



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

INSTITUTO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA
INSTITUTO DE CIENCIAS DE LA SALUD

**DOCTORADO EN CIENCIAS DE LOS ALIMENTOS Y
SALUD HUMANA**

TESIS DOCTORAL

**EFFECTO ANTINOCICEPTIVO DE EXTRACTOS
ETANÓLICOS Y LIOFILIZADOS DE GRANADA
(*Punica granatum* L.) Y SU COMBINACIÓN CON
ÁCIDO ACETILSALICÍLICO, EN UN MODELO
ANIMAL DE DOLOR NOCICEPTIVO E
INFLAMATORIO**

Para obtener el grado de
Doctor en Ciencias de los Alimentos y Salud Humana

PRESENTA

M. en C. José Antonio Guerrero Solano

Director (a)

Dra. Mirandeli Bautista Ávila

Codirector (a)

Dr. Osmar Antonio Jaramillo Morales

Pachuca de Soto, Hgo., México, mayo de 2022



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

Instituto de Ciencias de la Salud
Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería
Instituto de Ciencias Agropecuarias

San Agustín, Tlaxiaca, Hgo., 08 de abril de 2022

ICSa-DCASH-Abril 2022

Asunto: Asignación de Jurado de Examen

M. en A. JULIO CESAR LEINES MEDÉCIGO COORDINACIÓN DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR

Por este medio se informa que el comité tutorial asignado al M. en C. José Antonio Guerrero Solano, con número de cuenta 111972, estudiante del Doctorado en Ciencias de los Alimentos y Salud Humana, dió terminación al trabajo de tesis titulado "Efecto antinociceptivo de extractos etanólicos y liofilizados de granada (*Punica granatum* L.) en combinación con ácido acetilsalicílico, en un modelo animal de dolor nociceptivo e inflamatorio", y por lo tanto se autoriza la impresión del documento de tesis en extenso propuesto por el estudiante.

Lo anterior, en función de que, el estudiante realizó todas las correcciones, adiciones y/o modificaciones sugeridas por el comité en la revisión previa con fecha 15 de marzo de 2022.

Por tal motivo, solicito a usted tenga a bien permitir al doctorando dar continuidad al proceso necesario que conlleve a la obtención del grado de Doctor en Ciencias de los Alimentos y Salud Humana.

DRA. MIRANDELI BAUTISTA ÁVILA

Director de tesis

DR. OSMAR ANTONIO JARAMILLO MORALES

Codirector de tesis

DRA. ARACELI CASTAÑEDA OVANDO

DRA. AURORA QUINTERO LIRA

ATENTAMENTE

Pachuca, Hidalgo, 08 de abril del 2022

"Amor, Orden y Progreso"

M en C. Esp. Adrián Moya Escalera
Director del Instituto de Ciencias de la Salud
Dean

Dra. Lyda López Pontigo
Coordinadora de Posgrado del ICSa
Director of Graduate Studies of ICSa



M. en N.C Arianna Omania Covarrubias
Jefa del Área Académica de Nutrición
Chair of Academic Area of Nutrition

Dra. Esther Ramírez Moreno
Coordinadora del Programa Educativo
Director of Graduate Studies

DEDICATORIA

Dedico mi tesis al Gran Arquitecto del Universo, a quien conocí mejor después de haber visto la luz en mi iniciación como hijo de la viuda. Sé que sin él, quien me dio la oportunidad de vivir, la familia que tengo, el privilegio de ser padre y el rumbo y camino, no tendría lo que hoy tengo, ni sería quien hoy soy. Gracias por las pruebas que me hacen crecer como ser humano y gracias por abrirme el camino que deseo seguir.

A mis hijos Antonio y Damián Guerrero, así como a mi esposa Tania, quienes son mi razón de vivir, y uno de mis más grandes motivos para superarme día a día. Fue con ustedes con quien aprendí que el amor verdadero es desinteresado, es posible amar y darlo todo sin esperar nada a cambio. Los amo.

A mis padres, Gloria Solano Solano y José Guerrero Aguilar por haberme procreado y ser guía moral, educativa y un ejemplo de vida. Gracias también por el apoyo económico y en momentos de crisis. Siempre he sentido aquél respaldo que me hace aventurarme a lo nuevo y lo desconocido de una manera menos incierta. Los amo.

A mi hermana Adriana Guerrero Solano, mis sobrinas Karla Sophia y Natalia.

A mis amigos Álvaro, José Morán, Jaciel, Marisol, Oscar, Beto botas, Itzel, Gabriel y demás amigos que aún sin mencionarlos aquí, saben que están en mi corazón.

A la memoria de mis amados abuelos.

*A todos con cariño sincero
José Antonio Guerrero Solano.*

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Mirandeli Bautista Ávila y el Dr. Osmar Antonio Jaramillo Morales, por brindarme la confianza para la realización de un proyecto de tesis bajo su dirección. Gracias por el tiempo, la enseñanza, los consejos, las observaciones y el afecto otorgado.

A mi comité tutorial, Dra. Araceli Castañeda Ovando y Dra. Aurora Quintero Lira, por el tiempo invertido en sus puntuales observaciones así como los avances de tesis, seminarios y la revisión final del documento presente. Por sus enseñanzas y por su absoluta disposición de compartir el conocimiento. Mi eterna gratitud.

A la Dra. Esther Ramírez Moreno por su dedicación y alta gerencia como coordinadora del Doctorado en Ciencias de los Alimentos y Salud Humana.

Al personal del bioterio (Dr. Alejandro, Dra. Bárbara, Dra. Fabiola) donde pasé gran parte del proyecto experimental.

A mi casa, la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, a la cual pertenezco desde el año 2000, cuando ingresé a nivel medio superior y en donde ahora cumpla 14 años de estudio, además esta augusta institución, me abrió las puertas para iniciar mi carrera docente.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el otorgamiento de la beca 554424 para posgrado PNPC, sin duda alguna, necesaria para el desarrollo de la ciencia en México.

A todos, gracias
José Antonio Guerrero Solano.

ÍNDICE

PÁGINA

RESUMEN	XI
ABSTRACT.....	XII
1. ANTECEDENTES.....	1
1.1 GENERALIDADES DEL DOLOR	1
1.1.1 Definición	1
1.1.2 Neuroanatomía funcional del sistema del dolor.....	2
1.1.2.1 Neurona aferente primaria (nociceptor)	2
1.1.2.2 Neuronas del asta dorsal de la médula espinal y tractos ascendentes.....	3
1.1.2.3 Vías nociceptivas ascendentes.....	4
1.1.2.4 Vías nociceptivas descendentes	5
1.1.3 Clasificación del dolor	7
1.1.4 Dolor nociceptivo	8
1.1.4.1 fisiopatología	8
1.1.4.2 Integración del sistema ascendente y descendente en el proceso nociceptivo	9
1.1.4.3 Modulación del dolor	9
1.1.5 Dolor inflamatorio	10
1.1.6 Fisiopatología del dolor inflamatorio.....	12
1.1.6.1 Disminución de pH.....	12
1.1.6.2 Cininas	12
1.1.6.3 Prostanoides	14
1.1.6.4 Adenocin trifosfato (ATP)	14
1.1.6.5 Serotonina	15
1.1.6.6 Histamina.....	16
1.1.6.7 Neurocininas.....	16
1.1.6.8 Óxido nítrico	16
1.1.6.9 Mediadores inflamatorios de las células del sistema inmunológico.....	18
1.1.6.10 Modificaciones transcripcionales	18
1.1.7 Dolor neuropático	20
1.1.7.1 Fisiopatología.....	20
1.1.7.2 Mecanismos de dolor neuropático	21
1.1.8 Tratamiento del dolor agudo	22
1.1.8.1 AINEs	23
1.1.9 Interacciones farmacológicas para el tratamiento del dolor.....	27
1.1.9.1 Métodos de evaluación de las interacciones farmacológicas	28
1.1.9.2 Isoblograma	29
1.2 GRANADA	37
1.2.1 Clasificación taxonómica, denominación y origen.....	37
1.2.2 Composición nutricional y fitoquímica de la granada.....	39
1.2.3 Usos en la medicina tradicional	44
1.2.5 Actividad biológica.....	45
1.2.6 Granada y dolor/nocicepción.....	46
1.2.7 Toxicidad	51
2. JUSTIFICACIÓN	53
3. HIPÓTESIS	53

4. OBJETIVOS	54
4.1 OBJETIVO GENERAL	54
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	54
5. MATERIALES Y MÉTODOS	55
5.1 ESQUEMA DE DISEÑO METODOLÓGICO	55
5.2 MATERIA VEGETAL Y EXTRACCIÓN	56
5.2.1 <i>materia vegetal</i>	56
5.2.2 <i>Preparación de extractos y liofilizados</i>	56
5.3 REACTIVOS	57
5.4 ANIMALES	57
5.5 PRUEBAS DE DOLOR	58
5.5.1 <i>Prueba de formalina</i>	58
5.5.1.1 Medición del comportamiento del dolor en la prueba de formalina	58
5.5.2 <i>Curva dosis respuesta del extracto seleccionado y ASA para isoblograma</i>	60
5.6.3 <i>Análisis isoblográfico</i>	60
5.7 IMPLICACIÓN DE LA VÍA DE L-ARG / ÓXIDO NÍTRICO / GMPC / ATP	62
5.8 ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y FENOLES TOTALES	63
5.9 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	64
6. RESULTADOS	65
6.1 EXTRACTOS Y LIOFILIZADOS	65
6.2 EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTINOCICEPTIVO DE LOS EXTRACTOS Y LIOFILIZADOS (PRUEBA DE FORMALINA)	65
6.3 CURVA DOSIS- RESPUESTA (PRUEBA DE FORMALINA) DE EXTRACTO DE MAYOR EFECTO Y FÁRMACO DE REFERENCIA	68
6.4 ISOBOLOGRAMA	73
6.5 IMPLICACIÓN DE LA VÍA L-ARG / NO / GMPC / ATP	75
6.6 ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y CONTENIDO FENÓLICO TOTAL	77
7. DISCUSIÓN	78
8. CONCLUSIONES	89
9. REFERENCIAS	90
10. ANEXOS	109
DICTAMEN COMITÉ DE ÉTICA	109

ÍNDICE DE TABLAS

	PÁGINA
Tabla 1. Función de los nervios periféricos formados por fibras A, B y C.	3
Tabla 2. Condiciones asociadas al dolor neuropático.	20
Tabla 3. Categorización de las reacciones dolorosas como respuestas mediadas por el cerebro, por los reflejos supraespinales o por los reflejos espinales.	42
Tabla 4. Clasificación Taxonómica de <i>Punica granatum</i> de acuerdo a la ITIS.	38
Tabla 5. Composición nutricional de granada roja (comparativo).	40
Tabla 6. Compuestos fitoquímicos encontrados en la granada.	42
Tabla 7. Efectos benéficos a la salud de la granada y sus componentes.	46
Tabla 8. Estudios relacionados con granada y dolor.	47
Tabla 9. Dosis utilizadas para construir curvas dosis-respuesta de ExC2 y ASA antes de la administración de formalina al 2%.	60
Tabla 10. Dosis (DE ₃₀) utilizadas para la interacción ASA – ExC2 antes de la administración de formalina al 2%.	62
Tabla 11. Rendimiento de extractos y liofilizados de granada.	65
Tabla 12. Valores de porcentaje de efecto obtenido por dosis en las curvas dosis respuesta de ExC2 y ASA.	72
Tabla 13. Efecto de la combinación ExC2-ASA en la prueba de formalina.	74
Tabla 14. Actividad antioxidante y contenido fenólico total de ExC2.	77

ÍNDICE DE FIGURAS

	PÁGINA
Figura 1. Características de las fibras nociceptoras.	3
Figura 2. Láminas Redex en la médula espinal (corte transversal).	4
Figura 3. Vías ascendentes y descendentes del dolor.	6
Figura 4. Clasificación del dolor de Woolf.	7
Figura 5. Mecanismos moleculares de la nocicepción.	19
Figura 6. Estructura química del ácido acetilsalicílico.	25
Figura 7. Línea de aditividad del isoblograma.	32
Figura 8. Isoblograma que muestra la línea de aditividad y la combinación de dosis P.	33
Figura 9. Isoblograma que muestra la línea de aditividad y curvas para combinaciones que son sinérgicas (curva I) y subaditivas (curva II).	34
Figura 10. Isoblograma cuando un medicamento (A) está inactivo.	35
Figura 11-A, 11-B Estructuras químicas de componentes abundantes en <i>Punica granatum</i> L.	43
Figura 11-C. Estructuras químicas de componentes abundantes en <i>Punica granatum</i> L.	44
Figura 12. Esquema de diseño metodológico.	55
Figura 13a y 13b. Prueba de formalina en rata Wistar	59
Figura 14a y 14b. Cursos temporales de la prueba de formalina obtenidos por la administración i.g. de los extractos y liofilizados.	66
Figura 15. Porcentaje de antinocicepción de los diferentes grupos de estudio, por fases de la prueba de formalina.	67
Figura 16. Porcentaje de antinocicepción global de los diferentes grupos de estudio en la prueba de formalina.	68
Figura 17a y 17b . Curso temporal de la prueba de formalina en las curvas dosis respuesta de ExC2 – ASA.	69
Figura 18a y 18b. Porcentaje de antinocicepción de las diferentes dosis de la curva dosis respuesta de ExC2 y ASA por fases, de la prueba de formalina.	70
Figura 19a y 19b. Porcentaje de antinocicepción global de las diferentes dosis de estudio para la curva dosis respuesta en la prueba de formalina.	71
Figura 20. Curva dosis respuesta de ExC2 y ASA	73
Figura 21. Isoblograma de la interacción entre ExC2 y ASA en la prueba de formalina.	75
Figura 22. Implicación de la vía L-Arg/NO/GMPc/ATP en el efecto antinociceptivo de ExC2	76
Figura 23. Implicación de la vía L-Arg/NO/GMPc/ATP en el efecto antinociceptivo de la combinación de ExC2-ASA	76

LISTA DE ABREVIATURAS

AA	Ácido araquidónico
ABTS	2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin -6- ácido sulfónico)
ACF	Adyuvante Completo de Freund
AINE	Analgésico Antiinflamatorio No Esteroideo
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
ASA	Ácido acetilsalicílico
ASICs	Canales iónicos sensibles al ácido
ATP	Adenosín trifosfato
BDNF	Factor neurotrófico derivado del cerebro
CGRP	Péptido relacionado con el gen de la calcitonina
CICUAL	Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio
COX-1	Ciclooxigenasa 1
COX-2	Ciclooxigenasa 2
CREI	Comité para asuntos éticos y de investigación de la IASP, por sus siglas en inglés
DAG	Diacil glicerol
DE ₅₀	Dosis efectiva 50
DL ₅₀	Dosis letal 50
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidracilo
DPPH	2,2-diphenyl-1-picrilhidrazilo
ExC1, ExC2 y ExC3	Extracto de cáscara de granada variedad 1, 2 y 3
FDA	<i>Food & Drugs Administration</i> (Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos, por sus siglas en inglés)
FRAP	<i>Ferric Reducing Antioxidant Power assay</i> (Ensayo de poder antioxidante férrico, por sus siglas en inglés)
FRAP	<i>Fluorescence Recovery After Photobleaching</i> (Recuperación de fluorescencia después del foto-blanqueo, por sus siglas en inglés)
GMPc	Guanosin monofosfato cíclico
GTP	Guanosin trifosfato
i.c.v.	Intracerebrovascular
i.g.	Intragástrico
i.p.	Intraperitoneal
IASP	<i>International Association of Study of Pain</i> (Asociación Internacional para el Estudio del Dolor)
IL-1 β	Interleucina 1 <i>beta</i>
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
iNOS	Óxido Nítrico Sintasa inducible
IP3	Inositol trifosfato
IRSN	Inhibidor de la recaptación de serotonina y noradrenalina
ITIS	Sistema de Información Taxonómica Integrada (Integrated Taxonomic Information System, por sus siglas en inglés)
L-Arg	L-Arginina

Lj1, Lj2 y Lj3	Liofilizados de jugo de granada variedad 1, 2 y 3
L-NAME	N ^ω -nitro-L-arginin metil ester
NADPH	Nicotinamida-Adenina Dinucleotido fosfato
NGF	Factor de Crecimiento Neuronal
NKA	Neurocinina A
NKCC1	Cotransportador de sodio, potasio y cloruro
NMDA	ácido N-metil-D-aspartico
NO	Óxido nítrico
NOS	Sintasa del óxido nítrico
OMS	Organización Mundial de la Salud
PGE ₁	Prostaglandina E ₁
PGE ₂	Prostaglandina E ₂
PKA	Proteína quinasa A
PKC	Proteína quinasa C
RPLPO	Ribonucleoproteína larga humana P0
SAGARPA	Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación
SEDAGROH	Secretaría de Desarrollo Agropecuario de Hidalgo
SIRS	Síndrome de Respuesta Inflamatoria Sistémica
SNA	Sistema Nervioso Autónomo
SNC	Sistema Nervioso Central
TCDPS	Tracto de la Columna Dorsal Post Sináptico
TCT	Tracto Cérvicotalámico
TEM	Tracto Espinomesencefálico
TER	Tracto Espinoreticular
TET	Tracto Espinotalámico
TNFα	Factor de necrosis tumoral alfa
TRPV1	<i>Transient receptor potential cation channel subfamily V member 1</i> , por sus siglas en inglés
UAEH	Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo

RESUMEN

Muchos fármacos han sido utilizados para el tratamiento del dolor, sin embargo, estos no siempre son eficaces y en su mayoría conllevan efectos adversos, por ello es necesario proponer tratamientos alternativos y naturales que ayuden a mitigar el sufrimiento que genera la conducta nociceptiva. En este sentido, en el presente trabajo se planteó a la granada (*Punica granatum* L.) como agente antinociceptivo por sus antecedentes etnofarmacológicos y porque aún no se esclarecen los posibles mecanismos de acción de su efecto analgésico (antinociceptivo). Por lo que el objetivo fue evaluar el efecto sinérgico de la combinación de extracto etanólico de cáscara de granada (*Punica granatum* L.) y ácido acetilsalicílico en el modelo de formalina. Para ello, se evaluó el efecto antinociceptivo de extractos y liofilizados de tres variedades de granada en la prueba de formalina al 2% en rata Wistar macho. Se realizó una curva dosis-respuesta del extracto o jugo de mayor efecto y el fármaco de referencia por separado para calcular dosis equiefectivas y evaluar efecto de la combinación mediante un isoblograma. Asimismo, se estudió el mecanismo de acción del efecto por la vía del óxido nítrico y se realizaron pruebas de actividad antioxidante y fenoles totales al extracto por DPPH, ABTS+ y FRAP. Los extractos y liofilizados presentaron actividad antinociceptiva contra el grupo VEHÍCULO en fase 1 y principalmente fase 2 de la prueba de formalina ($p < 0.05$). El extracto de cáscara de granada verde (ExC2) presentó mayor efecto que el resto, con un efecto dosis dependiente. El ácido acetilsalicílico (ASA) mostró mayor potencia y eficacia que ExC2. La dosis efectiva que produjo 30% de antinocicepción (DE_{30}) obtenida de las curvas dosis-respuesta logarítmicas de ExC2 y ASA, permitió una curva con la combinación en proporciones fijas (1: 1) que fue analizada mediante isoblograma en donde se encontró una interacción sinérgica, la DE_{30} experimental fue significativamente menor ($p < 0.05$) que la DE_{30} teórica. El mecanismo antinociceptivo de la combinación ExC2-ASA implica a la vía L-Arginina/NO/cGMP. Los extractos y liofilizados de granada tienen efecto antinociceptivo en un modelo de dolor nociceptivo e inflamatorio, el ExC2 tuvo mayor efecto y su combinación con ASA genera sinergia. El mecanismo de acción de este efecto está relacionado con la vía de L-Arginina/NO/GMPc/ATP K^+ . Estos hallazgos sugieren que una interacción entre ExC2 y ASA podría ser viable para tratar el dolor inflamatorio y nociceptivo.

ABSTRACT

Many drugs are used for the treatment of pain, however, they are not always effective and most of them carry adverse effects, for this reason is necessary to propose natural treatments helping mitigate the suffering generated by nociceptive behavior. In this sense, pomegranate (*Punica granatum* L.) is proposed as an antinociceptive agent due to its ethnopharmacological antecedents and because the mechanisms of action of its analgesic (antinociceptive) effect have not yet been clarified. Therefore, the aim of this work was to evaluate the synergistic effect of the combination of ethanolic extract of pomegranate peel (*Punica granatum* L.) and acetylsalicylic acid in the formalin test. The antinociceptive effect of ethanolic extracts and lyophilized juices of three varieties of pomegranate was evaluated in the 2% formalin test in male Wistar rats. A dose-response curve of the extract / juice with the highest effect was performed with the reference drug to calculate equi-effective doses and evaluate the effect of the combination by an isobologram. It was studied whether the mechanism of action of the effect is via nitric oxide (antagonist) and tests of antioxidant activity and total phenols (DPPH ·, ABTS · + and FRAP) were performed on the best extract. The extracts and lyophilized juices showed antinociceptive activity against the VEHICLE group in phase 1 and mainly phase 2 of the formalin test ($p < 0.05$). The green pomegranate peel extract (ExC2) showed a greater effect than the rest, with a dose-dependent effect. Acetylsalicylic acid (ASA) presented greater potency and efficacy than ExC2. The effective dose that produced 30% antinociception (ED_{30}) obtained from the logarithmic dose-responses curves of ExC2 and ASA, resulted in a curve with the combination in fixed proportions (1:1) that was analyzed by isobologram. In the isobologram a synergistic interaction was found, the experimental ED_{30} was significantly lower ($p < 0.05$) than the theoretical ED_{30} . The antinociceptive mechanism of the ExC2-ASA combination involves the L-Arginine / NO / cGMP pathway. Pomegranate extracts and lyophilized juices have an antinociceptive effect in a model of nociceptive and inflammatory pain, ExC2 had a greater effect and its combination with ASA generates synergy. The mechanism of action of this effect is related to the L-Arginine / NO / cGMP / ATP K + pathway. These findings suggest that an interaction between ExC2 and ASA could be interesting for treating inflammatory and nociceptive pain

1. ANTECEDENTES

1.1 GENERALIDADES DEL DOLOR

Melzack *et al.*, en 1965, propusieron una hipótesis para explicar los fenómenos de modulación de la estimulación nerviosa nociceptiva (la conocida como teoría de la compuerta), el estudio de los mecanismos subyacentes a la transmisión dolorosa ha conocido un desarrollo exponencial. En gran medida esto se debe a la convergencia de tres factores: el concepto de dolor como enfermedad (no sólo como síntoma), el desarrollo de nuevos modelos animales, nuevas técnicas bioquímicas, y la colaboración entre la investigación básica y la experiencia clínica (1, 2). El dolor, aunque indeseable, supone una estrategia adaptativa que protege de las agresiones del medio externo y sin la presencia de las respuestas reflejas ante un estímulo doloroso, se tendría desventaja para la supervivencia. Sin embargo, en algunas circunstancias, el dolor deja de ser una sensación benéfica para el organismo y se convierte en sí mismo en una patología que debe ser suprimida para permitir al organismo sobrevivir (3).

1.1.1 DEFINICIÓN

La definición clásica de dolor la propone la Asociación Internacional para el Estudio del Dolor (IASP, por sus siglas en inglés), y versa: *“una experiencia sensorial y emocional desagradable asociada con un daño real o potencial al tejido y que es descrita en términos de daño”* (4). Recientemente, Williams y Kennet (5), agregaron el componente emocional y social en una propuesta de actualización de la definición del dolor, considerándolo como: *“Una experiencia angustiante asociada con el daño tisular real o potencial con componentes sensoriales, emocionales, cognitivos y sociales”*. Desde el aspecto clínico, Pedrajas-Navas y Molino-González lo describen como: *“una experiencia sensitiva desagradable, acompañada de una respuesta afectiva, motora, vegetativa e incluso, de personalidad”* teniéndose así que, el dolor es una experiencia subjetiva y por tanto diferente en cada individuo y no necesariamente debe existir una lesión morfológica que justifique el dolor de un paciente (6). Hay autores que distinguen 2 modalidades de dolor: 1) dolor interoceptivo (de origen endógeno o visceral, donde predomina el componente afectivo y la participación emocional) y 2) dolor exteroceptivo en el que el factor predominante es sensitivo y donde el componente emocional no es tan notorio. La experiencia de dolor se ha dividido en dos componentes; 1) el componente localizante y discriminativo, que informa al paciente sobre la naturaleza, intensidad, duración y localización del dolor, que proporciona claves para el diagnóstico del estado patológico que lo causa y 2) el

componente afectivo y de alerta, que demanda la atención del individuo provocando una sensación desagradable que motiva al aprendizaje de la percepción dolorosa y está asociado con los reflejos motores de evitación (7).

