



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

Evaluación antinociceptiva de la interacción farmacológica de un
analgésico antiinflamatorio no esteroideo con *Tilia americana*
en un modelo experimental de dolor.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIOLÓGICO

PRESENTA
JORGE VALDES RUIZ



CIUDAD DE MÉXICO

2017



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Dra. Juana Rosado Pérez.

SECRETARIO: Dra. Rosa Ventura Martínez.

VOCAL: M. en F. Idalia Leticia Flores Gómez.

1er. SUPLENTE: Dr. Osvaldo Daniel Castelán Martínez.

2° SUPLENTE: Dr. Arturo Valle Mendiola.

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LABORATORIO 28 DE DESARROLLO DE MEDICAMENTOS DEL DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA. FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNAM.

DIRECTOR DEL TEMA: _____

Dra. Rosa Ventura Martínez

ASESOR INTERNO: _____

M. en F. Idalia Leticia Flores Gómez

SUSTENTANTE: _____

Jorge Vades Ruiz

DEDICATORIA

A mis padres por demostrarme que con esfuerzo y dedicación se logra lo que se desea. Por cuidar de mí, por apoyarme en lo que me apasiona y por hacer de mí la persona que soy. Los amo.

A la UNAM por todo lo que me hizo vivir, por todo lo aprendido y por ser una parte importante de mi vida.

A la FES Zaragoza por todos los momentos que pasé en ella, por las personas que conocí, por sus enseñanzas y por hacerme sentir orgulloso de ser universitario.

AGRADECIMIENTOS

- A mi madre por su amor, paciencia, comprensión y por dedicarme su tiempo. Eres la mejor mamá de mundo.
- A mi padre, quien es mi ejemplo a seguir, por su amor, su esfuerzo y ayuda. Gracias por darme la oportunidad de estudiar y apoyarme en todo.
- A mis hermanos. A Moisés por ayudarme cada que necesitaba de él y por trazar las metas a superar. A Leonardo por hacer más ligeros mis días, por su ayuda y por hacer que me esforzara para poder ser un ejemplo para él.
- A mi directora de tesis, la Dra. Rosa Ventura, por ser guía en este trabajo, por su paciencia, consejos y por compartir sus conocimientos conmigo.
- A la familia Salgado Zavala, por su amistad y por convertirse en mi familia. A Juan y Alan por su cariño, su apoyo incondicional, sus consejos y todos los momentos buenos y divertidos que hemos pasado.
- A Luis, por su amistad, por escucharme, por sus consejos y apoyo. “Las malas compañías son las mejores”.
- A Carolina por acompañarme es esta etapa, por su amor, su tiempo y apoyo. Gracias por disfrutar y maravillarte de este mundo junto a mí, eres increíble. Te quiero mi dulce corazón.
- A los amigos que me regalo la FES Zaragoza, a Nelly, Dani, Clau, Ema, Jahz, BU, Lalo, Axel, Pollito y Punk. Gracias por su amistad, y por regalarme tantos buenos momentos.
- A Mariana, Karina, Ara y Lupita por ayudarme siempre que lo necesite, por aguantarme, por todos sus consejos y por compartir sus conocimientos conmigo.

*“Los hombres sin historia, son la historia.
Grano a grano se forman largas playas”*

Silvio Rodríguez

Investigación realizada gracias al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación Tecnológica (PAPIIT) de la UNAM.

Clave del proyecto: IN204416

NOMBRE DEL PROYECTO: Estudio de los efectos farmacológicos y/o adversos de algunas plantas medicinales mexicanas utilizadas en la medicina tradicional y sus interacciones con fármacos conocidos.

AGRADEZCO A LA DGAPA-UNAM LA BECA RECIBIDA

TABLA DE CONTENIDO

ABREVIATURAS	1
ÍNDICE DE FIGURAS	4
ÍNDICE DE CUADROS	5
ÍNDICE DE DIAGRAMAS	6
1. INTRODUCCIÓN	7
2. MARCO TEÓRICO	8
2.1. Dolor.....	8
2.1.1. Clasificación del dolor.....	8
2.1.1.1. Dolor neuropático.....	9
2.1.1.2. Dolor nociceptivo.....	9
2.1.1.2.1. Dolor somático.....	9
2.1.1.2.2. Dolor visceral.....	10
2.2. Nocicepción.....	10
2.3. Tratamiento farmacológico del dolor.....	13
2.3.1. Opioides.....	13
2.3.2. Analgésicos antiinflamatorios no esteroideos (AINEs).....	13
2.3.2.1. Diclofenaco.....	16
2.3.3. Tratamientos alternativos para el dolor.....	18
2.4. Uso de las plantas medicinales.....	18
2.4.1. <i>Tilia americana variedad mexicana</i>	19
2.4.1.1. Usos en la medicina tradicional.....	20
2.4.1.2. Estudios farmacológicos y análisis químico.....	21
2.5. Interacciones farmacológicas.....	22
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	24
4. HIPÓTESIS	26
5. OBJETIVOS	27
5.1. Objetivo general.....	27
5.2. Objetivos particulares.....	27
6. METODOLOGÍA	28
6.1. Material vegetal.....	28

6.1.1. Obtención del extracto.....	28
6.2. Animales	28
6.3. Modelo de estiramiento abdominal (writhing test).....	29
6.3.1. Diseño experimental	30
6.4. Modelo de determinación de úlceras gástricas	33
6.5. Análisis de datos	34
7. RESULTADOS	36
7.1. Inhibición del número de estiramientos abdominales inducidos por el diclofenaco.....	36
7.2. Inhibición del número de estiramientos abdominales inducidos por el extracto metanólico de <i>T. americana var. mexicana</i>	38
7.3. Curva dosis respuesta (CDR) del efecto antinociceptivo inducido por diclofenaco y el extracto metanólico de <i>T. americana var. mexicana</i> en administración simple.....	40
7.4. CDR del efecto antinociceptivo inducido por diclofenaco y el extracto metanólico de <i>T. americana var. mexicana</i> en combinación.....	41
7.5. Daño gástrico producido por diclofenaco en administración simple y en combinación con el extracto metanólico de <i>T. americana var. mexicana</i>	45
8. DISCUSIÓN	47
9. CONCLUSIONES	54
10. PERSPECTIVAS	55
11. REFERENCIAS	56

ABREVIATURAS

°C	Grados Celsius
5-LOX	5-Lipooxigenasa
ABC	Área bajo la curva
AC	Adenilato ciclasa
AINE	Analgésico antiinflamatorio no esteroideo
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
ASIC	Canales iónicos sensibles a protones
Ca ²⁺	Ion calcio
CDR	Curva dosis respuesta
C _{max}	Concentración máxima
COX	Ciclooxigenasa
CV	Coefficiente de variación
DE ₅₀	Dosis efectiva 50
Diclo	Diclofenaco
EEM	Error estándar de la media
E _{max}	Efecto máximo
EXT	Extracto metanólico de <i>T. americana var. mexicana</i>
g	Gramos
GI	Gastrointestinal
GMPc	Guanosin monofosfato cíclico
Gp-P	Glicoproteína-P
h	Horas
HPLC	Cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC, por sus siglas en inglés)
i.p.	Intraperitoneal
IASP	Asociación Internacional para el estudio del dolor

IC ₈₀	Concentración inhibitoria 80
IL-1	Interleucina-1
K ⁺	Ion Potasio
LOX	Lipooxigenasa
LPS	Lipopolisacárido
M	Molar
m	Metros
m/s	Metros por segundo
MeOH	Metanólico
mg	Miligramos
mg/kg	Miligramos por kilogramos
min	Minutos
mM	Milimolar
mm ²	Milímetros cuadrados
ng/mL	Nanogramos por mililitro
ng•h/mL	Nanogramos por hora sobre mililitros
OMS	Organización mundial de la salud
p.o.	Vía oral
PAG	Sustancia gris periacueductal
PG	Prostaglandinas
PGD ₂	Prostaglandina D ₂
PGE ₂	Prostaglandina E ₂
PGF _{2α}	Prostaglandina F _{2α}
PGI ₂	Prostaglandina I ₂ ó prostaciclina
pH	Potencial de hidrogeno
PIFIR	Disfunción inducida por dolor en rata (PIFIR, por sus siglas en inglés)
PLA ₂	Fosfolipasa A ₂

RVM	Médula ventral rostral
SNC	Sistema nervioso central
SSI	Solución salina isotónica
<i>T. americana var. mexicana</i>	<i>Tilia americana variedad mexicana mexicana</i>
T _{max}	Tiempo máximo
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa
TRPV1	Receptor de potencial transitorio V1
Tx	Tratamiento
TXA ₂	Tromboxano A2
u.a.	Unidades de área
var.	Variedad
μm	Micrómetros

ÍNDICE DE FIGURAS	Pág.
Figura 1. Representación de la vía del dolor por un estímulo nociceptivo.	12
Figura 2. Mecanismo de acción de los AINE por inhibición de la enzima COX.	15
Figura 3. Estructura química de diclofenaco.	17
Figura 4. Árboles de <i>T. americana var. mexicana</i> .	19
Figura 5. Inflorescencias de <i>T. americana var. mexicana</i> .	20
Figura 6. Estiramientos abdominales por la administración de ácido acético i.p. en ratones.	29
Figura 7. Curso temporal del número de estiramientos abdominales inducidos por el ácido acético en presencia de diferentes dosis de diclofenaco (Diclo).	36
Figura 8. Número total de estiramientos abdominales en presencia de diferentes dosis de diclofenaco durante 20 min.	37
Figura 9. Curso temporal del número de estiramientos abdominales inducidos por el ácido acético en presencia de diferentes dosis del extracto metanólico de <i>T. americana var. mexicana</i> (EXT).	38
Figura 10. Número total de estiramientos abdominales en presencia de diferentes dosis del extracto metanólico de <i>T. americana var. mexicana</i> administrado por vía oral durante 20 min.	39
Figura 11. Curva dosis respuesta del efecto antinociceptivo inducido por diclofenaco (p.o.) y el extracto metanólico de <i>T. americana var. mexicana</i> (p.o.) en administración simple.	40
Figura 12. Curvas dosis respuesta del efecto antinociceptivo inducido por diclofenaco (p.o.) en administración simple y en combinación con diferentes concentraciones del extracto metanólico de <i>T. americana var. mexicana</i> (p.o.).	43
Figura 13. Superficie de interacción sinérgica entre diclofenaco y el extracto metanólico de las inflorescencias de <i>T. americana var. mexicana</i> .	44
Figura 14. Fotografías representativas de estómagos con A) vehículo, B) indometacina (100 mg/kg, p.o., por un día), C) diclofenaco (10 mg/kg, p.o., por 7 días) y D) diclofenaco (10 mg/kg) + EXT (300 mg/kg, p.o., por 7 días) metanólico.	45

ÍNDICE DE CUADROS	Pág.
Cuadro 1. Propiedades y características de los nociceptores Aδ y C.	11
Cuadro 2. Valores farmacocinéticos de tres presentaciones comerciales de diclofenaco.	17
Cuadro 3. ABC del efecto antinociceptivo del diclofenaco y el extracto metanólico de <i>T. americana var. mexicana</i> en administración simple y en combinación.	42
Cuadro 4. ABC del efecto antinociceptivo de las combinaciones menos el ABC del efecto obtenido por la administración individual de diclofenaco y el extracto metanólico de <i>T. americana var. mexicana</i>.	44
Cuadro 5. Daño gástrico reportado como índice de úlcera por evaluación macroscópica del estómago.	46

ÍNDICE DE DIAGRAMAS

Pág.

Diagrama 1. Diseño experimental para la determinación de la respuesta antinociceptiva de diclofenaco y el extracto metanólico de <i>T. americana var. mexicana</i> en administración simple.	31
Diagrama 2. Diseño experimental para la determinación de la respuesta antinociceptiva de diclofenaco y el extracto metanólico de <i>T. americana var. mexicana</i> en combinación.	32
Diagrama 3. Diseño experimental para la determinación de úlceras gástricas provocadas por diclofenaco en administración simple y en combinación con el extracto metanólico de <i>T. americana var. mexicana</i> .	34

1. INTRODUCCIÓN

El dolor es la razón más frecuente de consulta al médico y es uno de los síntomas más importantes que induce discapacidad en los pacientes que lo padecen. De hecho, constituye una de las señales de alerta del organismo que indica la presencia de una condición patológica.

A lo largo de la historia de la humanidad y alrededor de todo el mundo, se han usado plantas medicinales para la atención de problemas de salud y, hasta la fecha gran parte de la población mundial sigue recurriendo a estas alternativas ya sea como único tratamiento (Tx) (por costumbre, un mal sistema de salud, etc.) o en conjunto con algún tratamiento médico.

Entre las opciones para el alivio del dolor, se encuentran los analgésicos antiinflamatorios no esteroideos (AINE) que son medicamentos con mecanismos de acción, potencia, eficacia y seguridad conocidos; sin embargo, el paciente opta muchas veces por complementar el tratamiento con el uso de infusiones de plantas usadas en la medicina tradicional ya que muchas de éstas tienen efecto analgésico, como es el caso de la *Tilia americana*. En este sentido, hay pocos estudios que demuestren si existe alguna interacción farmacológica con el uso de la combinación de plantas medicinales y medicamentos que beneficie o perjudique a la salud del paciente. Por esa razón, es necesario que los consumidores de todo el mundo dispongan de información e instrumentos que les permitan acceder a tratamientos adecuados, seguros y eficaces.

Por lo tanto, el objetivo de este trabajo es determinar el sinergismo analgésico de un fármaco analgésico no esteroideo, con un extracto de *Tilia americana variedad mexicana* (*T. americana var. mexicana*), en un modelo experimental de dolor en el cual se espera que haya un efecto de potenciación sin aumentar los efectos adversos el fármaco.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Dolor

El dolor se define por la Asociación Internacional para el Estudio del Dolor (IASP, por sus siglas en inglés) como una sensación desagradable y una experiencia emocional asociada con un daño tisular real o potencial, o descrita en términos de tal daño¹. Sin duda, el dolor cumple una función protectora para los seres vivos, ya que es el sistema de alerta que indica la presencia de un estímulo nocivo y evita la interacción con este tipo de estímulos y, por lo tanto, el daño tisular grave. Sin embargo, cuando el dolor es producido por una patología existente, pierde su carácter protector y el médico se ve obligado a tratarlo al mismo tiempo que trata la patología que lo está provocando².

Debido a esto, el dolor y su tratamiento es un problema al que se enfrentan los médicos día con día³. Es considerado uno de los síntomas más importantes que puede llevar a la discapacidad en los pacientes que lo padecen. A nivel económico implica un problema importante, debido a que los pacientes con dolor disminuyen su capacidad de concentración, fuerza y rendimiento⁴.

2.1.1. Clasificación del dolor

Existen diferentes clasificaciones del dolor basadas en su etiología, los mecanismos fisiopatológicos que lo inducen, la región afectada, su intensidad y duración, entre otros⁵.

En función de los mecanismos fisiopatológicos, el dolor puede clasificarse en nociceptivo o neuropático.

2.1.1.1. Dolor neuropático

El dolor neuropático es el resultado de una lesión y alteración de la transmisión de la información nociceptiva a nivel del sistema nervioso central (SNC) o periférico, en donde una de sus principales características es la presencia de alodinia, que es la aparición de dolor frente a estímulos que habitualmente no son dolorosos. Este tipo de dolor incluye fibromialgia, dolor del miembro fantasma, neuropatía diabética y otros síndromes en los que existe un dolor difuso y mal localizado que no involucra la inflamación periférica^{6, 7}.

