al 1% (panel A), representado como nocicepción en área bajo la curva (ABC) de un periodo de 0-20 min (panel B). Cada grupo representa la media \pm S.E.M. de 6 animales. * $P < 0.001$, $F_{5,37} = 27.72$ vs control.

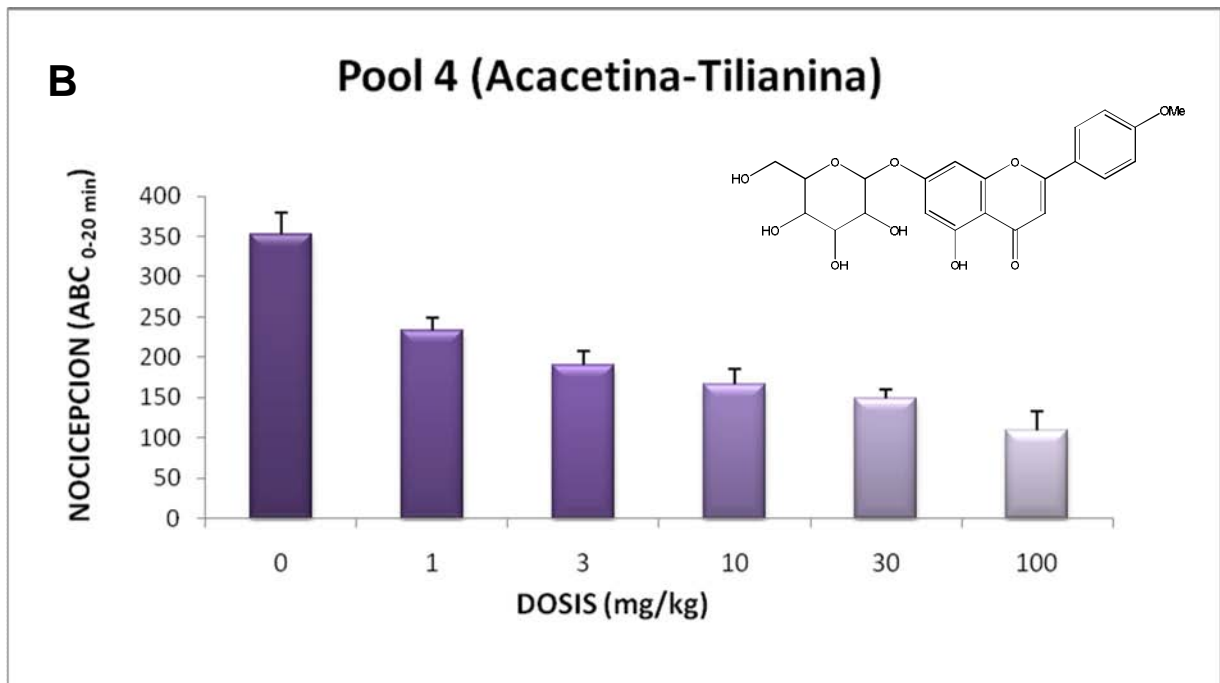
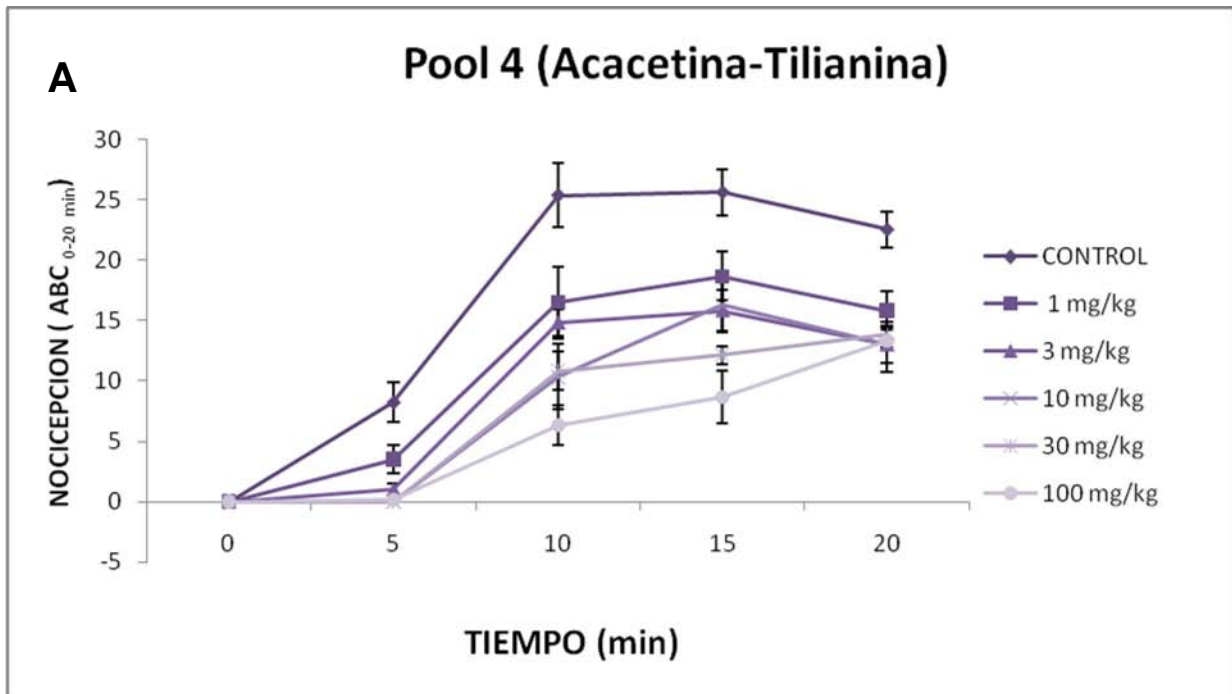


Figura 15. Curso temporal del efecto antinociceptivo de 7-O-glucósido acacetina (pool 4) en los estiramientos abdominales inducidos con ácido acético al 1% (panel A), representado como nocicepción en área bajo la curva (ABC) de un periodo de 0-20 min (panel B). Cada grupo representa la media \pm S.E.M. de 6 animales. * $P < 0.001$, $F_{5,37} = 27.72$ vs control.