1.1.2 NEUROANATOMÍA FUNCIONAL DEL SISTEMA DEL DOLOR

1.1.2.1 NEURONA AFERENTE PRIMARIA (NOCICEPTOR)

Es la primera neurona que recoge el estímulo doloroso. Está situada en los ganglios espinales de la médula y en los ganglios sensitivos de los nervios craneales 5º, 7º, 9º y 10º. Del cuerpo celular sale un axón que se bifurca en uno periférico y otro central. El axón periférico viaja en el nervio periférico hacia la zona de inervación sensorial, dando lugar a las terminaciones nerviosas especializadas, los llamados nociceptores. Éstos son despolarizados por estímulos productores de lesión o amenaza de lesión. Los nociceptores son despolarizados (activados) por estímulos nocivos térmicos, mecánicos o químicos. Tienen campos receptores relativamente pequeños. Algunos son activados por sólo un tipo de estímulo (p. ej., los mecanorreceptores de umbral alto), mientras que otros responden a más de un tipo (nociceptores polimodales). Cuando los nociceptores son estimulados, se despolarizan en relación directa con la intensidad del estímulo y la frecuencia con la que se aplica. La despolarización se transmite pasivamente a lo largo de la membrana del receptor y cuando alcanza un umbral en la unión del receptor con el axón al que está conectado, éste genera una despolarización del tipo todo o nada (potencial de acción) que se propaga a lo largo de la membrana axónica. La sensación provocada por la estimulación adecuada de los nociceptores cutáneos es de dolor punzante, ardiente o sordo. Los nociceptores musculares provocan un dolor más inespecífico, al igual que los situados en otros tejidos profundos, como articulaciones, tendones o periostio. Los axones de los nervios periféricos se clasifican como fibras A, B y C. Las terminaciones distales de las fibras A y C son nociceptoras y por tanto transmiten estímulos dolorosos. Las fibras A son mielinizadas y se clasifican en cuatro subgrupos: alfa (α), beta (β), gamma (γ) y delta (δ). Las fibras C no tienen vaina de mielina. Cada tipo de fibra tiene características específicas (Figura 1). En la figura se observa que a mayor diámetro (como en las fibras A α y A β), la velocidad de conducción es mayor. Las fibras A δ presentan una velocidad media y las fibras C una conducción lenta, sin embargo estas últimas representan el 70% de los nervios periféricos. En la Tabla 1 se puede observar con más detalle la función de cada una de las fibras. La información nociceptiva recogida viaja hacia la médula espinal transmitida a lo largo de las fibras A δ y C a través de las raíces posteriores. Algunas fibras entran por las raíces anteriores de la médula espinal, lo que explica que las rizotomías de las raíces dorsales no proporcionen alivio completo del dolor crónico.

Tabla 1. Función de los nervios periféricos formados por fibras A, B y C.

TIPO DE FIBRA	FUNCIÓN
Fibras A α , A β , A γ y A δ	A α → Contracción músculo esquelético A β → Tacto y presión A γ → Transmisión a husos musculares A δ → Transmisión dolor agudo localizado, estímulos térmicos y parte del tacto
Fibras B	Estímulos neurovegetativos (Sistema Nervioso Autónomo)
Fibras C (polimodales)	Dolor profundo difuso, estímulos mecánicos, térmicos y químicos

Fuente: (8).

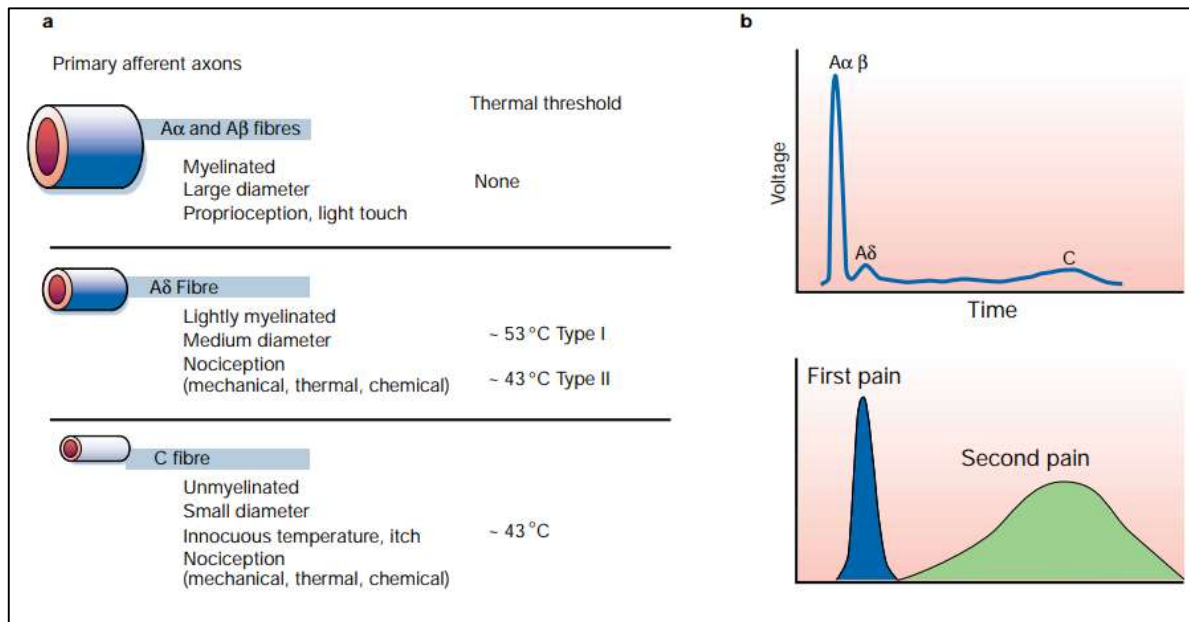


Figura 1. Características de las fibras nociceptoras. Fuente: Adaptado de (8) y (9).

1.1.2.2 NEURONAS DEL ASTA DORSAL DE LA MÉDULA ESPINAL Y TRACTOS ASCENDENTES

Láminas de Rexed. Los axones aferentes primarios forman sinapsis con neuronas (segunda neurona) de la sustancia gris de la médula espinal (o de los núcleos troncoencefálicos equivalentes en el caso de los nervios craneales). Las neuronas se distribuyen en diez capas o láminas denominadas láminas de Rexed (Figura 2), las láminas I a VI están en el asta posterior, las láminas VII a IX en la anterior y la X rodea al canal central. La información procedente de la piel termina de forma

preferente en las láminas I, II y V y la procedente de las vísceras, músculos y otros tejidos profundos tienden a evitar la lámina II y a terminar en las láminas I, V y X (10, 11). Las neuronas se clasifican como nociceptivas específicas si sólo responden a estímulos dolorosos, o de rango dinámico amplio si responden también a otros estímulos. Hay neuronas que reciben señales exclusivamente de la piel y el aparato locomotor, son las llamadas neuronas somáticas, mientras que otras reciben además señales procedentes de las vísceras, son las neuronas viscerosomáticas; no se ha demostrado la existencia de neuronas con aferencias exclusivamente viscerales (11). La existencia de neuronas viscerosomáticas provoca un fenómeno de convergencia de las señales procedentes de vísceras y aparato locomotor dando lugar al llamado dolor referido. El dolor de una víscera se refiere a una zona cutánea que recoge también su señal nociceptiva, a veces la zona cutánea y la víscera pueden estar alejadas (12). Muchas neuronas del asta dorsal tienen un papel modulador de la señal nociceptiva y se denominan interneuronas (13).

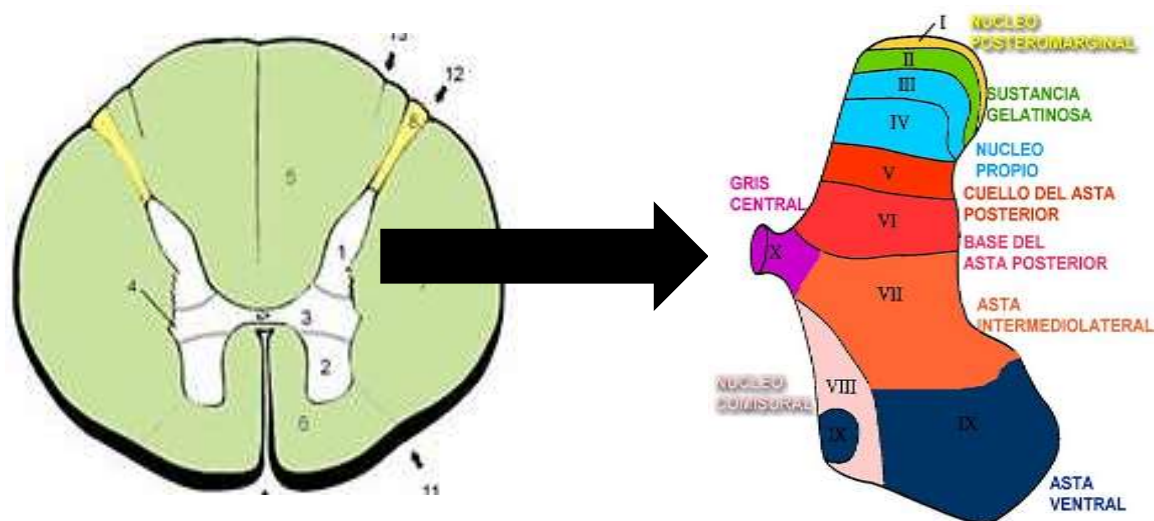


Figura 2. Láminas Redex en la médula espinal (corte transversal). Fuente: (14).

1.1.2.3 VÍAS NOCICEPTIVAS ASCENDENTES

Los axones de las neuronas medulares cruzan la línea media y ascienden por el cuadrante anterolateral de la médula formando las vías nociceptivas ascendentes; se han identificado cinco vías: el tracto espinotalámico (TET), el espinoreticular (TER), el espinomesencefálico (TEM), el cervicotalámico (TCT) y el de la columna dorsal postsináptico (TCDPS). No todas las fibras cruzan la línea media, un porcentaje asciende por el mismo lado de la médula lo que explica el fracaso de las cordotomías anterolaterales en el control del dolor. Los axones de las segundas neuronas se proyectan en múltiples estructuras del tronco encefálico, por lo que pueden

participar en varios componentes de la respuesta nociceptiva (sensorial, de alerta, autonómica, neuroendocrina y afectiva) (15, 16).

El TET representa la mayor vía nociceptiva, se encuentra anterolateralmente en la sustancia blanca de la médula espinal. Sus axones cruzan la línea media al lado contralateral de la médula espinal y ascienden hacia el tálamo, formación reticular, núcleo magno del rafe y sustancia gris periacueductal. Se divide en tracto anterior y medial. El haz lateral se proyectará hasta el núcleo ventrolateral del tálamo, vehiculizando aspectos discriminativos del dolor: localización, intensidad y duración. El haz medial va al tálamo medial y transmite percepciones autonómicas y sensaciones desagradables del dolor. Algunas fibras llegan también a la sustancia gris periacueductal (vínculo importante en vías ascendentes y descendentes). Fibras colaterales también llegan a la formación reticular y son responsables de la situación de alerta frente al dolor (15).

Terceras neuronas. Se han identificado numerosas estructuras subcorticales que intervienen en el procesamiento del dolor, la más importante es el tálamo. Las neuronas de estas estructuras forman sinapsis con las vías nociceptivas ascendentes y constituyen la tercera neurona cuyas proyecciones axónicas hacen sinapsis con estructuras corticales.

Áreas corticales nociceptivas. Se ha demostrado intervención en el procesamiento del dolor en las siguientes áreas cerebrales: corteza somatosensorial, circunvolución cingulada anterior, ínsula, corteza prefrontal y parietal inferior, todas estas forman “la cuarta neurona” en el procesamiento del dolor. En las estructuras subcorticales y corticales del encéfalo se origina la percepción consciente del dolor, actividades subconscientes y respuestas neuromoduladoras efectoras (motoras), endocrinas y emocionales, iniciadas consciente o inconscientemente (16).

1.1.2.4 VÍAS NOCICEPTIVAS DESCENDENTES

Existen tres vías principales: 1) Neuronas de la sustancia gris periacueductal y periventricular que hacen conexiones excitatorias en la médula rostroventral. 2) Neuronas de la médula rostroventral que forman conexiones inhibitorias en las láminas II, III y V del asta dorsal. La estimulación de estas neuronas inhiben a las neuronas del asta dorsal, y 3) Circuitos locales en el asta dorsal median la modulación de las vías descendentes (Figura 3) (17).

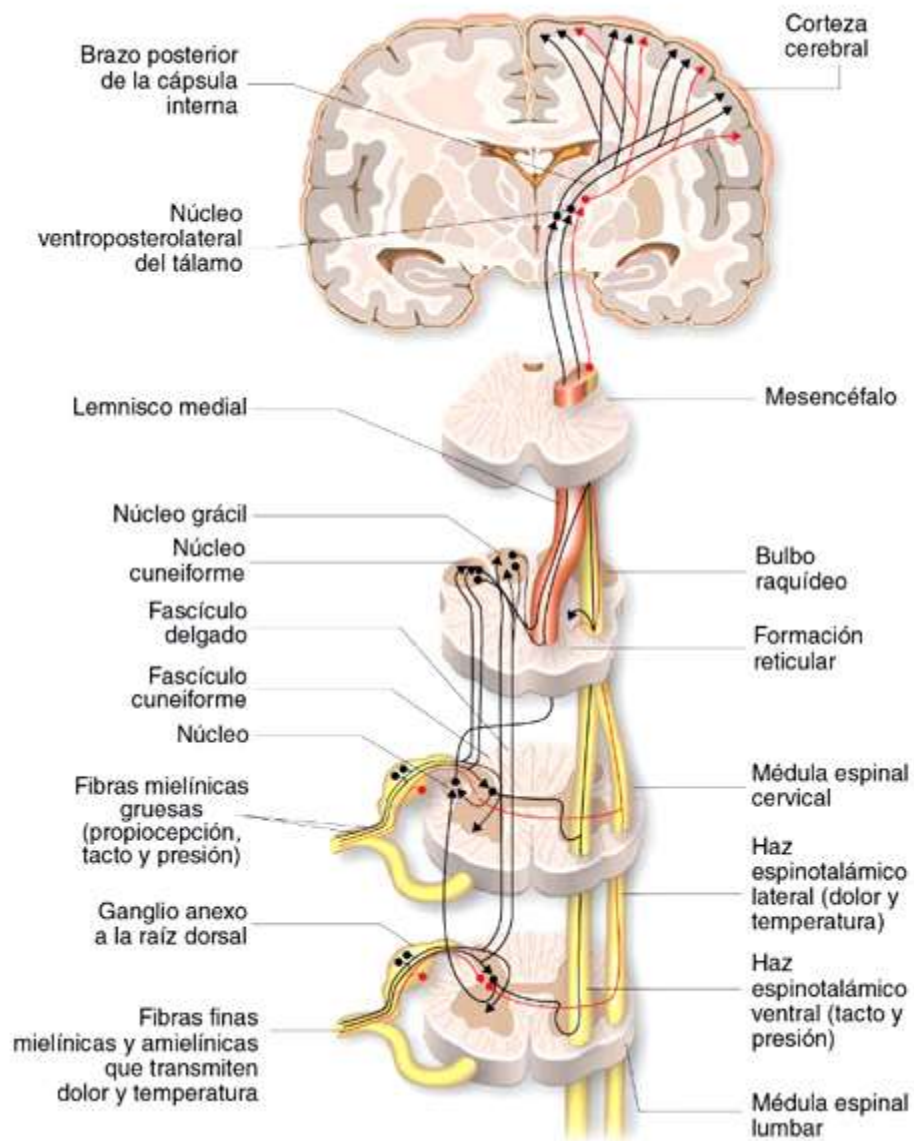


Figura 3. Vías ascendentes y descendentes del dolor. Fuente: Pedrajas- Navas y Molino- González, 2006 (6).

1.1.3 CLASIFICACIÓN DEL DOLOR

La clasificación más aceptada en la actualidad es la establecida por C. J. Woolf (18), debido a que en ella se engloban los tipos de dolor, resultando en cuatro tipos: por su origen somático y mecanismo fisiológico; nociceptivo, inflamatorio, neuropático y funcional (Figura 4). En la figura se aprecia que el dolor ocurre normalmente en respuesta a la activación de los nociceptores (nociceptivo), alertando la presencia de estímulos potencialmente dañinos lo que supone un rol protector, sin embargo, el dolor clínico puede surgir de estados crónicos inflamatorios (dolor inflamatorio), como secundario al daño del sistema nervioso (dolor neuropático), incluso cuando no existen signos de daño que pueda causarlo (dolor funcional).

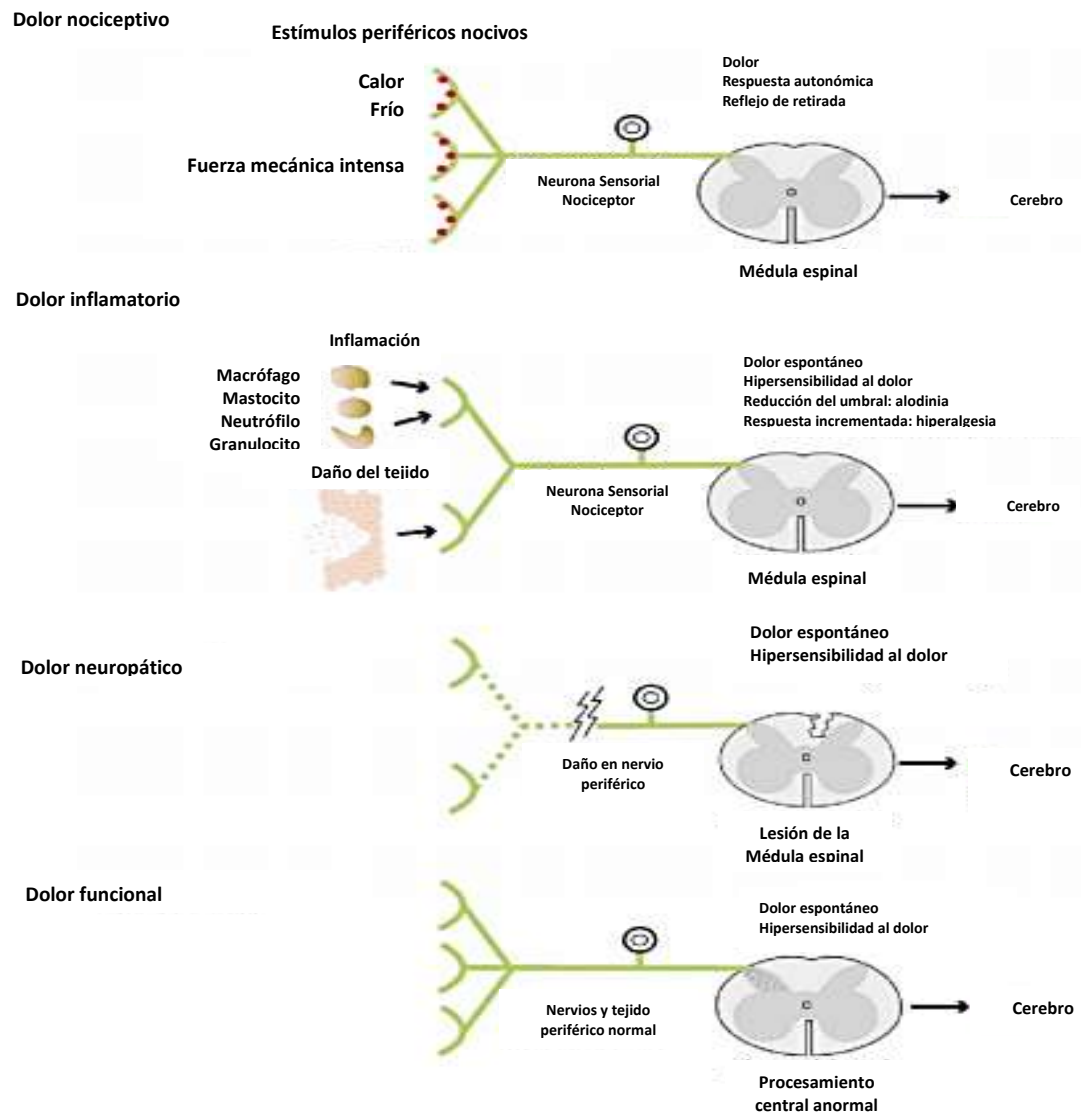


Figura 4. Clasificación del dolor de Woolf. Fuente: (18, 19).

1.1.4 DOLOR NOCICEPTIVO

1.1.4.1 FISIOPATOLOGÍA

El dolor que experimenta un individuo es el resultado de una interacción de múltiples variables biológicas, psicológicas, sociales y culturales. Melzack considera que la interacción de dichas variables determina un sistema funcional cerebral que ha denominado *neuromatriz*, que sería responsable de dar unas características personales a la percepción dolorosa (20). La mayoría de los nociceptores tiene la propiedad de aumentar su respuesta a la estimulación repetida. Este fenómeno se denomina *sensibilización periférica*, y puede ser de dos tipos: *autosensibilización*, cuando se debe a la acomodación de la membrana; o *heterosensibilización*, cuando se debe a la acción de sustancias químicas (serotonina, bradiquinina, histamina, prostaglandinas, leucotrienos y sustancia P) presentes en la zona de lesión. La hipersensibilidad al dolor después de una lesión se da debido a que la sensibilidad de los nociceptores de alto umbral cambia. Dicho mecanismo fue propuesto en los años 30's del siglo pasado por Thomas Lewis, sugiriendo además que el reflejo desde el axón era el responsable de ampliar la sensibilización desde la zona de daño tisular (*hiperalgesia primaria*) hacia regiones vecinas en las que la respuesta está aumentada y el tejido sin daño (*hiperalgesia secundaria*). La hiperalgesia primaria está mediada por mecanismos de inflamación periféricos y la secundaria por hiperactividad central (11, 21).

Las segundas neuronas pueden sufrir cambios en la expresión de genes y modificaciones funcionales duraderas por su estimulación repetida, lo que produce dolor con estímulos no dolorosos. Este fenómeno se conoce como *alodinia*. Las neuronas aumentan progresivamente su respuesta por la actividad de receptores de glutamato. Este tipo de sensibilización se denomina *sensibilización central* y puede provocar también *hiperalgesia secundaria*. El tálamo juega un papel fundamental en la percepción del dolor. Su lesión produce el llamado *síndrome talámico*, que se manifiesta por ataques de dolor espontáneo y de gran intensidad del hemicuerpo contralateral. Además, no sólo participa en el procesamiento sensorial del dolor sino también en la modulación afectiva del mismo (22, 23). En cuanto al cerebro, Melzack y Casey (24), propusieron tres dimensiones de la experiencia dolorosa:

- a) Dimensión sensitivo-discriminativa: reconoce las cualidades estrictamente sensoriales del dolor como localización, intensidad, cualidad, características espaciales y temporales.
- b) Dimensión cognitiva-evaluadora: aquella que valora no sólo la percepción tal y como se está sintiendo; sino también se considera el significado de lo que está ocurriendo y de lo que pueda ocurrir.
- c) Dimensión afectivo-emocional: la sensación dolorosa despierta un componente emocional en el que confluyen deseos, esperanzas, temores y angustia. Los procesos

neurofisiológicos que influyen en la elaboración y expresión de los componentes del dolor son:

1. La reacción de alerta y atención: el dolor produce una reacción de atención intensa y extensa, íntimamente relacionada con la activación de la formación reticular, lo que hace que la sensación dolorosa pueda ser elaborada, evaluada y contribuya a modular la reacción afectiva.

2. La actividad vegetativa y somatosensorial: consiste en la aparición de un conjunto de reacciones vegetativas y somáticas, provocadas de forma inmediata por la estimulación nociceptiva.

3. Reacción modulada: Activada por la propia aferencia nociceptiva a diversos niveles del neuroeje, controla la penetración de la conducción nociceptiva.

Las lesiones del lóbulo frontal y de la corteza singular ocasionan una disociación de los componentes afectivos, con una marcada disminución del sufrimiento por el dolor, pero no de la discriminación de éste. La corteza parietal somatosensorial está relacionada con el componente de discriminación sensorial del dolor y la corteza singular con el componente afectivo-emocional del mismo.

1.1.4.2 INTEGRACIÓN DEL SISTEMA ASCENDENTE Y DESCENDENTE EN EL PROCESO NOCICEPTIVO

Al producirse una estimulación dolorosa en la piel se generan impulsos nerviosos en las aferencias primarias. Concomitantemente, aumentan los niveles de varias sustancias (sustancia P, prostaglandinas, histamina, serotonina y bradiquinina entre otras) que median la reacción inflamatoria. El impulso nociceptivo es conducido a la médula espinal donde se ve afectado por factores locales y la modulación descendente. Los mediadores neuroquímicos de esta interacción en el asta dorsal son: serotonina, norepinefrina, GABA, encefalina, neurotensina, acetilcolina y dinorfina (25). La señal dolorosa viaja por la médula hasta hacer sinapsis con neuronas del tálamo y otras estructuras subcorticales. Durante el trayecto se forman proyecciones que activan el núcleo reticular gigantocelular. Las neuronas de este núcleo se proyectan al tálamo y también activan la sustancia gris periacueductal. Las neuronas encefalinérgicas desde la sustancia gris y noreinérgicas desde el núcleo reticular gigantocelular activan neuronas serotoninérgicas descendentes del núcleo del rafe, estas fibras junto con fibras noradrenérgicas van desde el locus caeruleus y el núcleo reticular lateral a proyecciones descendentes, modulando impulsos al asta dorsal vía cordón dorsolateral (17, 25).