2.1.1.2. Dolor nociceptivo

El dolor nociceptivo es la consecuencia de la activación periférica de los receptores del dolor o nociceptores. Debido a que es un dolor de alto umbral solo es activado en presencia de estímulos intensos, ya sean térmicos, mecánicos o químicos. También puede ser secundario a una lesión, enfermedad, inflamación, infección ó cirugía. El aparato neurobiológico que genera dolor nociceptivo evolucionó a partir de la capacidad incluso de los sistemas nerviosos más primitivos para detectar el daño inminente o real de los estímulos ambientales. Este tipo de dolor se divide en somático y visceral^{7, 8}.

2.1.1.2.1. Dolor somático

El dolor de tipo somático se refiere a aquel que se presenta en el músculo esquelético, huesos, articulaciones y piel por estímulos nocivos. El tipo de estímulos que activan a los nociceptores que inervan estos tejidos son de tipo químico, mecánico y térmico; y el dolor que provocan se caracteriza por ser localizado, bien delimitado pero variable en la descripción y la experiencia. La mayoría de los receptores del dolor de tipo somático son quimiosensibles a los mediadores de la inflamación. Durante la inflamación o después de un traumatismo, estos nociceptores son muy sensibles sobre todo a estímulos mecánicos⁹.

2.1.1.2.2. Dolor visceral

El dolor visceral describe el dolor de los órganos internos y generalmente se describe como difuso, mal localizado y caracterizado por hipersensibilidad a un estímulo provocativo como la distensión del órgano. Otra característica de este tipo de dolor es que es comúnmente “referido”, es decir que el dolor se irradia y no se siente en el lugar sobre el que actuó el estímulo, por lo tanto, el individuo podría pensar que el dolor proviene de sitios somáticos u órganos distantes de la fuente del dolor mismo¹⁰.

Para que haya una activación de los nociceptores viscerales y se presente un dolor de este tipo, no es necesario que haya una lesión en los tejidos o el riesgo de que se produzca una, sino pueden ser activados por una distensión, tracción, isquemia o estímulos químicos endógenos⁹. El dolor, como ya se mencionó, es una sensación emocional desagradable que depende de múltiples factores que incluyen la experiencia previa del individuo, la edad, el género, la raza, el nivel sociocultural, etc. Sin embargo, cualquier tipo de dolor involucra el proceso neuronal de codificación de estímulos nocivos al que se le conoce como nocicepción¹¹.

2.2. Nocicepción

La nocicepción representa el mecanismo fisiológico asociado con la percepción de señales nociceptivas, generados tras la activación de los receptores sensoriales específicos por estímulos nocivos y su integración en el SNC. Los receptores sensoriales son capaces de diferenciar entre estímulos inocuos y nocivos y, a los que detectan estímulos nocivos se les conoce como nociceptores. En general, los nociceptores son terminaciones periféricas de las fibras aferentes sensoriales primarias (fibras nerviosas no encapsuladas) que reciben y transforman los estímulos nocivos en potenciales de acción que son transmitidos hacia centros superiores en donde se hace conciencia de la sensación dolorosa¹².

Existen principalmente dos tipos de nociceptores que son las fibras A δ y fibras C (Cuadro 1). Las primeras son fibras mielínicas con velocidades de conducción alta

y responden a estímulos intensos; mientras que, las segundas son fibras amielínicas, con velocidades de conducción lenta y responden a estímulos de tipo mecánico, químico y térmico, así como a las sustancias liberadas del daño tisular¹³.

Cuadro 1. Propiedades y características de los nociceptores A δ y C.

Tipo de Fibra	Aδ (Finamente mielinizadas)	C (Sin mielina)
Diámetro de la fibra	2-5 μm	<2 μm
Velocidad de conducción	5-15 m/s	0.5-2 m/s
Distribución	Piel, músculos, articulaciones	En la mayoría de los tejidos
Sensación dolorosa	Rápido, punzante, bien localizado	Lento, difuso, sordo
Posición de la sinapsis dentro del asta dorsal de la médula espinal	Lámina 1 y 4	Lámina 2 (sustancia gelatinosa)

(Modificada de Steeds, 2016).

En general, la nocicepción inicia con la activación de los nociceptores por un estímulo nocivo, a través de la liberación de diversos mediadores químicos inducidos por un daño tisular. La lesión aguda se asocia con una primera sensación de dolor bien localizada, transducida y transmitida por nociceptores A δ seguida de una segunda y más difusa sensación de dolor mediada por la activación de nociceptores C¹¹. Estos inducen un cambio en el potencial de membrana y transmiten la señal a través de las fibras aferentes primarias hacia el asta dorsal de la médula espinal, estimulando así la liberación de neurotransmisores como el glutamato; entre otros. La señal cruza por esta estructura haciendo sinapsis sobre las neuronas de proyección. Un subconjunto de estas neuronas asciende y conducen la información a través del tracto espinotalámico hacia el tálamo donde realizará una sinapsis y proyectará la señal hacia la corteza somatosensorial con la intención de proporcionar información

respecto al sitio e intensidad del estímulo para así poder integrar la sensación dolorosa con el componente afectivo, experiencias previas, etc.^{14, 15, 16} (Figura 1).

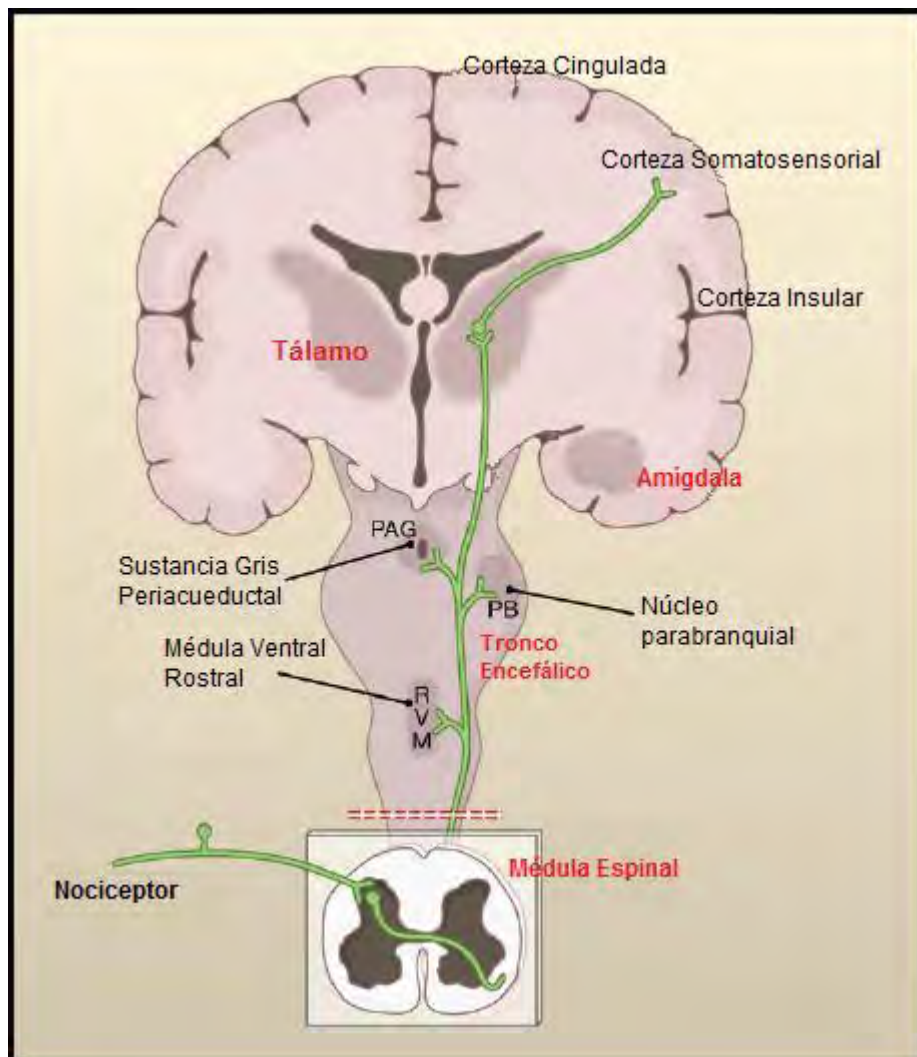


Figura 1. Representación de la vía del dolor por un estímulo nociceptivo (modificada de Basbaum y cols., 2009).

La nocicepción involucra una serie de procesos neurofisiológicos que se realizan de forma consecutiva, los cuales se identifican como: transducción, transmisión, modulación y percepción. La transducción es el proceso por el cual el estímulo nocivo se transforma en un estímulo eléctrico. La transmisión es la propagación del impulso nervioso hasta los nervios sensoriales del SNC. La modulación es la capacidad que tienen los sistemas analgésicos endógenos de modificar la transmisión del impulso nervioso, fundamentalmente inhibiendo en las astas

posteriores de la médula. Finalmente, la percepción es el proceso en el que los tres primeros interactúan con una serie de otros fenómenos individuales, creando la experiencia subjetiva y emocional denominada dolor¹⁵.

2.3. Tratamiento farmacológico del dolor

Entre las diversas opciones terapéuticas para el alivio del dolor se encuentran los fármacos de tipo opioide como la morfina, codeína, oxicodona y el tramadol; así como los analgésicos antiinflamatorios no esteroideos como el ácido acetilsalicílico, ibuprofeno, acetaminofén y diclofenaco, entre otros⁶.

2.3.1. Opioides

Los opioides son los analgésicos utilizados para aliviar el dolor de moderado a severo. El término opioide se aplica a los derivados de la morfina, el fármaco prototipo. Estos fármacos interactúan con sus receptores (μ , κ y δ) a nivel del SNC induciendo un incremento en el umbral nociceptivo. Estos receptores pertenecen a la familia de receptores acoplados a la proteína G_i que inhiben a la adenilato ciclasa; incrementando el flujo de salida postsináptico de K^+ (hiperpolarización) o reducción del flujo de entrada presináptico de Ca^{2+} , que impiden la descarga neuronal y la liberación de neurotransmisores excitatorios que participan en el dolor como glutamato y sustancia P¹⁷.

2.3.2. Analgésicos antiinflamatorios no esteroideos (AINEs)

Los AINEs son fármacos ampliamente utilizados para el tratamiento del dolor de leve a moderado de origen somático, postoperatorio, visceral e inflamatorio. Son un grupo de sustancias con estructuras químicas heterogéneas, cuyo prototipo es el ácido acetilsalicílico (aspirina). Además de su efecto analgésico, estos fármacos inducen efecto antiinflamatorio, antipirético y antiplaquetario¹⁸. Su mecanismo de acción consiste en inhibir la síntesis de prostaglandinas (PG), que son uno de los mediadores involucrados en los procesos dolor e inflamación. Este proceso

consiste en lo siguiente: en la presencia de un estímulo nocivo se liberan fosfolípidos de las membranas celulares del tejido involucrado; específicamente, a través de la fosfolipasa A₂ (PLA₂) se libera ácido araquidónico que a su vez es precursor de tres grupos de eicosanoides: leucotrienos, tromboxanos y PGs. Los dos últimos se sintetizan por la intervención de la enzima conocida como ciclooxigenasa (COX) (Figura 2). Los AINEs actúan inhibiendo estas enzimas, por lo tanto interrumpen la síntesis de PGs¹⁹. Existen diferentes tipos de PGs con diferentes células dianas y funciones, una de sus más importantes funciones reside en la sensibilización de los nociceptores a otros mediadores químicos como histamina, bradicinina, etc. por lo que la inhibición de su síntesis impide la activación de los nociceptores, por ende, la transmisión del dolor²⁰. Aunque también se sabe que algunas PGs participan en la homeostasis del organismo, a nivel vascular, renal y gastrointestinal (GI), principalmente.

Existen 3 isoformas de la COX, la COX-1, la COX-2 y la COX-3. La COX-1 tiene una estructura primaria compuesta por 602 aminoácidos, se expresa constitutivamente a niveles elevados en células y tejidos como el endotelio, monocitos, plaquetas, túbulos colectores renales, incluso en vesículas seminales¹⁹. La concentración de COX-1 permanece relativamente estable e interviene en procesos homeostáticos como la mediación de la función normal de las plaquetas, regulando el flujo sanguíneo renal, inclusive proporcionando citoprotección de la mucosa gástrica²¹.

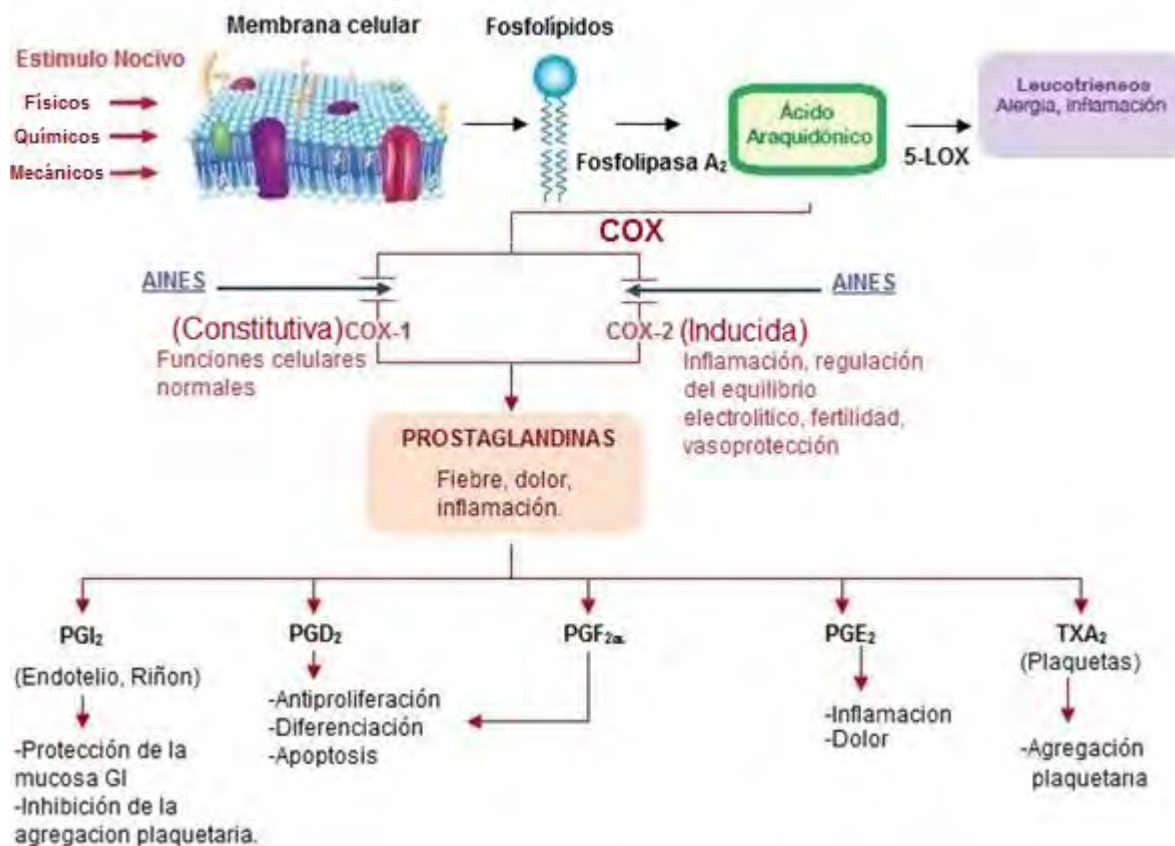


Figura 2. Mecanismo de acción de los AINE por inhibición de la enzima COX.

La isoforma COX-2 consta estructuralmente por 604 aminoácidos, es una enzima inducida en respuesta al daño tisular y por los mediadores de la inflamación como lipopolisacáridos (LPS), interleucina-1 (IL-1), factor de necrosis tumoral α (TNF- α), en una amplia variedad de células, así como en tejidos como el endotelio vascular, osteoclastos, monocitos, macrófagos, etc., siendo responsable de la producción de las PGs como mediadores del dolor e inflamación¹⁹. Aunque, se ha demostrado que la COX-2 también es expresada constitutivamente, teniendo funciones específicas en la reproducción, fisiología renal, resorción ósea y neurotransmisión²¹.