7.4. Determinación de la DE₅₀

Finalmente la figura 16 muestra la comparación de las curvas dosis-respuesta con sus respectivos valores de dosis efectiva media (DE₅₀) calculado para la antinocicepción obtenida con la administración de diferentes dosis de la mezcla del glucósido de acetina y acetina (pool 4) (DE₅₀= 7.5 mg/kg) y acetina (DE₅₀= 3 mg/kg), así como de los fármacos de referencia diclofenaco (DE₅₀=12 mg/kg) y tramadol (DE₅₀= 9.95 mg/kg).

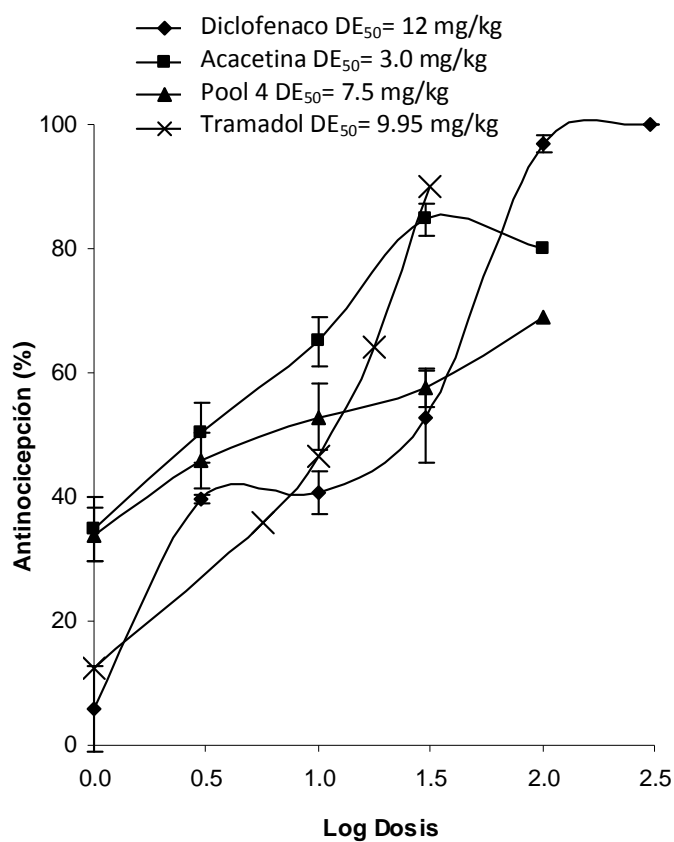


Figura 16. Curvas dosis respuesta del efecto antinociceptivo de acetina y 7-O-glucósido acetine (pool 4) en comparación con los fármacos de referencia diclofenaco y tramadol en la determinación de la Dosis Efectiva Media (DE₅₀). Los puntos representan la media ± S.E.M. de al menos 6 animales.

7.5. Determinación de la DL₅₀

Evaluación de la actividad toxica del extracto metanólico por vía intraperitoneal produjo una reducción de la nocicepción a una dosis de 100 mg/kg. No se observo ningún daño macroscópico ni pérdida de peso significativa después de los 14 días de administración en un intervalo de dosis de 100-1600 mg/kg sin embargo hubo mortalidad en la dosis de 2900 y 5000 mg/kg . La dosis estimada por el método de Lorke fue de 2828 mg/kg (Tabla 6).

Tabla 6. Dosis letal 50 del extracto metanólico de flores de *Agastache mexicana* ssp. *xolocotziana*

Dosis mg/kg	Animales muertos
	Extracto metanólico
Primera parte	
100	0/6
1000	0/3
Segunda parte	
1600	0/3
2900	1/3
5000	3/3
DL₅₀	2828.4 mg/kg

8. DISCUSIÓN

La especie *Agastache mexicana ssp. xolocotziana* es endémica de México y una planta utilizada en la medicina tradicional. Entre sus usos etnomédicos figuran el curar heridas, purulencia agusanada, quemaduras, resfriado, dolor de cabeza, fiebre, úlceras, tumores, disenterías y es recomendado como estomáquico y antiespasmódico (Hernández, 1942; Herrera, 1921). Por sus propiedades en el tratamiento del dolor en el presente estudio se evaluó la capacidad antinociceptiva de extractos crudos de *A. mexicana* en un modelo de dolor visceral en ratones denominado “writhing”, el cual consiste en contabilizar el número de estiramientos abdominales que se presentan en presencia de un agente químico como el ácido acético al 1%.

El dolor visceral es el tipo de dolor más frecuente producido por las enfermedades y uno de los motivos más habituales de consulta médica. El modelo de estiramiento abdominal o “writhing” es considerado como un modelo de nocicepción o dolor de tipo visceral donde se puede detectar analgesia, mediada a nivel central y periférico (Cervero y Laird, 1999). Se ha descrito que cuando el ácido acético diluido es inyectado intraperitonealmente, hay una acumulación de células inflamatorias, además de producción de citocinas o mediadores como la acetilcolina, la bradicina, la sustancia P y las prostaglandinas, entre otros (Cervero y Laird, 1996), que activan fibras C y A δ en nervios sensoriales produciendo dolor, hiperalgesia o alodinia tanto en humanos como en animales experimentales (Cervero y Laird, 2004; Estrup et al., 2009).