1.1.4.3 MODULACIÓN DEL DOLOR

Melzack y Wall (26) postularon la teoría de compuerta de control del dolor que se basa en:

1. La transmisión del dolor en la médula espinal es modulada por un mecanismo de compuerta en las astas dorsales.
2. El mecanismo de control está influenciado por la actividad de las fibras aferentes. La actividad en las fibras A β tiende a inhibir la transmisión (cierran la compuerta), mientras que la actividad de las fibras nociceptivas A δ y C facilita la transmisión (abren la compuerta).
3. El mecanismo de compuerta espinal está influenciado por estímulos que descienden de niveles superiores del sistema nervioso central, entre los que se incluyen procesos de origen cognoscitivo.
4. Cuando la actividad de las neuronas de segundo orden sobrepasa un nivel crítico, se activa el sistema nociceptivo supraespinal.

Además del mecanismo espinal de modulación existe un completo sistema analgésico intrínseco y un sistema modulador supraespinal. En cuanto al sistema analgésico intrínseco, se ha demostrado la existencia de sustancias endógenas localizadas en el sistema nervioso y en otras áreas corporales que se unen a receptores afines a la morfina y derivados. Estas sustancias se denominan endorfinas u opioides endógenos. Se han identificado tres tipos de receptores de opioides: *mu*, *delta* y *kappa*. Los opioides endógenos que se unen a estos receptores son las encefalinas, la *beta*-endorfina y las dinorfinas. La estimulación eléctrica de la región anterior del hipotálamo y de varias zonas de la sustancia gris periacueductal produce analgesia mediada por endorfinas (*beta*-endorfina) (27). De la sustancia gris periacueductal descienden tres vías que juegan un papel central en la inhibición del dolor: 1) la que se dirige a la región rostromedial vecina, la núcleo *locus coeruleus*, 2) una proyección al núcleo paragigantocellularis y, 3) la más importante, la aferencia a los núcleos del rafe, sobre todo al núcleo magnus. La estimulación directa de este núcleo produce analgesia mediada por la acción de neuronas serotoninérgicas, cuyos axones descienden por la parte dorsal del cordón lateral hacia el asta dorsal de la médula espinal donde hacen sinapsis con interneuronas inhibitorias. Existe un sistema modulador cortical difuso: este sistema es inhibitorio y muy potente, implicando a diferentes zonas corticales, se activa de forma generalizada y es proporcional al factor desencadenante. Hay dos estímulos naturales que lanzan este sistema: a) aplicación de un estímulo doloroso aún más intenso en otro lugar del organismo. b) niveles elevados de estrés como estar en combate o en competición deportiva (28).

1.1.5 DOLOR INFLAMATORIO

Ante una agresión de cualquier etiología, se desencadena un proceso inflamatorio mediado por factores humorales y celulares, que intenta limitar y reparar la lesión producida; la inflamación localizada es una respuesta de protección estrechamente

controlada por el organismo en el lugar de la lesión. La pérdida de este control local o la aparición de una respuesta hiperactivada condicionan una respuesta sistémica que se conoce como síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS). Una vez iniciada la respuesta inflamatoria se ponen en marcha mecanismos compensadores concertados y la evolución (resolución, síndrome de disfunción multiórgánica o muerte) depende del balance entre el SIRS y estos mecanismos (29).

La defensa natural del organismo se basa en tres elementos: barrera externa, sistemas inespecíficos, y respuestas antígeno-específicas (29). La inflamación es la respuesta inicial e inespecífica del organismo ante estímulos mecánicos, químicos o microbianos (30). Es una respuesta rápida y ampliada, controlada humoral y celularmente (complemento, citocinas, coagulación y cascada fibrinolítica) y desencadenada por la activación conjunta de fagocitos y células endoteliales. Es una respuesta beneficiosa si el proceso inflamatorio mantiene un equilibrio entre células y mediadores; aparece vasodilatación, aumento de la permeabilidad vascular, activación / adhesión celular e hipercoagulabilidad. La vasodilatación y el incremento de la permeabilidad microvascular en el lugar de la inflamación aumentan la disponibilidad local de nutrientes y de oxígeno, produciendo calor, hinchazón y edema tisular. Los cambios hemodinámicos producen los cuatro síntomas clásicos asociados a la inflamación local: rubor (eritema), tumor (edema), calor y dolor. La respuesta a la agresión induce cambios cardiovasculares (aumento de la frecuencia cardíaca, de la contractilidad y del gasto cardíaco) y neuroendocrinos (liberación de catecolaminas, cortisol, hormona antidiurética, hormona de crecimiento, glucagón e insulina). Existe atrapamiento de líquidos debido al tercer espacio, e incremento del consumo de oxígeno. La diferencia en la concentración arteriovenosa de oxígeno se mantiene en rangos normales por la adaptación del aporte de oxígeno, pero, si aparece falta de éste, el organismo adopta rápidamente la vía anaerobia. Asociado al aumento en las necesidades metabólicas, se comprueba una caída en las resistencias vasculares sistémicas. Si no aparece una segunda agresión, estas alteraciones fisiológicas locales y sistémicas persisten de tres a cinco días y desaparecen en siete a diez días, con reducción clínica del tercer espacio, aumento de la diuresis y normalización del pulso y de la temperatura. En ocasiones, la intensidad o la repetición de la agresión provocan la pérdida del control local o la activación de unos mecanismos de respuesta que están habitualmente quiescentes y que sobrepasan los sistemas de control SIRS. La inflamación puede desencadenarse por una infección (virus, bacterias, protozoos y hongos) o por una causa no infecciosa (traumatismo, lesiones químicas, reacciones autoinmunes, cirrosis o pancreatitis). Existen tres fases en el desarrollo del SIRS. En la fase I, como respuesta a la agresión, se liberan localmente citocinas que inducen la respuesta inflamatoria, reparan los tejidos y reclutan células del sistema retículo endotelial. En

la fase II, se liberan pequeñas cantidades de citocinas a la circulación para aumentar la respuesta local. Se reclutan macrófagos y plaquetas y se generan factores de crecimiento. Se inicia una respuesta de fase aguda, con disminución de los mediadores proinflamatorios y liberación de los antagonistas endógenos. Estos mediadores modulan la respuesta inflamatoria inicial. Esta situación se mantiene hasta completar la cicatrización, resolver la infección y restablecer la homeostasis. Si la homeostasis no se restablece, aparece la fase III o reacción sistémica masiva. Las citocinas activan numerosas cascadas humorales de mediadores inflamatorios que perpetúan la activación del sistema retículo endotelial, con pérdida de la integridad microcirculatoria y lesión en órganos diversos y distantes (1, 19, 30, 31).

1.1.6 FISIOPATOLOGÍA DEL DOLOR INFLAMATORIO.

1.1.6.1 DISMINUCIÓN DE PH

La producción de protones aumenta la inflamación y se involucra en la hiperalgesia inflamatoria y en la hipoxia/anoxia causada por el ejercicio muscular; de hecho, el dolor producido por inyecciones intradérmicas de soluciones ácidas y la disminución de pH aumenta los efectos de otros mediadores inflamatorios. Las soluciones ácidas que son administradas de manera exógena dan como resultado un vertiginoso pero temporal aumento en la permeabilidad de cationes en las membranas, lo que incrementa la activación sostenida de los nervios y la mecano sensibilidad (32). El mecanismo por el que los protones inducen la activación de las neuronas sensoriales está mediado por los receptores *transient receptor potential cation channel subfamily V member 1* (TRPV1, por sus siglas en inglés). El receptor de capsaicina TRPV1 es un canal iónico que se encuentra específicamente en los nociceptores. Este receptor puede ser activado por la acidificación que causan los protones, la capsaicina y también por calor nocivo. Todos estos factores pueden causar dolor *in vivo*. Algunos estudios con ratones deficientes en receptores TRPV1 han demostrado que estos canales son esenciales para originar hiperalgesia térmica. Un mecanismo que caracteriza al dolor inflamatorio iniciado por el daño tisular es la sensibilización de los receptores TRPV1 (33, 34). Otros estudios indican que los receptores TRPV1 participan en la nocicepción solo cuando existen condiciones de acidez extrema y que los principales receptores a la disminución del pH en condiciones inflamatorias en los nociceptores humanos son los canales iónicos sensibles al ácido (ASICs) (35).

1.1.6.2 CININAS

Las cininas ejercen numerosos efectos proinflamatorios; como la liberación de prostanoïdes, citocinas y radicales libres desde varios tipos de células, estimulando las neuronas simpáticas post ganglionares que afectan el calibre de los vasos

sanguíneos (36). Las cininas degranulan los mastocitos para liberar histamina y otros mediadores de la inflamación, causando extravasación plasmática por la contracción de las células del endotelio vascular, además son sustancias algogénicas potentes e inducen dolor por la activación directa de los nociceptores, sensibilizándolos al calor y los estímulos mecánicos (36).

Existe sinergismo entre las acciones de bradicinina y otras sustancias algogénicas como las prostaglandinas y la serotonina. En la sangre la bradicinina se forma como parte de la cascada de la coagulación por el proceso enzimático de un precursor cininógeno de alto peso molecular. En otros tejidos la kalidina, de escaso peso molecular, también se convierte en bradicinina por acción enzimática (37).

El efecto de las cininas está mediado por dos receptores B_1 y B_2 . Los agonistas endógenos para el receptor B_2 son la bradicinina y la kalidina. Estudios con antagonistas selectivos de los receptores B_2 confirman que la bradicinina es un mediador importante del dolor y sus antagonistas atenúan el dolor y la hiperalgesia que se asocia a varias condiciones inflamatorias. Esos datos también indican que los antagonistas B_2 tienen un potencial analgésico como terapéutico (38).

Los receptores B_2 se expresan con los receptores TRPV1 en los nociceptores, así mismo, los receptores B_1 que se regulan a la alza en la inflamación también se colocan con estos receptores vainilloides en las neuronas sensoriales, por lo que se sugiere que los receptores B_1 podrían ser responsables de las conductas nociceptivas inducidas por la bradicinina (37, 38).

No existe evidencia de una activación directa de los nociceptores a través del receptor B_1 , al parecer la hiperalgesia mediada por estos receptores es por la liberación de otros mediadores como las prostaglandinas, macrófagos y leucocitos. Los receptores B_2 están presentes en los nociceptores y se acoplan a las proteínas G para inducir la activación de la fosfolipasa C y generar diacil glicerol (DAG), e inositol trifosfato (IP3) por el rompimiento de fosfolípidos de las membranas. El IP3 estimula la liberación de Ca^{+2} almacenado intracelularmente mientras que el DAG activa la proteína cinasa C (PKC) para fosforilar proteínas que incluyan receptores celulares y canales iónicos. La PKC tiene un papel clave en la excitación de las fibras aferentes ejercidas por la bradicinina que se asocia a un aumento en el paso de iones, principalmente de sodio (38, 39).

Las neuronas sensoriales tienen una alta concentración de cloruro (Cl^-) debido a la presencia del cotransportador de sodio, potasio y cloruro (NKCC1). Las corrientes entrantes de Cl^- aumentan la excitabilidad neuronal que se exagera aún más debido al aumento de la conductancia de Ca^{+2} activado por el cloruro en células neuronales, pero también en células no neuronales, lo que podría implicar una excitación indirecta de los nociceptores causada por la cascada de efectos que origina la bradicinina (40).

1.1.6.3 PROSTANOIDES

Los prostanoides (prostaglandinas, leucotrienos e hidroxiácidos) están entre los mediadores más importantes de la hiperalgesia inflamatoria, se generan a partir del ácido araquidónico por la actividad de las enzimas ciclooxigenasa y lipooxigenasa, y actúan mediante varios receptores acoplados con segundos mensajeros pero, los receptores EP para la prostaglandina E₂ (PGE₂) e IP para la prostaciclina son probablemente las más importantes por sus efectos en las neuronas sensoriales (41). Se ha reportado que la prostaglandina E₁ (PGE₁) y la prostaciclina incrementan de manera directa la actividad de los nociceptores y la PGE₂ estimula la liberación de sustancia P en cultivos de células neuronales. Estos efectos despolarizantes pueden deberse a un aumento de la conductancia de sodio en la membrana; de manera más usual, las prostaglandinas sensibilizan las neuronas sensoriales reduciendo su umbral de activación y exacerbando sus respuestas a otros estímulos (42, 43). En los mamíferos dos genes codifican diferentes ciclooxigenasas: la ciclooxigenasa 1 (COX-1) es prácticamente ubicua y se expresa de manera constitutiva en los tejidos para efectuar diversas funciones fisiológicas, mientras que la ciclooxigenasa 2 (COX-2) generalmente se presenta en bajos niveles pero es altamente inducible y se incrementa por muchos tipos de estímulos como la presencia de citocinas o factores de crecimiento, lo que ocurre en la inflamación (44).

1.1.6.4 ADENOCIN TRIFOSFATO (ATP)

La capacidad de ATP de producir dolor se conoce desde la década de los 60's del siglo pasado, sin embargo los receptores y los mecanismos a través de los que interviene en la señalización sensorial, apenas comienzan a discernirse (45). Los efectos fisiológicos y farmacológicos del ATP se producen mediante la actividad de los receptores P_{2X} y P_{2Y}; al respecto, existe un creciente interés desde los años 90's del siglo pasado, cuando se clonó el receptor P_{2X3} y se pudo saber que se expresaba en altas concentraciones selectivamente en las neuronas nociceptivas (46). Inicialmente, se propuso que el ATP liberado desde las células dañadas tendría un papel importante en el dolor nociceptivo, pero nuevos reportes del empleo de ratones *knock out* y antagonistas selectivos de los receptores P_{2X3}, indican que el ATP está más involucrado en condiciones crónicas, como el desarrollo del dolor inflamatorio y neuropático (47, 48), sugiriendo que el ATP liberado tónicamente de las neuronas dañadas o células vecinas promueven la activación sostenida de los receptores P_{2X3} en las neuronas sensoriales, provocando potenciales de acción intensos, que viajan hacia el sistema nervioso central, lo que se experimenta como dolor crónico.

Aunque la atención está dirigida principalmente hacia los receptores P_{2X3}, los receptores P_{2Y} también se expresan en las neuronas nociceptivas y se les atribuye un

rol más modesto en la nocicepción. Los receptores P_{2Y} están acoplados a proteínas G, lo que conduce a la conducción de fosfolipasa C, la liberación de calcio intracelular y la posterior activación de la PKC (49).

1.1.6.5 SEROTONINA

Está bien establecido que la serotonina se involucra en el procesamiento del dolor. La actividad serotoninérgica está mediada por al menos 12 tipos de receptores distintos, distribuidos de manera heterogénea, algunos con actividad pronociceptiva y otros con capacidad analgésica (50). La mayoría de estos receptores están metabotrópicamente ligados a proteínas G, por lo que activan cascadas de segundos mensajeros para modular la actividad neuronal. La excepción la constituyen los receptores 5-HT₃ que están asociados a un canal de sodio (Na⁺), lo que facilita la presencia de corrientes de Na⁺ resistentes a tetrodotoxina dependientes de voltaje que son específicas de las neuronas sensoriales de calibre pequeño, disminuyendo su umbral de activación y aumentando la magnitud de sus descargas (36).

En lo que se refiere a los receptores metabotrópicos de la serotonina, las alteraciones que son promovidas en la excitabilidad pueden estar mediadas por activación de la enzima adenilato ciclasa y la generación de adenosin monofosfato cíclico (AMPC) desencadena una serie de fosforilaciones mediadas por la proteína quinasa A (PKA), que al actuar sobre canales de potasio disminuyen su conductancia contribuyendo a la sensibilización de las aferentes primarias (51).

Los receptores 5-HT₂, 5-HT₄ y 5-HT₆ están acoplados a este sistema de transducción de señal, como factores pronociceptivos, a pesar de que no hay evidencias contundentes de la expresión del receptor 5-HT₆ en el ganglio de la raíz dorsal y de que algunos autores señalan que los antagonistas 5-HT₆ aumentan la concentración celular de glutamato y aspartato *in vivo* (51, 52). Finalmente, la concepción original de que los receptores 5-HT₁ promueven acciones pronociceptivas en las aferentes primarias, se ha vuelto endeble en función de que se ha descubierto que estos receptores se acoplan negativamente a la adenilato ciclasa (51, 53). Los receptores 5-HT_{1D}, pueden reducir la actividad nociceptiva, la vasodilatación y la extravasación plasmática que induce la liberación del neuropéptido; se ha observado que los receptores 5-HT₅ presentan similitud con los 5-HT_{1D}, pero con un perfil farmacológico distinto debido a que no inhiben a la adenilato ciclasa y su expresión mayoritaria es en sitios supraespinales (54). Algunos reportes describen la participación periférica y espinal de los receptores 5-HT₇, en la hiperalgesia inducida por la inflamación en el modelo de formalina (53).

1.1.6.6 HISTAMINA

La histamina se puede liberar por la degranulación de los mastocitos inducida por otros mediadores, como la sustancia P, su acción puede producir comezón en bajas concentraciones y dolor cuando las concentraciones son altas (55, 56). Estudios efectuados con ratones *knock out* empleando modelos de dolor (tail flick, hot plate y formalina), indican que la histamina exacerba la respuesta a los estímulos nociceptivos, debido a que en todos estos paradigmas los ratones *knock out* fueron menos sensibles que los de la cepa silvestre (57).

Las neuronas sensoriales liberan histamina y por acción de sus receptores H₁ se eleva la permeabilidad al calcio, lo que provoca liberación de prostaglandinas y otros péptidos conduciendo a la presencia de hiperalgesia y otros efectos inflamatorios. Así mismo, existen datos que muestran efectos sinérgicos de la morfina cuando se coadministra con bloqueadores de los receptores H₁ y H₂ (56, 57).

1.1.6.7 NEUROKININAS

Normalmente, algunos neuropéptidos (neurokininas CGRP) son liberados de las terminaciones nerviosas para ejercer efectos trópicos eferentes en su sitio blanco (18). Sin embargo, durante la inflamación las neurokininas, sustancia P y neurokinina A (NKA) contribuyen de manera directa o indirecta a la inflamación neurogénica, la presencia de hiperalgesia en la periferia y los cambios en la excitabilidad de la médula espinal en sus astas dorsales (18). Algunos estudios en los que se emplearon antagonistas indican que los efectos de las neurokininas son mediadores a través de la activación de receptores específicos (58).

Actualmente, los receptores NK₁ y NK₂ más que el NK₃ se involucran en los efectos preinflamatorios e hiperalgésicos de las neurokininas. Estudios indican que los receptores NK inducen la activación de la PKC ejerciendo un rol crítico en la modulación de la excitabilidad de las neuronas sensoriales (59). Estos compuestos pueden también despolarizar de manera directa las neuronas nociceptivas al reducir la permeabilidad al potasio por medio de los receptores NK₁ que están presentes en las terminales de las fibras aferentes primarias (60). El papel de las neurokininas en la hiperalgesia inflamatoria tiene el soporte experimental de que los antagonistas en los receptores NK₁ producen analgesia conductual, a pesar de ello, algunos estudios clínicos han fallado al tratar de demostrar eficacia en diferentes tipos de dolor (59, 60).

1.1.6.8 ÓXIDO NÍTRICO

Las especies reactivas de oxígeno han recibido poca atención con respecto a la activación de las fibras aferentes durante el daño tisular y la inflamación. Estas

incluyen al peróxido de hidrógeno, los iones superóxido e hidroxilo y el monóxido de nitrógeno o también llamado óxido nítrico (NO).

El NO es un gas simple formado por un átomo de hidrógeno y uno de oxígeno con funciones diversas en el organismo humano, como un vasodilatador derivado de L-Arginina y una molécula de oxígeno, las cuales se convierten en una molécula de NO y otra de L-citrulina mediante enzimas llamadas sintasas de óxido nítrico (NOS) (61). La NOS tipo macrófago se expresa a partir de un estímulo inmunológico/inflamatorio (presencia de lipopolisacáridos o citoquinas inflamatorias), una vez expresada es independiente de calcio y produce NO en cantidades mayores (en el orden nanomolar), por periodos prolongados. Una vez sintetizado el NO difunde fácilmente a los tejidos vecinos donde se une a la guanilato ciclasa para activarla y catalizar la transformación de guanosin trifosfato (GTP) en guanosin monofosfato cíclico (GMPc).

El NO también puede unirse a las proteínas de la cadena respiratoria mitocondrial ocasionando muerte celular por asfixia o por apoptosis, por lo que es importante insistir en que el NO tiene doble función en el dolor. El NO generado por las enzimas constitutivas es producido en muy pequeñas cantidades y por corto tiempo, en tanto que el NO producido por la enzima inducible en respuesta a estímulos inflamatorios e infecciosos se genera en cantidades mil veces mayores y por largo tiempo (62).

El NO induce un dolor quemante retardado bajo inyección intradérmica (63). En algunos trabajos pioneros se sugirió la participación de la vía L-arginina / NO en la fisiopatología del dolor (analgesia periférica y central). Establecieron que la acetilcolina (estimula la liberación de NO constitutivo), antagoniza la hiperalgesia inducida en ratas por PGE₂ y carragenina, así como las contorciones inducidas en ratones en la prueba de whirling (64, 65).

Posteriormente, se confirmó que el NO tiene un papel pronociceptivo en los estados de dolor inducidos por estímulos como carragenina, capsaicina, glutamato, formalina o estímulos mecánicos (66). La vía más importante de la oxidación del NO es la L-Arginina. Esto ocurre en varios tipos celulares, pero particularmente en las neuronas de tamaño pequeño y mediano.

Tras la activación de la NOS por Ca⁺² y otros cofactores, el NO altera procesos celulares, principalmente por la activación de la GMPc; en relación con esto, el aumento en la producción de la GMPc ocurre en células satélite en el ganglio de la raíz dorsal después de la administración de donadores de óxido nítrico (67).

Durante la inflamación, se presenta una forma inducible y dependiente de calcio de la NOS, lo que aumenta la síntesis de NO. La NOS parece ser importante en la regulación de la actividad de la COX₂ y la posterior producción de prostanoideos inflamatorios. Además, el NO puede alterar la respuesta de las neuronas sensoriales a otros mediadores inflamatorios como la bradicinina. Finalmente, se ha sugerido que la formación de NO contribuye a las descargas ectópicas inducidas por las

lesiones de los nervios periféricos y que el aumento de la excitabilidad en estas condiciones se podría reducir con el empleo de inhibidores selectivos de NOS (61, 67).

1.1.6.9 MEDIADORES INFLAMATORIOS DE LAS CÉLULAS DEL SISTEMA INMUNOLÓGICO

Varias citocinas, como las interleucinas (IL-1, IL-6 e IL-8) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α), se liberan desde varias células inmunológicas y pueden producir una profunda hiperalgesia (68, 69), la cual es medida por varios mecanismos indirectos, como la liberación de prostanoides y el aumento de la expresión de receptores de bradicinina (69, 70).

Por otro lado, las neurotropinas, en especial el factor de crecimiento neuronal (NGF) en condiciones inflamatorias, aumentan su producción debido a la presencia de otros mediadores inflamatorios como la IL-1 y TNF α . El NGF incrementa a su vez la síntesis del péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP) y la sustancia P, llegando a regular varias proteínas como el receptor de capsaicina, canales de sodio y ASICs. De esta manera, los anticuerpos anti NGF pueden reducir la hiperalgesia y los cambios neurogénicos inducidos por el NGF y la inflamación (71, 72).

1.1.6.10 MODIFICACIONES TRANSCRIPCIONALES

Aparte de los cambios en la traducción de la señal, la sopa inflamatoria puede inducir cambios en la transcripción de las fibras aferentes primarias. Las moléculas de señal son liberadas de las células inmunes, el prototipo es el NGF que está sustancialmente regulado al alta en la inflamación. Una vez liberado se une a su receptor TrkA, el complejo de unión se internaliza y transporta retrógradamente al cuerpo celular donde inicia ambos cambios en la transcripción de genes por activación de una cascada de cinasas (18). A la larga, estos cambios refuerzan el estado sensibilizado de la neurona y se regulan a la alta canales catiónicos (TRPV1, SNS y SNS-2), aumentando la capacidad de despolarización (18, 19).

La actividad eléctrica en los nociceptores, por sí sola es capaz de cambiar los niveles de transcripción de genes de las fibras aferentes primarias; ejemplo de ello es la estimulación directa del nervio ciático con un estimulador calibrado por 30 min, que induce el aumento de los niveles de ácido ribonucleico mensajero (ARNm) del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) en el ganglio de la raíz dorsal luego de 2 horas. El mismo protocolo aplicado a una fibra A β no aumenta la transcripción de BDNF (73).

Durante el curso de la inflamación, las fibras A del ganglio de la raíz dorsal comienzan a expresar neuropéptidos y neuromoduladores asociados a las fibras C (como sustancia P y BDNF), en términos de sus acciones centrales este cambio de

fenotipo hace que las fibras A β de bajo umbral y las A δ de alto umbral comiencen a comportarse como las fibras C (9).

Estos eventos pueden ser considerados como una respuesta fisiológica protectora, ya que el sistema nociceptivo retorna a la normalidad una vez que el daño tisular ha sido reparado; sin embargo, en condiciones crónicas puede producirse dolor espontáneo de carácter intermitente o persistente que también involucra complejos cambios en el procesamiento periférico y central de la señalización. En estas circunstancias, la relevancia fisiológica de la nocicepción es menos clara y se pierde la función protectora de la actividad de las fibras aferentes primarias (74).