Finalmente, la COX-3, de más reciente descubrimiento, es la tercera isoforma de la COX, siendo descubierta en 2002. Aún se tiene poca información de esta enzima, incluso algunos autores la consideran una variante de la COX-1¹⁹, al parecer, es el blanco farmacológico de una AINE atípico como el paracetamol.

En general, se considera que los AINEs son inhibidores no selectivos de la COX ya que inhiben tanto a la COX-1 como a la COX-2. De hecho, se considera que los efectos adversos que producen este grupo de fármacos se deben a la inhibición de la COX-1; mientras, que los efectos analgésicos y antiinflamatorios de deben a la inhibición de la COX-2²².

Los principales efectos adversos de los AINEs son:

- Trastornos GI, ulceración y sangrado
- Insuficiencia renal
- Alteración de la coagulación
- Daño óseo y articular
- Daño hepático
- Trastornos el SNC y confusión
- Respuesta de hipersensibilidad

Estos efectos adversos son consecuencia del propio mecanismo de acción de este grupo de fármacos ya que las PGs son hormonas locales presentes en la mayoría de los tejidos que no solo intervienen como mediadores del dolor y la inflamación, sino que juegan un papel muy importante en la protección de la mucosa GI, la agregación plaquetaria, funciones renales, contracción y dilatación vascular, entre otras funciones²³.

2.3.2.1. Diclofenaco

El diclofenaco es un derivado del ácido fenilacético (Figura 3), y al igual que la mayoría de los AINE posee propiedades analgésicas, antipiréticas y antiinflamatorias. Es uno de los AINEs más comúnmente prescrito ya que ha demostrado ser eficaz en el tratamiento de una variedad de dolores agudos y crónicos además de afecciones inflamatorias, incluso a nivel mundial es el AINE más prescrito y el octavo medicamento más vendido²¹.

Éste se comercializa en formulaciones orales, intravenosas, supositorios, parches transdérmicos y gel. La presentación oral esta formulada como una sal de sodio o potasio y es principalmente utilizada para osteoartritis y artritis reumatoide. Las propiedades farmacocinéticas de algunas formulaciones orales y tópicas se muestran en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Valores farmacocinéticos de tres presentaciones comerciales de diclofenaco.

Formulación	Dosis	Área bajo la curva (ABC) (ng•h/mL)	C _{max} (ng/mL)	T _{max} (h)
Diclofenaco sódico oral	50 mg	1429	1417	2.22
Diclofenaco potásico oral	50 mg	1309	1312	1.00
Diclofenaco sódico gel	4000 mg	233	15	14

(Modificado de Gan, 2010)

El diclofenaco tiene una relativa equipotencia al inhibir las dos isoformas de la COX, pero demuestra ventajas respecto a los demás AINE debido a que es uno de los inhibidores más eficaces de la síntesis de PGE₂ y se ha reportado en base molar que es de 3 a 1000 veces más potente para inhibir la COX en comparación a otros AINE. En ensayos *in vitro* se ha dilucidado a partir de la comparación de la concentración inhibitoria 80 (IC₈₀) que el diclofenaco inhibe la actividad de la COX-2 cuatro veces más que a COX-1 teniendo un IC₈₀ de 0.23mM y 1.0mM respectivamente y con esto presentando una ventaja relativa de seguridad con relación a la aparición de efectos adversos²¹.

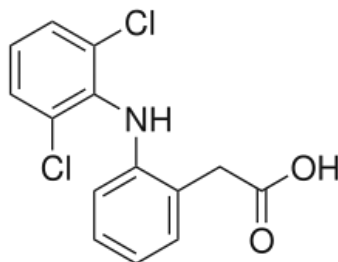


Figura 3. Estructura química de diclofenaco.

2.3.3. Tratamientos alternativos para el dolor

Además de los tratamientos farmacológicos, existen otras alternativas para el alivio del dolor, como la aplicación de estímulos eléctricos, la aplicación de calor y/o frío, terapias de rehabilitación, medicina alternativa, etc. El tratamiento a elegir va a depender del tipo de paciente, de la patología que lo genere, del nivel socio económico de la población, etc. En este sentido, el uso de las plantas medicinales ha sido una opción ampliamente utilizada en todo el mundo²⁴.

2.4. Uso de las plantas medicinales

En general, en varios países del mundo se han usado las plantas medicinales para atender algunos problemas de salud, incluso una gran mayoría de países desarrollados y en vías en desarrollo, siguen haciendo uso de ellas actualmente. En los últimos años se ha producido un enorme cambio tanto en las estrategias como en las políticas de los gobiernos, en los ministerios y los organismos multilaterales encargados de atender la salud. El uso de las plantas medicinales ha dejado de ser calificado negativamente, comenzando a establecerse programas y proyectos, para la investigación, aplicación e industrialización de los productos derivados de éstas²⁵.

La atención primaria de salud de hasta un 80% de la población de los países en vías de desarrollo se basa en la medicina tradicional, a través del uso de plantas medicinales, por tradición cultural. En muchos casos no se cuenta con información suficiente que demuestre su utilidad o eficacia, mucho menos, su seguridad. Incluso, en países desarrollados, muchas personas recurren a diversos tipos de remedios naturales porque consideran que «natural» es sinónimo de inocuo. Por esa razón, es necesario generar información que permitan ofrecerles a los pacientes tratamientos adecuados, seguros y eficaces²⁶.

En México el uso de plantas medicinales para el alivio del dolor está establecido por pueblos indígenas que por empirismo han descubierto una gran variedad de

plantas con efectos antinociceptivos prometedores; sin embargo, es necesario comprobar el efecto farmacológico real de dichas plantas. Para sustentar su empleo, existen algunos estudios de especies ampliamente utilizadas en la medicina tradicional mexicana como: *Exostema caribaeum*, *Brickellia veronicaefolia*, *Scaphyglottis livida*, *Ligusticum porteri*, *Gnaphalium spp* y *Amphipterygium adstringens*. Estas plantas se han utilizado para tratar diversos tipos de dolor, demostrando que solo poseen un efecto antinociceptivo real, tres de ellas, *Brickellia veronicaefolia*, *Scaphyglottis livida* y *Ligusticum porteri*²⁷. Estos resultados sugieren la importancia de comprobar si existe en realidad un efecto terapéutico o funcionan como un efecto placebo en el tratamiento.

2.4.1. *Tilia americana* variedad mexicana

La *T. americana* var. *mexicana* conocida popularmente como: cirimo, flor de tilia, jonote, jonote blanco, sirimu, tila, tzirimo; es una variedad endémica de México que pertenece a la familia de las *Tiliceae*. Comprende aproximadamente 50 géneros con 450 especies²⁸. Sus especies se caracterizan por ser árboles de hasta 35 m de altura y 1 m de diámetro, con madera suave de color blanca²⁹(Figura 4). Poseen follaje vistoso; hojas en forma de corazón de color verde claro, algunas con el borde en forma de sierra; y flores de color amarillento colocadas en una hoja angosta que forman un ramillete (Figura 5).



Figura 4. Árboles de *T. americana* var. *mexicana*
(<http://www.naturalista.mx/taxa/206762-Tilia-americana-mexicana>).



Figura 5. Inflorescencia de *T. americana* var. *mexicana* (<http://bios.conabio.gob.mx/especies/6066964>).

La *T. americana* var. *mexicana* se distribuye en gran parte del territorio del país en climas cálido y templado, entre los 1,000 y 2,000 m. Forma parte del estrato arbóreo del bosque mesófilo de montaña, tipo de vegetación que cubre menos del 1% del territorio nacional²⁸. Principalmente se encuentra en los estados de Hidalgo, Querétaro, Coahuila, Nuevo León y Chihuahua³⁰.

2.4.1.1. Usos en la medicina tradicional

El té de tila, como popularmente se le conoce a esta especie, es particularmente empleado en la zona centro del país para calmar los nervios (Hidalgo, Michoacán, Morelos, Puebla, Tlaxcala y Veracruz). Asimismo, con frecuencia es utilizada contra enfermedades del corazón y presión arterial. Además, se menciona su uso para aliviar el cólico menstrual. En general, se recomienda tomar la cocción de la flor como tratamiento de todos estos padecimientos.

A esta planta se le atribuye también actividad antitusígena, como antidisentérico, antiespasmódico (para cólicos hepáticos, congestión hepática, enterocolitis) y eupéptico (para gastroenteritis y hemorroides)³¹.

2.4.1.2. Estudios farmacológicos y análisis químico

Entre los estudios farmacológicos preclínicos que se han realizado con la *T. americana var. mexicana* se ha podido determinar que los extractos acuoso, metanólico (MeOH), de acetato de etilo y hexánico de las inflorescencias producen efecto ansiolítico además de sedante en diversos modelos experimentales³²⁻³⁸. Tanto el extracto acuoso como el hexánico producen efecto neuroprotector en un modelo *in vitro* de isquemia intestinal en el íleon de cobayo^{39, 40}; mientras que, los extractos acuoso y metanólico disminuyen la intensidad de las convulsiones inducidas por pentilentetrazol³⁸.

Con relación a su efecto antinociceptivo, existe un estudio en el que se ha demostrado que los extractos acuoso, metanólico y hexánico tienen efecto analgésico en el dolor inflamatorio además de que la quercetina, uno de sus principales metabolitos secundarios, puede ser uno de los responsables de este efecto³⁶.

El análisis por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC, por sus siglas en inglés) de dos fracciones obtenidas del extracto metanólico mostró la presencia de varios flavonoides, como en la tilirosida, rutina, kaempferol y quercetina en la fracción más activa del efecto ansiolítico³³.

Un análisis más detallado de los extractos metanólicos de las inflorescencias recolectadas en diferentes estados (Guerrero, Veracruz e Hidalgo), mostró la presencia de kaempferitrina, quercetin-3-pentosilhexósido, isoquercitrina, astragalina y tilirosida en las muestras de los estados de Guerrero y Veracruz; mientras que, en la especie recolectada en Hidalgo se encontró la presencia de los flavonoides kaempferitrina, astragalina, tilirosida y querceti-3,7-O-dirhamnosido; además de quercetina-3-pentosido y quercetin-malonylhexosido. El kaempferol-3-pentosilhexósido, la quercitrina y el kaempferol-3-O-rhamnosido solo fueron detectados en la muestra de Guerrero. También el compuesto querceti-3,7-O-dirhamnosido se encontró en la muestra del estado de Veracruz³⁵.

Es importante mencionar que la presencia de diversos flavonoides se va a ver afectada dependiendo de la región en donde se recolecte la especie a evaluar.

2.5. Interacciones farmacológicas

Como sabemos, una interacción de tipo farmacológica se refiere al incremento o disminución en la respuesta farmacológica que produce un fármaco en presencia de otro. Algunas veces este tipo de interacciones son benéficas para el paciente ya sea por incrementar su eficacia terapéutica y/o por disminuir los efectos adversos de uno de ellos⁴¹. Este tipo de interacciones también aplica para uso de un fármaco y un extracto de plantas medicinales⁴¹, el cual, como ya lo mencionamos, se utiliza frecuentemente con la creencia de que los extractos de las plantas por ser “naturales” son inocuos. Sin embargo, esto no es del todo cierto, ya que los extractos pueden afectar la actividad terapéutica de los fármacos ya sea a nivel farmacocinético (absorción, distribución, metabolismo y eliminación) y/o farmacodinámico (alterando su unión a la molécula blanco, induciendo hipersensibilización o desensibilización de receptores, etc.)⁴². Estas interacciones pueden resultar en fenómenos de sinergia de tipo potenciación, suma o antagonismo⁴¹, ya sea de los efectos terapéuticos o de los efectos adversos.

Además, estas interacciones podrían poner el peligro la vida del paciente, ya sea por un fracaso terapéutico o por toxicidad, esto podría ocurrir debido a que la actividad de muchas plantas medicinales no está debidamente caracterizada, así como las interacciones de las preparaciones obtenidas de dichas plantas con los fármacos que se utilizan en combinación para aliviar ciertos síntomas o enfermedades⁴².

Desafortunadamente, aún no se cuenta con un sistema de farmacovigilancia enfocado al uso de plantas medicinales en combinación de tratamientos farmacológicos convencionales; sin embargo, la Organización Mundial de la Salud

(OMS) documentó, hasta antes de 1995, cerca de 5,000 reportes de sospechas de reacciones adversas producidas por el uso de algunas plantas medicinales⁴¹.

Evidentemente, la caracterización de las actividades farmacológicas, adversas o tóxicas de las plantas medicinales es muy compleja debido al diverso contenido de metabolitos presentes en las diferentes partes de la planta; además de las variaciones de su concentración con relación a las diferentes épocas del año y las diferentes regiones en que crece. Por lo que actualmente, diversos grupos de investigadores se encuentran trabajando en dar el sustento científico necesario para el uso de varias plantas medicinales. Pero, si en este sentido existe poca evidencia, sobre las interacciones farmacológicas entre fármacos y los extractos de plantas medicinales existen aún menos estudios controlados.

Actualmente la atención de la salud de una gran parte de la población mundial sigue siendo las plantas medicinales que se consumen como tratamiento único o en combinación con un tratamiento farmacológico, resultando en algunas ocasiones de gran ayuda para el paciente, pero en otras no teniendo ningún efecto y en los peores casos produciendo efectos perjudiciales para la salud del paciente debido a las interacciones farmacológicas que han sido poco estudiadas, es por ello que se deben realizar estudios de este tipo para poder proporcionar dicha información tanto a médicos como a pacientes sobre el uso correcto de las plantas medicinales con medicamentos, de ahí la importancia de este estudio.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Uno de los síntomas más frecuentes por los que acude el paciente a consulta médica es el dolor; por lo que el médico se enfrenta al reto de aliviar este síntoma incluso antes de tratar la patología que lo está generando. Evidentemente, para el médico es muy importante establecer un diagnóstico del problema que está produciendo dolor para poder elegir el tratamiento farmacológico más adecuado para su alivio.

Entre las opciones terapéuticas con las que se cuenta para el alivio de este síntoma está el diclofenaco, que pertenece al grupo de los AINEs. Este es ampliamente utilizado por su bajo costo y su menor incidencia de efectos adversos, con relación a otros fármacos del mismo grupo como aspirina, naproxeno e indometacina, entre otros. Este fármaco es muy utilizado en dolores de tipo inflamatorio de intensidad leve a moderada, también ha demostrado una adecuada eficacia analgésica en dolores de tipo visceral, solo o en combinación con agentes espasmolíticos. Este se utiliza con relativa seguridad debido a que se conoce su mecanismo de acción, margen de seguridad, potencia y eficacia; así como sus efectos adversos.

Por otro lado, el uso de plantas en la medicina tradicional a lo largo de la historia, alrededor de todo el mundo sigue siendo una alternativa muy empleada porque se considera que por ser de origen natural producirá menos efectos adversos; por lo que es de gran importancia caracterizar la actividad farmacológica de estas plantas; así como su seguridad. Actualmente se siguen usando de modo frecuente las plantas medicinales para el tratamiento de síntomas o enfermedades ya sea como tratamiento único o junto con un tratamiento médico.

En este sentido, frecuentemente los pacientes complementan el tratamiento farmacológico con el uso infusiones de plantas medicinales para el alivio del dolor, así como de otros padecimientos. Por esta razón es indispensable contar con estudios farmacológicos que determinen si existe algún tipo de interacción benéfica y/o perjudicial para el paciente al utilizar estas combinaciones.