El modelo de “writhing” se ha validado para el estudio de nuevas sustancias con actividad analgésica. De tal manera que después de corroborar la actividad de los extractos crudos en el modelo, se procedió a realizar el fraccionamiento biodirigido del extracto más polar que sería el que se asemeja más a la preparación de un “té” (ya sea por infusión o por decocción). Con el fraccionamiento se obtuvieron las fracciones activas y se purificaron los posibles componentes responsables de la actividad antinociceptiva.

De los 3 extractos crudos analizados, el extracto de acetato de etilo fue el que presentó mayor actividad antinociceptiva, del cual se sabe mediante un estudio previo que contiene ácido ursólico (como posible responsable de la actividad) en aproximadamente un 15% (Aguirre-Hernández, 2001; Estrada-Reyes et al., 2004). La presencia de este terpeno en esta fracción de acetato de etilo se identificó junto con la salvigenina contenida en un 0.23% (Aguirre-Hernández, 2001; Estrada-Reyes et al., 2004). Del ácido ursólico existe amplia información en la literatura sobre sus propiedades antinociceptivas y anti-inflamatorias (Safayhi et al., 1997; Najid et al., 1992; Ferreret et al., 2007). En lo que respecta al extracto metanólico, extracto de mayor polaridad del cual se corroboró también actividad antinociceptiva; pero del cual además se obtuvo un mayor rendimiento (25.80 g, 11.46%) en comparación con los extractos crudos de acetato de etilo (6.26, 2.78%) y hexano (3.03, 1.34%), se decidió realizar su fraccionamiento biodirigido. Ello permitió la obtención de 12 pools de los cuales se pudieron seleccionar 3 pools de mayor actividad, en los que se identificaron la mezcla ácido ursólico/acacetina en el pool 2 y los flavonoides acacetina (pool 3) y la mezcla 7-O-glucósido acacetina/acacetina (pool 4). Estos componentes fueron previamente informados para *A. mexicana* como: acacetina y 7-O-glucósido acacetina (Aguirre-Hernández, 2001; Estrada-Reyes et al., 2004); sin embargo, en ese estudio su presencia no se asoció con ninguna actividad farmacológica.

En el presente fraccionamiento se obtuvo un mayor rendimiento para acetina 0.7% (141.2 mg) y para la mezcla 7-O-glucósido acetina/acetina (pool 4) 3.33% (666.7 mg), pero además se comprobó con resultados experimentales su actividad antinociceptiva y su participación en la actividad del extracto metanólico reforzando las propiedades de los flavonoides en la especie *Agastache mexicana ssp. xolocotziana* para el tratamiento del dolor visceral (Hernández, 1942; Herrera, 1921).

Los flavonoides se distribuyen ampliamente en las plantas, además son los responsables del color en muchas especies. Son considerados como antioxidantes naturales de los alimentos que además pueden inhibir la carcinogénesis en roedores. Estudios científicos indican que acetina inhibe la proliferación de células cancerosas de hígado de humanos denominadas Hep G2, al promover el bloqueo del progreso del ciclo celular y al inducir apoptosis, con lo que se ha sugerido que podría ser útil en el tratamiento del cáncer (Hsu et al., 2004). En cuanto a la 7-O-glucósido acetina/acetina (Pool 4), recientemente se reportaron sus efectos como antihipertensivo y relajante vascular en modelos *in vitro* e *in vivo* (Hernández-Abreu, 2009), en los cuales se reportan evidencias de participación de la vía del óxido nítrico (ON) /GMPc. La participación de esta vía en el efecto de 7-O-glucósido acetina (pool 4) fue descrita previamente por Nam y cols. (2006), quienes sugieren que una inhibición de la producción de ON podría ser parte del mecanismo de acción anti-inflamatorio de la 7-O-glucósido acetina (Nam et al., 2006). De hecho, varios estudios han demostrado que algunos tipos de nocicepción involucran la presencia de ON, concluyendo que el bloqueo de la producción de ON disminuye la transmisión nociceptiva (Sakurada et al., 1996; Liu et al., 1997; Ji et al., 2004; Caruso et al., 2005; Beirith et al., 2002). En un futuro será interesante evaluar el efecto de 7-O-glucósido acetina en modelos de nocicepción y la participación de esta vía del ON/GMPc.

Con la finalidad de conocer la dosis efectiva media (DE_{50}) de los compuestos puros del extracto metanólico de *Agastache mexicana*, acetina y 7-O-glucósido acetina (pool 4), se realizaron curvas dosis respuesta. De estas se observó un comportamiento dosis-dependiente con una $DE_{50} = 3$ mg/kg para acetina y $DE_{50} = 7.5$ mg/kg para 7-O-glucósido acetina (pool 4). Ambos compuestos mostraron mejor potencia antinociceptiva para este nivel de respuesta que diclofenaco $DE_{50} = 12$ mg/kg e incluso que tramadol $DE_{50} = 9.5$ mg/kg, ambos fármacos utilizados en la clínica para procesos dolorosos. Los fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) se utilizan ampliamente en la clínica por sus propiedades antiinflamatorias y analgésicas. En cuanto a los fármacos de referencia empleados en este estudio, el diclofenaco de sodio es un AINE que posee propiedades analgésicas y antipiréticas (Lagarto et al., 2008). Es un derivado del ácido fenilacético, toda vez que tiene potencia como analgésico y antiinflamatorio cien veces mayor que la aspirina. Sin embargo, se han reportado diversos efectos adversos durante su aplicación en la terapéutica del dolor, como la presencia de flebitis cuando este fármaco es administrado de manera rápida por vía endovenosa. Al igual que con la mayoría de los AINEs, existe el riesgo potencial de toxicidad renal; sin embargo, la incidencia de este problema se presenta principalmente en los consumidores crónicos de estos fármacos (Souter, 1997).