Existe una gran complejidad en los procesos envueltos en la regulación del dolor, es un fenómeno complejo que envuelve la interacción de una gran variedad de mecanismos que dependen no sólo de una infinidad de estímulos, sino también de la intensidad de los mismos y de otras condiciones asociadas a la enfermedad de base que ocasiona el dolor (14). Durante la inflamación se liberan sustancias mediadoras como péptidos (bradicinina), lípidos (prostaglandinas), neurotransmisores (serotonina, 5-HT, ATP), neurofinas (NGF) y reducción de pH. Estos excitan o sensibilizan las terminales de los nociceptores al interactuar con sus receptores en esas neuronas (Figura 5). La activación del nociceptor transmite el estímulo hacia centros superiores iniciando la inflamación neurogénica en la que neurotransmisores como el CGRP y la sustancia P inducen vasodilatación y extravasación, así como la activación de células no neuronales como mastocitos y neutrófilos, los cuales adicionan sustancias a la sopa inflamatoria (Figura 5).

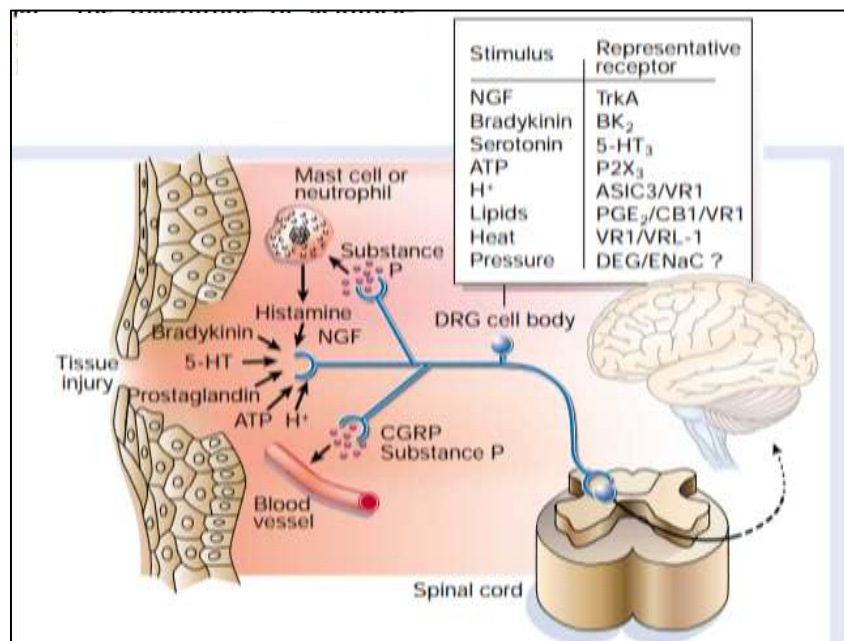


Figura 5. Mecanismos moleculares de la nocicepción. Fuente: (8).

1.1.7 DOLOR NEUROPÁTICO

1.1.7.1 FISIOPATOLOGÍA

El dolor neuropático es una condición crónica causada por lesión del sistema nervioso. A diferencia del dolor agudo, que es protector, el dolor neuropático persiste y no tiene un propósito útil, afectando severamente la calidad de vida del paciente (75).

Son múltiples las afecciones de dolor neuropático (Tabla 2), dentro de las cuales, las más importantes son la neuropatía diabética, la neuropatía no diabética dolorosa, la neuralgia posherpética, la neuralgia del trigémino, la radiculopatía y el síndrome de cirugía fallida de la espalda, dolor central posterior al accidente cerebrovascular, lesión de la médula espinal y esclerosis múltiple (2).

Tabla 2. Condiciones asociadas al dolor neuropático.

Condiciones asociadas al dolor neuropático
<i>Dolor neuropático periférico</i>
Neuropatía diabética dolorosa
Neuropatía asociada al virus de inmunodeficiencia humana
Neuropatía periférica inducida por quimioterapia
Neuralgia postherpética
Neuralgia trigeminal
Síndrome de dolor regional complejo
Mononeuropatías compresivas
Radiculopatías
Neuropatías inflamatorias
(polineuropatía desmielinizante inflamatoria aguda y crónica)
Neuropatía postraumática
Dolor del miembro fantasma
<i>Dolor neuropático central</i>
Lesión de la médula espinal
Dolor central posterior al accidente cerebrovascular
Mielopatía compresiva
Dolor relacionado con la esclerosis múltiple
Siringomielia

Fuente: (2).

El dolor neuropático se clasifica con frecuencia como central o periférico, según el sitio de la lesión que lo está causando. Sin embargo, el dolor neuropático puede considerarse como una manifestación de múltiples procesos del sistema nervioso periférico y central, que resultan en la sensibilización de los sistemas nervioso periférico y central. En la práctica, varios mecanismos diferentes pueden coexistir y

cambiar con el tiempo, y la respuesta de un individuo a un medicamento sigue siendo impredecible. En el sistema nervioso periférico, se disparará espontáneamente un nuevo crecimiento de un nervio lesionado (descargas ectópicas) y, con el tiempo, pueden desarrollarse conexiones entre estas nuevas áreas de crecimiento y las neuronas aferentes cercanas (12).

1.1.7.2 MECANISMOS DE DOLOR NEUROPÁTICO

De esta forma, los mecanismos de dolor neuropático propuestos son los siguientes:

Aumento de descargas aferentes: El dolor neuropático se mantiene debido a descargas anormales de alta intensidad de los potenciales de acción de los tejidos nerviosos. Estas promueven cambios plásticos en la médula espinal y centros superiores (síndrome de dolor regional complejo). El aumento de descargas aferentes desde focos ectópicos al sitio de lesión o al ganglio de la raíz dorsal correlaciona con la hipersensibilidad táctil y térmica en los modelos animales. Sin embargo, el aumento de la actividad disminuye rápido tras un periodo de 3 a 8 días, mientras que el neuropático permanece por meses tras la lesión, indicando que otros mecanismos contribuyen a su mantenimiento. El cambio de la excitabilidad podría deberse a incrementos importantes en la densidad de canales de Na⁺ resistentes a tetrodotoxina. La consecuencia de la lesión y el aumento de cargas es la sensibilización espinal, resultado de la liberación aumentada de aminoácidos excitatorios que activan a los receptores espinales de los mismos, aumentando la respuesta a los estímulos nociceptivos (2,12).

Facilitación descendente: El aumento anormal del dolor tras una lesión es mediado mediante la activación de procesos descendentes que surgen de la médula rostral ventromedial como resultado de cambios neuroplásticos tras la lesión. Las células de encendido de la médula responden a estímulos nocivos con el aumento de sus disparos, activando rutas de facilitación del dolor (para algunos autores, esto es un requisito para el mantenimiento de la sensibilización central). El aumento de los disparos en las células de encendido de la médula rostral ventromedial induce a su vez la elevación de concentraciones de aminoácidos excitatorios, que puede promover la apoptosis de interneuronas gabaérgicas exacerbando el dolor neuropático por pérdida de los mecanismos de inhibición central (14, 27).

Aumento de dinorfina espinal: Se ha demostrado una asociación entre la lesión de fibras periféricas y una regulación a la altura de dinorfina espinal. El aumento de las concentraciones de dinorfina espinal (hasta 7 veces lo habitual), se desarrollan lentamente alcanzando un nivel máximo a los 10 días, lo que indica un posible papel de esta en el mantenimiento neuroplástico más que en el inicio del dolor neuropático (45).

La dinorfina espinal facilita la liberación de sustancia P y el CGRP evocados por capsaicina mediante un mecanismo no opioide. Estos mediadores sensibilizan a los

receptores ácido N-metil-D-aspartico (NMDA) y aumentan la liberación de glutamato. La dinorfina también promueve un aumento de las concentraciones de Ca^{+2} que no es bloqueado por naloxona. Se sugiere que la dinorfina A puede contribuir al mantenimiento del dolor neuropático al unirse a receptores espinales de bradicinina, ya que el empleo de antagonistas B_1 y B_2 revierten la persistencia de los procesos alodínicos, siempre y cuando exista una elevación sostenida de dinorfina (75).

Ramificación colateral: Una hipótesis señala que las fibras $\text{A}\beta$, en respuesta al daño del nervio, forman ramificaciones colaterales que luego hacen sinapsis anormal en neuronas de segundo orden del tracto espinotalámico. Sin embargo, para otros autores, la ramificación de las fibras propuestas $\text{A}\beta$ no corresponde temporalmente con el desarrollo y mantenimiento del dolor neuropático tras la lesión al nervio. Se ha determinado que marcadores inmuno histológicos que se pensaba marcaba fibras $\text{A}\beta$ específicamente, también marcan fibras C, tras lesión, por lo que esta hipótesis puede resultar insatisfactoria (76).

Participación de factores neurotróficos: Las neurotrofinas ayudan a la supervivencia neuronal y el crecimiento durante el desarrollo del sistema nervioso, manteniendo la integridad estructural y funcional del sistema nervioso adulto y regulan la plasticidad del sistema nervioso, tras daño o enfermedad. Está reportado que, en tejidos dañados, el aumento del transporte retrógrado del NGF concurre dando como resultado un incremento en los niveles de sustancia P y el CGRP, indicando que el NGF periférico contribuye sustancialmente al desarrollo del dolor inflamatorio, y tal vez, al neuropático. Se ha postulado que el BDNF actúa como modulador del dolor central, ya que su liberación promueve la fosforilación y potenciación de los receptores NMDA en las neuronas espinales. Experimentos con anticuerpos anti BDNF, han mostrado la reducción de la hiperalgesia táctil y térmica, así como la alodinia mecánica. De esta forma anticuerpos monoclonales humanos, para estos factores neurotróficos pueden tener potencial terapéutico en el tratamiento del dolor neuropático (75,76).

1.1.8 TRATAMIENTO DEL DOLOR AGUDO

El dolor agudo es una respuesta fisiológica ante un estímulo adverso (mecánico, térmico o químico), asociada a cirugía, traumatismos o enfermedad aguda. Cesa cuando lo hace la causa que lo provocó, comportándose como un signo de alarma (77). El tratamiento del dolor agudo debe actuar sobre la causa y, además, en la mayoría de los casos serán necesarios fármacos para aliviar el dolor. Muñoz (78) propone los siguientes:

Analgésicos antiinflamatorios no esteroideos (AINEs)

- Con escasa o nula capacidad antiinflamatoria: paracetamol, metamizol
- Inhibidores no selectivos
- Ácido acetilsalicílico y derivados
- Antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) convencionales
- Inhibidores selectivos de la COX 2 (COXIB)

Opioides

- Menores: codeína, tramadol
- Mayores: morfina, fentanilo
- Coadyuvantes

1.1.8.1 AINEs

Los AINEs representan uno de los grupos farmacológicos más consumidos en el mundo, sin embargo, en muchas ocasiones son infrutilizados o se abusa de ellos; siendo a veces innecesaria su prescripción. Son un conjunto heterogéneo de compuestos químicos, generalmente no relacionados entre sí, que comparten acciones terapéuticas para el control en diverso grado del dolor, la inflamación y la fiebre. Esta diversidad química les confiere propiedades farmacocinéticas distintas. Asimismo, comparten un perfil de efectos secundarios relativamente frecuentes (79, 80).

Su eficacia clínica es equiparable entre ellos con pequeñas variaciones; representan los fármacos utilizados en el primer peldaño de la escalera analgésica de la OMS (81). Los AINEs tienen un efecto máximo, esto significa que llegado este, el aumento de las dosis no comporta una mejoría terapéutica y sí una mayor incidencia de efectos adversos medicamentosos, principalmente gastrointestinales, renales y cardiovasculares, por lo que se recomienda no incrementar las dosis máximas especificadas (82).

Todos actúan sobre el metabolismo del ácido araquidónico (AA), liberado a partir de la lesión tisular, bloqueando a la enzima COX e inhibiendo la síntesis de eicosanoides (prostaglandinas, tromboxanos y prostaciclina) (83). Esta acción es la clave tanto de sus efectos terapéuticos como de sus reacciones adversas. La mayoría de los AINEs inhiben tanto a la COX-1 (constitutiva), como a la COX-2 (proinflamatoria). Las prostaglandinas estimulan la vasodilatación local produciendo edema y sensibilizan a los nociceptores, pero además tienen varias funciones protectoras como el mantenimiento de la integridad de la mucosa gastrointestinal y el flujo sanguíneo renal (79). Los antiinflamatorios no esteroideos no desarrollan tolerancia y no producen dependencia física ni psíquica. Carecen de acción sobre los receptores opioides, actúan primariamente en la periferia, tienen muy poco efecto sobre el SNC; no provocan depresión respiratoria ni sedación, no tienen un efecto importante en el proceso ni en el curso natural de la enfermedad subyacente (84).

Ácido acetilsalicílico (ASA)

El ASA (comúnmente denominado aspirina, haciendo referencia al nombre comercial impuesto por su primer fabricante), es quizá el AINE más representativo que existe (Figura 6), siendo el medicamento analgésico y antipirético más utilizado en todo el mundo, ya que ha estado en uso clínico durante más de 100 años. El ASA se une y acetila los residuos de serina en las ciclooxigenasas, lo que resulta en una disminución de la síntesis de prostaglandina, agregación plaquetaria e inflamación. ASA solo se encuentra en personas que han consumido este medicamento, pertenece a la familia de los salicilatos y a menudo es utilizada como analgésico (contra dolores y dolores menores), antipirética (contra la fiebre) y antiinflamatoria. También tiene un efecto anticoagulante y se usa en dosis bajas a largo plazo para prevenir ataques cardíacos y cáncer (85).

Químicos alemanes lo aislaron de la reina de los prados (*Filipendula ulmaria*, anteriormente clasificada como *Spiraea ulmaria*) en 1839. Si bien su extracto fue algo efectivo, también causó problemas digestivos como irritación estomacal y diarrea, e incluso la muerte cuando se consumió en altas dosis. En 1853, un químico francés llamado Charles Frederic Gerhardt neutralizó el ácido salicílico al amortiguarlo con sodio (salicilato de sodio) y cloruro de acetilo, creando anhídrido acetosalicílico. El producto de Gerhardt funcionó, pero no deseaba comercializarlo y abandonó su descubrimiento (86).

En 1897, el investigador Arthur Eichengrun y Felix Hoffmann, asistente de investigación en Friedrich Bayer & Co. en Alemania, derivatizaron uno de los grupos funcionales hidroxilo en ácido salicílico con un grupo acetilo (formando el éster acetil), lo que redujo en gran medida los efectos adversos. Este fue el primer fármaco sintético (no una copia de algo que existía en la naturaleza, y el comienzo de la industria farmacéutica). El nombre 'aspirina' se compone de a- (del grupo acetil) -spir- (del género de plantas *Spiraea*) e -in (un término común para los fármacos en ese momento) (87-89).

El ASA se puede administrar vía oral, rectal e intravenosa. Se encuentra disponible en diferentes dosis (comprimidos: 325 mg, 500 mg; comprimido de liberación retardada: 81 mg, 325 mg, 500 mg, 650 mg; masticable: 81 mg; supositorio: 60 mg, 120 mg, 200 mg, 300 mg, 600 mg e intravenoso: 250 mg, 500 mg). La más baja es de 81 mg, también llamada "baby aspirin" (85).

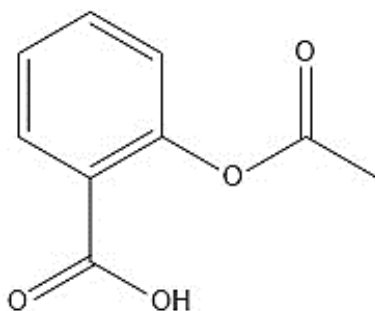


Figura 6. Estructura química del ácido acetilsalicílico.
Fuente: Elaboración propia.

Farmacocinética y farmacodinamia del ASA

Farmacocinética (90). La absorción de ASA del tracto gastrointestinal (GI) depende del estado de formulación. Cuando se consume como preparación líquida, se absorbe rápidamente a diferencia de las tabletas. Su hidrólisis produce ácido salicílico. El ácido salicílico tiene una ventana terapéutica estrecha. Si se mantiene dentro de ese rango estrecho, proporciona el efecto antiinflamatorio apropiado.

La absorción de ASA es sensible al pH a nivel del intestino delgado. La absorción es mayor en el intestino delgado que en el estómago para el mismo rango de pH. A pH 3.5 o 6.5, la absorción intestinal de la aspirina es mayor que la absorción gástrica del compuesto. El estómago no absorbe la aspirina a pH 6.5.

La eliminación de salicilatos ocurre por dos vías: a través de la creación de ácido salicílico y glucurónido salicílico. El ácido salicílico se aclara por vía renal, lo que puede incrementarse elevando el pH urinario. Los medicamentos como los antiácidos pueden aumentar el aclaramiento renal a medida que elevan el pH urinario. Puede atravesar la barrera hematoplacentaria. También se expresa en la leche materna.

Farmacodinamia (90). Casi el 90% de la inhibición de la COX se puede lograr con la administración de 160 a 325 mg de aspirina. Estos efectos duran aproximadamente de 7 a 10 días, lo que generalmente se corresponde con la vida útil de una plaqueta. La inhibición de la prostaciclina se puede lograr con el uso de dosis más altas, la cual ocurre en las células endoteliales de los vasos sanguíneos.

Efectos adversos y toxicidad de ASA

Efectos adversos. ASA ha tenido múltiples metaanálisis, lo que sugiere que reduce el riesgo de eventos cardiovasculares adversos importantes en pacientes que tienen

diabetes sin enfermedad cardiovascular, mientras que también causa una tendencia hacia tasas más altas de hemorragia y complicaciones gastrointestinales; el efecto secundario más común de ASA es el malestar gastrointestinal que va desde gastritis hasta hemorragia gastrointestinal (91).

La hipersensibilidad a los AINE es común entre la población general, la tasa es aproximadamente del 1% al 2% y los síntomas pueden ser tan leves como una simple erupción hasta un angioedema y anafilaxia. En pacientes con asma o rinosinusitis crónica, la prevalencia de estos síntomas alérgicos podría llegar al 26%. Si esto se acompaña de pólipos nasales e inflamación del tracto respiratorio con eosinófilos, se denomina tríada de aspirina (92).

Otro efecto adverso del ASA es el síndrome de Reye, que lleva el nombre del patólogo australiano Reye y se describió por primera vez en 1963. Es una afección rara, pero fatal con una tasa de mortalidad estimada entre el 30% y el 45%. Es una forma de encefalopatía secundaria a cambios grasos en un hígado por lo demás sano. La viñeta clínica del síndrome de Reye constituye una infección viral del tracto respiratorio superior en niños y la administración concomitante de aspirina para el tratamiento de la fiebre.

Se cree que la lesión mitocondrial secundaria a la enfermedad viral precedente es el primer golpe tanto en el hígado como en el cerebro. La aspirina o compuestos similares proporcionan el segundo golpe que completa el síndrome. La incidencia ha disminuido drásticamente debido a una mejor conciencia y al uso de acetaminofén para controlar la fiebre en los niños, en lugar de la aspirina. Aunque existe asociación entre aspirina y síndrome de Reye, algunos autores sostienen que en el momento del diagnóstico no se controlaban de forma rutinaria los niveles de salicilatos, no se obtuvieron biopsias y no se descartaron errores genéticos innatos del metabolismo (93).

Finalmente, otro efecto adverso es la hemorragia intracerebral, ya que la aspirina aumenta el riesgo de hemorragia intracraneal (RR = 1.65; IC del 95%, 1.06 a 5.99) contra el grupo placebo (94).

Toxicidad. La toxicidad oral del ASA ha sido estudiada en perros, gatos y ratas albinas; los perros y los gatos vomitaron cantidades variables de una dosis de 1 g/kg, y los estudios restantes de dosis retenidas se realizaron en ratas albinas, las cuales fisiológicamente no son capaces de vomitar. Se estimó que la dosis letal media oral en ratas albinas era 0.92 ± 0.45 g/kg masa corporal (95).

Los signos clínicos de intoxicación por dosis de este orden fueron inactividad, alteración de la respuesta al sonido y la vista, tensión catapléjica, anorexia, diarrea, hemorragia nasal, hiperreflexia y espasmos convulsivos.

Las muertes dentro de las primeras 24 horas se debieron a convulsiones tónico-clónicas e insuficiencia respiratoria, las muertes en el segundo y tercer día por shock

cardiovascular. En la autopsia se encontraron diversos grados de gastroenteritis, hepatitis, nefritis, edema pulmonar y cambios tóxicos menores en las glándulas salivales, ovarios, piel, glándulas suprarrenales, timo, mesenterio, bazo, músculo cardíaco y músculo esquelético.

La supervivencia estuvo acompañada de la desaparición de los signos clínicos de intoxicación en el segundo y tercer día, diuresis, regreso del peso corporal a la normalidad y regresión o desaparición de los cambios patológicos en la autopsia (95).

Por otro lado, en humanos, los pacientes que tienen toxicidad por aspirina pueden tener una gran variedad de síntomas. Los síntomas de toxicidad leve pueden ser, entre otros, *tinnitus*, mareos, letargo, náuseas y vómito (94). Para una toxicidad más grave, los signos y síntomas incluyen hipertermia, taquipnea que conduce a alcalosis respiratoria, acidosis metabólica con brecha aniónica alta, hipokalemia, hipoglucemia, convulsiones, coma y edema cerebral. La muerte suele ocurrir debido a un edema cardiopulmonar secundario a un edema simple pulmonar (96, 97). El tratamiento para la toxicidad por salicilatos se basa en la concentración de salicilatos, el estado ácido-base, el estado del volumen, los electrolitos, la descontaminación gastrointestinal, la protección de las vías respiratorias y el estado respiratorio, y una mejor eliminación (98).

1.1.9 INTERACCIONES FARMACOLÓGICAS PARA EL TRATAMIENTO DEL DOLOR

Las interacciones farmacológicas se definen como la aparición de un efecto farmacológico, terapéutico o tóxico, de intensidad mayor o menor a la prevista, que surge como consecuencia de la acción simultánea de dos o más fármacos, además de implicar modificaciones de los efectos de uno o ambos (99).

La importancia de analizar interacciones farmacológicas radica en: a) existe un gran número de procesos fisiológicos y patológicos mediados por interacciones entre distintos sustratos biológicos, b) las interacciones se utilizan en la clínica para mejorar efectos terapéuticos de fármacos administrados individualmente, c) la polifarmacia es una realidad debido a diversas patologías en un solo individuo y aunque estas combinaciones no pretenden que los fármacos “interaccionen” para obtener beneficios terapéuticos, estas pueden ocurrir, incrementándose de forma exponencial la interacción al aumentar el número de fármacos implicados, d) existen tóxicos ambientales que pueden interaccionar aumentando o disminuyendo la gravedad de una enfermedad (99).

Tipos de interacciones y mecanismos fundamentales (100, 101):

Interacciones farmacéuticas: Incompatibilidades de tipo fisicoquímico, que impiden combinar dos o más fármacos en una misma solución.

Interacciones farmacocinéticas: Se dan por modificaciones producidas por el fármaco desencadenante sobre los procesos de absorción, distribución y eliminación del otro fármaco, cuyo efecto es modificado. Los cambios en la absorción pueden ocurrir por modificaciones en el pH, cambios en la velocidad de vaciamiento gástrico o por formación de complejos que imposibiliten la absorción; como consecuencia se producen alteraciones en la velocidad de absorción y/o cambios en la cantidad total de fármaco absorbido.

Los cambios en la distribución se deben a que desviaciones (acidosis-alcalosis) en el pH fisiológico de la sangre modifican el grado de ionización de algunos fármacos y, por tanto, su distribución y la facilidad de su paso a través de las barreras orgánicas. También las modificaciones en la unión de los fármacos a las proteínas plasmáticas alteran la distribución.

Los cambios en el metabolismo se deben a que ciertas enzimas participan en el metabolismo de los fármacos y pueden ser inducidas o inhibidas por la acción de otros fármacos. Estos mecanismos enzimáticos en la mayoría de los casos se deben a un incremento en la expresión del citocromo p450 y de la NADPH - citocromo P450 reductasa. Las consecuencias clínicas de la inducción dependerán de si los metabolitos son activos o inactivos, produciendo un aumento o disminución del efecto del fármaco. Por otra parte, la inhibición del metabolismo de un fármaco incrementa su vida media y su nivel “estable” (equilibrio), aumentando la intensidad de su efecto y la probabilidad de que aparezcan efectos tóxicos.

Interacciones farmacodinámicas: Se deben a modificaciones en la respuesta del órgano efector y aunque en la mayoría se desconoce su mecanismo, se producen a distintos niveles como: a) unión a receptores a nivel celular y molecular en donde un fármaco puede favorecer o inhibir la unión de un segundo fármaco a lugares específicos de acción o receptores, b) transducción de señales en donde a nivel intracelular puede alterar los mecanismos de transducción de otro, c) sistemas efectores en donde se modifica la actividad del SNC y se pueden observar interacciones sinérgicas para los efectos depresores y con menor frecuencia para los estimulantes.