Entre las plantas medicinales que se utilizan en la medicina tradicional para el alivio del dolor se encuentra la *T. americana* var. *mexicana*. Como ya se mencionó anteriormente, en la medicina tradicional se recomienda tomar la cocción de la flor para diversos problemas como: calmar los nervios, contra enfermedades del corazón y presión arterial; así como para el alivio del cólico menstrual. Existen pocos estudios preclínicos enfocados a darle sustento al uso de esta planta medicinal en el tratamiento del dolor y prácticamente no existen estudios que muestren la posible interacción del diclofenaco con esta planta en el alivio del dolor de tipo visceral, por lo que la pregunta de este estudio es:

¿Qué tipo de interacción farmacológica se producirá y cómo afectará el efecto analgésico y/o los efectos adversos de un analgésico no esteroideo de uso clínico como el diclofenaco con un extracto de la *T. americana* var. *mexicana* en un modelo de dolor visceral evaluado en ratones?

4. HIPÓTESIS

En relación a las evidencias científicas que sustentan el efecto analgésico del extracto metanólico de *Tilia americana variedad mexicana*, y debido a su contenido de quercetina, entre otros metabolitos, la administración de dicho extracto potenciará el efecto analgésico del diclofenaco en un modelo de dolor experimental, sin potenciar sus efectos adversos.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Determinar el sinergismo analgésico del diclofenaco, un fármaco del grupo de los analgésicos antiinflamatorios no esteroideos, con un extracto de *Tilia americana variedad mexicana* en un modelo de dolor visceral.

5.2. Objetivos particulares

- Determinar las curvas dosis respuesta del efecto analgésico del diclofenaco y del extracto de *T. americana var. mexicana* en administración simple en un modelo de dolor visceral.
- Determinar las dosis efectivas 50 (DE₅₀) del diclofenaco y del extracto de *T. americana var. mexicana* en un modelo de dolor visceral.
- Determinar el efecto analgésico de la combinación de diferentes dosis de diclofenaco con diferentes dosis del extracto de *T. americana var. mexicana* en un modelo de dolor visceral.
- Determinar las DE₅₀ del diclofenaco en presencia de diferentes dosis del extracto de *T. americana var. mexicana* en un modelo de dolor visceral.
- Determinar las combinaciones que produzcan el máximo efecto y la de máxima eficacia analgésica utilizando un análisis de superficie de interacción sinérgica.
- Determinar el daño gástrico como posible efecto adverso de las combinaciones que produzcan la máxima potenciación y la máxima eficacia analgésica.

6. METODOLOGÍA

Este trabajo forma parte de un proyecto aprobado por las Comisiones de investigación y ética de la Facultad de Medicina de la UNAM con el número 012-215.

6.1. Material vegetal

Las inflorescencias de *T. americana var. mexicana* se colectaron en junio de 2005, en el municipio de Tenango de Doria en el estado de Hidalgo, México; con coordenadas: 20° 20' 8" N, 98° 13' 36" W, a una altitud de 1632 m sobre el nivel del mar. Una muestra del espécimen se conservó en el herbario del Instituto Mexicano del Seguro Social con voucher IMSSM-15070 donde fue identificado por la M. en C. Abigail Aguilar Contreras.

6.1.1. Obtención del extracto

El extracto metanólico de *T. americana var. mexicana* (EXT) fue proporcionado por la Dra. María Eva González Trujano del Laboratorio de Neurofarmacología de Productos Naturales del Instituto Nacional de Psiquiatría. Este se obtuvo bajo el siguiente procedimiento: primero se trituraron 1,600 g de las inflorescencias secas de la Tilia y el polvo se maceró con 4 litros de metanol a una temperatura de 22 grados Celsius (°C). El disolvente se separó del residuo sólido por filtración para luego evaporarlo al vacío. Finalmente, se obtuvieron 38 g del extracto metanólico crudo que corresponde a 1.75% de peso seco de la planta (Martínez y cols., 2009).

6.2. Animales

Para la determinación del efecto nociceptivo se utilizaron ratones machos de la cepa taconic con un peso corporal entre 25 a 30 g, mientras que para la determinación del índice de úlceras se utilizaron ratas macho de la cepa wistar con un peso corporal entre 160 a 180 g, las cuales se obtuvieron del bioterio de la

Facultad de Medicina de la UNAM. Los animales se mantuvieron en un cuarto de experimentación a una temperatura controlada de $21 \pm 2^\circ\text{C}$ y bajo un ciclo de 12 horas luz/oscuridad. Se les retiró el alimento 24 horas antes del procedimiento experimental y se les mantuvo con agua *ad libitum*.

El uso y manejo de animales se llevó a cabo de acuerdo con un protocolo aprobado por el Comité de Ética Animal local de acuerdo con las normas nacionales (NOM-062-ZOO-1999) y normas internacionales sobre el cuidado y uso de los animales de laboratorio.

6.3. Modelo de estiramiento abdominal (writhing test)

El modelo estiramiento abdominal o “writhing” consiste en determinar el número de “contorsiones abdominales” inducidas en los ratones por la administración intraperitoneal (i.p.) de una sustancia irritante como el ácido acético (1%). La conducta de “contorsión o estiramiento abdominal” se reconoce porque el animal contrae los músculos abdominales, arquea la espalda hasta que el abdomen toca el piso de la caja de acrílico, y extiende una o ambas extremidades posteriores⁴³, tal como se muestra en la Figura 6.

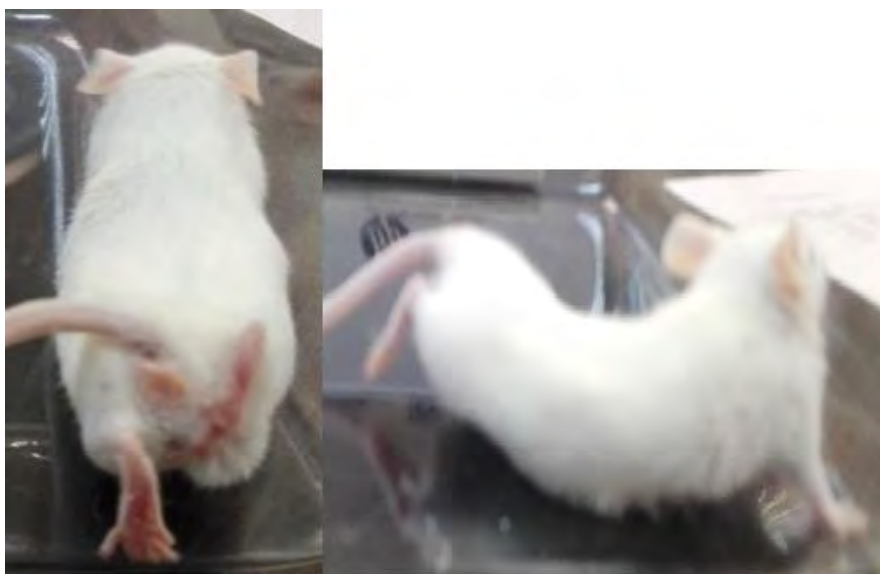


Figura 6. Estiramientos abdominales por la administración de ácido acético i.p. en ratones.

Este modelo experimental se llevó a cabo de la siguiente manera: él o los tratamientos a evaluar se administran 20 minutos (min) antes de la solución de ácido acético y se cuantificó el número de estiramientos que presentaron los animales en presencia o en ausencia de algún tratamiento a partir de la administración del ácido acético. El número de estiramientos se cuantifican por un periodo de 20 min dividido en lapsos continuos de 5 min.

6.3.1. Diseño experimental

Para determinar el efecto antinociceptivo del diclofenaco y el extracto de *Tilia* en administración simple se formaron grupos de 6 animales, evaluando un tratamiento en cada grupo. Se utilizaron las dosis de diclofenaco de 0.03, 0.3, 1.0, 3.0 y 10 mg/kg; así como del extracto metanólico de *T. americana var. mexicana* (0.3, 3, 10, 30, 100 y 300 mg/kg), ambos en administración por vía oral en un volumen de 0.1 mL/10 g de peso corporal con ayuda de una sonda esofágica. Como control positivo se utilizó una dosis de morfina de 3 mg/kg administrado por vía i.p. (Diagrama 1).

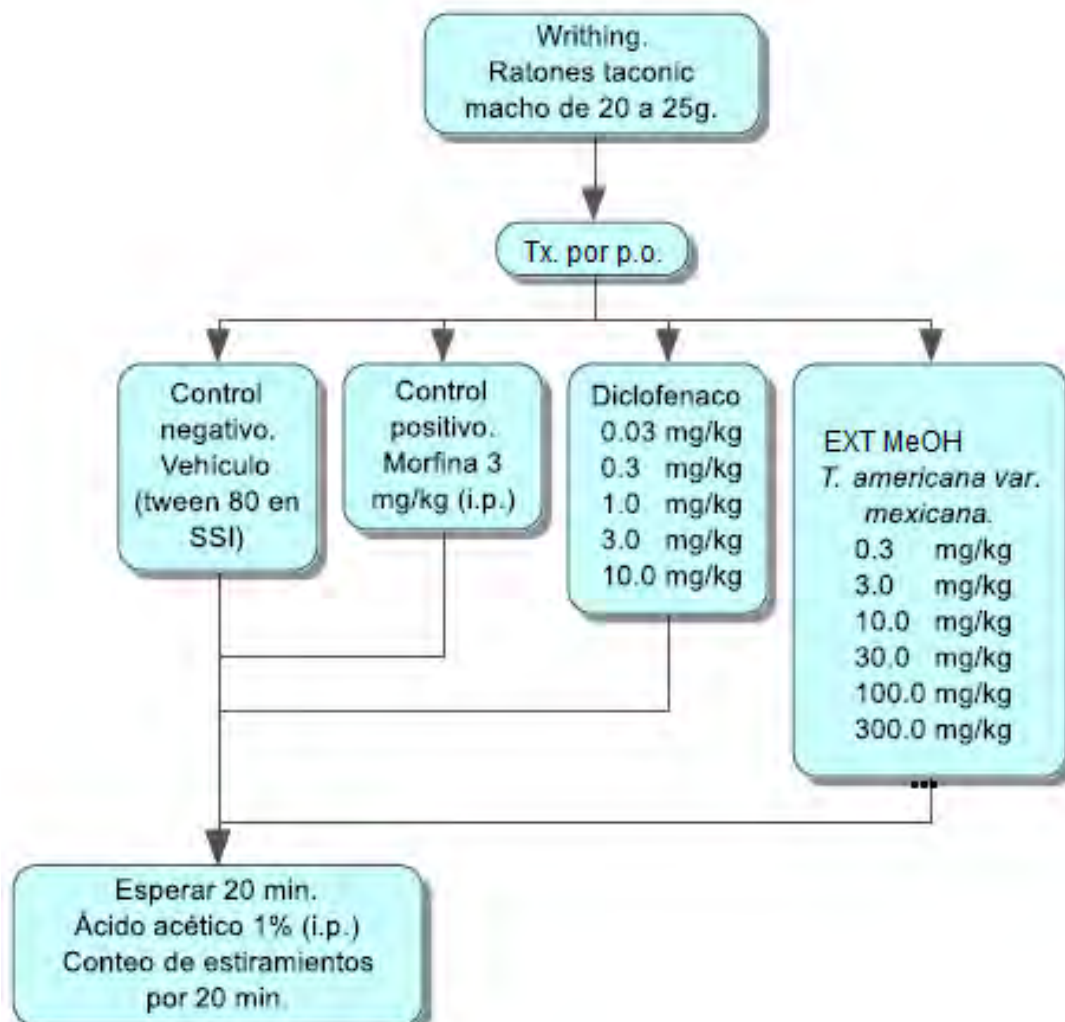


Diagrama 1. Diseño experimental para la determinación de la respuesta antinociceptiva de diclofenaco y el extracto metanólico de *T. americana var. mexicana* en administración simple.

Para determinar el tipo de interacción sinérgica que se produce por la combinación del diclofenaco con el extracto de *Tilia*, se administraron simultáneamente las dosis de diclofenaco de 0.03, 1 y 10 mg/kg; con las del extracto metanólico de *T. americana var. mexicana* (0.3, 3, 10 y 30 mg/kg) por p.o. (Diagrama 2).

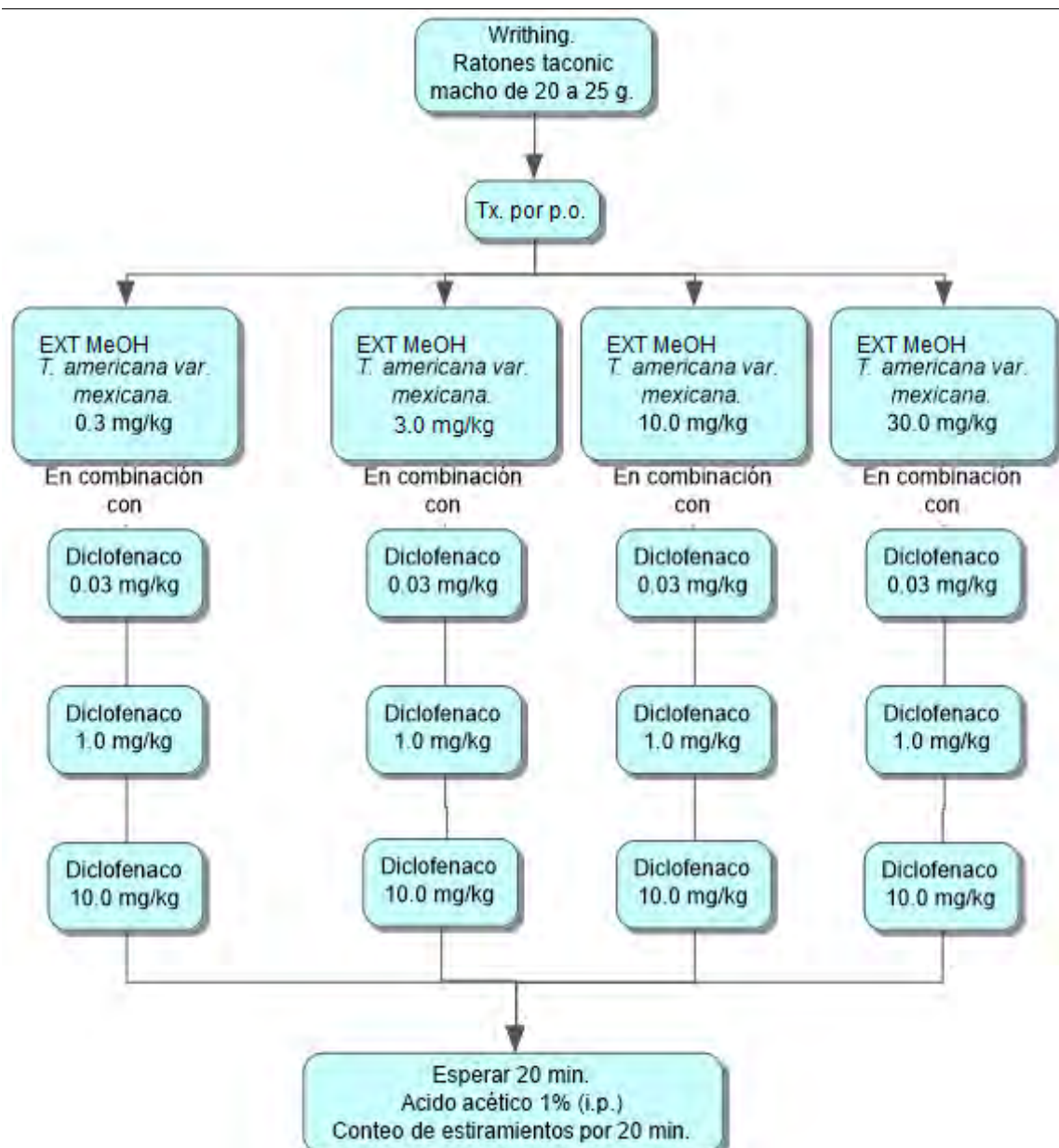


Diagrama 2. Diseño experimental para la determinación de la respuesta antinociceptiva de diclofenaco y el extracto metanólico de *T. americana var. mexicana* en combinación.