La mayor parte de los efectos adversos observados con el diclofenaco se producen en un 20% y únicamente un 2% tiene que suspender su tratamiento por intolerancia al medicamento. Entre los principales efectos observados se encuentra la irritación gastrointestinal. En los pacientes que emplean el medicamento de forma crónica se puede observar sangrado gastrointestinal. De igual forma existe una elevación de las

aminotransferasas hepáticas sin una aparente repercusión clínica (Insel, 1996). Tramadol, un derivado de aminociclohexanol, es un analgésico potente con actividad parcialmente opioide, ya que actúa sobre los receptores de opioides endógenos μ_1 y μ_2 y modulando monoaminas (Horishita et al., 2006; Scott y Perry, 2000; Xie et al., 2008). Mientras que el tramadol es efectivo en diferentes tipos de dolor moderado a intenso. Induce menor número de reacciones adversas para un nivel dado de analgesia comparado con otros opioides, aunque produce malestar general y náuseas dependiendo de la dosis. No tiene efectos clínicamente relevantes en los parámetros respiratorios y cardiovasculares a las dosis de uso recomendadas (Scott y Perry, 2000). De lo anterior, es necesaria la búsqueda de nuevos fármacos o alternativas de terapéutica para el dolor eficaces pero que produzcan el mínimo de efectos adversos.

El estudio de toxicidad aguda es el primer paso en la investigación de una sustancia desconocida dentro de un enfoque farmacológico. En este estudio se utilizó el método de Lorke, el cual se basa en la suposición de que la toxicidad de un extracto o sustancia investigado es completamente desconocida y con el propósito de determinar el índice de toxicidad aguda como la DL_{50} empleando un número mínimo de animales experimentales (Lorke 1980). La DL_{50} calculada por éste método para el extracto metanólico de *A. mexicana* spp. *xolocotziana* fue de 2828 mg/kg, valor considerado como de poca importancia toxicológica.

9. CONCLUSIONES

- El Cernimiento preliminar de la eficacia y potencia del efecto antinociceptivo de extractos de *A. mexicana* ssp. *xolocotziana* fue mayor en el de acetato de etilo seguido por el hexánico y éste igual que el metanólico con la presencia de acacetina mayor que la 7-O-glucósido acacetina y esta a su vez mayores que el ácido ursólico como componentes activos responsables de la actividad.
- La Potencia antinociceptiva de acacetina y 7-O-glucósido/acacetina (DE_{50} = 3 y 7.5 mg/kg, respectivamente) es comparable con la de diclofenaco y tramadol (DE_{50} = 12 y 9.95 mg/kg, respectivamente) en el modelo de dolor visceral.
- Se corroboran las propiedades analgésicas que se atribuyen a esta especie en la medicina tradicional.

10. PERSPECTIVAS

- Realizar la evaluación antinociceptiva de los componentes en los “pools” restantes para la identificación de compuestos activos.
- Evaluar los posibles mecanismos de acción involucrados.
- Evaluar otras actividades farmacológicas asociadas con su uso en la medicina tradicional.

11. BIBLIOGRAFÍA

Alonso C., Lara F., Esquivel B., Mata R. 1999. Plantas medicinales de México II. Composición, usos y actividad biológica. México. 278 pp.

Aguilar A., Martínez M.A. 1993. Los herbarios medicinales de México. Secretaría de Salud. La investigación científica de la herbolaría medicinal mexicana. Edición Conmemorativa. México. pp. 89-98.

Appenzeller O. 1982. The Autonomic Nervous System. Ed. Elsevier. Amsterdam. 910 pp.

Argueta A., Cano L., Rodarte M. 1994. Atlas de las plantas de la medicina tradicional Mexicana. Ed.: Instituto Nacional Indigenista Press. México. 1193 pp.

Balandrin M.F., Kinghorn A.D., Farnsworth. 1993. Plant-derived natural products in drug development. Journal American Chemical Society **115**: 3-12.

Barberán F.A.T., Gil M.I. 1992. Chemistry and natural distribution of flavonoids in the Labiatae. Ed: R.M. Harley y T. Reynolds. London. pp. 299-305.

Bardina P.A., Martínez M.J. 2003. Tipos de dolor. En Manual práctico de dolor. Hosp. Univ. Príncipe de Asturias. Ed: PBM, Madrid. pp. 14-19.

Barragán A. 2005. La experiencia del dolor crónico. Tesis de doctorado en Antropología. México: ENAH-INAH. 270pp.

Bautista S.G. 2004. Neuropatías consecutivas a diabetes. Dolor neuropático secundario a enfermedades sistémicas. Sistema de Actualización Médica en Dolor Neuropático (SAM). Ed.: Intersistemas. México. pp. 190-202.

Barzaga F.P., Núñez F.Y., Carrillo D. C., Chávez H. I., González S. M. L., González R., Echevarría M. 2004. Efecto antiinflamatorio del Extracto Acuoso Liofilizado de *Ocimum tenuiflorum* L. en ratas. Acta Farmacéutica Bonaerense. **23**: 292-297.

Beirith, A., Santos, A.R.S., Calixto, J.B., 2002. Mechanisms underlying the nociception and pawoedema caused by injection of glutamate into the mouse paw. Brain Research **924**: 219-228.

Benthsath A., Rusznyak S., Szent-György A. 1936. Vitamin nature of flavona. Nature; 798. En: Flavonoids in Health and Disease. Ed Marcel Dekker, INC. New York. 137-161.

Blinderman C.D., Cherny N.I. 2005 .Existential issues do not necessarily result in existential suffering: Lessons from cancer patients in Israel. *Palliat Medic* **19**: 371- 380.