1.1.9.1 MÉTODOS DE EVALUACIÓN DE LAS INTERACCIONES FARMACOLÓGICAS

Aunque la presencia de interacciones farmacológicas se conoce desde inicios del siglo pasado, no existe al momento uniformidad en lo que respecta a la terminología utilizada para definir las, ni en el análisis preciso de las mismas (100). El concepto

más aceptado es que existe interacción cuando el efecto de la asociación es diferente del esperado; si el efecto es igual al esperado, es decir, un efecto sumativo, se denomina efecto aditivo, cuando el efecto es mayor al esperado, la interacción se denomina sinérgica (súper aditiva), y si el efecto es menor se denomina antagonista (sub aditivo). En consecuencia, lo que define el sinergismo o el antagonismo en una asociación farmacológica, es la desviación del efecto observado con respecto al efecto esperado.

1.1.9.2 ISOBOLOGRAMA

La base histórica para predecir el efecto de una combinación se basa en el concepto de equivalencia de dosis; es decir, una dosis igualmente efectiva: dosis equiefectivas (o isoeffectivas). Bliss en 1939 y luego Finney en 1942 abordaron sistemáticamente el problema para poder calcular la respuesta esperada de la combinación de dos fármacos. Una consideración importante es si los dos productos químicos actúan independientemente. Bliss se refirió a tres tipos de acción conjunta que denominó acción conjunta independiente, acción conjunta similar y acción sinérgica. Un concepto importante contenido en los dos primeros es la idea de acción independiente (cada medicamento produce efectos abiertamente similares, por ejemplo, cada uno baja la presión arterial), de modo que todo o parte de un componente puede ser sustituido por el otro en una proporción que se basa en las relaciones dosis-respuesta de los dos. Por ejemplo, un medicamento antihipertensivo que reduce la presión arterial al bloquear los receptores de angiotensina II y uno que ejerce su efecto antihipertensivo a través de la diuresis, se ajustaría a esta definición de acción conjunta independiente similar. Sus potencias individuales permiten un cálculo de cuánto de uno es equivalente al otro en la producción de este efecto. Por el contrario, dos fármacos antihipertensivos que tienen como efecto general el bloqueo del β adrenoceptor como componentes de su acción no encajarían en esta definición debido a la competencia de los dos por el receptor β común. En general, si dos fármacos abiertamente similares (ya sea dos antagonistas o dos agonistas) actúan sobre el mismo receptor celular, sus acciones no son independientes porque el efecto de su combinación depende de las concentraciones unidas de los dos (y sus actividades intrínsecas si son agonistas). Uno no podría sustituir una cantidad de uno por otro en una combinación basada únicamente en sus relaciones individuales de dosis-respuesta porque un cambio en la concentración de uno afecta las concentraciones unidas de ambos (102).

En cuanto a la aditividad, los medicamentos u otras sustancias químicas que producen efectos abiertamente similares generalmente lo harán con diferentes dosis.

La relación dosis-respuesta de cada agente proporciona esta información y permite enfocarse en una magnitud específica del efecto. Por ejemplo, dos medicamentos que son capaces de aumentar la frecuencia cardíaca pueden diferir en las dosis respectivas necesarias para aumentar la frecuencia. Para distinguir estos cuantitativamente, se puede elegir un nivel de efecto, por ejemplo, un aumento de la frecuencia de 10 latidos por minuto. El primer medicamento puede lograr esto con una dosis de 100 mg, mientras que el segundo requiere solo 25 mg. Estos son indicadores de potencia de fármacos. Se dice que el medicamento que requiere la dosis más baja tiene una mayor potencia que el otro. La relación de dosis, en este caso, $100/25 = 4$, llamada potencia relativa, es un indicador conveniente de este atributo cuantitativo del par de fármacos.

Esta misma potencia relativa puede o no aplicarse a todos los niveles de efecto de estos dos medicamentos; se asume una potencia relativa constante, es decir, un medicamento es cuatro veces más potente que el otro en todos los niveles de efecto logrados por cada fármaco. Para el fármaco A, el fármaco de menor potencia, su dosis cuando actúa solo se denota con el símbolo en cursiva, A ; para el medicamento B, la cantidad correspondiente se denota como B . La potencia relativa R es entonces A/B , un valor mayor que uno.

Ahora, se considera la situación en la que ambos fármacos están presentes juntos, en la que se usan símbolos en minúscula, es decir, se denota mediante a y b las dosis de los componentes respectivos cuando se administran como una combinación. Debido a que se supone que estos medicamentos tienen una potencia relativa constante (R), la combinación (a, b) se puede expresar como una cantidad equivalente de cualquier medicamento. Si el fármaco A es el fármaco de referencia, la dosis combinada satisface la relación

$$a + Rb = A \quad (1.1)$$

En palabras, la ecuación 1.1 significa que uno puede usar cantidades respectivas de a y b calculado a partir de lo anterior para lograr el efecto de la dosis A del fármaco A actuando solo. En la Ecuación 1.1 está implícito el concepto de acción conjunta independiente, es decir, la presencia de B es como la adición de una forma más concentrada de A. La misma combinación (a, b) también se puede expresar en términos de un equivalente del fármaco B y viene dada por la ecuación:

$$a / R + b = B \quad (1.2)$$

Aquí el fármaco menos potente (A) actúa como una versión diluida de la otra y se agrega a B. Las relaciones expresadas por las ecuaciones 1.1 y 1.2 significan que las dosis en la combinación contribuyen al efecto de acuerdo con las potencias de fármacos individuales, una situación denominada aditividad.

La reorganización de estos da una forma más sencilla:

$$a / A + b / B = 1 \quad (1.3)$$

En cada una de las ecuaciones anteriores, las dosis A y B son dosis eficaces de los agentes individuales cuando cada uno está presente solo, R es la relación A / B , y las cantidades a y b son las dosis respectivas en la combinación que dan el efecto nivel alcanzado por la dosis A sola o la dosis B sola.

Cuando la potencia relativa R es la misma en todos los niveles de efecto, las dos primeras formas son convenientes; sin embargo, cuando R varía con el nivel del efecto, la relación más explícita de la ecuación 1.3 es conveniente porque usa los valores de A y B que se aplican a ese efecto. Los pares de dosis equivalentes se denominan isobolas, por ejemplo los pares $(A, 0)$, $(0, B)$ y (a, b) dados por las relaciones anteriores. La desviación de la aditividad significa que se produce algún tipo de interacción cuando ambas sustancias están presentes juntas. Por lo tanto, calcular cantidades que son aditivas es la base para determinar estas desviaciones cuando se estudian pares reales. Los pares no aditivos pueden ser un primer paso útil (102-104).

Dicho lo anterior, la ecuación 1.3 proporciona un gráfico simple de pares de dosis eficaces (a, b) . Si se sabe que A y B son las dosis respectivas que dan un efecto específico, por ejemplo, 50% del efecto máximo, cuando cada agente actúa solo, estas son constantes que se utilizan para identificar las dosis a y b en una combinación que produce este mismo efecto. Estas dosis combinadas deben satisfacer la Ecuación 1.3. Por ejemplo, si $A = 500$ mg y $B = 100$ mg, entonces la ecuación, $a / 500 + b / 100 = 1$, proporciona combinaciones de dosis aditivas como $(100, 80)$, $(250, 50)$, etc. La totalidad de pares (a, b) como la línea recta que se muestra en la Figura 7 (102, 103, 105).

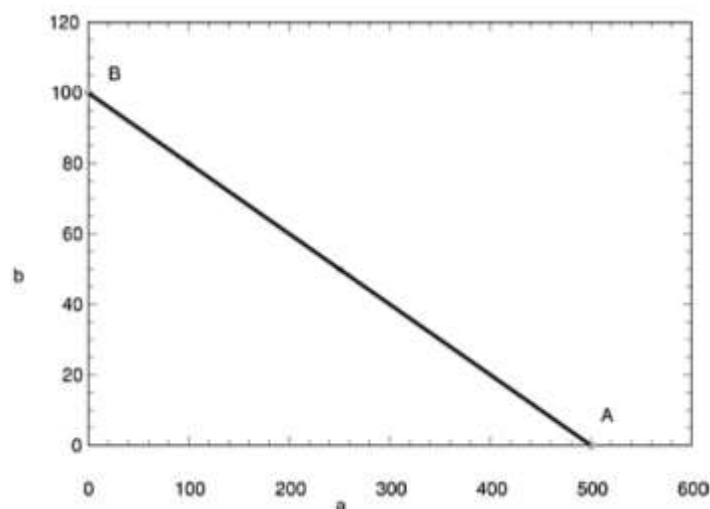


Figura 7. Línea de aditividad del isoblograma. Fuente: (102, 105).

Esta línea de aditividad tiene coordenadas cartesianas que representan todas las combinaciones posibles que son equivalentes en la producción del efecto de 500 mg de fármaco A o 100 mg de fármaco B. Un gráfico de este tipo (Figura 7) es útil para mostrar los resultados de las pruebas reales con combinaciones, las cuales pueden revelar desviaciones de la aditividad. Suponer, por ejemplo, que la combinación $a = 100$ mg, $b = 50$ mg produce el nivel de efecto especificado. Este punto (100, 50) se encuentra debajo de la línea de aditividad como punto P (Figura 8), lo que significa que se necesitan cantidades menores de medicamentos A y B en la combinación. Se ha producido alguna interacción, ya sea entre los fármacos o los sistemas en los que actúan conjuntamente, y por lo tanto, se necesitan cantidades inferiores a las predichas por la aditividad. Esto se llama una combinación súper aditiva o sinérgica.

Por el contrario, algunas combinaciones pueden requerir dosis que son mayores que las cantidades aditivas de la Ecuación 1.3, en cuyo caso el punto que representa la combinación estará por encima de la línea de aditividad como punto Q (Figura 8). Este fenómeno significa sub aditividad, es decir, los componentes son algo antagónicos por alguna razón. Este gráfico, que consiste en la línea aditiva y los pares de dosis reales necesarios para alcanzar el nivel de efecto específico, se denomina isoblograma. Fue introducido por Loewe, quien realizó varios estudios de combinaciones que utilizaron este tipo de gráfico (106). Estos casos no aditivos se expresan como relaciones de desigualdad que contrastan con la Ecuación 1.3, de acuerdo con las relaciones mostradas en las ecuaciones 1.4 y 1.5.

$$a/A + b/B < 1 \tag{1.4}$$

$$a/A + b/B > 1 \quad (1.5)$$

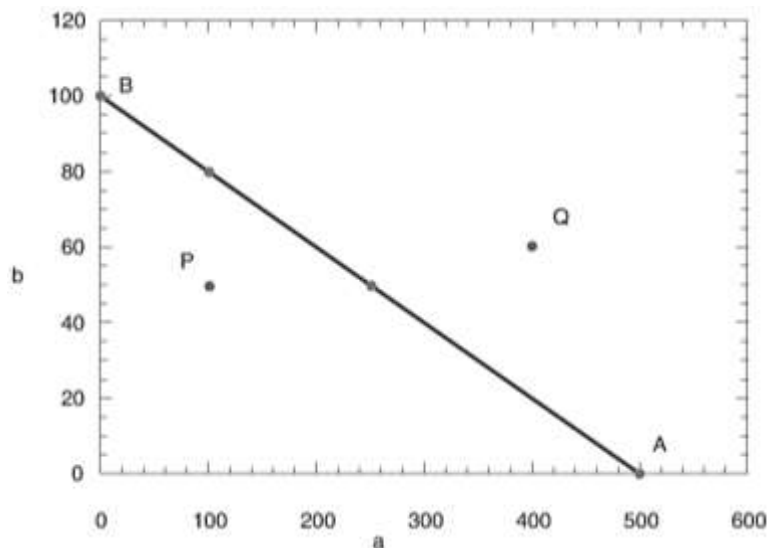


Figura 8. Representación de un isoblograma que muestra la línea de aditividad y la combinación de dosis P (sinérgica) y Q (sub aditiva). Fuente: (102).

La relación 1.4 indica sinergismo o súper aditividad, mientras que la relación 1.5 significa sub aditividad. Probar dos medicamentos juntos puede revelar muchas combinaciones sinérgicas y, por lo tanto, su representación gráfica sugiere una curva suave que es cóncava hacia arriba (Figura 9, curva I) o una curva que es cóncava hacia abajo, indicativa de combinaciones sub aditivas (Figura 9, curva II).

Las curvas, o conjuntos de puntos discretos (dosis) que dan el mismo efecto, se denominan isobolas, que son de efecto constante y tienen terminales (puntos axiales) que indican las dosis individuales, A del fármaco A y B del fármaco B, cuando cada una está presente sola.

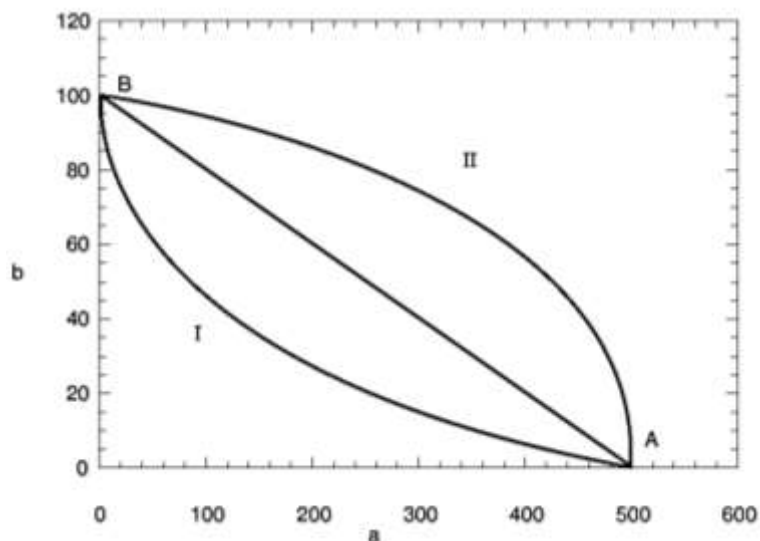


Figura 9. Isoblograma que muestra la línea de aditividad y curvas para combinaciones que son sinérgicas (curva I) y subaditivas (curva II). Fuente: (107).

Aunque las curvas suaves indican sinergia o sub aditividad sobre todas las combinaciones de dosis, no hay razón por la cual tales patrones deben ocurrir cuando se prueban combinaciones reales de productos químicos. En otras palabras, algunos pares de dosis pueden ser sinérgicos, mientras que otros son aditivos, o incluso sub aditivos. En consecuencia, las isobolas (Figura 9) deben considerarse solo como modelos que podrían describir la acción combinada de dos fármacos activos. Un caso interesante es aquel en el que uno de los medicamentos (medicamento A) está inactivo cuando se administra solo. Aquí la isobola de la aditividad es una línea horizontal (Figura 10) de modo que la sinergia y la sub aditividad se indican mediante pares de dosis que dan los puntos P y Q debajo y por encima de esta línea, respectivamente (104, 107-109).

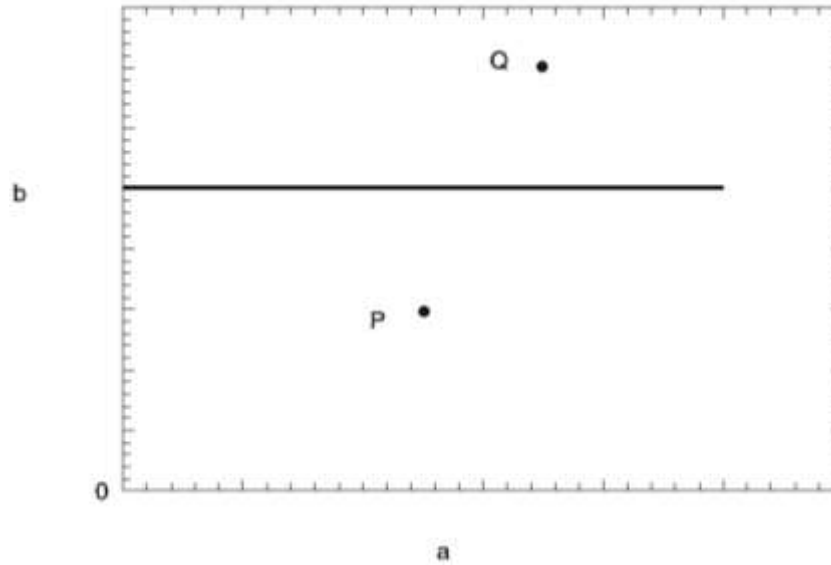


Figura 10. Isoblograma cuando un medicamento (A) está inactivo. El fármaco activo (B) produce el efecto deseado con la dosis b y este efecto es independiente de la dosis de A en una combinación teóricamente aditiva. Si las combinaciones de dosis reales, indicadas por los puntos P y Q, producen el efecto especificado, estas son sinérgicas y subaditivas, respectivamente. Fuente: (107).

La distinción entre acciones aditivas y no aditivas utiliza valores de dosis que producen un nivel específico de efecto. Hasta ahora se han tratado estas dosis como cantidades exactas. Estos se muestran como puntos en el isoblograma, y la base de esta gráfica es la ecuación de aditividad (Ecuación 1.3) y las desigualdades dadas en las expresiones 1.4 y 1.5. Pero en cada una de estas expresiones, las cantidades, a , b , A y B que denotan dosis, representan valores que se conocen solo en sentido probabilístico. En otras palabras, los valores para estas cantidades son solo estimaciones hechas a partir de datos de dosis-efecto. Esto es así debido a la variabilidad inherente de los datos de dosis-efecto, de modo que las cantidades son valores de dosis (o concentración) que se derivan del modelado de estos datos.

En la práctica, los datos de dosis-efecto se muestran como puntos en un gráfico. Para cualquier fármaco o químico dado, la administración de una dosis precisa conduce a diferentes medidas del efecto, ya sea en el mismo animal (o sistema) o en diferentes animales tratados de manera idéntica (104, 107). Estos resultados diferentes pueden deberse en parte a problemas en la métrica utilizada para definir el efecto, pero, incluso en ausencia de problemas métricos, existe una variabilidad biológica inherente.

¿Cómo, entonces, se obtienen las dosis a , b , etc.? Muy a menudo, estos provienen de los modelos matemáticos que se utilizan para describir la relación subyacente entre la dosis y el efecto. Por lo tanto, una dosis controlada con precisión conduce a una respuesta variable, y se utiliza algún método (como "mínimos cuadrados") para

obtener el efecto medio. Comúnmente, los métodos de regresión se utilizan para estimar el efecto medio.

Las técnicas de análisis de regresión (lineal y no lineal) requieren que la dosis (variable independiente) esté libre de errores y que los valores del efecto obedezcan alguna distribución estadística. En términos prácticos, hay un error en la variable dependiente (el efecto); se deduce, por lo tanto, que el uso de modelos conlleva cierta incertidumbre.

Dado que el verdadero efecto de una dosis es desconocido y simplemente se estima a partir de la curva de dosis-respuesta, la asignación de un valor, por ejemplo, el 50% de los animales probados, significa que la dosis también es una estimación de la ecuación modelo. Se utiliza un nivel de efecto teórico en la ecuación del modelo derivado, y la dosis se calcula a partir de esta ecuación.

En resumen, estas dosis calculadas también tienen errores, aunque se presume que las dosis reales utilizadas como datos en el modelo están libres de errores. Por lo tanto, cada dosis efectiva 50 (DE_{50}) o dosis letal 50 (DL_{50}) es una estimación, un número con límites de confianza.

Cuando estos valores se usan para los fármacos individuales como números de intercepción que definen la línea de aditividad en un isoblograma, queda claro que la ubicación precisa de esta línea es desconocida, es decir, los valores de A y B utilizados para anclar la línea son variables aleatorias que a menudo tienen amplios límites de confianza.

Esto también es cierto para las dosis combinadas (a, b), de modo que todos los componentes del isoblograma tienen errores. Si el modelado se realiza en los puntos isobolares (a, b), existe el problema teórico adicional de tratar con la incertidumbre en ambas variables. Por ejemplo, el procedimiento de regresión lineal común, no se aplicaría a esta situación de doble incertidumbre.

El isoblograma es, por lo tanto, una pantalla visual que tiene alguna utilidad en el análisis aproximado, pero no es muy útil como único dispositivo para sacar conclusiones precisas sobre la naturaleza de la interacción, es decir, distinguir entre la acción conjunta aditiva y no aditiva. Se necesita precaución especial en situaciones en las que los puntos aparecen cerca de la "línea" de aditividad (103, 108, 109).

La metodología cuantitativa para estudiar combinaciones químicas biológicamente activas comenzó con aplicaciones a los venenos. El método de las isobolas tuvo su primera aplicación en estudios de datos de pruebas de toxicidad para el ensayo de insecticidas y fungicidas, y esa aplicación, a su vez, condujo a usos farmacológicos más amplios y nuevos desarrollos estadísticos.

Sin embargo, los métodos cuantitativos para estudiar combinaciones de agonistas no se han destacado en los principales libros de texto de farmacología. No obstante, en los últimos años, la importancia de este tema ha sido apreciada por más y más farmacólogos, especialmente aquellos que estudian medicamentos que afectan el

sistema nervioso para alterar la percepción del dolor, el comportamiento, la locomoción y el estado de ánimo.

De hecho, estas son también las clases de drogas que tienden a ser abusadas, y este reconocimiento probablemente explica el uso creciente de métodos isobolográficos y métodos cuantitativos relacionados por parte de los investigadores en el campo del abuso de fármacos. Es bien sabido que los toxicómanos raramente abusan de una droga; la mayoría de las veces, el uso de polidrogas es la norma.

Las drogas usadas adecuadamente también interactúan, mejorando así los efectos deseables e indeseables. Además de la importancia clínica obvia, existe un reconocimiento creciente de que el estudio cuantitativo de las combinaciones de medicamentos, especialmente la detección de sinergismo farmacológico verdadero, puede ser un primer paso útil para iluminar el mecanismo. Muchos estudios recientes de combinación de medicamentos, especialmente aquellos que tratan con opioides y otros analgésicos, tienen este como su objetivo principal. Esta aplicación ampliada, a su vez, ha generado nuevos desarrollos estadísticos para ayudar en este esfuerzo (102, 110).

1.2 GRANADA

1.2.1 CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA, DENOMINACIÓN Y ORIGEN

La granada (*Punica granatum* L.) pertenece al orden *Myrtales*, familia *Punicaceae*, la que está representada por un solo género (*Punica*) y por dos especies, *P. granatum* y *P. protunica*. En la Tabla 4 se muestra la clasificación taxonómica (111). Botánicamente, *Punica granatum* L., se encuentra en la subclase Rosidae, orden Myrtales, que alberga algunas otras frutas como la guayaba (*Psidium* sp.) y la feijoa (*Feijoa* sp.). Sin embargo, la granada es inusual en ser una de las dos únicas especies en su género *Punica*, que es el único género en la familia *Punicaceae* (112).

Es importante mencionar que *Punica granatum* L., es de las dos especies, la única comestible (113). Estudios moleculares sugieren que una reconsideración taxonómica podría colocar a *Punica* dentro de las *Lythraceae* (114). La segunda especie en *Punica*, *P. protopunica*, se encuentra solo en el archipiélago de Socotra (Yemen), aislada, en la Península Arábiga, y se considera una especie ancestral con un camino evolutivo independiente, de la que se sabe muy poco (115-117).

Tabla 4. Clasificación taxonómica de *Punica granatum* de acuerdo con *Integrated Taxonomic Information System* (ITIS).

Clasificación	Denominación	Observaciones
Reino	Plantae	Plantas, vegetales
Sub reino	Viridiplantae	Plantas verdes
Infrareino	Streptophyta	Plantas terrestres
Superdivisión	Embryophyta	-
División	Tracheophyta	Plantas vasculares, traqueófitos
Subdivisión	Spermatophytina	Espermatófito, planta con semillas, fanerógamas
Clase	Magnoliopsida	-
Superorden	Rosanae	-
Orden	Myrtales	-
Familia	Lythraceae	Lisimaquia
Subfamilia	Punicoideae	-
Género	<i>Punica</i>	Granada
Especie	<i>Punica granatum</i> L.	Granada

Fuente: *Integrated Taxonomic Information System* (ITIS) (112)

El nombre *Punica granatum* L. deriva del latín “*pōmum*” y “*grānum*”, cuyo significado es manzana con granos (111, 118). Su nombre en inglés “*pomegranate*” proviene de la misma raíz “*pōmum*” – manzana – y “*grānātum*” – con granos o semillas -. La granada se conocía en inglés temprano como “*Apple of Grenada*” ; esta es una etimología popular que confunde el latín “*grānātum*” con el nombre de la ciudad española de Granada, que deriva del árabe (119).

La granada se considera nativa en la región desde Irán hasta el norte de la India, con plantas aparentemente silvestres en muchos bosques de estas áreas (120). Otros sugieren que es nativa del área más pequeña de Irán y sus alrededores, y se extendió por el movimiento humano a un área mucho más amplia en la prehistoria (121).

La granada se ha cultivado en toda la región mediterránea, las granadas comestibles se cultivaron en Persia (Irán) en el año 3000 a. C. y también estuvieron presentes en Jericó, en el moderno Israel. Para el año 2000 a. C., los fenicios habían establecido colonias en el mar Mediterráneo en el norte de África, trayendo granadas a los modernos países de Túnez y Egipto. Casi al mismo tiempo, las granadas se naturalizan en el oeste de Turquía y Grecia.