Las soluciones de diclofenaco se prepararon con solución salina isotónica (SSI); mientras que, las suspensiones del extracto metanólico de *T. americana var. mexicana* se prepararon con una o dos gotas de tween 80 hasta lograr una suspensión homogénea, y se diluyeron con el volumen necesario de SSI. Como grupo control se utilizaron animales administrados con el vehículo del extracto (tween 80 en SSI).

Al término de las pruebas experimentales, los ratones se sacrificaron por dislocación cervical.

6.4. Modelo de determinación de úlceras gástricas

El daño gástrico se determinó en ratas Wistar macho. Los grupos se dividieron en vehículo, (tween 80 en SSI), Diclofenaco (10 mg/kg) y diclofenaco + extracto metanólico (300 mg/kg). El tratamiento se administró en un periodo de 7 días por vía oral (p.o.) en los que se mantuvieron a las ratas con agua y comida *ad libitum*. 24 horas antes del experimento se les retiró la comida. 4 horas posteriores a la última administración se sacrificó a las ratas por dislocación cervical de acuerdo con la normatividad oficial vigente (NOM-062-ZOO-1999), posterior a esto se realizó una incisión abdominal y se extrajo el estómago, sellando con pinzas de tipo mosquito, el esfínter esofágico inferior y el píloro. Se introdujo por el esfínter esofágico inferior una aguja, se llenó el estómago con 12 mL de formaldehído 10% para fijar el tejido por 20 min. Posteriormente se vació el estómago y se abrió con un corte por la curvatura mayor, se lavó con agua destilada para quitar residuos orgánicos y se dejó secar. Una vez seco se escaneó el tejido junto con una regla y se cuantificó en la imagen digital el área de las úlceras, se sumaron los resultados de cada estómago y se dividió entre la n del grupo al que pertenecían obteniendo así el índice de úlcera para cada tratamiento³⁷. Como control positivo se utilizó un grupo de animales con administración aguda de indometacina (100 mg/kg p.o.) (Diagrama 3).

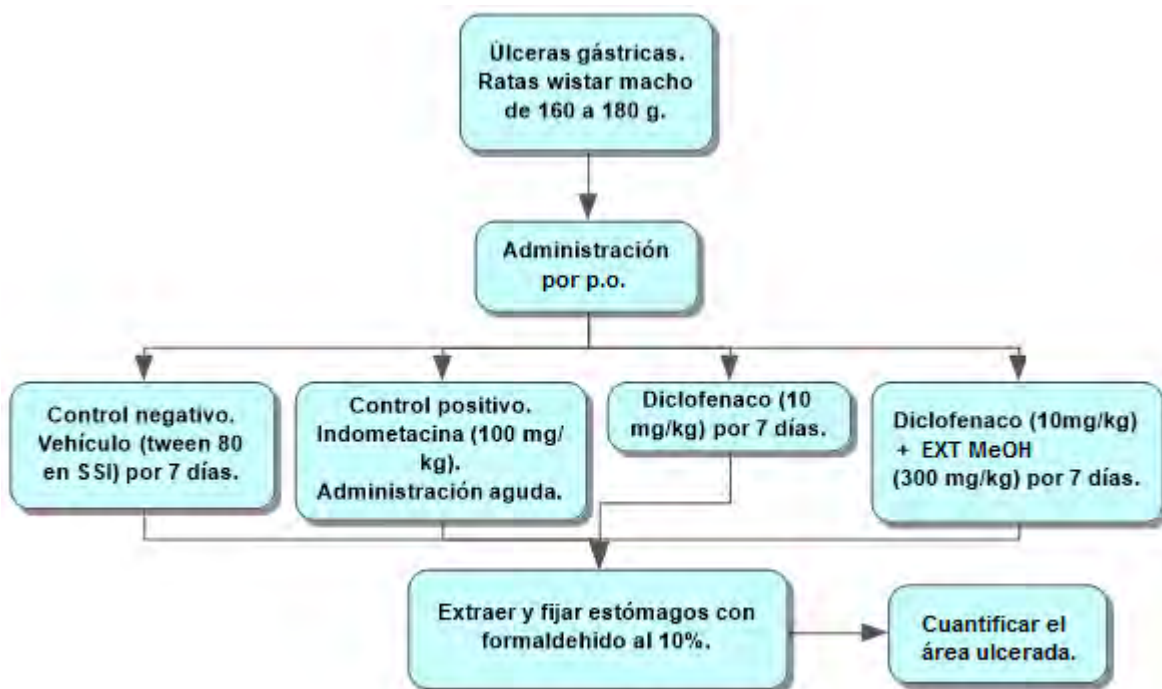


Diagrama 3. Diseño experimental para la determinación de úlceras gástricas provocadas por diclofenaco en administración simple y en combinación con el extracto metanólico de *T. americana var. mexicana*.

6.5. Análisis de datos

Para la determinación del efecto antinociceptivo de los diferentes tratamientos, se calculó el porcentaje de inhibición de estiramientos utilizando los datos de número de estiramientos y ABC, estos valores se calcularon utilizando las siguientes fórmulas:

$$\% \text{Antinocicepción} = \frac{\text{Estiramientos vehículo} - \text{Estiramientos Tx}}{\text{Estiramientos vehículo}} \times 100$$

(Fórmula 1).

$$\% \text{Antinocicepción} = \frac{\text{ABC estiramientos vehículo} - \text{ABC estiramientos Tx}}{\text{ABC estiramientos vehículo}} \times 100$$

(Fórmula 2).

Para determinar el daño gástrico inducido por los diferentes tratamientos se calculó el índice de ulceración con la siguiente fórmula.

$$\text{Índice de ulceración} = \frac{\text{Suma del área ulcerada del grupo}}{\text{Número de ratas del grupo}}$$

(Fórmula 3).

Los resultados se muestran como la media de seis animales \pm error estándar de las medias (EEM) para cada grupo. El efecto antinociceptivo acumulado durante todo el periodo de observación (20 min) fue determinado como el ABC del curso temporal. El ABC de cada una de las concentraciones del diclofenaco y en combinación fueron calculadas por el método de los trapezoides. Un análisis de varianza fue utilizado para la comparación entre grupos, seguido por las pruebas post-hoc de Tukey o la prueba de Dunnett, respectivamente. El efecto analgésico global fue evaluado por el ABC del curso temporal, producido por la combinación para determinar el efecto sinérgico. Los resultados fueron comparados con la suma de efectos producidos por el diclofenaco y el extracto que fueron administrados individualmente, usando una prueba de t de Student de una vía. Un valor de $p < 0.05$ fue considerado para ser estadísticamente significativo. El análisis estadístico se realizó usando el programa Graph Pad Prism 6.

7. RESULTADOS

7.1. Inhibición del número de estiramientos abdominales inducidos por el diclofenaco

En el modelo experimental del writhing o estiramiento abdominal, el ácido acético al 1% (i.p.) indujo 10.07 ± 1.37 estiramientos a partir de los 5 min de su administración, conducta que se incrementó al transcurrir el tiempo alcanzando un máximo de 26.71 ± 1.22 estiramientos a los 10 min y permaneciendo prácticamente sin cambios hasta los 20 min que terminó la prueba. Por otro lado, la administración previa del diclofenaco disminuyó gradualmente el número de estiramientos inducidos por el ácido acético durante los 20 min que duró la prueba. El máximo efecto en la disminución de los estiramientos abdominales se observó con la dosis de 10 mg/kg de diclofenaco, alcanzando un número de estiramientos de 1.17 ± 0.65 desde los 5 min y de 6.5 ± 1.33 hasta los 20 min después de la administración del ácido acético. El efecto inducido con la máxima dosis del diclofenaco fue prácticamente el mismo que el inducido con morfina (3 mg/kg), un agonista opioide utilizado como control positivo en esta prueba (Figura 7).

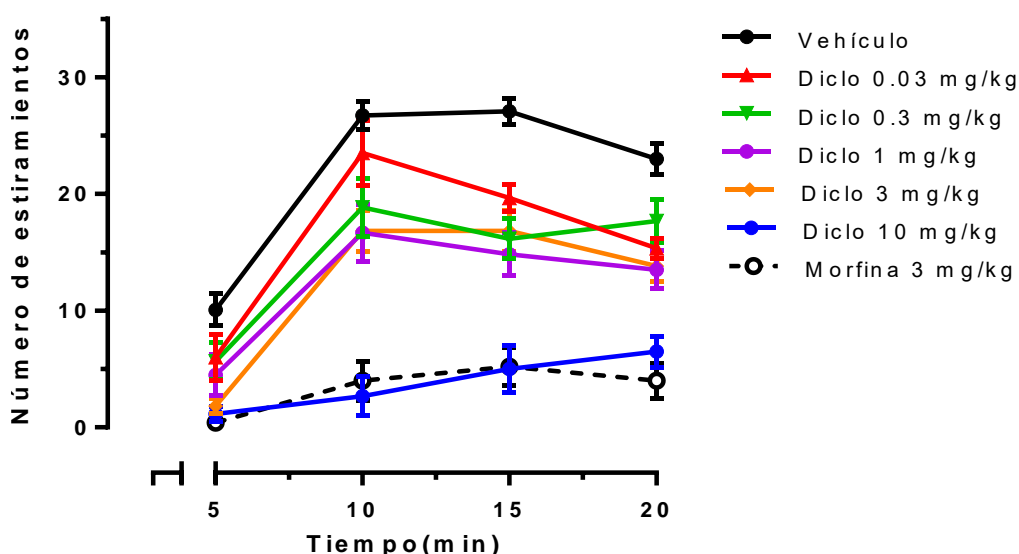


Figura 7. Curso temporal del número de estiramientos abdominales inducidos por el ácido acético en presencia de diferentes dosis de diclofenaco (Diclo).

Al realizar el análisis del total del número de estiramientos inducidos por el ácido acético durante los 20 min de la prueba, se observó que el diclofenaco indujo una disminución en el número de estiramientos en comparación con el vehículo en todas las dosis (0.03, 0.3, 1.0, 3.0 y 10 mg/kg) (64.5 ± 4.26 , 58.33 ± 5.02 , 49.5 ± 5.65 , 49.33 ± 3.74 y 15.33 ± 4.44 estiramientos vs 86.86 ± 3.23 estiramientos, respectivamente, $p < 0.05$). El efecto del diclofenaco fue dosis-dependiente, y se alcanzó un efecto máximo ($E_{m\acute{a}x}$) con la dosis más alta (10 mg/kg) que no mostró diferencia con el efecto inducido por la morfina (3 mg/kg) en las mismas condiciones experimentales (Figura 8).

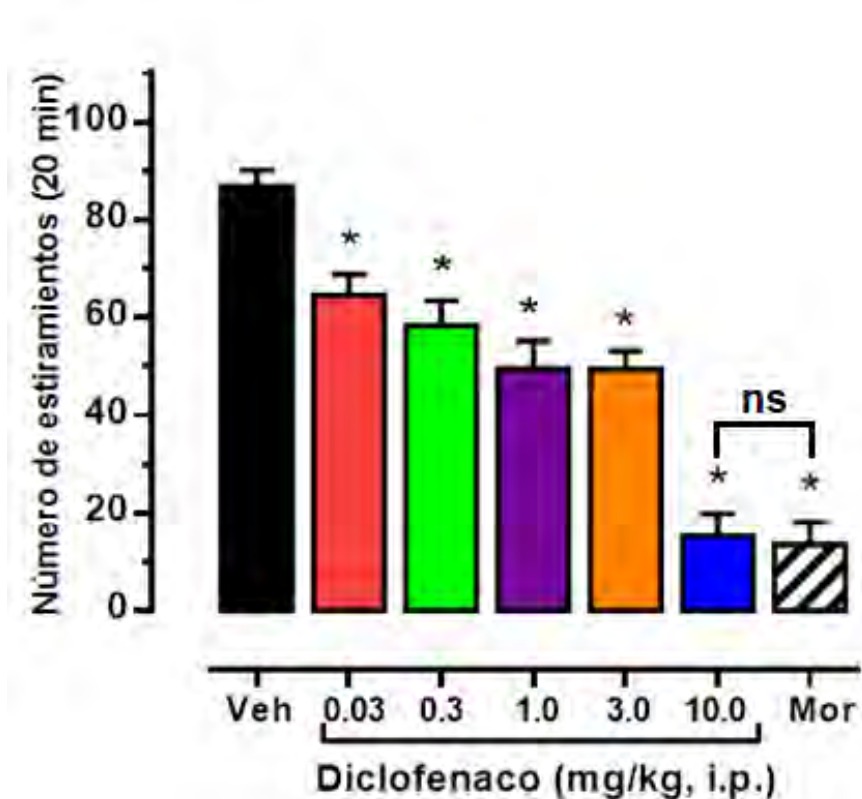


Figura 8. Número total de estiramientos abdominales en presencia de diferentes dosis de diclofenaco durante 20 min. $P < 0.05$, ANOVA una vía, Dunnett.

7.2. Inhibición del número de estiramientos abdominales inducidos por el extracto metanólico de *T. americana var. mexicana*

La administración del extracto metanólico de *T. americana var. mexicana*, también disminuyó gradualmente el número de estiramientos inducidos por el ácido acético durante los 20 min que duró la prueba. El máximo efecto en la disminución de los estiramientos abdominales se observa con la dosis de 300 mg/kg, alcanzando un número de estiramientos de 3.5 ± 1.45 desde los 5 min y de 10.67 ± 2.12 hasta los 20 min después de la administración del ácido acético. El efecto inducido con la máxima dosis del extracto fue menor que el inducido con morfina (3 mg/kg), nuestro control positivo (Figura 9).

Figura 9. Curso temporal del número de estiramientos abdominales inducidos por el ácido acético en presencia de diferentes dosis del extracto metanólico de *T. americana var. mexicana* (EXT).

Al realizar el análisis del total del número de estiramientos inducidos por el ácido acético durante los 20 min de la prueba, se observó que el extracto metanólico de *T. americana var. mexicana* indujo una disminución en el número de estiramientos en comparación con el vehículo en todas las dosis (0.3, 3, 10, 30, 100 y 300

mg/kg) (62.83 ± 2.98 , 61.83 ± 1.3 , 48.17 ± 6.2 , 41.33 ± 4.29 , 41.5 ± 7.69 y 35 ± 9 estiramientos vs 86.86 ± 3.23 estiramientos, respectivamente, $p < 0.05$). El efecto del extracto de *T. americana var. mexicana* fue dosis-dependiente, y se alcanzó un efecto máximo ($E_{m\acute{a}x}$) con la dosis más alta (300 mg/kg) que, a diferencia del efecto del diclofenaco, sí mostró diferencia con el efecto inducido por la morfina (3 mg/kg) en las mismas condiciones experimentales (Figura 10).

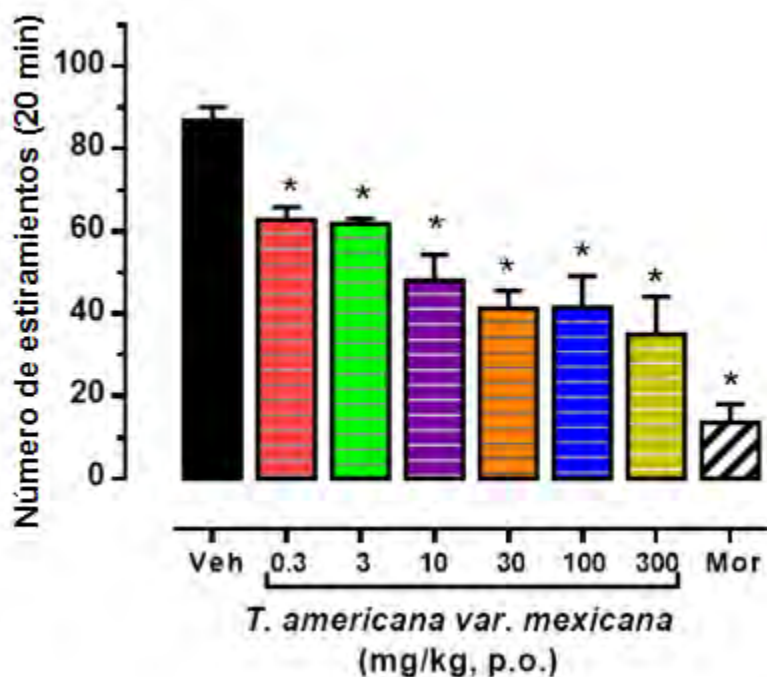


Figura 10. Número total de estiramientos abdominales en presencia de diferentes dosis del extracto metanólico de *T. americana var. mexicana* administrado por vía oral durante 20 min. $P < 0.05$, ANOVA una vía, Dunnett.