Breivik H. 2006. Survey of chronic pain in Europe: Prevalence, impact on daily life, and treatment. *European Journal of Pain*. **10**: 287–333.

Bruneton J. 1999. Pharmacognosy. Phytochemistry medicinal plants. 2ª. Edición Ed. Lavoisier. New York. 1119 pp.

Bye R., Linares E., Ramamoorthy T.P., García F., Collera O., Palomino G., Corona, V., 1987, *Agastache mexicana* ssp. *Xolocotziana* (Lamiaceae). A new taxón from mexican medicinal plants. *Phytologia* **62**: 156-163.

Bye, R., Linares E., Ramamoorthy T.P., Gacia F., Collera O., Palomino G., Corona V., 1987. *Agastache mexicana* Subespecie *Xolocotziana* (Lamiaceae), A new taxón from the mexican medicinal plant. *Phytologia*. **62**: 157-163.

Bye R., Linares E., 1983. The role of plants in the mexicana markets and their importance in ethnobotanical studies, *Journal of Ethnobiology* **3**: 1-3.

Cabrera, A.L. 1970. Flora de la provincia de Buenos Aires. Colección Científica INTA 4. Buenos Aires **6**: 169.

Cano L., 1997, Flora medicinal de Veracruz. Y. Inventario etnobotánica. Ed. Universidad Veracruzana. Xalapa. p. 49.

Carballo AI, Martínez AL, González-Trujano ME, Pellicer F, Ventura-Martínez R, Díaz-Reval MI, López-Muñoz FJ. 2010. Antinociceptive activity of *Annona diversifolia* Saff. leaf extracts and palmitone as a bioactive compound. *Pharmacology Biochemistry Behavior*. **95**:6-12.

Carretero A.M.E. 2001. Alcaloides: derivados del triptófano y otros alcaloides (III). *Panorama Actual Medico*. **25**: 442-449.

Caruso, C., Durand, D., Watanobe, H., Lasaga, M., 2005. NMDA and group I metabotropic glutamate receptors activation modulates substance P release from the arcuate nucleus and median eminence. *Neuroscience Letters* **393**:60–64.

Cassinello E.J. 2004. El dolor. Definición, tipos patogénicos, formas de presentación y evaluación del dolor. Manual SEOM de Cuidados Continuos. Ed.: Sociedad Española de Oncología Médica. Dispublic, S.L (DL: M-41079- 2004). España. 455 pp.

Charles D.J., Simon J.E., Widrlechner M.P. 1991. Characterization of essential oils of *Agastache* species. *Journal of Agricultural & Food Chemistry* **39**: 1946-2949.

Chávez Carpio, C.Y. 1986. Propagación vegetativa de toronjil morado (*Agastache mexicana* (HBK) Lint & Epling) and toronjil blanco (*Agastache* sp.) por esquejes de tallo, bajo condiciones de invernadero. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias Biología, México D.F. 234 pp.

Cervero F., Laird JM. 1999. Visceral pain. *Lancet* **353**: 2145-2148.

Cervero F., Laird JM. 1996. From acute to chronic pain: mechanisms and hypotheses. *Prog Brain Res.* **110**: 3-15.

Cervero F., Laird JM. 2004. Understanding the signaling and transmission of visceral nociceptive events. *J Neurobiol* **61**:45-54.

Cingolani H.E., Alberto B.H. 2000. Fisiología humana de Houssay. Ed. El Ateneo. Buenos Aires. pp. 848-852.

Cronquist A., 1988. The evolution and classification of flowering plant. 2o. Edición. The New York Botanical Garden. New York. 555 pp.

Davies D.D., Giovanelli J., Rees T.A., 1969. Bioquímica Vegetal. Ediciones Omega. Barcelona. pp. 452-461.

Dennis S., Melzack R. 1983. Perspective on phylogenetic evolution of pain expression in Animal Pain: Perception and Alleviation. Kitchell R. L., H Erickson. H., Carstens E., Davis L.E. Bethesda. Ed. MD: America Physiological Society. pp. 151-160.

Díaz R.E, Casado H.A. 2003. Introducción al problema del dolor en Oncología. En: Tratamiento del dolor en Oncología. Ed. You & Us S.A. Madrid. pp. 1- 12.

Estrada-Reyes R., Aguirre-Hernández. E., García A. A., Soto H. M., Linares E., Bye R., Heinze G., Martínez V.M. 2004. Comparative chemical composition of *Agastache mexicana* ssp. *mexicana* and *Agastache mexicana* ssp. *Xolocotziana*. *Biochemical systematics and ecology.* **32**: 685-694.

Estrup A.O., Andresen T., Louring C.L., Upton RN. 2009. Translational pain research: Evaluating analgesic effect in experimental visceral pain models. *World J Gastroenterol* **15**: 177-181.

Exner J., Ulubelen A., Mabry T. J. 1981. Chemistry of *Agastache*, Parte II: Flavonoids of *Agastache aurantiaca*. *Revista Latinoamericana de Química* **12**: 37-38.

Ferrer A.E.H., Hernández E.M., Pérez M.C.S., Basterrechea R.M., Fuentes F.V.R., Torres F. M., 2005. Aislamiento de ácido ursólico de las hojas de *Cestrum laurifolium* L'Herit. *Revista CENIC Ciencias Químicas.* **38**: 243-247.

Fields H, Martin B. 1994. Dolor: fisiopatología y tratamiento. En: Harrison. Principios de Medicina Interna, 13ª edición. Ed. Interamericana Mc Graw-Hill. vol. I. pp. 444-449.

Fields, *op. cit.* pp. 2059-2065.

Fields, *op. cit.* pp. 2384-2388.