La granada continuó dispersándose por todo el mundo, llegando a China por 100 d.C. En el año 800 d.C., la fruta se extendió por todo el Imperio Romano, incluida España. Al mismo tiempo, se sabía que se cultivaba ampliamente en el centro y sur de la India. A principios de la década de 1400, la granada había llegado a Indonesia. En los años 1500 y 1600, los españoles introdujeron estas especies a América Central, México y América del Sur.

La primera evidencia clara de que la granada era sembrada en Estados Unidos de Norteamérica fue a principios de 1700, cuando se introdujeron cultivos en Florida y

en Georgia. En 1770, la granada llegó a la costa oeste y estaba creciendo en California (120-123). En tiempos modernos, España, Marruecos, Egipto, Israel, Estados Unidos, Argentina y Chile, son los principales productores (111).

De acuerdo con cifras reportadas por la Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural en México, para el año 2020, la producción nacional de granada fue de poco más de 7 mil toneladas (124), lo cual representa un considerable aumento en la producción tomando en cuenta el dato histórico que indica que en 1991, la producción nacional fue de 3 mil 83 toneladas (125).

Los últimos datos reportados por la Secretaría de Desarrollo Agropecuario de Hidalgo (SEDAGROH en el 2021), indican que en el año 2018, el estado tuvo el tercer lugar en producción de granada en México, aportando el 17.19% de la producción nacional con 1 388 ton, antecedido por Morelos (1 545 ton) y Guanajuato (2 065 ton). La mayor parte de la producción hidalguense de granada se encuentra en la región denominada Valle del Mezquital, al oeste del estado; siendo los municipios de Tasquillo (551 ton), Chilcuautila (386 ton) e Ixmiquilpan (257 ton) los principales productores (126).

1.2.2 COMPOSICIÓN NUTRIMENTAL Y FITOQUÍMICA DE LA GRANADA

La porción comestible de la granada, corresponde a los arilos y las semillas, de los primeros se extraen el jugo que contiene carbohidratos, proteínas, vitaminas hidrosolubles, electrolitos y ácido ascórbico, entre otros; de las semillas (que comúnmente son consumidas debido a su escasa rigidez y agradable sabor) se obtienen ácidos grasos (Tabla 5) y algunos polifenoles.

Tabla 5. Composición nutrimental de granada roja.

Nutriente	<i>Tabla de composición de alimentos Novartis Medical Nutrition (por cada 100 g)</i>
Porción comestible	0.56
Energía (kcal)	65
Humedad (%)	-
Hidratos de Carbono (g)	14.8
Proteínas (g)	0.73
Grasas (g)	0.33
Fibra (g)	0.2
Calcio (mg)	6
Fósforo (mg)	10
Hierro (mg)	0.40
Magnesio (mg)	3
Sodio (mg)	5
Potasio (mg)	275
Vitamina A (µg eq)	3
Vitamina D (µg)	0
Ácido ascórbico (mg)	5.7
Tiamina (mg)	0.03
Riboflavina (mg)	0.02
Niacina (mg)	0.30
Piridoxina (mg)	0.11

Fuente: (127).

La granada es una fuente rica en compuestos bioactivos, presentes tanto en el fruto (cáscara y arilos), como en las hojas y corteza (128). La fruta posee una gran cantidad de flavonoides, se estima que cerca de 0.2 a 1% del peso de la fruta representan a este grupo de compuestos, de los cuales aproximadamente un 30% de todas las antocianidinas de la fruta, se concentran en la cáscara (129).

El jugo de granada fresco presenta un alto contenido de polifenoles, importantes cantidades de ácido elágico, ácido clorogénico, ácido caféico, ácido cumárico, ácido ferúlico, catequinas y una gran cantidad de antocianinas (130).

La concentración de polifenoles en los frutos de granada se va incrementando a medida que aumenta su estado de desarrollo, sin embargo, se detiene una vez que alcanza el estado de maduración (128). De acuerdo a Akhtar *et al.*, se pueden encontrar 124 fitoquímicos diferentes en la fruta de granada, entre estos fitoquímicos, es probable que los polifenoles de alto peso molecular (por ejemplo, elagitaninos y la punicalaginas) medien la mayoría de los efectos protectores contra una amplia gama de agentes dañinos (129).

En la cáscara, se han identificado casi 48 compuestos fenólicos. Toda la fruta es rica en compuestos polifenólicos, como los isómeros punicalagínicos, los derivados del ácido elágico y las antocianinas, pero, curiosamente, la cáscara contiene el conjunto más prometedor de fenoles (predominantemente los de taninos hidrolizables) en comparación con su concentración en cualquier otra parte anatómica del fruto (129, 131).

La creciente evidencia sugiere que los polifenoles hidrolizables en cáscara, específicamente los elagitaninos, son los antioxidantes más activos entre los taninos contenidos en ellos (132). Sin embargo, los estudios *in vivo* sugieren que las propiedades antioxidantes de los polifenoles absorbidos en la dieta están vinculadas a sus compuestos metabolizados, como las urolitinas (129). En la Tabla 6 se enlistan algunos polifenoles y ácidos grasos encontrados en algunos estudios por partes del fruto. Las Figuras 11-A, 11-B y 11-C, muestran la estructura química de algunos de los polifenoles (elagitaninos y antocianinas), flavonoides y ácidos grasos de mayor relevancia clínica.

Tabla 6. Compuestos fitoquímicos encontrados en la granada.

Extracto de hoja de granada	Extracto de flor de granada	Cáscara de granada	Jugo de granada	Semilla de granada
Taninos: -Punicalagina -Punicafolina -Pedunculaga -Ácido galágico -Ácido elágico -Glucósidos de flavonas (luteolina, apigenina)	Polifenoles -Ácido gálico -Ácido elágico -Triterpenoides (ácido maslínico, ácido asiático, ácido oleanólico, ácido ursólico)	-Elagitaninos (punicalagina, punicalina, granatina α , granatina β , telimagrandina 1, casuarinina, pedunculagina, corilagina, ácido galágico, ácido gálico) -Flavonoides (ácido caféico, catequina, quercetina, galocatequina, luteolina, kaempferol, Proantocianidinas (delfinidina, cianidina, pelargonidina, rutina, ácido cumárico -Otros flavonoles, flavonas, flavononas	-Fenoles y polifenoles como: -Taninos (punicalagina α , punicalagina β , pedunculagina I, galoil HHDP hexosa, granatina B, ácido elágico, punigluconina, ácido elágico deoxihexosa, ácido elágico pentósido, siringetin hexóxido, felatina, ploricina, ácido gálico) -Flavonoides (antocianinas como delfinidina, cianidina, pelargonidina, galocatequina, epicagalocatequina, ácido caféico, ácido clorogénico, ácido cumárico, catequina, epicatequina, quercetina, rutina) -Vitamina C -Vitamina E -CoE Q10 -Ac Lipoico -Numerosos minerales (particularmente Hierro)	-Ácido punílico (95% del total de ácidos grasos) -Ácido linoleico α -Ácido linolénico -Ácido esteárico -Ácido oléico -Ácido mirístico -Ácido palmítico -Ácido araquidónico -Ácido behénico Ácido lignocerático -Ácido eleosteárico -Ácido catalpico -Fitosteroles Ácido elágico -Isoflavonas

Fuente: Adaptado de (129, 133-137).

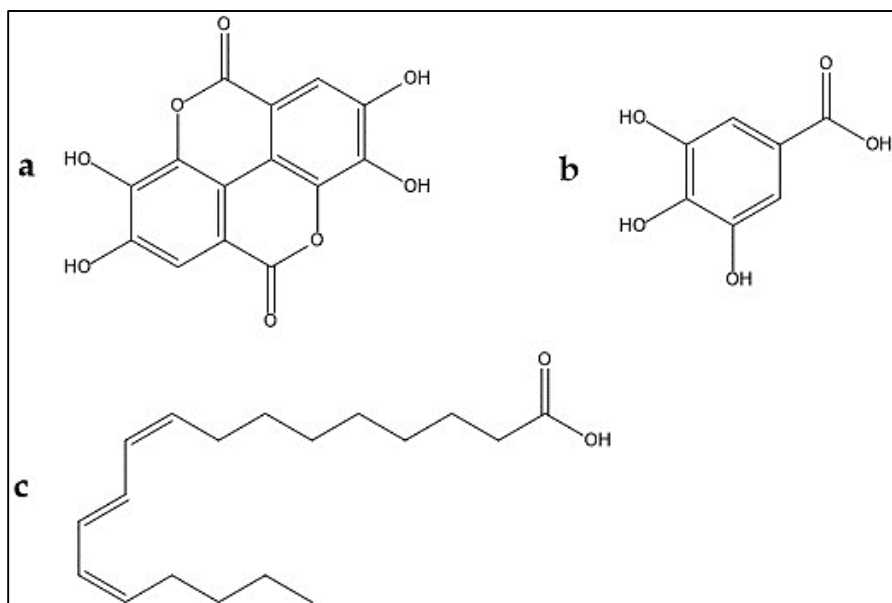


Figura 11-A. Estructuras químicas de componentes abundantes de *Punica granatum* L. (a) ácido elágico (b) ácido gálico, (c) ácido punícico. Fuente: Elaboración propia.

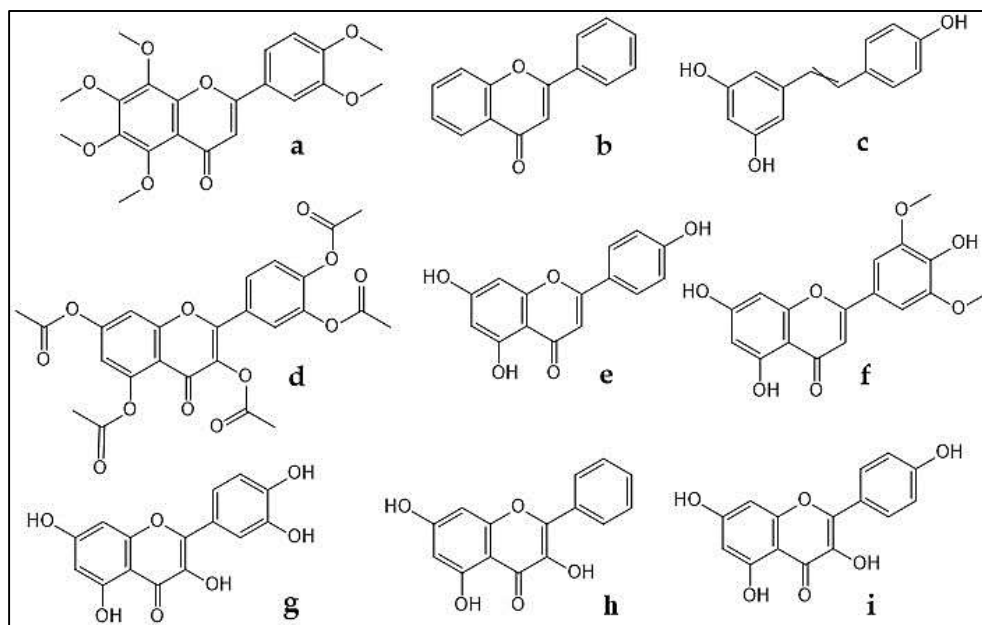


Figura 11-B. Estructura química de algunos flavonoides encontrados en la granada. (a) nobiletina, (b) flavona, (c) resveratrol, (d) quercetin penta-acetato, (e) apigenina, (f) crisina, (g) quercetina, (h) galangina, (i) kaempferol. Fuente: Elaboración propia.

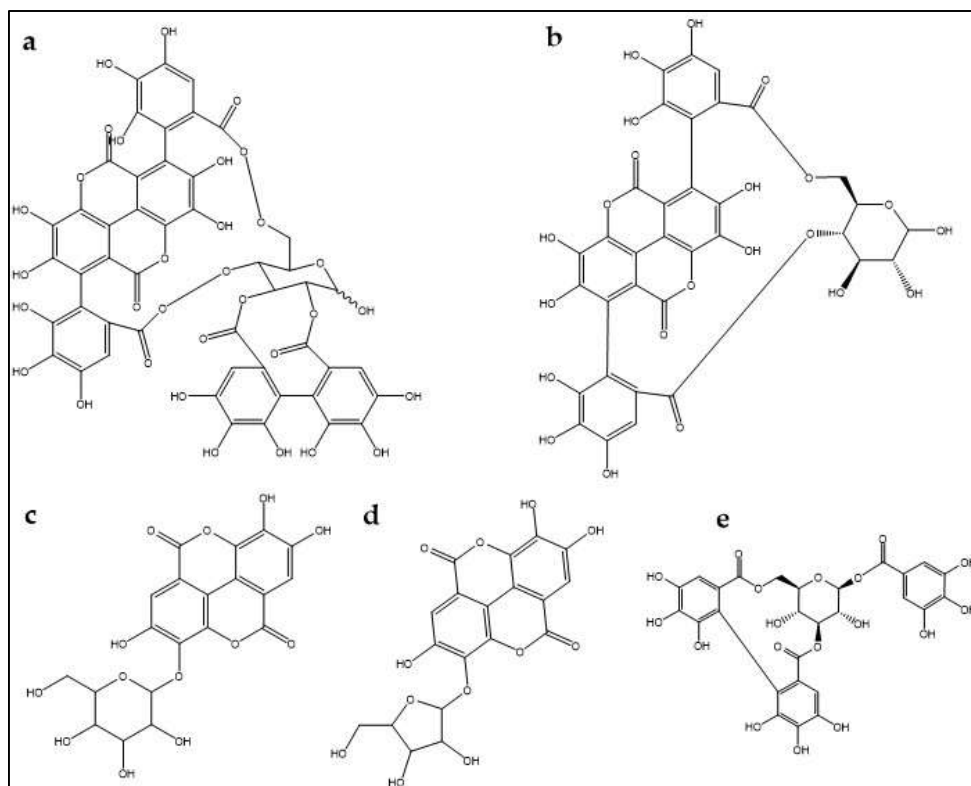


Figura 11-C. Estructura química de algunos taninos contenidos en la granada. (a) punicalagina, (b) punicalina, (c) ácido elágico hexósido, (d) ácido elágico pentósido, (e) corilagina. Fuente: Elaboración propia.

1.2.3 USOS EN LA MEDICINA TRADICIONAL

Se ha reportado que flores, hojas, corteza de brotes y raíces jóvenes, cáscara de fruta e infusiones de granada se han usado tradicionalmente (138). Las flores, por ejemplo, a través de infusiones o decocciones, se han utilizado para aliviar la diarrea simple, el flujo vaginal y también acompañado con cáscara de granada ha sido generalmente utilizada para aliviar la inflamación del páncreas, a su vez, se recomienda el jugo fresco de fruta de *Punica granatum* L., para curar enfermedades de la vesícula biliar.

La fruta contiene “taninos fuertes” y se considera como nutrición amarga. Su decocción parece ser útil para el tratamiento de disentería y trastornos estomacales (139). En el *Charaka-Samhita* (el trabajo médico conocido más antiguo del mundo), ya se mencionaban las propiedades medicinales de la raíz y la cáscara de granada como taenida; los chinos, los romanos (Censorius 234-149 a.C, Pliny 23-79 d.C. y Celsus 25 a.C.- 50 d.C) y los árabes también conocían esta propiedad.

Desde tiempos inmemoriales, en la India, se utilizaba la raíz del árbol de granada para tratar infestaciones de parásitos intestinales. Más recientemente en la historia, en 1807, un físico inglés de apellido Buchanan confirmó este hecho después de dos casos de éxito en tratamientos otorgados por él. Existe registro de que en Portugal, un médico (Dr. Gomez), trató de manera exitosa a 14 personas con parásitos en 1822 (140) y se ha reportado que el uso más extendido en el mundo de la granada es precisamente como antiparasitario (vermífugo) y como taenicida (141, 142).

Hay reportes de que los macerados en etanol de granada se utilizan como antibacterianos y para la resolución de enfermedades inflamatorias (139, 143). Otro uso común del fruto y de la flor es como un potente agente astringente (sustancia que tiene la propiedad de retraer los tejidos y producir una acción cicatrizante, antiinflamatoria y antihemorrágica), así pues, se utiliza para la disentería, diarrea, estomatitis, úlceras, sangrados y enemas (139, 144).

También se sabe que extractos del fruto o raíz vía oral o vaginal, han sido utilizados para prevenir la fertilidad y para inducir el aborto (145, 146). En la medicina tradicional china es utilizada también como tratamiento de quemaduras (147) y está documentado que se ha utilizado como tratamiento para la mordedura de serpiente (148).

En la medicina tradicional mexicana es utilizado el fruto, sus semillas y cáscara, así como la raíz y la hoja (en té o infusión), para los siguientes padecimientos: parásitos, amacizar la dentadura, bronquitis, ampollas en la boca, algodoncillo, diarrea, tos, dolor de garganta y empacho (141).

Villavicencio-Nieto (149), tras un extenso trabajo de campo en la región de Hidalgo, refiere que el granado, se usa para quitar el dolor del cuerpo (la cáscara del fruto de granada se hierva junto con hojas de níspero y la infusión se bebe como agua de tiempo) y que las hojas de granada se utilizan para el dolor de estómago. También reportaron su uso para la diarrea y el asco (hervir cáscara de granada y de nuez, manzanilla y guayaba; o bien tomando infusión de cáscara de granada y de nuez, canela, guayaba y lentejilla).

1.2.5 ACTIVIDAD BIOLÓGICA

Muchos de los usos en la medicina tradicional, se han explicado y demostrado por medio de estudios *in vitro* e *in vivo*, sobre todo en modelos preclínicos, con distintas

partes del árbol de granada. La Tabla 7 muestra los efectos benéficos a la salud de la granada y sus componentes.

Tabla 7. Efectos benéficos a la salud por parte de la granada y sus componentes.

Efecto benéfico a la salud	Parte de la granada (en su forma natural o como producto)	Referencias
Hipoglucemiante	Flor, jugo, semilla, vino	(150-157)
Hipotrigliceridemiante	Semilla, jugo, flor, cáscara y hoja	(151, 153, 158-162)
Hipocolesterolemiante		
Antihipertensivo	Jugo, compuestos aislados del jugo	(163-167)
Reductor de peso corporal	Hoja, aceite de semilla, cáscara	(159, 160, 168, 169)
Antiaterosclerótico	Jugo, cáscara, semilla	(170, 171)
Disfunción erectil	Jugo	(172)
Antiinflamatorio	Cáscara	(173, 174)
Síndrome metabólico	Jugo, semilla, cáscara, hoja,	(175, 176)
Resistencia a la insulina	Flor, jugo	(177)
Cáncer de próstata, mama, pulmón, colon y piel	El fruto entero, compuestos aislados	(178-185)
Antimicrobiano y antifúngico	Cáscara	(173, 186, 187)
Cicatrización de lesiones	Cáscara	(188)
Salud bucal (antiplaca, antioxidante, antiinflamatorio)	Jugo	(189-192)
Quemaduras	Cáscara	(147)

1.2.6 GRANADA Y DOLOR/NOCICEPCIÓN

El efecto biológico de interés en este trabajo es el uso de granada como agente antinociceptivo en el dolor. La Tabla 8, se construyó a partir del análisis de datos basados en la parte de la granada estudiada, el modelo de dolor utilizado, las especies elegidas para el estudio y el tipo de muestra de granada (extractos, productos comerciales, jugo, semillas, etc.), dosis, vía de administración, fármaco de referencia y hallazgos más relevantes.

Tabla 8. Estudios relacionados con granada y dolor.

Parte	Modelo de dolor	Especie	Muestra	Dosis y vía de admin. (mg/kg)	Fármaco de referencia (mg/kg)	Resultados relevantes (p<0.05) y % ID	Ref
<i>Fruta entera</i>	Formalina	Ratón suizo albino macho	Extracto comercial	10, 30, 100 i.p.	Diclofenaco 100 i.p.	Dosis de 100 mg reduce nociception en ambas fases de la prueba. % ID: Sin datos	(193)
	“Writhing” “Hot-tail flick test” Plantar	Ratón suizo albino macho Rata Sprague Dawley adulta	Extracto etanólico	100, 150, 200 i.p.	Ácido acetilsalicílico (ASA) 100 i.p.	Reduce contorciones, sacudidas e hiperalgesia en ambas pruebas. %ID: Writhing: 37 (59 ASA) Hot tail flick: 24 (37.5 ASA)	(194)
	“Writhing” “Hot-tail flick test” Plantar	Ratón suizo albino macho Rata Sprague Dawley adulta	Extracto de etil acetato	100, 150, 200 i.p.	ASA 100 i.p.	Reduce contorciones, sacudidas e hiperalgesia en la prueba plantar %ID: Writhing: 41 (53 ASA) Hot tail flick: 30.5 (43.8 ASA)	(195)
	“Writhing” “Hot- plate” Inmersión de cola	Ratón albino macho	Extracto hidroalcohólico	1000, 2000 y 3000 <i>per os</i> .	ASA: 100 <i>per os</i>	Reduce contorciones, aumenta latencia en prueba de inmersión de cola en respuesta a la estimulación termal. % ID: Writhing: 1 g = 45.3, 2 g= 70.9, 3 g= 86.8	(196)
	Transección de nervio Tibial y sural	Rata Wistar adulto ambos sexos	Extracto comercial	100, 300 <i>per os</i>	Gabapentina 100 <i>per os</i>	Ambas dosis estimulan cambios bioquímicos (TNF- α , TBARS, GSH y Nitrito) y comportamiento (hiperalgesia y alodinia) inducida por la cirugía. % ID: Sin datos	(197)
<i>Cáscara</i>	Osteoartritis	Mujeres adultas	Extracto hidroalcohólico	500 cada 12 horas durante 8 semanas <i>per os</i>	No aplica	Disminuye el daño de rodilla y marcador de osteoartritis. Disminuye la escala análoga visual. %ID: Sin datos	(198)

"Hot-plate" ACF	Ratas adultas especifica sexo)	Wistar (no sexo)	Liofilizado Extracto hidroalcohólico de cáscara	50, 100, 200 <i>per os</i>	Indometacina: 3 <i>per os</i>	Mayor resistencia al calor a 200 mg / kg, con efecto comparable al fármaco de referencia. %ID: 58-75 En ACF, se suprimió la inflamación de la extremidad y el daño óseo a 200 mg / kg.	(199)
"Hot-tail flick"	Rata macho adulta	Wistar adulto	Extracto hidroalcohólico	100, 200 <i>per os</i>	Indometacina 20 <i>per os</i>	100 y 200 mg / kg del extracto produjo actividad analgésica comparable al fármaco de referencia %ID: Sin datos	(200)
"Writhing" Formalina "Hot-plate" Inmersión de cola	Rata macho adulto Ratón adulto	Wistar adulto Albino	Extracto metanólico	10, 25, 50, 100, 150 i.p. e i.c.v	Sulfato de morfin: 5 i.p e i.c.v. DL- Acetilsalicilato de licina 100 i.p. e i.c.v	Produce actividad antinociceptiva en las tres pruebas. En hot-plate e inmersión de cola, incrementa dosis dependiente la latencia al estímulo. %ID: Formalina: 75- 82 Writhing: 29- 52	(201)
Formalina "Writhing"	Ratón adulto	Albino	Extracto hidroalcohólico	400 i.p.	No aplica	El extracto tiene efecto analgésico y antiinflamatorio en ambas pruebas. % ID: Sin datos	(202)
ACF poliartritis inducida Prueba de von Frey Formalina	Rata macho adulto Ratón ICR adulto	Wistar adulto Albino	Extracto metanólico, ácido elágico como marcador	300 para ACF 100 para formalina Formulación tópica	Gel de diclofenaco al 1%	En ACF y prueba de hiperalgesia mecánica, se encontró que el ácido elágico fue efectivo a 0.65 y 0.32%, y ambos (ac. Elágico y extracto mostraron efectos analgésicos). %ID: Formalina fase 1- sin inhibición, fase 2: 35.63 para extracto y 33.76 para ac. elágico.	(203)
Neuropatía diabética dolorosa "Hot-plate" "Tail flick"	Ratón macho diabético (alloxano)	Suizo adulto	Dispersión en spray extracto etanólico granada Ácido gálico	25, 50 y 100 i.p.	Tramadol: 10 <i>per os</i> Glibenclamida: 5 <i>per os</i>	El extracto mejora la función nerviosa periférica en las pruebas de latencia. En hot-plate la latencia fue similar al grupo control 33.3, 73.5 y 85.1% en	(204)

								dosis de 25, 50, y 100 mg / kg, respectivamente.	
		Inducción de úlcera gástrica por Etanol (80%) y ASA	Rata macho adulta	Wistar	Extracto metanólico	250 y 500	No aplica	El extracto tiene un efecto gastroprotector. %ID: 22.37 y 74.21% en úlceras por etanol y 21.95 y 63.41% en úlceras por ASA.	(205)
Jugo y semilla		“Hot- tail flick” “Hot- plate”	Ratón macho viejos y jóvenes	Suizo	Extracto etanólico de semilla	100, 250, 500 <i>per os</i>	Sulfato de morfina 5 <i>per os</i>	El extracto tuvo efecto antinociceptivo (similar al fármaco de referencia) a dosis de 250 y 500 mg / kg sin diferencias por edad.	(206)
		“Writhing” ACF	Ratón macho adulto	Suizo	Aceite de semilla + ketoprofeno en nanoemulsion	300 + 10 i.g. Curva dosis-respuesta: 30-150 + 0.1- 5 i.g.	No aplica	La nanoemulsión reduce las contorciones hasta 12 horas <i>vs.</i> 3 horas de ketoprofeno. En la curva hubo un efecto de 1 mg/kg <i>vs.</i> 0.5 mg/kg de ketoprofeno. En ACF se encontró que la nanoemulsión tuvo efecto de hasta 10 hrs en la alodinia mecánica <i>vs.</i> 6 horas de ketoprofeno.	(207)
		Dolor corneal	Ratón macho adulto (cepa no descrita)		Extracto de jugo y semilla	Dosis aguda 2, 4, 6 ml/kg <i>per os</i> Dosis crónica 1, 2, 3 ml/kg <i>per os</i>	Morfina: 2 s.c. Naloxona: 2 s.c.	La dosis alta en la prueba aguda, y la dosis más baja en la prueba crónica, disminuyen el dolor corneal agudo y aumentan la nocicepción inducida por morfina.	(208)
Hojas y flor		“Hot-plate test”	Ratón macho adulto	Suizo	Extracto cloroformico, metanólico y acuoso de flor	50 i.p.	Sulfato de morfina 5 i.p.	El tiempo de reacción post inyección fue mayor que en el control con efecto similar a la morfina. La analgesia máxima fue a los 60 min para todos los extractos. %ID: No reportado	(209)
		“Writhing”	Ratón macho adulto	Suizo	Extracto Per-eter, diclorometano y metanol	200 <i>per os</i>	Diclofenaco: 50 <i>per os</i>	Los extractos y el diclofenaco disminuyeron el número de contorciones comparado con el control. %ID: Diclofenaco 61.8, Per-	(210)

	Rata Evans adulta	Long macho				ether, 75.7, dichloromethane 68.5 y metanol 54.7	
"Writhing"	Ratón adulto sexos	Suizo ambos	Extracto hidroalcohólico de hoja	100 y 200 <i>per os</i>	Ibuprofeno 100 <i>per os</i>	Los extractos a ambas dosis redujeron las contracciones en comparación con el control siendo la cascara más efectiva que la hoja. %ID: Hoja: 27.8 y 43.2. Cascara: 30.1 y 49.8	(211)

% ID = Porcentaje de inhibición del dolor; i.p. = intraperitoneal; i.g. = intragástrico

1.2.7 TOXICIDAD

El consumo de las partes comestibles de la granada y sus extractos se considera seguro. Se ha demostrado que un extracto de fruta de granada de grado alimenticio, administrado por vía oral, en un estudio de toxicidad aguda, tuvo una Dosis Letal 50 (DL₅₀) de más de 5000 mg/kg en ratas Wistar y ratones albinos suizos y en el estudio subcrónico todos los animales sobrevivieron y no hubo cambios en los parámetros clínicos (físicos y conductuales) (212).