7.3. Curva dosis respuesta (CDR) del efecto antinociceptivo inducido por diclofenaco y el extracto metanólico de *T. americana var. mexicana* en administración simple

El análisis de las ABC obtenidas a partir de los cursos temporales del diclofenaco y el extracto metanólico de *T. americana var. mexicana* mostró que con el primero se alcanzó un $E_{m\acute{a}x}$ de 80.99 ± 6.27 % de antinocicepción; y con el segundo de 60.63 ± 10.63 % de antinocicepción. Las dosis de 10, 30 y 100 y 300 mg/kg del extracto metanólico de *T. americana var. mexicana* indujeron un efecto antinociceptivo menor en comparación con la dosis de 10 mg/kg de morfina (45.04 ± 7.94 , 53.22 ± 5.33 , 53.11 ± 8.92 y 60.63 ± 10.63 % de antinocicepción vs 84.6 ± 5.1 %, $p < 0.05$). Las DE_{50} del diclofenaco y el extracto metanólico de *T. americana var. mexicana* obtenidas bajo estas condiciones experimentales corresponden a: 3.6 ± 0.36 y 9.81 ± 0.56 mg/kg, respectivamente (Figura 11).

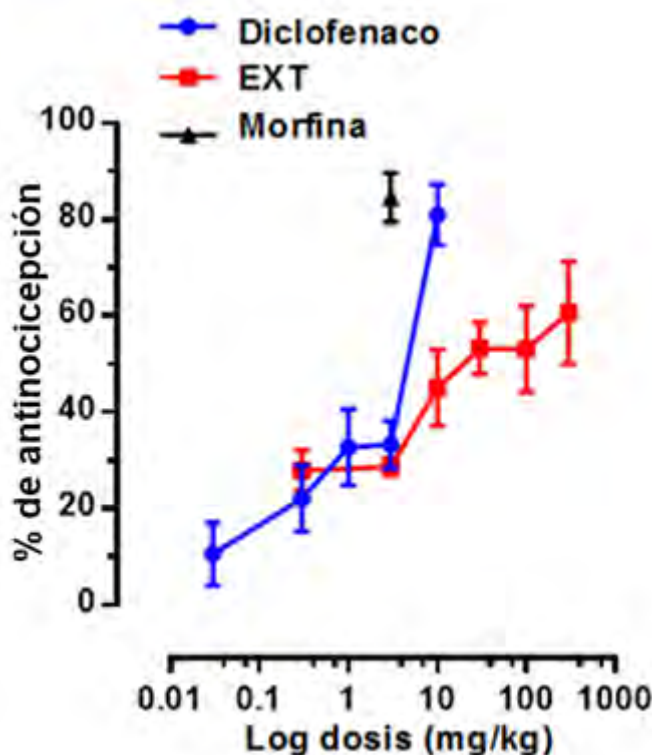


Figura 11. Curva dosis respuesta del efecto antinociceptivo inducido por diclofenaco (p.o.) y el extracto metanólico de *T. americana var. mexicana* (p.o.) en administración simple. Cada punto representa la media de 6 animales por cada dosis \pm EEM.

7.4. CDR del efecto antinociceptivo inducido por diclofenaco y el extracto metanólico de *T. americana var. mexicana* en combinación.

Para analizar el efecto antinociceptivo de las combinaciones, se mantuvo fija una concentración de extracto metanólico (0.3, 3, 10 y 30 mg/kg) y se probó con las diferentes dosis de diclofenaco elegidas (0.03, 1 y 10 mg/kg), obteniendo el porcentaje de antinocicepción calculado a partir del ABC (Cuadro 3).

El análisis de las ABC obtenidas a partir de los cursos temporales del extracto metanólico de *T. americana var. mexicana* en combinación con diclofenaco (0.03, 1 y 10 mg/kg) mostró que para el primer grupo de combinaciones se alcanzó un $E_{m\acute{a}x}$ de 58.20 ± 5.39 %; con la segunda de 71.02 ± 2.12 %; con la tercera de 64.94 ± 2.90 %; y para la última de 79.32 ± 3.12 % de antinocicepción. Las DE_{50} de las combinaciones diclofenaco y el extracto metanólico 0.3, 3, 10 y 30 mg/kg de *T. americana var. mexicana* obtenidas bajo estas condiciones experimentales fueron menores en comparación a las DE_{50} del diclofenaco en administración simple (3.18 ± 0.97 , 2.73 ± 0.68 , 4.93 ± 0.82 y 0.80 ± 0.86 mg/kg vs 3.6 ± 0.36 mg/kg) (Figura 12).

Cuadro 3. ABC del efecto antinociceptivo del diclofenaco y el extracto metanólico de *T. americana var. mexicana* en administración simple y en combinación.

		Extracto metanólico de <i>T. americana var. mexicana</i> (u.a.)				
mg/kg		0	0.3	3.0	10	30
D I C L O F E N A C O	0	0	27.9±4.2	28.7±1.8	45±7.9	53.2±5.3
	0.03	10.6±6.5	17.7±4.8	38.2±7.3	31.8±6.3	40.8±4.2
	0.3	22.1±6.8	ND	ND	ND	ND
	1.0	32.7±7.9	41.5±3.4	51.9±1.9	39.5±3.1	54±2.3
	3.0	33.3±4.9	ND	ND	ND	ND
	10	81±6.3	58.2±5.4	71.0±2.1	64.9±2.9	79.3±3.1

Se muestra la media ± EEM de una n= 6. ND= No determinado. Los valores en negrilla corresponden al efecto real antinociceptivo obtenido con la combinación de los tratamientos correspondientes.

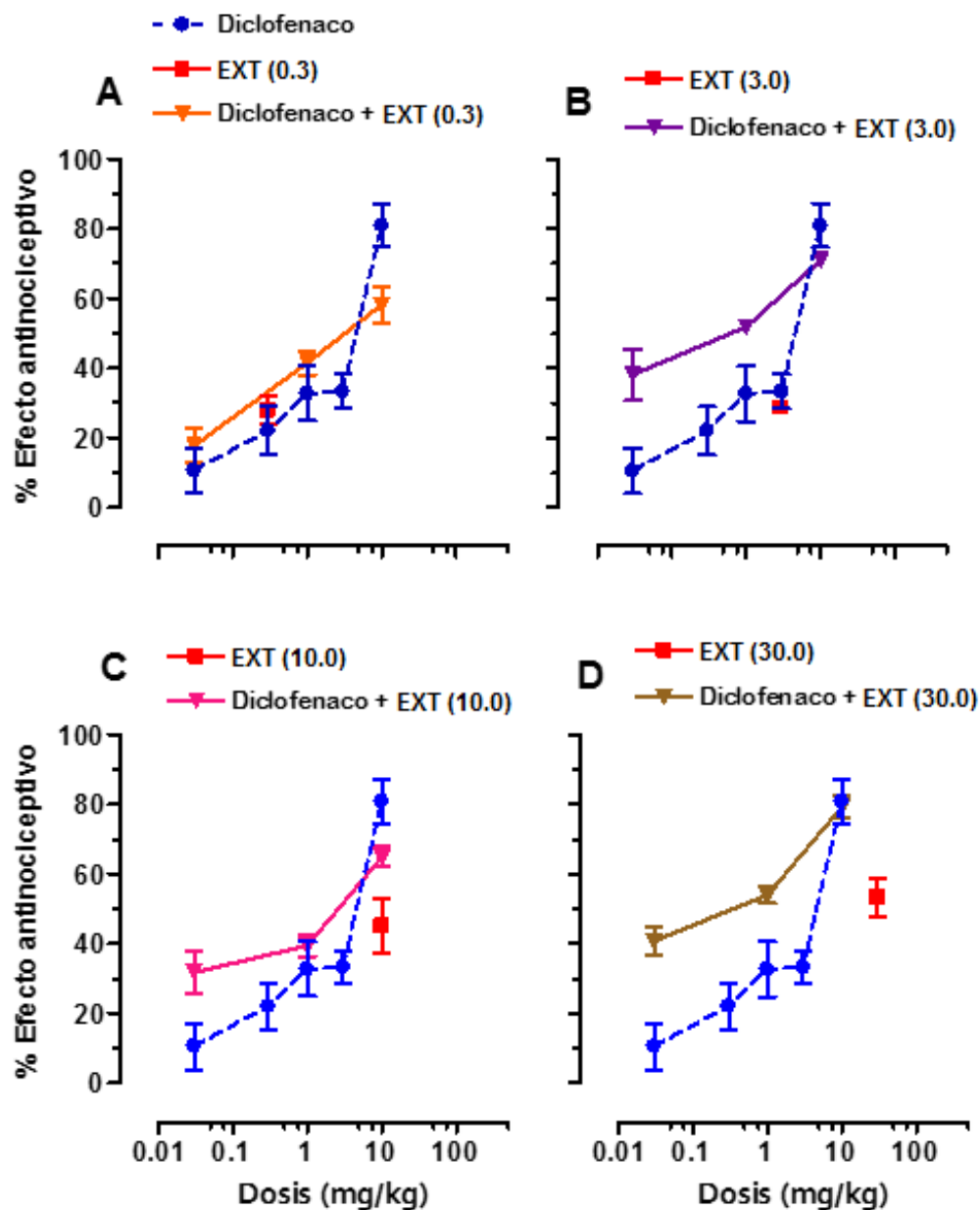


Figura 12. Curvas dosis respuesta del efecto antinociceptivo inducido por diclofenaco (p.o.) en administración simple y en combinación con diferentes concentraciones del extracto metanólico de *T. americana* var. *mexicana* (p.o.). Las combinaciones que se muestran corresponden a tres dosis de Diclofenaco (0.3, 1 y 10 mg/kg, p.o.) con **A**) EXT (0.3 mg/kg, p.o.), **B**) EXT (3 mg/kg, p.o.), **C**) EXT (10 mg/kg, p.o.); y, **D**) EXT (30 mg/kg, p.o.). En cada gráfica se muestra el efecto antinociceptivo de la dosis correspondiente del Extracto metanólico de *Tilia* utilizada en la respectiva combinación. Cada punto representa la media de 6 animales por cada dosis \pm EE.

Cuadro 4. ABC del efecto antinociceptivo de las combinaciones menos el ABC del efecto obtenido por la administración individual de diclofenaco y el extracto metanólico de *T. americana var. mexicana*.

		Extracto <i>T. americana var. mexicana</i> (u.a.)			
		0.3	3	10	30
Diclofenaco (ABC)	mg/kg				
	0.03	-20.76	-1.07	-23.85	-22.96
	1	-19.13	-9.51	-38.27	-31.96
	10	-50.69	-38.63	-61.09	-54.89

Se muestra el valor de la resta del porcentaje de antinocicepción de la combinación del extracto y diclofenaco menos el valor de los componentes individuales.

El análisis del efecto de la interacción de las combinaciones, se hizo restando el valor de su efecto antinociceptivo menos el valor correspondiente de los componentes individuales de dicha combinación para así determinar si las combinaciones produjeron un efecto de potenciación, suma o antagonismo del efecto antinociceptivo. Se obtuvieron solo valores negativos que van desde -1.07 unidades de área (u.a.) hasta -54.89 u.a. (Cuadro 4) (Figura 13).

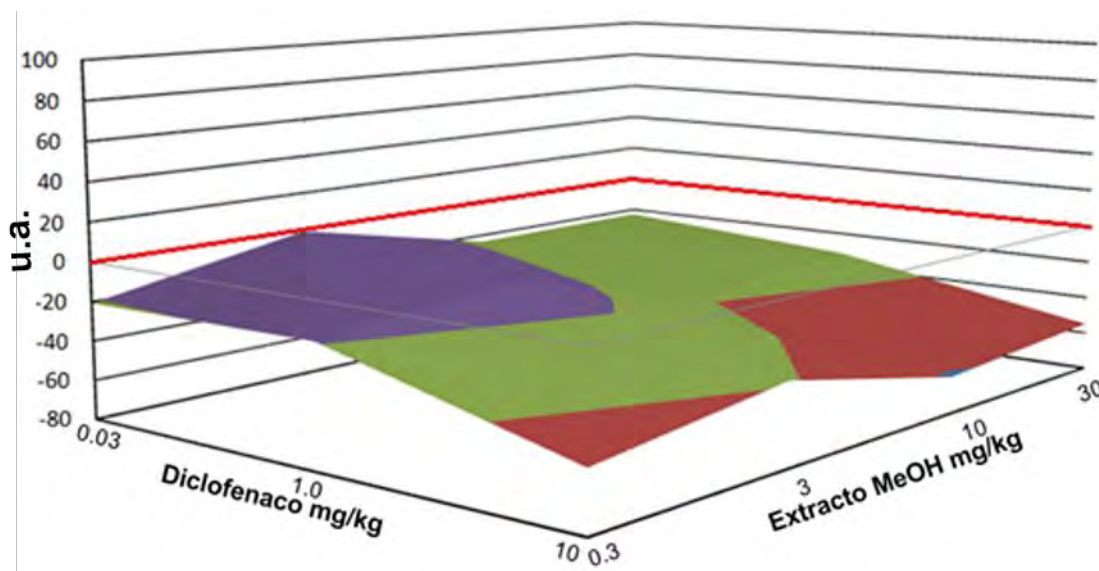


Figura 13. Superficie de interacción sinérgica entre diclofenaco y el extracto metanólico de las inflorescencias de *T. americana var. mexicana*.

7.5. Daño gástrico producido por diclofenaco en administración simple y en combinación con el extracto metanólico de *T. americana var. mexicana*

El examen macroscópico de los estómagos de las ratas con los diferentes tratamientos (Figura 14) muestra que en el grupo vehículo no hay daño a la mucosa, mostrando una mucosa normal, sin inflamación ni hemorragias; mientras que, el grupo con indometacina en administración aguda (nuestro control positivo) produjo lesiones hemorrágicas severas que se muestran como zonas rojizas oscuras con diferentes formas y tamaños que cubren gran parte de la mucosa estomacal. Por otro lado, la administración crónica de diclofenaco durante 7 días, produjo moderado daño en la mucosa con un menor número de lesiones en comparación con la indometacina, las cuales fueron prevenidas con la administración concomitante del EXT MeOH de la *T. americana var. mexicana*. El daño gástrico inducido por los AINEs en esta parte del estudio se reportó como el índice de úlceras producido por cada tratamiento (Cuadro 5).