Fisher D.G. 1985. Morphology and anatomy of the leaf of *Coleus blumei* (Lamiaceae). American Journal of Botany **72**:392-406

Fuentes G.R.G., Widrechner M.P., Wilson L.A. 2000. Inheritance studies of aromatic compounds in *Agastache foeniculum* (Pursh) Kuntze. Journal of Essential Oil Research **12**: 581-594.

Galati E.M., Morforte M.T., Kirjavainen S., Forestieri A.M., Trovato A., Tripodo M.M. 1994. Biological effects of hesperidin, a citrus flavonoid: anti-inflammatory and analgesic activity. *Fármaco*. **40**: 709-712.

Ganong W. F. 2006. Fisiología Médica. 20ª edición. Editorial El Manual Moderno. México. pp. 129-138.

González A., Condón L. 2000. Incapacidad por dolor lumbar en España. *Medicina Clínica Barcelona*. **114**: 491-492.

González B.S., Rodríguez L.M. 2003. El dolor, Fisiopatología Clínica. Sistema de medición. en *Dolor y Cáncer. Hacia una oncología sin dolor*. Ed. Médica Panamericana S.A. Madrid. pp. 7-32.

Gonzalez-Trujano ME, Carrera D, Ventura-Martinez R, Cedillo-Portugal E, Navarrete A. 2006. Neuropharmacological profile of an ethanol extract of *Ruta chalepensis* L. in mice. *J Ethnopharmacology*. **106**:129-35.

Gryglewski RJ, Korbut R, Robak J., Swies J. 1987. On the mechanism of antithrombotic action of flavonoids. *Biochem Pharmacol*. **36**:317-322.

Guyton A. 1996. Tratado de Fisiología Médica. Ed.: Interamericana Mc Graw Hill. 9ª edición. México 161-174, pp. 662-653.

Hernández A.O., Castillo E.P., León R.I., Ibarra B.M., Villalobos M.R., González C.J., Vergara G.J., Estrada S.S. 2009. Antihypertensive and vasorelaxant effects of tilianin isolated from *Agastache mexicana* are mediated by NO/cGMP pathway and potassium channel opening. *Biochemical Pharmacology*. **78**: 54-61.

Hernández, F. 1942, Historia de la plantas de nueva España. Tomo I. Ed.: Imprenta universitaria, México, 227 pp.

Herrera A. L. 1921. La biología en México durante un siglo. Ed. Universidad de Michigan. Michigan. 504pp.

Hickey L. J., Wolfe J. A. 1975. The bases of angiosperm phylogeny. Vegetative morphology. *Annals of Missouri Botanical Garden* **62**:538-589

Horishita T., Minami K., Uezono Y., Shiraishi M., Ogata J., Okamoto T., Shigematsu A. (2006). The tramadol metabolite, Odesmethyl tramadol, inhibits 5-hydroxytryptamine type 2C receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *Pharmacology*. **77**: 93–99.

Hsu Y.H., Kuo P.L., Liu C.F., Lin C.C. 2004. Acacetin-induced cell cycle arrest and apoptosis in human non-small cell lung cancer A549 cells. *Cancer Letters*. **212**: 53-60.

IASP. 1979. Pain terms: A list with definitions and notes on usage-Pain. **14**: 205- 08.

Itokawa H., Suto K., Takeya K. 1981. Structures of isoagastochoside and agastachin, new glucosylflavones isolated from *Agastache rugosa*. *Chemical Pharmaceutical Bulletin* **29**: 1777-1779.

Insel PA. 1996. Analgesic-antipyretic and anti-inflammatory agents and drug employment in the treatment of gout. In: Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of therapeutics (Hardman JG, Limbird L, Molinoff PB, Ruddon RW, Goodman A. eds) McGraw-Hill, New York.pp. 617-57.

Ji, R.R., Strichartz, G., 2004. Cell signalling and the genesis of neuropathic pain. *Science* **252**: 1–19.

Kyu-Lee H.K., Oh S.R., Kim J.W., Lee C.O. 1995. Agastaquinone, a new cytotoxic diterpenoid quinone from *Agastache rugosa*. *Journal of Natural Products* **58**: 1718-1721.

Kumar S.S., Okuyama E., Fujimoto H., Ishibashi M. 2003. Separation of *Leucas aspera*, a medicinal plant of Bangladesh, guided by prostaglandin inhibitory and antioxidant activities. *Chemical pharmacology bulletin*. **51**: 559-598.

Lagarto A., Bueno V., Martínez A., García R., Lara M., Fernández A., Gabilondo T., Valdés O., Carrillo C., Montero. 2008. Irritación gástrica producida por diclofenaco de sodio: estudio comparativo de tabletas de liberación controlada en conejos. *Revista Toxicologica*. **25**: 32-37.

Le Bars D., Gozariu M., Cadden S.W. 2001. Animal Models of Nociception, *Pharmacological Reviews* **53**: 558-619.

Linares E., Flores B., Bye R., 1988, Selección de plantas medicinales de México. Ed.: Limusa, México. 125 pp.

Linares E., Flores B., Bye R. 1995. Plantas medicinales de México: usos y remedios tradicionales. 2ª. edición. Ed.: Centro de Tecnología electrónicas e informática (CETEI) y el Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México (IB_UNAM) México. 155 pp.

Lint H., Epling C. 1945. A revisión of *Agastache*, American Midland Naturalist. **33**: 207-230.

Liu, H., Mantayh, P.W., Basbaum, A.I., 1997. NMDA-receptor regulation of substance P release from primary afferent nociceptors. Nature **386**: 721–724.

Lognay G.C., Vercheure M., Steyel M., Marlier M. 2002. Volatile constituents of *Agastache scrophuriaefolia*. Journal Essential Oil research. **14**: 42-43.

Lorke D.A. 1983. New approach to practical acute toxicology testing. Archives of Toxicology. **54**: 275-287.