En otro estudio, el resultado de la toxicidad aguda oral (método OCDE 2001) no reveló signos de toxicidad en un extracto de cáscara a una dosis única fija de 2000 mg/kg durante 14 días (213). Además, la fracción butanólica del extracto metanólico de la cáscara de granada se evaluó en una prueba de toxicidad aguda, encontrando que era segura a una dosis superior a 500 mg/kg (214). Sin embargo, se advierte que se debe tener precaución con algunos extractos de otras partes, que pueden tener efectos tóxicos a altas dosis debido a su alto contenido de alcaloides y taninos.

Las vías de administración también pueden influir en el grado de toxicidad, por ejemplo, se descubrió que la DL₅₀ del extracto de cáscara (administración intraperitoneal de dos variedades de Marruecos) es 320.5-355.8 mg/kg en ratas Wistar y 300-348.2 mg/kg en ratones albinos respectivamente (201).

Vidal y colaboradores (215), encontraron que la DL₅₀ de extracto hidroalcohólico de granada de fruta entera administrado por vía intraperitoneal a ratones era de 731.1 mg/kg y se sugiere que hay embriotoxicidad a una dosis mayor de 100 mg/kg.

También se ha informado que las punicalaginas (un tanino abundante en la granada) tienen un efecto citotóxico en las líneas celulares, en altas concentraciones (216). Sin embargo, Cerdá *et al.*, (168), realizaron un ensayo en el que concluyeron que la administración oral de altas dosis (0.5, 2, 5, 10 y 20% de extracto de cáscara) de punicalagina y elagitaninos de granada a ratas Wistar durante 37 días no es tóxica, y lo corroboraron con un estudio histopatológico de hígado y riñón.

Finalmente, Álvarez *et al.*, evaluaron la toxicidad subaguda y subcrónica de un microencapsulado de arilos de granada roja en rata y ratón. No se produjeron muertes ni efectos deletéreos cuando se administraron por vía oral dosis altas de 5000 mg/kg en ratas durante 14 días, lo que indica una ausencia de toxicidad

subaguda. De manera similar, 3000 mg/kg de microencapsulado administrado en ratones CD-1 durante 90 días no mostraron toxicidad subcrónica. El microencapsulado no causó ninguna citotoxicidad en el cultivo de células epiteliales usando el ensayo de azul de Alamar. Además, el análisis histopatológico de riñón e hígado corroboró la ausencia de toxicidad en ratones CD-1 (217).

2. JUSTIFICACIÓN

El fruto de la granada supone una alternativa natural para el tratamiento del dolor. Si bien, en medicina tradicional ha sido utilizada de manera milenaria, no son del todo claros los mecanismos de acción por los cuales se presenta el efecto antinociceptivo y tampoco se ha estudiado el efecto de un extracto en combinación con un fármaco. En este contexto, utilizar extracto de cáscara de granada como coadyuvante generará una disminución de los efectos adversos frecuentes en el tratamiento farmacológico del dolor y más aún, en combinación con el ácido acetilsalicílico se busca potenciar el efecto del fármaco, reduciendo la dosis necesaria y por ende los efectos adversos frecuentes en este fármaco. Finalmente, la cáscara de granada es un subproducto no utilizado de la granada, la cual es un alimento altamente comercial por su jugo, por lo que utilizarla en lugar de desecharla puede generar beneficios a los productores y la población que lo demande.

3. HIPÓTESIS

Alternativa (H_i)

Existe efecto antinociceptivo en extractos etanólicos y liofilizados de granada (*Punica granatum* L.) y efecto sinérgico en la combinación del extracto de mayor efecto con ácido acetilsalicílico en el modelo de formalina.

Nula (H_0)

No existe efecto antinociceptivo en extractos etanólicos y liofilizados de granada (*Punica granatum* L.) y no existe efecto sinérgico en la combinación del extracto de mayor efecto con ácido acetilsalicílico en el modelo de formalina.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto antinociceptivo de extractos etanólicos y liofilizados de granada (*Punica granatum* L.) y su combinación con el ácido acetilsalicílico en un modelo animal de dolor nociceptivo e inflamatorio.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obtener extractos etanólicos y jugos liofilizados de tres distintas variedades de granada (rotoevaporación a presión reducida y liofilización) para obtener muestras.
- Evaluar el efecto antinociceptivo (monodosis) de los extractos y liofilizados (prueba de formalina) en rata Wistar macho para realizar un cribado.
- Realizar curva dosis-respuesta del extracto etanólico de cáscara de granada y del fármaco de referencia (prueba de formalina) para determinar dosis efectivas.
- Realizar análisis isobolográfico del efecto de dosis equiefectivas del combinado fármaco-extracto para determinar el tipo de interacción.
- Determinar el mecanismo de acción del efecto por la vía del óxido nítrico mediante antagonista conocer la vía de acción.
- Realizar pruebas de actividad antioxidante y fenoles totales al extracto seleccionado (DPPH•, ABTS•+, FRAP) para determinar su implicación en la nocicepción.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 ESQUEMA DE DISEÑO METODOLÓGICO

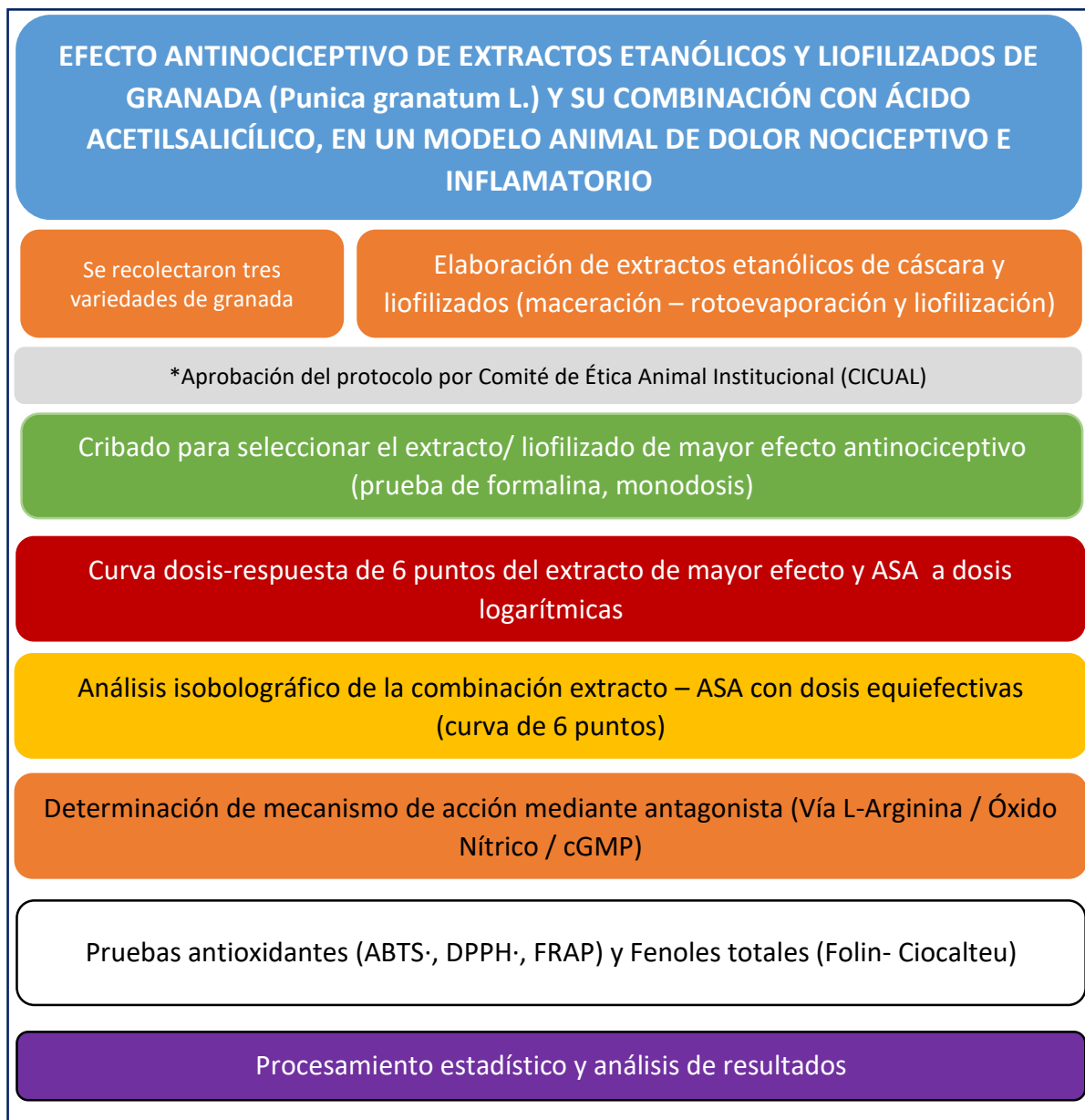


Figura 12. Esquema de diseño metodológico

5.2 MATERIA VEGETAL Y EXTRACCIÓN

5.2.1 MATERIA VEGETAL

Se recolectaron ejemplares de tres variedades de granada (denominadas comúnmente como agridulce, verde y roja), del municipio de Tasquillo, Hidalgo, México (Latitud 20.5485, Longitud: -99.3104 20 ° 32'5'' Norte, 99 ° 18'37'' Oeste. Altitud: 1641), a finales del mes de agosto del 2018. Los frutos se recolectaron personalmente en su etapa de madurez comercial mediante un muestreo probabilístico aleatorio simple, asegurando un peso, color y tamaño similares. El tamaño de lote recolectado por cada variedad fue de 20 kg. La identificación taxonómica fue confirmada por el área de botánica del Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería, se clasificó y se entregó el *voucher* de identificación, el cual se depositó en el Departamento de Farmacognosia.

5.2.2 PREPARACIÓN DE EXTRACTOS Y LIOFILIZADOS

Se utilizó la cáscara (pericarpio) y el jugo de las tres variedades de granada. Las cáscaras fueron separadas manualmente del resto del fruto, una vez separadas fueron recortadas en tamaño a cuadros de aproximadamente 0.5 cm² y se extendieron en una mesa de trabajo para el secado a medio ambiente fresco y seco. Una vez seco, se pesó y se realizó una extracción sólido-líquido mediante maceración con etanol absoluto (J.T. Baker, México), durante 21 días (100 g de cáscara por 400 ml disolvente). Posteriormente se realizó rotoevaporación a presión reducida (Büchi R200, Suiza) con las siguientes condiciones: temperatura de baño 35°C; presión 175 mbar; rotación moderada.

El producto final se pesó y se almacenó en un ambiente fresco y seco hasta su utilización. El jugo fue extraído de los arilos por medio de prensado manual, posteriormente se realizó un filtrado grueso con gasa estéril (PROTEC, México) para separar la semilla y la membrana carpelar que divide a los arilos. Se congeló a -40° C en alícuotas hasta el momento de su utilización.

Una vez descongelado, se filtró utilizando gasa y algodón plisado (PROTEC, México) y se llevó a extracción acuosa parcial por medio de rotoevaporación a presión reducida con las siguientes condiciones: temperatura de baño de 35 – 40 °C; presión 70 mbar; rotación moderada a rápida. Se extrajo gran parte de su contenido acuoso y se generó un producto reducido que fue llevado a liofilización (Labconco

Freezone 4.5, KC, USA) a temperatura de -40°C y 190×10^{-3} mBar. El resultado se pesó y se almacenó herméticamente en un ambiente fresco y seco.

5.3 REACTIVOS

Para la extracción sólido-líquido se utilizó etanol absoluto (J.T. Baker, México). Para la prueba de formalina se preparó formalina al 2% diluyendo formaldehído al 37% (J.T. Baker, México), en solución salina fisiológica (PiSA, México). Los extractos se disolvieron en vehículo Tween 80 al 1% (Sigma Aldrich, MA, USA.) y se administraron por vía intragástrica (i.g.). Para la disolución de ASA (Sigma Aldrich, MA, USA), se utilizó carboximetilcelulosa al 0.5% (Sigma Aldrich, MA, USA) y se administró vía i.g. (el volumen de administración tanto para ASA como para extractos fue de 4 ml / kg de peso).

Los animales del grupo vehículo recibieron solución salina fisiológica (4 ml / kg) o carboximetilcelulosa al 0.5% (4 ml / kg). Para discernir el mecanismo de acción se preparó L-NAME (Sigma Aldrich, MA, EE. UU.) y L-Arginina (Sigma Aldrich, MA, USA) disolviéndolos en solución salina (PiSA, México) y administrados por vía intraperitoneal (i.p.) a un volumen de 4 ml/kg peso. Todas las soluciones se prepararon el mismo día en que se realizaron las pruebas.

5.4 ANIMALES

Todos los experimentos en animales se realizaron siguiendo las directrices “*IASP Guidelines for the Use of Animals in Research*” (218). Además, el protocolo fue aprobado por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo (UAEH) (número de autorización: CICUAL010-2019), y se llevó a cabo en cumplimiento de la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 que trata de las especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio (219). Se realizaron máximos esfuerzos para minimizar el sufrimiento de los animales y reducir su número al mínimo de ratas por grupo de estudio. Al final de los experimentos, fueron sacrificadas en una cámara de eutanasia por CO_2 .

Se utilizaron 198 ratas (*Rattus norvegicus*) cepa Wistar, sexo macho, adulto joven (peso 180-200 g). Los animales se mantuvieron a temperatura y ciclos de luz controlados (ciclo de luz oscura de 12 h y temperatura de $27 \pm 2^{\circ}\text{C}$) con acceso *ad libitum* a alimento comercial 5008 Formulab Diet (Formulab, CA, USA) y agua

esterilizada el periodo antes de los experimentos. Previo a los experimentos, las ratas se sometieron a un período de ayuno de al menos 8 horas.

5.5 PRUEBAS DE DOLOR

5.5.1 PRUEBA DE FORMALINA

Se realizó un rastreo (cribado) del extracto etanólico o jugo liofilizado con mayor efecto antinociceptivo mediante la prueba de formalina. Para esto, en el laboratorio del bioterio de la UAEH, 66 ratas ($n=6$) se colocaron en jaulas cilíndricas acrílicas con un fondo de papel “kraft” (para minimizar el frío de la mesa de trabajo) durante 1 hora para aclimatarse y adaptarse a las condiciones circundantes.

Se colocaron espejos detrás de las jaulas cilíndricas para una vista periférica y sin obstáculos de las ratas y específicamente sus patas (Figura 13a y 13b). La actividad antinociceptiva de los extractos de cáscara de granada (denominados a partir de este punto ExC1, ExC2, ExC3 y liofilizados de jugo Lj1, Lj2, Lj3), se evaluó mediante esta prueba siguiendo el método de Wheeler-Aceto y Cowan con modificaciones (220).

La prueba consiste en medir durante una hora (1 minuto cada 5), el número de sacudidas de la pata trasera derecha (ipsilateral), después de una inyección subcutánea (50 μ L de formalina al 2%) con una aguja calibre 30G en la superficie dorsal de la pata trasera derecha, 30 minutos después de la administración del medicamento o extracto a evaluar. Los grupos de estudio fueron: 1) VEHÍCULO (Tween 80 al 1%), 2) ASA (100 mg/kg peso i.g.), los grupos del 3 al 5, correspondieron a ExC1, ExC2, ExC3, y los grupos del 6 al 8 a Lj1, Lj2, Lj3. Todos ellos a una dosis de 316 mg/kg peso i.g. El tamaño de muestra fue en todos los casos de 6 animales por grupo.

5.5.1.1 MEDICIÓN DEL COMPORTAMIENTO DEL DOLOR EN LA PRUEBA DE FORMALINA

La respuesta antinociceptiva se midió evaluando el curso temporal, en el que se observó el número promedio de sacudidas de la extremidad trasera (pata) de las ratas de los diferentes grupos, en relación con el grupo VEHÍCULO (control). Las sacudidas son uno de los comportamientos relacionados con la nocicepción en el modelo de formalina y se caracteriza por sacudidas o levantamientos espontáneos, rápidos y breves de la pierna.

Por lo tanto, cada episodio de temblor, vibración o elevación de la pierna se contó como una sacudida. Posteriormente, se calculó el área bajo la curva por el método de los trapezoides (221), del número de sacudidas en relación con el tiempo y, a partir de estos resultados, se calculó el porcentaje de antinocicepción, utilizando la ecuación presentada a continuación:

$$\% \text{ Antinocicepción} = \frac{\text{ABC vehículo} - \text{ABC tratamiento}}{\text{ABC vehículo}} \times 100 \quad (1.6)$$

En donde:

ABC vehículo: Área bajo la curva del grupo vehículo

ABC tratamiento: Área bajo la curva de los grupos tratados

En esta prueba se miden dos tipos de dolor: de 0 a 15 minutos (denominado fase 1) representa el dolor nociceptivo, y de 15 a 60 minutos (fase 2), corresponde al dolor inflamatorio.

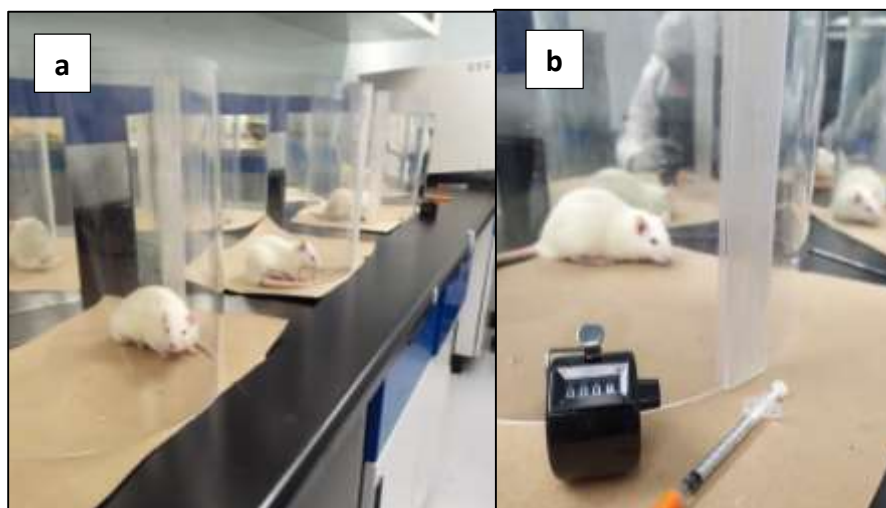


Figura 13a y 13 b. Prueba de formalina en rata Wistar. Se puede apreciar que los animales se encuentran aislados de su entorno en cilindros de acrílico, los cuales permiten su observación, además de que los espejos permiten una visión periférica del animal y el papel kraft permite reducir el contacto con el frío de la mesa de trabajo. En la Figura 15 b se aprecia además un dispositivo cuenta eventos con el cual se mide el número de sacudidas de pata y la jeringa con la que se administra formalina a la misma.

5.5.2 CURVA DOSIS RESPUESTA DEL EXTRACTO SELECCIONADO Y ASA PARA ISOBOLOGRAMA

Una vez que se seleccionó el extracto de mayor efecto antinociceptivo (ExC2) se determinó que con ese se trabajaría el resto del experimento. Mediante la prueba de formalina (descrita anteriormente), se llevó a cabo una curva dosis-respuesta de 6 puntos para ExC2 y para el fármaco de referencia (ASA) dando como resultado 60 ratas repartidas en los siguientes grupos de estudio: Los grupos de estudio (n=6) fueron: 1) VEHÍCULO (Tween 80 al 1%). Seis grupos recibieron ExC2 por vía oral en dosis a incrementos logarítmicos, y seis grupos que recibieron ASA a dosis logarítmicas también (ver Tabla 9, dosis para curvas dosis-respuesta de ExC2 y ASA).

Como excepción, la dosis de 1000 mg/kg no se evaluó para ASA, debido a que excede la DL_{50} reportada para este fármaco (95). Todos los grupos recibieron el mismo volumen de preparaciones y la vía de administración para todos fue intragástrica.

Tabla 9. Dosis utilizadas para construir curvas dosis-respuesta de ExC2 y ASA antes de la administración de formalina al 2%.

Dosis (mg / kg peso)	
ASA	ExC2
3.16	10
10	31.6
31.6	100
100	316
316	562
562	1000

*La administración en todos los casos fue por vía i.g.

5.6.3 ANÁLISIS ISOBOLOGRÁFICO

Una vez obtenida la curva dosis-respuesta de ASA y ExC2, se realizó un análisis isobolográfico el cual es una herramienta conveniente para evaluar la interacción entre los analgésicos a partir de dosis equiefectivas (102, 108). En primera instancia, se calculó para ambos fármacos (ASA y ExC2) la dosis efectiva 30 (DE_{30}), en función de sus curvas de dosis-respuesta, despejando la ecuación de la recta.

A partir de la DE_{30} de ambos medicamentos, se consideró la dosis efectiva teórica para el isoblograma, generando una curva dosis-respuesta teórica administrando

ambos medicamentos, simultáneamente, en proporciones constantes (1:1) de ASA (0.5) + ExC2 (0.5).

Las curvas para la respuesta se calcularon utilizando la siguiente secuencia: (1) ASA DE_{30} + ExC2 DE_{30} ; (2) (ASA DE_{30} + ExC2 DE_{30}) / 2; (3) (ASA DE_{30} + ExC2 DE_{30}) / 4; (4) (ASA DE_{30} + ExC2 DE_{30}) / 8, (5) (ASA DE_{30} + ExC2 DE_{30}) / 16 y (6) (ASA DE_{30} + ExC2 DE_{30}) / 32 (Tabla 10). El tamaño de n fue de 6, resultando un total de 72 animales.

La DE_{30} experimental fue calculada a partir de la curva dosis-respuesta de la combinación ASA-ExC2. Para determinar el tipo de interacción (sinérgica, aditiva o antagonista), se comparó el valor de la DE_{30} teórica con la DE_{30} experimental de la combinación y se consideraron las diferencias. Además, el índice de interacción (γ) se calculó de la siguiente manera:

$$\gamma = \frac{DE_{30} \text{ de la combinación (experimental)}}{DE_{30} \text{ de la combinación (teórica)}} \quad (1.7)$$

En donde:

γ = Índice de interacción

DE_{30} = Dosis efectiva 30

Lo que indica qué fracción de la DE_{30} del efecto del fármaco individual representa la DE_{30} correspondiente en la combinación. Los valores cercanos a 1 corresponden a una interacción aditiva, mientras que los valores superiores a 1 indican una interacción infraaditiva (antagonista) y así mismo, los valores inferiores a 1 corresponden a la interacción sinérgica (potenciación).