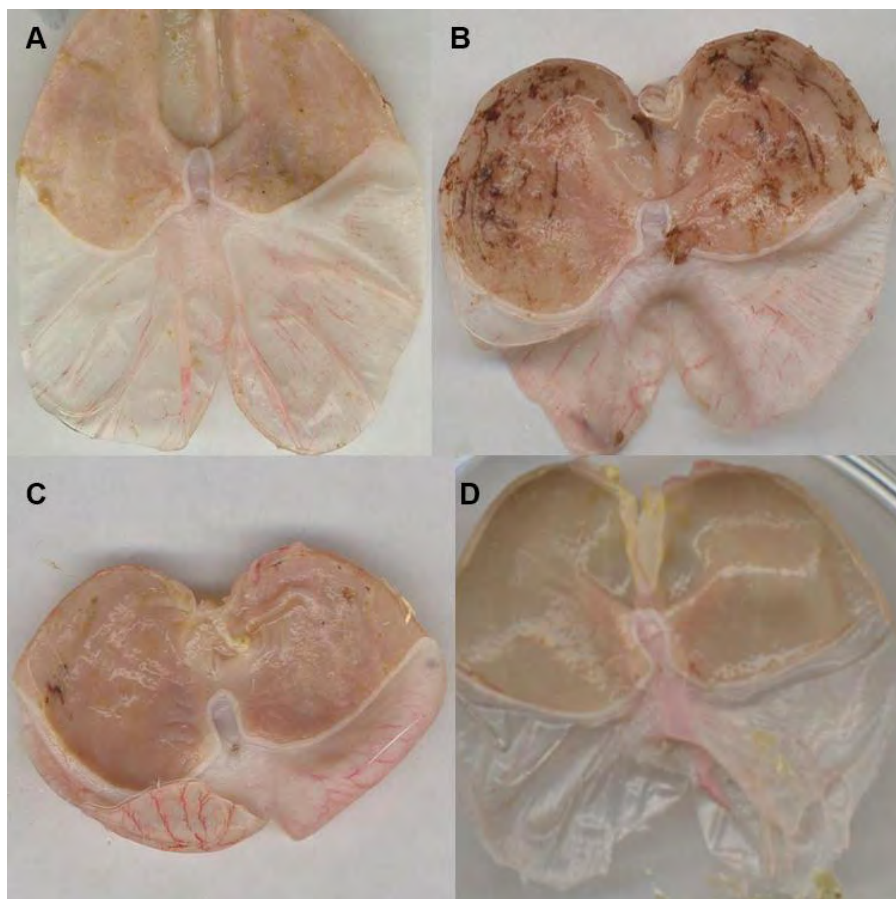


Figura 14. Fotografías representativas de estómagos con A) vehículo, B) indometacina (100 mg/kg, p.o., por un día), C) diclofenaco (10 mg/kg, p.o., por 7 días) y D) diclofenaco (10 mg/kg) + EXT (300 mg/kg, p.o., por 7 días).

Cuadro 5. Daño gástrico reportado como índice de úlcera por evaluación macroscópica de estómago.

Tratamiento	Índice de úlcera (mm ²)
Vehículo	1 ± 1
Indometacina (administración aguda 100 mg/kg)	133.5 ± 77.5
Diclofenaco (10 mg/kg) por 7 días	26 ± 5.29
Diclofenaco (10 mg/kg) + Extracto MEOH (300 mg/kg) por 7 días	6.5 ± 4.5 *

Se muestra la media ± EEM. *Muestra diferencia significativa P<0.05, t de Student comparado contra diclofenaco.

8. DISCUSIÓN

El diclofenaco es un analgésico antiinflamatorio del grupo de los AINEs y uno de los más utilizados en el sector salud para el tratamiento de diversos tipos de dolor de intensidad leve a moderada. Alivia el dolor de tipo inflamatorio de diversos orígenes incluyendo el causado por la artritis, por lo que es utilizado en ataques de gota; también alivia el dolor leve causado por heridas pequeñas, los cólicos y dolores menstruales, el dolor por cálculos renales, la cefalea y la migraña y es útil en el control del dolor causado por un proceso traumático o una cirugía⁴⁴.

En general, los fármacos de este grupo inhiben a las diferentes isoformas de la enzima COX, la COX-1 (constitutiva) y la COX-2 (inducible), por lo que se les conoce como inhibidores no selectivos²¹. La COX, es la enzima que se encarga de la síntesis de las PGs a partir del ácido araquidónico. Las PGs sintetizadas por la COX-1 son la que participan en funciones fisiológicas del organismo; mientras que, las PGE₂ y PGI₂ sintetizadas por la COX-2 son los prostanoïdes de mayor impacto en el procesamiento de la señal dolorosa, estimulando a los receptores a prostanoïdes EP1 y EP4, los cuales inducen una hipersensibilización de las fibras nociceptivas a mediadores de dolor como bradicinina, histamina y sustancia P. Al interaccionar las PGs con sus receptores activan a las proteína cinasa C y A (PKC, PKA) respectivamente. Estas cinasas sensibilizan/activan múltiples moléculas incluyendo al receptor de potencial transitorio V1 (TRPV1), receptores purinérgicos P2X3, canales de calcio y de sodio voltaje dependientes, dando como resultado una hipersensibilización a los mediadores del dolor y la inflamación⁴⁵.

La diferencia en la eficacia clínica entre los diferentes AINEs de uso clínico puede deberse a su perfil de inhibición para cada isoforma de la enzima; por ejemplo, el ácido acetil salicílico tiene una razón de inhibición COX-1/COX-2 de: >100, la indometacina 11, el naproxeno 2.4 y el diclofenaco de 0.27, lo cual también tiene consecuencias en los efectos adversos que producen⁴⁶.

Además, se ha demostrado que el diclofenaco induce parte de su efecto analgésico por otros mecanismos como la estimulación de las vías del canal de potasio de guanosin monofosfato cíclico (GMPc) óxido nítrico periférico, inhibición de la síntesis de leucotrienos, de fosfolipasa A2, modulación de los niveles de ácido araquidónico, inhibición de los canales iónicos sensibles a ácidos, la liberación de opioides endógenos, entre otros²¹. Respecto a su intervención a nivel de SNC se le atribuye que induce un aumento de α -endorfina en la pituitaria y atenuación de hiperalgesia mediada por la activación de receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) que son receptores activados por glutamato e involucrados en la transmisión de la señal nociceptiva en la médula espinal⁴⁷.

Nuestros resultados muestran que el diclofenaco por administración oral induce un efecto antinociceptivo dosis-dependiente en el modelo de estiramiento abdominal, lo cual está de acuerdo con lo reportado previamente por Björkman en 1995, cuando el diclofenaco fue administrado por vía i.p., intratecal e intracerebroventricular⁴⁷.

El modelo writhing o estiramiento abdominal utilizado en este estudio se basa en la inducción de una respuesta dolorosa en los ratones por la administración i.p. de un agente irritante (ácido acético al 1%). Este provoca estiramientos abdominales (espasmos) de manera regular que se incrementan en el lapso de 10 a 15 min. En este modelo, para determinar el efecto analgésico de algún tratamiento, se administra el tratamiento 20 min antes del ácido acético y se cuantifican el número de estiramientos por un periodo de 20 min evaluando cada 5 min.⁴³ Este modelo representa un modelo de dolor visceral en el que el estímulo químico actúa sobre una amplia región de fibras para el dolor, ya que la mayor parte de las vísceras poseen nociceptores quimiosensibles pertenecientes a las fibras de tipo C, que conducen un dolor de tipo lento y difuso^{11, 15}. Este estímulo nocivo produce espasmos en el músculo liso que ocasionan dolor, probablemente porque se ejerce una estimulación mecánica sobre los receptores para el dolor mecanosensibles aunque el dolor producido también puede ser un efecto indirecto

de los espasmos al comprimir los vasos sanguíneos en la zona en la que se origina el fenómeno generando una isquemia y acelerando así el metabolismo del tejido, esta aceleración acentúa aún más la isquemia relativa creando las condiciones para la liberación de sustancias inductoras del dolor como la bradicinina y las enzimas proteolíticas, incluso la generación de ácido láctico, resultado del metabolismo anaerobio del músculo¹⁵.

Además, la administración de ácido acético produce acidosis tisular de manera local y dolor por la modulación de los canales iónicos sensibles a protones (ASIC por sus siglas en inglés), tal como el ASIC1 que es selectivo de sodio en las neuronas sensoriales que se activa una vez que el pH cae por debajo de un valor de 7.0, aunque también pueden estar involucrados receptores como el TRPV1 que es estimulado por acidosis o por una activación directa⁴⁸. La membrana al ser dañada a causa de la acidosis, libera eicosanoides como el ácido araquidónico, el precursor de las PGs y tromboxanos. Un estudio en humanos en la que se provocó hiperalgesia en vísceras por administración de ácido ha demostrado la intervención de receptores EP1 y EP3, estos receptores se expresan en los nervios aferentes primarios, sugiriendo un papel importante de la PGE₂ en la hipersensibilidad de dolor visceral⁴⁵.

Nuestros resultados muestran que el diclofenaco tiene prácticamente la misma eficacia que la morfina, un analgésico opioide utilizado como control positivo, en este modelo de dolor; a pesar de que la morfina es un fármaco utilizado para dolor severo por sus efectos a nivel de SNC. La morfina inhibe la transmisión ascendente de la información nociceptiva desde el asta dorsal de la médula espinal, para activar circuitos de control del dolor que descienden desde el tallo encefálico, por medio de la parte rostral ventromedia del bulbo raquídeo, hasta el asta dorsal de la médula espinal⁴⁹. La morfina es un agonista de los receptores a opioides μ acoplados a proteína G (Gi) y la activación de estos receptores provoca una inhibición en la actividad de la enzima adenilato ciclasa (AC) y por

consiguiente del adenosil monofosfato cíclico (AMPc) causando cierre de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje en las terminales presinápticas de neuronas primarias y con esto la reducción de la liberación de neurotransmisores que participan en el dolor como la sustancia P y el glutamato; por otra parte, a nivel postsináptico activa canales de potasio ocasionando hiperpolarización e impidiendo la propagación del impulso doloroso⁵⁰. La eficacia del diclofenaco en este modelo puede ser por su gran capacidad para inhibir a las COX, incluso haciéndolo desde 3 a 1000 veces con más potencia que otros AINE y por lo tanto la inhibición en la síntesis de PGE_2 que tiene una importante intervención en la sensibilización de los mediadores de dolor y como ya se mencionó, en el dolor visceral hay liberación de este tipo de PG²¹.

Con relación al extracto metanólico de las inflorescencias de *T. americana var. mexicana*, nuestros resultados mostraron que éste produce un efecto antinociceptivo, como previamente se reportó en el modelo de disfunción inducida por dolor en rata (PIFIR por sus siglas en ingles) en donde se induce la nocicepción con la administración de ácido úrico³⁶; aunque mostró más efectividad en el modelo de estiramiento abdominal de acuerdo a este estudio. Esto puede ser debido a que en el modelo de PIFIR se utilizan ratas, se trata de un modelo de dolor inflamatorio y la administración del tratamiento es posterior al estímulo doloroso⁵¹; mientras que en el de estiramiento abdominal se utilizan ratones, se administra primero el tratamiento antes del estímulo y se induce un dolor de tipo visceral. Sin embargo, el extracto metabólico de *T. americana var. mexicana* muestra actividad antinociceptiva en ambos modelos.

Los metabolitos responsables del efecto antinociceptivo de la *T. americana var. mexicana* podrían ser la quercetina y sus derivados, de acuerdo con un estudio realizado por Martínez y cols., en 2009. Dicho metabolito puede estar interfiriendo en la absorción del diclofenaco, por un cambio en el pH del medio, por una formación de complejos o en la inducción de los transportadores de fármacos como

la glicoproteína-P (Gp-P) que se encuentra en las membranas de varios tejidos, incluyendo el tracto GI, reduciendo las concentraciones plasmáticas del diclofenaco y por lo tanto su biodisponibilidad⁴¹, este fenómeno se ha comprobado en estudios de interacciones fármaco-fármaco y el mismo autor atribuye este posible mecanismo a las interacciones de tipo fármaco-medicina completaría y alternativa, entre ellas las plantas medicinales⁵².

Por otro lado, el estudio entre las interacciones farmacológicas es una práctica médica común que puede inducir efectos benéficos y/o perjudiciales. Con relación a la interacción entre fármacos y plantas medicinales, existen evidencias que muestran que el *Allium sativum L. Garlik* (Ajo), que contiene un metabolito llamado alicina, produce efectos de antiagregante plaquetario, vasodilatador periférico, antimicrobiano, etc. y, puede potenciar la actividad antihipertensiva del propanolol, hidroclorotiazida y captoprilo⁵³. El *Panax quinquefolius, American ginseng* (Ginseng Americano) favorece el efecto de los antirretrovirales⁵⁴ y reduce el efecto de warfarina⁵⁵; el *Hypericum perforatum* y su relación con el aumento de colesterol y lipoproteínas LDL en administración con atorvastatina y el efecto sinérgico que tiene en combinación con clopidogrel⁵⁶, y el *Ginkgo biloba* cuando se administra con warfarina incrementa el riesgo de sangrado. Por lo que se hace necesario estudiar el tipo de interacción que producen otras plantas de uso medicinal con fármacos de uso clínico frecuente.

En cuanto a estudios relacionados con el uso de los AINEs hay evidencia de un estudio *in vitro* de una interacción de tipo farmacodinámica de flurbiprofeno, un AINE, con jugo y té fermentado de uva debido estos últimos reducen la tasa de hidroxilación del AINE, sugiriendo su capacidad de inhibir el citocromo-P2C957. Otro estudio en humanos para el flurbiprofeno y el paracetamol en combinación con extractos que contenían metabolitos curcumina y piperina muestran que no hay un efecto clínicamente significativo de los metabolitos sobre la disposición farmacocinética de ambos fármacos⁵⁸.

En este trabajo se demostró que a pesar de que el extracto metanólico de las inflorescencias de *T. americana var. mexicana* muestra efectos antinociceptivos, antagoniza el efecto antinociceptivo del diclofenaco cuando se administran de manera conjunta. Esto puede deberse a que el extracto metanólico de esta especie contiene diversos metabolitos de diferente naturaleza química con efectos farmacológicos no estudiados, es decir que quizá uno o más metabolitos del extracto podrían ser los responsables del efecto antinociceptivo del mismo, sin embargo, estos mismo metabolitos u otros presentes en el extracto podrían estar alterando la farmacocinética del diclofenaco, que es el tipo de interacción farmacológica más común entre fármacos y plantas medicinales (interacciones). También podría ser que el efecto antinociceptivo de los metabolitos presentes en la planta pueden actuar a través del mismo mecanismo de acción del diclofenaco y, al combinarse, no se logra una potenciación del efecto.

Estudios fitoquímicos han reportado la presencia de flavonoides como la quercitrina y derivados, isoquercitrina, kaempferol, astragalina y tilirosida como componentes mayoritarios en extractos polares de varias especies de *Tilia*³⁴, esto coincide con un estudio más reciente realizado a diferentes extractos metanólico de *T. americana var. mexicana* por HPLC recolectada en tres diferentes localidades de México, coincidiendo en la mayoría de derivados de quercetrina y kaempferol, respecto a las inflorescencias que se utilizaron en nuestro estudio se encuentra presentes los siguientes metabolitos: Kaempferol-3,7-O-dirhamósido (kaempferitrina), Quercetina-3-O-glucósido(isoquercitrina), Kaempferol-3-O-glucósido (astragalina), Quercetin-3-pentoside, Quercetin-malonilhexósido, Kaempferol-3-O-rhamnosida, Kaempferol-3-O-(6-p-coumaroil)-glucósido (tilirosida) y Quercetin-3,7-O-dirhamnosida³⁵.

Sin embargo, el uso de las plantas medicinales no solo se dirige a potenciar el efecto terapéutico de algunos fármacos, sino a tratar de reducir sus efectos adversos. En este sentido, uno de los efectos adversos que producen los AINEs son los trastornos GI, tales como ulceración y sangrado GI²³, sobre todo con su

uso a largo plazo. En estudios previos se reportó que entre una a dos después de la administración de 600 mg de ácido acetilsalicílico se producen hemorragias y rupturas superficiales en la mucosa (erosiones), esto solo con la administración aguda; mientras que la administración crónica de un AINE se asocia con gastritis de tipo C caracterizada por hiperplasia epitelial, endotelial y muscular⁵⁹.