Martínez-Flórez, S., González-Gallego, J., Culebras J.M., Tuñón M.J. 2002. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. Nutr. Hosp. **17**: 271-278

Magazo V.V., Murillo G.M. 2006. Dolor y Cáncer. Guía de Práctica Clínica en Cuidados Continuos. Ed. Vicente Valentín Maganto. Madrid. pp. 103-130.

Maleki N., Fathiazad F., Garjani A. 2007. Antinociceptive properties of extracts and two flavonoids isolated from leaves of *Danae racemosa*. Archives of Pharmacal Research **30**: 1536-1542.

Mata R. 1993. Estudios químicos y aspectos biológicos de algunas plantas usadas en la medicina tradicional de México, Secretaría de Salud. La investigación científica de la herbolaría medicinal mexicana. Edición Conmemorativa. México. pp. 120-142.

Mazza G., Kiehn F.A. 1992. Essential oil of *Agastache foeniculum*, a potential source of methyl chavicol. Journal of Essential Oil. **4**: 295-299.

Mc Murry J. 1996. Organic Chemistry. 4ª. Edición Ed. Brooks/Cole Publishing Company, Mexico. pp. 1108-1110.

Meckes, M. 1993. La investigación científica de la herbolaría medicinal mexicana. Secretaría de Salud. Edición Conmemorativa. México. pp.69-73.

Meckes M., Garduño R.M.L., Marquina S., Álvarez L. 2001. Iridoides adicionales de la planta medicinal *Astianthus viminalis* y su actividad hipoglucemiante y antihiperoglucemiante. Revista de la Sociedad Química de México. **45**: 195-199.

Metcalfe, C. R., Chalk L. 1979. Anatomy of the dicotyledons. Systematic anatomy of leaf and stem, with a brief history of the subject, vol. I. Clarendon, Oxford. 294 p.

Mitchell J.A., Larkin S., Williams T.J. (1995). Cyclooxygenase-2: regulation and relevance in inflammation. *Biochemical Pharmacology* **50**:1535-1542.

Middleton E., Kandaswami C., Theoharides T. C. 2000. The Effects of Plant Flavonoids on Mammalian Cells: Implications for Inflammation, Heart Disease, and Cancer. *Pharmacology*. **52**: 673–751.

Montoro R.B., Clemente B.S., Mendante B.L. 2003. Marco actual de los productos biotecnológicos según los estudios farmacoeconómicos disponibles. *Medicina Clínica* **120**: 498-504.

Najid A., Simon A., Cook J., Chable-Rabinovitch H., Delage C., Chulia A., Rigaud M. 1992. Characterization of ursolic acid as a lipoxygenase and cyclooxygenase inhibitor using macrophages, platelets and differentiated HL60 leukemic cells. *FEBS Letters* **299**:213-217.

Nam K.H., Choi J.H., Seo Y.J., Lee Y.M., Won Y.S., Lee M.R., Lee M.N., Park J.G., Kim Y.M., Kim H.C., Lee C.H., Lee H.K., Oh S.R., Oh G.T. 2006. Inhibitory effects of tilianin on the expression of inducible nitric oxide synthase in low density lipoprotein receptor deficiency mice. *Experimental and Molecular Medicine*. **30**: 445-452.

Nava, T.A. 2008. Prevalencia del dolor crónico en mujeres de la zona metropolitana de Monterrey. Serie investigaciones. Instituto Estatal de las mujeres, Nuevo León. 169 pp.

Ortega A., Roca A. Mico J.A. 2002. Animal models of pain. A critical view. *Revista de la Sociedad Española del dolor*. **9**: 447-453.

Reddy S.K., Nguyen P. 2000. Breakthrough pain in cancer patients: new therapeutic approaches to an old challenge. *Curr Rev Pain*. **4**: 242-247.

Rodríguez H.L., Cárdenas J. 1999. Comparative chemotaxonomy in Labiatae *Phytochemistry*. **2**: 91-100.

Rzedowski G.C., Rzedowski J., (eds.) 2001. Flora fanerogámica del Valle de México, 2^a. ed. Instituto de Ecología, A.C. y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Pátzcuaro, Michoacán. 1406 pp.

Rzedowski J. 1993. Diversity and origins of the phanerogamic flora of Mexico. En Ramamoorthy T.P., Bye R., Lot A., Fa J. Ed.: *Biological diversity of Mexico: origins and distribution*, Oxford University Press. New York. pp.129-144.

Safayhi H., Rall B., Sailer E., Ammon H. 1997. Inhibition of boswellic acids of human leucocyte elastase. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. **281**:460-463.

Sakurada, T., Sugiyama, A., Sakurada, C., Tanno, K., Sakurada, S., Kisara, K., Hara, A., Abiko, Y. 1996. Involvement of nitric oxide in spinally mediated capsaicin- and glutamate-induced behavioural response in the mouse. *Neurochemistry International* **29**: 271–278.

Sánchez D.F, Cruz H.J. 2003. Anatomía y Fisiología del dolor. En: Tratamiento del dolor en Oncología. Ed.: Eduardo Díaz-Rubio. Ed. You & Us. Madrid. pp. 12-33.

Sanders R.W., 1987. Taxonomy of *Agastache* section *Brittonastrum* (Lamiaceae-Nepeteae). *Systematic Botany Monograph*. **15**: 1-92.

Sanders R.W. 1979. A systematic study of *Agastache* section *Brittonastrum* (Lamiaceae, Nepetae), Austin, Texas. Ph. D. Thesis. University of Texas. Faculty of the Graduate School. 250 pp.

Sanders R.W., 1979. A sistematic study of *Agastache mexicana* section *Brittonastrum*. (Lamiaceae, Nepetae). Austin Texas, University. 250 pp.