Como ya se mencionó, los AINEs causan daño a la mucosa gastrointestinal por inhibición de la síntesis de PGs o por irritación directa que causa alteraciones en la permeabilidad de la mucosa. En el estómago, las prostaglandinas estimulan la secreción de bicarbonatos que controlan la acidez del medio; así como de moco citoprotector. Por lo que, la inhibición de su síntesis por los AINEs produce un incremento en la susceptibilidad al daño en la mucosa y a la ulceración gastrointestinal. Además, varios estudios han mostrado que las especies reactivas de oxígeno participan importantemente en la patogénesis del daño en la mucosa inducido por los AINEs⁶⁰.

En nuestro estudio, se demostró que, a pesar de que el extracto metanólico de las inflorescencias de *T. americana var. mexicana* no potenció el efecto antinociceptivo del diclofenaco, sí fue capaz de reducir el daño gástrico inducido por éste cuando se administró de manera crónica. Esta protección producida por el extracto de *T. americana var. mexicana* puede ser porque alguno de los metabolitos presentes en el extracto metanólico promueva la producción de las PGI₂, que es la prostaglandina responsable de la protección gástrica¹⁹; o bien, por el efecto antioxidante de la quercetina (uno de los principales metabolitos de la *T. americana var. mexicana*), el cual podría evitar la generación de las especies reactivas de oxígeno que participan en la producción de úlceras gástricas por la administración de algunos AINEs como el diclofenaco⁶⁰.

9. CONCLUSIONES

- El extracto metanólico de las inflorescencias de *T. americana var. mexicana* inducen un efecto antinociceptivo en el modelo de writhing, es decir que tiene actividad como analgésico, sustentando científicamente el uso etnomédico de esta planta.
- La administración concomitante del extracto metanólico de *T. americana var. mexicana* y diclofenaco por vía oral en el modelo de writhing resulta en una interacción farmacológica de tipo antagónica, debido a que se disminuye el efecto antinociceptivo total del diclofenaco. Sin embargo, la aparente disminución en la respuesta antinociceptiva del diclofenaco por el extracto podría ser porque ambos están inhibiendo a la COX; por lo que podrían estar actuando a través del mismo mecanismo de acción.
- El uso del extracto metanólico de *T. americana var. mexicana* previene las lesiones gástricas provocadas por la administración crónica del diclofenaco, quizá porque la quercetina presente en la planta inhibe la producción de radicales libres que participan en la inducción de úlceras gástricas por la administración de AINEs.

10. PERSPECTIVAS

- Continuar con el estudio fitoquímico para conocer la composición química del extracto metanólico de las inflorescencias de la *T. americana var. mexicana* y aislar los compuestos posiblemente responsables del efecto antinociceptivo.
- Determinar si el extracto metanólico tiene efecto espasmolítico en un modelo *in vitro* debido a que se probó en un modelo de dolor visceral y tuvo un efecto positivo.
- Evaluar más combinaciones de diclofenaco y el extracto metanólico para dilucidar si en alguna combinación se tienen un efecto de potenciación, manteniendo la protección GI proporcionada por la planta.

11. REFERENCIAS

1. Patel NB. Fisiología del dolor. En: Patel NB, Kopf A, editores. Guía para el manejo del dolor en condiciones de bajos recursos. 1 ed. Washington, D.C.: IASP; 2010. p. 13-18.
2. International Association for the Study of Pain [Internet]. USA, Washington, D.C. Publications & News [citado 06 agosto 2016]. Disponible en: <http://www.iasp-pain.org/PublicationsNews/PAIN.aspx>
3. Ali N, Lewis M. Clinical picture. En: Ali N, Lewis M, editores. Understanding pain an Introduction for patients and caregivers. 1ed. Londres: Rowman & Littlefield; 2015. p. 73-146.
4. La Hora [Internet]. Ecuador, Quito. Dolor afecta la economía del país [citado 06 agosto 2016]. Disponible en: <http://lahora.com.ec/index.php/noticias/show/1000149499/-1/home/goRegional/Loja#.V6jhtrjhDIW>
5. López Timoneda F. Definición y clasificación del dolor. Clínicas Urológicas de la Complutense 1996; 4: 49-55.
6. Scholz J, Woolf CJ. Can we conquer pain?. Nat Neurosci. 2002; 5 (1): 1062-1067.
7. Woolf CJ. What is this thing called pain?. J Clin invest. 2010; 120 (11): 3742-3744.
8. Mesas A. Dolor Agudo y Crónico. Clasificación del Dolor. Historia clínica de las Unidades de Dolor. Clínica del Dolor, Servicio de Anestesiología. 2012: 1-22.
9. Bielefeldt K, Gebhart GF. Dolor visceral: mecanismos básicos. En: McMahon SB, Koltzenburg M, editores. Wall y Melzack Tratado del Dolor. 5 ed. España: Elsevier; 2007. p. 741-758.

10. Jonhson AC, Meerveld BG. The Pharmacology of Visceral Pain. *Adv Pharmacol.* 2016; 75 (1): 1-29.
11. Hudspith MJ. Anatomy, physiology and pharmacology of pain. *Anaesth Intens Care.* 2016; 17 (9): 425-430.
12. Barrot M. Tests and models of nociception and pain in rodents. *Neuroscience.* 2012; 211 (1): 39-50.
13. Steeds CE. The anatomy and physiology of pain. *Surgery.* 2016; 34 (2): 55-59.
14. Basbaum AI, Bautista DM, Scherrer G, y cols. Cellular and Molecular Mechanisms of Pain. *Cell.* 2009; 139 (2): 267-284.
15. Guyton AC, Hall JE. El sistema nervioso: Principios generales y fisiología de la sensibilidad. En: *Tratado de Fisiología Médica.* 12 ed. España: Elsevier; 2011; 542-594.
16. Ossipov MH, Dussor GO, Porreca F. Central modulation of pain. *J Clin Invest.* 2010; 120 (11): 3779-3787.
17. Clark MA, Finkel R, Rey JA, Whalen K. Opioides. En: *mFarmacología.* 5 ed. España: Wolters Kluwer; 2012; 205-222.
18. Díaz-González F, Sánchez-Madrid F. NSAIDs: Learning new tricks from old drugs. *Eur J Immunol.* 2015; 45 (3): 679-686.
19. Rao P, Knaus EE. Evolution of onsteroideal anti-Inflammatory Drugs (NSAIDs): cyclooxygenase (COX) inhibition and beyond. *J Pharm Pharm Sci.* 2008; 11 (2): 81-110.
20. Brune K, Zeilhofer HZ. Analgésicos antipiréticos: aspectos básicos. En: McMahon SB, Koltzenburg M, editores. *Wall y Melzack Tratado del Dolor.* 5 ed. España: Elsevier; 2007. p.471-482.
21. Gan TJ. Diclofenac: an update on its mechanism of action and safety profile. *Curr Med Res Opin.* 2010; 26 (7): 1715-1731.

22. Aristil Chéry PM. Analgésicos opioides y antagonistas. En: de León J, Salas E, Guerrero HF y cols., editores. Manual de farmacología básica y clínica. 6 ed. México: McGraw-Hill; 2013. p. 73-77.
23. Jordan S, White J. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs: clinical issues. Nurs Stand. 2001; 15(23): 45-52.
24. Cassileth B, Gubili J. Terapias complementarias para el manejo del dolor. En: Patel NB, Kopf A, editores. Guía para el manejo del dolor en condiciones de bajos recursos. 1 ed. Washington, D.C.: IASP; 2010. p. 59-64.
25. Biblioteca digital de la Medicina Tradicional Mexicana [Internet]. México. Argueta Villamar A. [citado 04 agosto 2016]. Disponible en: http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/intro_atlas.html
26. Organización Mundial de la Salud [Internet]. Ginebra, Suiza. Organización Mundial de la Salud; [citado 04 agosto 2015]. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2004/pr44/es/>
27. Deciga-Campos M, González-Trujano E, Navarrete A y cols. Antinociceptive Effect of Selected Mexican Traditional Medicinal Species. Proc West Pharmacol Soc. 2005; 48 (1): 70-72.
28. Pérez Calix Emmanuel. Flora del Bajío y de regiones adyacentes. Instituto de Ecología 2009; 160:1-39.
29. Pavón NP, Rico-Gray V. An endangered and potentially economic tree of Mexico: *Tilia mexicana* (Tiliaceae). Econ Bot. 2000; 54 (1): 113-114.
30. Biblioteca digital de la Medicina Tradicional Mexicana [Internet]. México. Argueta Villamar A. [citado 04 agosto 2016]. Disponible en: http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=Tilia_mexicana&id=7788

31. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad [Internet]. México. CONABIO [citado 27 diciembre 2016]. Disponible en: <http://bios.conabio.gob.mx/especies/6066964.pdf>
32. Pérez-Ortega G, Guevara-Fefer P, Chávez M y cols. Sedative and anxiolytic efficacy of *Tilia americana* var. *mexicana* inflorescence used traditionally by communities of State of Michoacán, Mexico. J Ethnopharmacol. 2008; 116 (3): 461-468.
33. Herrera-Ruiz M, Román-Ramos R, Zamilpa A y cols. Flavonoids from *Tilia americana* with anxiolytic activity in plus-maze test. J Ethnopharmacol. 2008; 118 (2):312-317.
34. Aguirre-Hernández E, Martínez AL, González-Trujano ME y cols. Pharmacological evaluation of the anxiolytic and sedative effects of *Tilia americana* L. var. *mexicana* in mice. J Ethnopharmacol. 2007; 109 (1): 140-145.
35. Aguirre-Hernández E, González-Trujano ME y cols. HPLC/MS analysis and anxiolytic-like effect of quercetin and kaempferol flavonoids from *Tilia americana* var. *mexicana*. J Ethnopharmacol. 2010; 127 (1): 91-97.
36. Martínez AL, González-Trujano ME, Aguirre-Hernández E y cols. Antinociceptive activity of *Tilia americana* var. *mexicana* inflorescences and quercetin in the formalin test and in an arthritic pain model in rats. Neuropharmacology. 2009; 56 (2): 564-571.
37. Martínez-Martínez AL, González-Trujano ME, López-Muñoz FJ. Análisis de la interacción antinociceptiva entre hesperidina y ketorolaco por medio de la exploración de superficie de interacción sinérgica. Rev Mex Anest. 2013; 36 (4): 249-256.
38. Cárdenas-Rodríguez N, González-Trujano ME, Aguirre-Hernández E y cols. Anticonvulsant and Antioxidant Effects of *Tilia americana* var. *mexicana* and

- Flavonoids Constituents in the Pentylene-tetrazole-Induced Seizures. *Oxid Med Cell Longev.* 2014; 2014; 1-10.
39. Ángeles-López GE, González-Trujano ME, Déciga-Campos M y cols. Neuroprotective Evaluation of *Tilia americana* and *Annona diversifolia* in the Neuronal Damage Induced by Intestinal Ischemia. *Neurochem Res.* 2013; 38 (1): 1632-1640.
40. Ángeles-López GE, González-Trujano ME, Gómez C y cols. Neuroprotective effects of *Tilia americana* var. *mexicana* on damage induced by cerebral ischaemia in mice. *Nat Prod Res.* 2015; 30 (18): 1-5.
41. Girona Brumós Lourdes. Introducción a las interacciones Farmacológicas. 1 ed. España: Sociedad Española de Farmacia Hospitalaria: SEFH; 2013. Capítulo 1, Interacciones farmacológicas: descripción y mecanismo y actitud clínica ante las interacciones farmacológicas; 12-65.
42. Tres JC. Interacción entre fármacos y plantas medicinales. *An Sist Sanit Navar* 2006; 29 (2): 233-252.
43. Siegmund E, Cadmus R, Lu G. A method for evaluating both non-narcotic and narcotic analgesics. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1957; 95 (4): 729-731.
44. Burian M, Tegeder I, Seegel M y cols. Peripheral and central antihyperalgesic effects of diclofenac in a model of human inflammatory pain. *Clin Pharmacol Ther.* 2003; 74 (2): 113-120.
45. Kawabata A. Prostaglandin E2 and Pain—An Update. *Biol Pharm Bull.* 2011; 34 (8): 1170-1173.
46. Warner TD, Giuliano F, Vojnovic I y cols. Nonsteroid drug selectivities for cyclo-oxygenase-1 rather than cyclo-oxygenase-2 are associated with human gastrointestinal toxicity: A full in vitro analysis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999; 96 (13): 7563-7568.

47. Björkman R. Central antinociceptive effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs and paracetamol. *Acta Anaesthesiol Scand.* 1995; 39 (103): 1-44.
48. Akbar A, Walters JRF, Ghosh S. Review article: visceral hypersensitivity in irritable bowel syndrome: molecular mechanisms and therapeutic agents. *Aliment Pharmacol Ther.* 2009; 30 (1): 423-435.
49. Gutstein HB, Akil H. Analgésicos opioides. En: Goodman & Gilman. *Las bases farmacológicas de la Terapéutica.* 11 ed. México: McGraw-Hill; 2007; 547-590.
50. Bao Y, Gao Y, Yang L y cols. The mechanism of μ -opioid receptor (MOR)-TRPV1 crosstalk in TRPV1 activation involves morphine anti-nociception, tolerance and dependence. *Channels.* 2015; 9 (5): 235-243.
51. López-Muñoz FJ, Salazar LA, Castañeda-Hernández G y cols. A New Model to Assess Analgesic Activity: Pain-Induced Functional Impairment in the Rat (PIFIR). *Drug Dev Res.* 1993; 28: 169-175.
52. Marchetti S, Mazzanti R, Beijnen JH y cols. Concise Review: Clinical Relevance of Drug–Drug and Herb–Drug Interactions Mediated by the ABC Transporter ABCB1 (MDR1, P-glycoprotein). *Oncologist.* 2007; 12 (8): 927-941.
53. Shi S, Klotz U. Drug interactions with Herbal Medicines. *Clin Pharmacokinet.* 2012; 51 (2): 77-104.
54. Andrade ASA, Hendrix C, Parsons TL y cols. Pharmacokinetic and metabolic effects of American ginseng (*Panax quinquefolius*) in healthy volunteers receiving the HIV protease inhibitor indinavir. *BMC Complement Altern Med.* 2008; 19 (8): 1-10.
55. Yuan CS, Wei G, Dey L y cols. Brief communication: American ginseng reduces warfarin's effect in healthy patients: a randomized, controlled Trial. *Ann Intern Med.* 2004; 141 (1): 23-27.
56. Lau WC, Welch TD, Shields T y cols. The effect of St John's wort on the pharmacodynamic response of clopidogrel in hyporesponsive volunteers and

- patients: increased platelet inhibition by enhancement of CYP3A4 metabolic activity. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2011; 57 (1): 86-93.
57. Greenblatt DJ, von Moltke LL, Perloff ES y cols. Interaction of flurbiprofen with cranberry juice, grape juice, tea, and fluconazole: In vitro and clinical studies. *Clin Pharmacol Ther.* 2006; 79(1): 125-133.
58. Volak LP, Hanley MJ, Masse G y cols. Effect of a herbal extract containing curcumin and piperine on midazolam, flurbiprofen and paracetamol (acetaminophen) pharmacokinetics in healthy volunteers. *Br J Clin Pharmacol.* 2012; 75 (2): 450-462.
59. Hawkey CJ. Nonsteroidal Anti-inflammatory Drug Gastropathy. *Gastroenterology.* 2000; 119 (2): 521-53
60. Abourehab MAS, Khaled KA, Sarhan HAA y cols. Evaluation of combined famotidine with quercetin for the treatment of peptic ulcer: in vivo animal study. *Drug Des Devel Ther.* 2015; 9: 2159-2169.