Sanfilippo J. 1993. La aculturación de las plantas medicinales mexicanas a la medicina europea. Secretaría de Salud. La investigación científica de la herbolaría medicinal mexicana. Edición Conmemorativa. México. pp.53-60.

Santillan A.M., Ma. López V. E., Aguilar R.S., Aguilar C.A. 2008. Estudio etnobotánico, arquitectura foliar y anatomía vegetativa de *Agastache mexicana* ssp. *mexicana* y *A. mexicana* ssp. *xolocotziana*. *Revista Mexicana de Biodiversidad* **79**: 513- 524.

Sanz R.A., Centeno C.C. 2001. Dolor único o múltiple. ¿Cuántos y de qué clase? Medida de dolor. El control del sufrimiento evitable. Terapia analgésica. Ed. You & Us Madrid. pp. 51-65.

Saskia A.B.E., van Accker, Bast A.A.L.T. 1998. Structural Aspects of Antioxidant Activity of Flavonoids. En: *Flavonoids in health and Disease*. Ed Marcel Dekker, INC. New York. 221-251.

Scott L.J., Perry C.M.(2000). Tramadol: a review of its use in perioperative pain. *Drugs* **60**: 139-76.

Simmonds M. 2001. Importance of flavonoids in insect-plant interactions: Feeding and oviposition. *Phytochemistry* **56**: 245-252.

Singleton V.L. 1981. Flavonoids. En: Childester CO.Mrak EM, Ed. Ste-wart Gf. *Advances in Food Research*. New York. pp.149-242.

Smit H, Elliot M, 2001. The impact of chronic pain in the community. *Family Practice*. **18**: 292-299.

Souter A.J. 1997. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs. In: *Intravenous Anesthesia*. (White P ed.) Williams & Wilkins, Baltimore. pp. 247-58.

Swies J., Robak J., Dabrowski L., Duniec Z., Michalska Z., Gryglewski R.J. 1984. Antiaggregatory effects of flavonoids in vivo and their influence on lipooxygenase and cyclooxygenase in vitro. *Pol J Pharmacol Pharm*, **36**:455-463.

Timberlake C.F., Henry B.S. 1986. Plant pigments as natural food colours. *Endeavour* **10**: 31-36.

Timoneda F. 1996 Definición y clasificación del dolor. *Anestesiología-Reanimación y Clínica del Dolor*, Hospital Clínico San Carlos. Madrid. pp.49-55.

Tirillini B., Menghini A., Pellegrino R. 1997. Constituents of the leaf secretory hairs of *Agastache foeniculum* Kuntze. *Journal of Essential Oil Research*. **9**: 19-21.

Tojar T., Sánchez S.M. 2001. Dolor neuropático. El control del sufrimiento evitable. *Terapia analgésica*. Ed You&Us, S.A. Madrid. pp. 67-78.

Torres R. 2000. Tratamiento adecuado para el dolor por cáncer. *Gaceta de la Clínica del Dolor*. **2**: 8-12.

Tres S.A., Pérez C.C. 2003. Síndromes Clínicos de dolor en pacientes con cáncer. *Tratamiento del dolor en Oncología*. Ed. Eduardo Díaz- Rubio. Madrid. pp.35-57.

Vargas L.A., Casillas L.E. 1993. La herbolaria ante los organismos oficiales de salud, Secretaría de Salud. *La investigación científica de la herbolaria medicinal mexicana*. Edición Conmemorativa. México. pp. 135-153.

Vázquez A., Pérez T., Casamayor T. 2004. Tratamiento del síndrome doloroso, *Ámbito Farmacéutico*. *Farmacología*. **23**: 74-78.

Villar A.M., Gómez P.S. 2006. Boldo. Indicaciones terapéuticas. *Farmacia Profesional*. **20**: 74-78.

Villoria C., Madrid L. 1994. Bases anatómicas, fisiológicas y biológicas del dolor. *Teorías. Estudio y tratamiento del dolor agudo y crónico*. Tomo1. Cap. 2. Ed. Libro del año. pp.77-140.

Villoria C.M. 2002. Dolor Irruptivo: Definición. Características. Perfil del tratamiento ideal. Documento de Consenso. SEOM. SECPAL. SED. Ed. Meditex. Madrid. 27-38 pp.

Vrijisen R., Everaert L., Boeté A. 1988. Antiviral activity of flavones and potentiation by ascorbate. *J Gen Virol.*,**69**:1749-1751.

Wenk R. 2008. Sufrimiento existencial en el final de la vida. La perspectiva de un médico. *Medicina Paliativa.* **15**: 48-50.

Weyerahl P., Marschall E., Manteuffel E., Huneck S. 1992. Volatile constituents of *Agastache rugosa*. *Journal of Essential Oils Research* **4**: 585-587.

World Health Organization. 2004. Palliative Care. The solid facts. Europe: WHO.

Xie H., Dong Z.Q., Ma F., Bauer W.R., Wang X., Wu G.C.(2008). Involvement of serotonin 2A receptors in the analgesic effect of tramadol in mono-arthritic rats. *Brain Research* **1210**: 76–83.

Zermeño M., García E., Guzmán P.; Covarrubias A. 2005. Exploración De Plantas Medicinales Utilizadas Por La Comunidad Indígena Xi'oi Del Municipio De Rayón En San Luis Potosí. Facultad de Ciencias Químicas, Instituto de Investigación de Zonas Desérticas, Universidad Autónoma de San Luis Potosí. p. 5.

CIBERREFERENCIAS.

- www.aula.acemefide.org/cursos/photo/1161933973Farmacologia%20del%20Dolor.pdf
- www.biologia.ucr.ac.cr/profesores/Jeffrey%20Sibaja/B110%20Organismos/Gimnos+Angiospermas-2009.pdf