Tabla 10. Dosis utilizadas para la interacción ASA – ExC2 antes de la administración de formalina al 2%

Dosis (mg / kg peso corporal)			
<i>Grupos (n=6)</i>	<i>ASA</i>	<i>ExC2</i>	<i>Total</i>
(1)	4	30	34
(2)	2	15	17
(3)	1	7.5	8.5
(4)	0.5	3.75	4.25
(5)	0.25	1.875	2.12
(6)	0.125	0.937	1.06

*Dosis (1) calculada a partir de la DE₃₀ de cada fármaco

5.7 IMPLICACIÓN DE LA VÍA DE L-ARG / ÓXIDO NÍTRICO / GMPC / ATP

Se determinó el papel de la vía del óxido nítrico en la modulación de ExC2 y la combinación ExC2-ASA en la actividad antinociceptiva. Se adoptó el método de Zakaria *et al.*, (222) con ligeras modificaciones. Se diseñaron dos experimentos, en el experimento 1, se formaron cinco grupos (n = 6) de ratas con las características y condiciones descritas en la sección 5.4. Para ello, las ratas del grupo (1) recibieron la DE₅₀ de ExC2 solamente (244 mg/kg); para el grupo (2) las ratas fueron pretratadas con 100 mg/kg i.p. de L-arginina 30 min antes de la prueba de formalina; el grupo (3) recibió 100 mg/kg i.p. de L-arginina y 15 min después, se administró ExC2 a DE₅₀ (244 mg/kg i.g.), 30 min después se realizó la prueba de formalina; los grupos (4) y (5) se diseñaron de la misma manera que (2) y (3) pero sustituyendo el pretratamiento de L-arginina con 10 mg/kg i.p. de L-NAME.

El experimento 2 fue casi idéntico, con la diferencia de que en lugar de administrar ExC2 DE₅₀, se administró la combinación ExC2-ASA (15 y 2 mg/kg respectivamente). Los resultados de las pruebas de formalina se analizaron como se describió anteriormente (sección 5.5.1).

5.8 ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y FENOLES TOTALES

Los antioxidantes de ExC2 se extrajeron diluyendo 2 mg de muestra en 1 ml de etanol. Para medir el contenido fenólico total se usó el método Folin-Ciocalteu. Para lo cual, se mezclaron 100 μL de ExC2 con 500 μL de reactivo Folin-Ciocalteu diluido 1:10. Luego, se añadieron 400 μL de carbonato de sodio al 7.5 % y la mezcla se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. La absorbancia de la mezcla se midió a 765 nm en un lector de microplacas (Biotek Power Wave XS, USA) Utilizando ácido gálico como patrón de referencia. Los resultados se expresaron en miligramos de ácido gálico equivalente / 100 g de base seca (mg EAG 100 g – 1 db) (223).

La actividad antioxidante fue determinada por ABTS $^{\cdot+}$, DPPH y FRAP. El catión radical ABTS $^{\cdot+}$ se produjo haciendo reaccionar 7 mmol L $^{-1}$ de solución madre ABTS $^{\cdot+}$ 2.45 mmol L $^{-1}$ de persulfato de potasio en la oscuridad a temperatura ambiente durante 16 h antes de usarse. El ABTS $^{\cdot+}$ se diluyó con agua desionizada hasta una absorbancia de 0.70 ± 0.10 a 754 nm.

Se añadieron 20 μL de muestra de ExC2 a 980 μL de la solución ABTS $^{\cdot+}$ diluida, y se tomaron lecturas de absorbancia después de 7 minutos de incubación a temperatura ambiente. Se leyó a 754 nm en el lector de microplacas (Biotek Power Wave XS, USA). La capacidad antioxidante se expresó como mg de capacidad antioxidante equivalente de Trolox por 100 g en seco ($\mu\text{mol ET 100 g} - 1$ base seca) (224).

Para el ensayo de DPPH, se preparó una solución etanólica (7.4 mg/100 ml) del radical DPPH estable y se añadió (500 μL) a 100 μL de ExC2 colocado en viales. Después de dejar la mezcla reposar a temperatura ambiente durante 1 h, se midió la absorbancia a 520 nm en el mismo lector de microplacas, los resultados se expresaron como $\mu\text{mol ET 100 g} - 1$ base seca (225).

El método de FRAP se llevó a cabo mediante la metodología de Pérez- Jiménez *et al.*, (223). Se preparó el reactivo FRAP en una concentración de 10:1:1 con 100 ml de solución amortiguador (0.3 M con un pH de 3.6), 10 ml de TPTZ (10 mM en ácido clorhídrico) y 10 ml de FeCl $_3$ (20 mM en agua). La curva patrón se elaboró con sulfato ferroso (concentraciones 0, 20, 30, 40 y 50 $\mu\text{M Fe}^{2+}/\text{l}$). Se colocaron 30 μL de ExC2, 90 μL de agua desionizada y 900 μL de FRAP, las muestras se agitaron y dejaron reposar en baño maría a 37°C durante 10 min. Se leyó la absorbancia (Power wave

XS UV-Biotek, EUA) a 593 nm. Los resultados se expresaron como micromoles de hierro (II) / litro ($\mu\text{mol Fe (II)/l}$).

5.9 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos obtenidos por cada prueba fueron sometidos a estadística descriptiva con medidas de tendencia central y de dispersión; se expresaron como la media $\pm$ EE o como media $\pm$ DE de cada una de las variables. La diferencia entre medias para cada variable fue estimada por un análisis de varianza (ANOVA) de una y dos vías con un post test de Bonferroni para establecer la diferencia de medias con un nivel de significancia de $p < 0.05$. Algunos datos fueron tratados mediante t de Student ($p < 0.05$). El análisis estadístico fue realizado con el software Prism for Windows, 2019 (GraphPad, CA, USA) y Microsoft 365 Excel 2019 (Microsoft, USA).

6. RESULTADOS

6.1 EXTRACTOS Y LIOFILIZADOS

Una vez procesados la cáscara (extracción sólido - líquido por maceración) y el jugo de granada (liofilización) se obtuvieron los productos finales, los cuales tuvieron un porcentaje de extracción para la cáscara de aproximadamente 10% del producto inicial y del 7% para el jugo. La Tabla 11 muestra los resultados por cada extracto y liofilizado.

Tabla 11. Rendimiento de extractos y liofilizados de granada

Variedad de granada	Extracto / liofilizado	Porcentaje de extracción (%)
Granada agri dulce	ExC1	7.11 ± 0.02
Granada verde	ExC2	10.48 ± 0.04
Granada roja	ExC3	12.13 ± 0.07
Granada agri dulce	Lj1	6.875 ± 0.05
Granada verde	Lj2	6.987 ± 0.04
Granada roja	Lj3	7.104 ± 0.05

6.2 EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTINOCICEPTIVO DE LOS EXTRACTOS Y LIOFILIZADOS (PRUEBA DE FORMALINA)

La formalina al 2% administrada por vía subcutánea a la pata trasera derecha ipsilateral de las ratas produjo el comportamiento nociceptivo esperado. Se encontró una respuesta nociceptiva inmediata (0-15 min, fase 1) y luego de un corto período de reposo, una respuesta inflamatoria (15 a 60 min, fase 2) que comenzó de forma gradual y continuó durante todo el período de observación.

El transcurso del tiempo mostró una respuesta bifásica típica observada en el grupo VEHÍCULO. La Figura 14a y 14b muestran el curso temporal de las sacudidas por minuto de los diferentes grupos estudiados (tres grupos de extractos de cáscaras y tres grupos de liofilizados de jugo), en comparación con el grupo VEHÍCULO y el fármaco de referencia (ASA). En las figuras 14a y 14b se puede apreciar que el grupo VEHÍCULO muestra una conducta típica de la prueba y tanto para ASA, los

extractos de cáscara y los liofilizados de jugo, se redujo el número de sacudidas en comparación con el VEHÍCULO (efecto antinociceptivo), encontrándose una reducción de la conducta nociceptiva mayor en el ExC2 y Lj2.

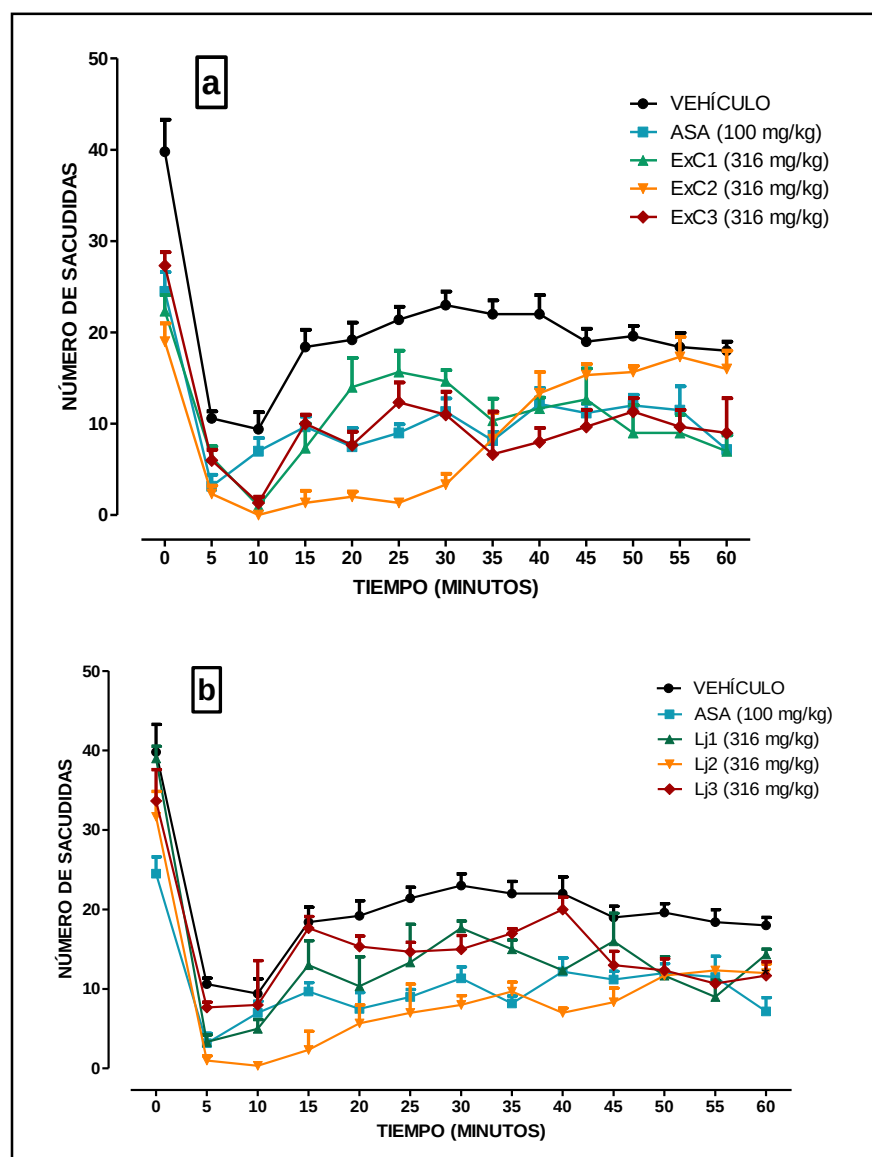


Figura 14. Cursos temporales de la prueba de formalina obtenidos por la administración i.g. de: (a) extractos y (b) liofilizados de tres variedades de granada a una dosis de 316 mg/kg.

Posteriormente se analizó el área bajo la curva (ABC) por fases y global de todos los grupos por el método de los trapezoides y a partir de ella, se calculó el porcentaje de antinocicepción. La figura 15, muestra la comparativa por grupos del porcentaje de antinocicepción, desde la perspectiva por fases. Se encontró que todos los extractos y liofilizados, así como ASA, presentan efecto antinociceptivo en ambas fases de la prueba de formalina, teniendo mayor efecto en la fase 2 de la prueba (25 a 50% de

antinocicepción). Todos los extractos y liofilizados tuvieron diferencia estadísticamente significativa ($p<0.05$) con relación al grupo VEHÍCULO y en la fase 1, el grupo ExC2 tuvo diferencia estadísticamente significativa positiva contra ASA.

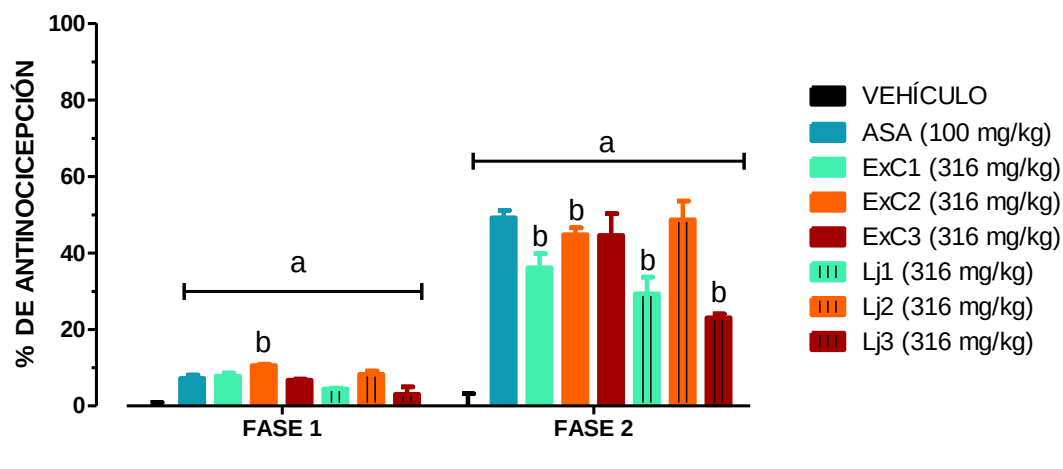


Figura 15. Porcentaje de antinocicepción de los diferentes grupos de estudio, por fases de la prueba de formalina. a= Diferencia estadísticamente significativa contra VEHÍCULO ($p<0.05$), b= Diferencia estadísticamente significativa contra ASA ($p<0.05$).

La Figura 16, muestra la comparativa por grupos del porcentaje de antinocicepción global (ambas fases). Se encontró que todos los extractos y liofilizados, así como ASA, presentan efecto antinociceptivo global, encontrándose mayor efecto en la variedad verde (tanto extracto de cáscara ExC2 como jugo liofilizado Lj1). Todos los extractos y liofilizados tuvieron diferencia estadísticamente significativa ($p<0.05$) con relación al grupo VEHÍCULO y únicamente ExC2 tuvo diferencia estadísticamente significativa contra ASA, por lo que cumple uno de los criterios para ser el extracto seleccionado para el resto del estudio (a pesar de que Lj2 tuvo un efecto similar, tuvo mayor error estándar y no presentó diferencia estadísticamente significativa contra ASA).

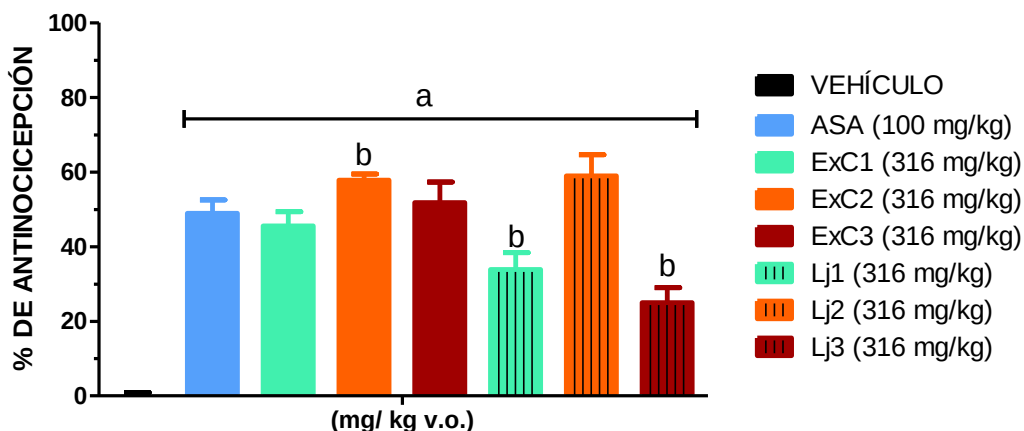


Figura 16. Porcentaje de antinocicepción global de los diferentes grupos de estudio en la prueba de formalina. a= Diferencia estadísticamente significativa contra VEHÍCULO ($p < 0.05$), b= Diferencia estadísticamente significativa contra ASA ($p < 0.05$).

6.3 CURVA DOSIS- RESPUESTA (PRUEBA DE FORMALINA) DE EXTRACTO DE MAYOR EFECTO Y FÁRMACO DE REFERENCIA

Una vez seleccionado el extracto de mayor efecto antinociceptivo en la prueba de formalina (ExC2), se realizó una curva dosis-respuesta tanto para ExC2 como para ASA (prueba de formalina), para determinar la potencia, eficacia y dosis efectivas necesarias para el desarrollo de la siguiente etapa del estudio. Para ello se utilizó una curva de seis puntos con dosis a incrementos logarítmicos.

Las Figuras 17a y 17b muestran el curso temporal de las sacudidas por minuto de las diferentes dosis estudiadas para ExC2 (Figura 17a) y ASA (Figura 17b), en comparación con el grupo VEHÍCULO. Se encontró que el grupo VEHÍCULO muestra una conducta típica de la prueba y tanto para ExC2 como para ASA, se redujo el número de sacudidas en la mayoría de las dosis. Se observa que mientras es mayor la dosis, hay una mayor reducción de sacudidas de pata, lo que indica un efecto dependiente de la dosis. Treinta minutos antes de la administración de formalina, las ratas se pretrataron con VEHÍCULO, ASA o ExC2 a seis dosis diferentes en incrementos logarítmicos. El valor de p (< 0.05) no se indicó en las figuras debido a la saturación de líneas, sin embargo, las diferencias estadísticas de la media $\pm$ EE de cada tiempo de medición ($n = 6$) en la fase 1 fueron mínimas y comenzaron a manifestarse a partir de la dosis de 316 mg tanto para ExC2 como para ASA, y respecto a la fase 2, ExC2 comenzó a tener un efecto significativo a partir de 316 mg/kg y ASA a partir de 10 mg/kg de peso.

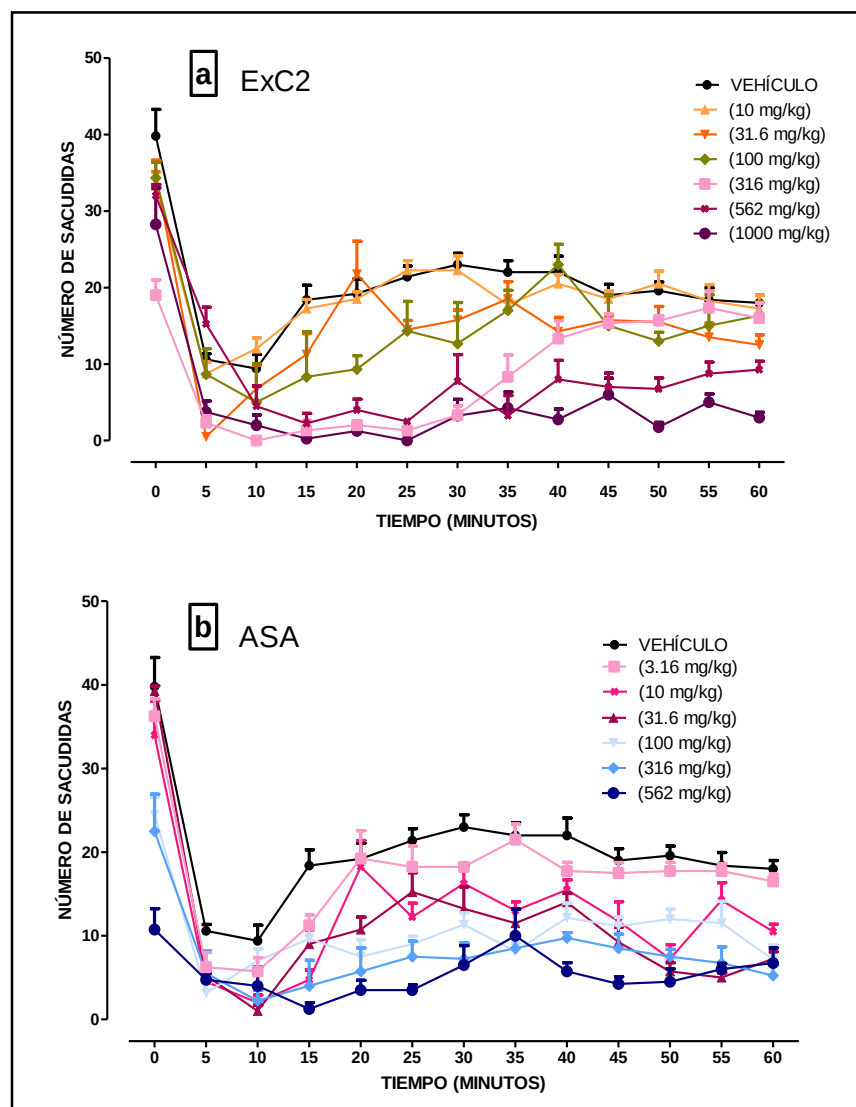


Figura 17a y 17b. Curso temporal de la prueba de formalina en las curvas dosis respuesta. Curso temporal de ExC2 (19a) y ASA (19b) en el número de sacudidas de pata inducidos por formalina cada 5 min durante 1 hora.

Posteriormente, se calculó el porcentaje de antinocicepción a partir del ABC. La figura 18a y 18b, muestra la comparativa por grupos del porcentaje de antinocicepción para ExC2 (Figura 18a) y ASA (Figura 18b) por fases.

Se encontró que el ExC2 y ASA a todas las dosis evaluadas, presentan efecto antinociceptivo en ambas fases de la prueba de formalina, siendo un efecto dependiente de la dosis para la fase 1 de ASA y fase 2 de ambos. En la fase 2 se encontró el mayor efecto porcentaje de antinocicepción. En la fase 1, tanto para ExC2 como para ASA, cuatro dosis tuvieron diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) con relación al grupo VEHÍCULO y en la fase 2, 5 dosis para ExC2 y 6 para ASA, tuvieron diferencia contra el VEHÍCULO.

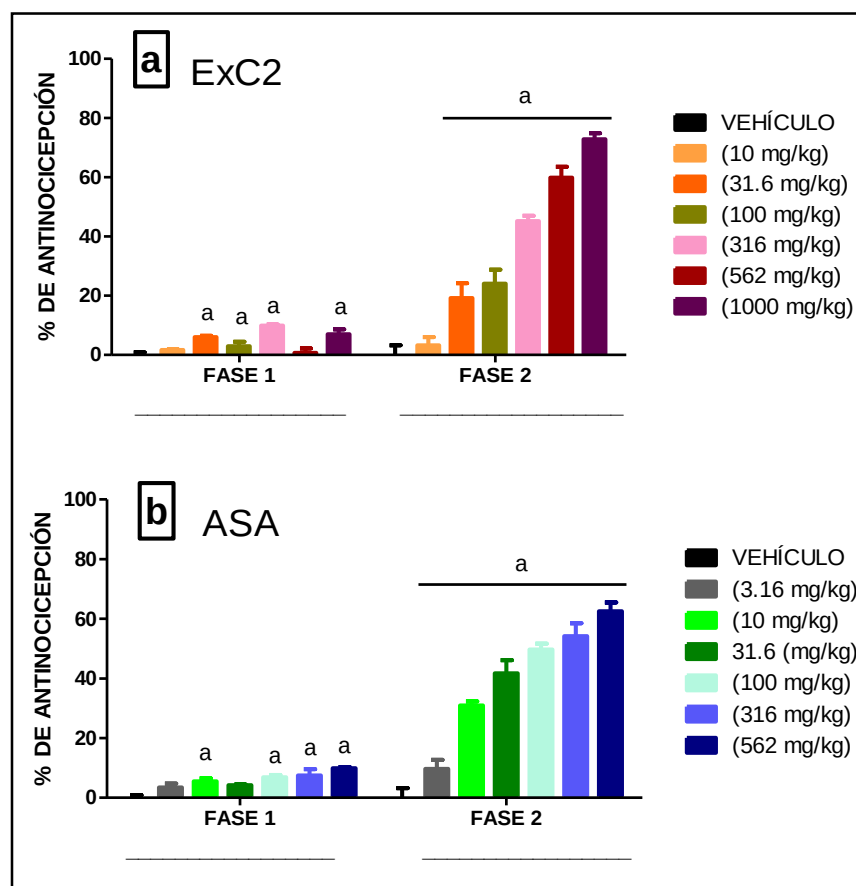


Figura 18a y 18b. Porcentaje de antinocicepción de las diferentes dosis de la curva dosis respuesta de ExC2 (20a) y ASA (20b) por fases, de la prueba de formalina. Las figuras muestran el porcentaje de antinocicepción por fases de la prueba de formalina obtenidos por la administración i.g. de ExC2 y ASA. a= Diferencia estadísticamente significativa contra VEHÍCULO ($p<0.05$), b= Diferencia estadísticamente significativa contra ASA ($p<0.05$).

A continuación se calculó el efecto global en porcentaje de antinocicepción a partir del ABC (Figura 19a y 19b). Desde la perspectiva global, se encontró que tanto ExC2, como ASA, presentan efecto antinociceptivo global dependiente de la dosis. Todas las dosis de ExC2 y ASA tuvieron diferencia estadísticamente significativa ($p<0.05$) con respecto al grupo VEHÍCULO.

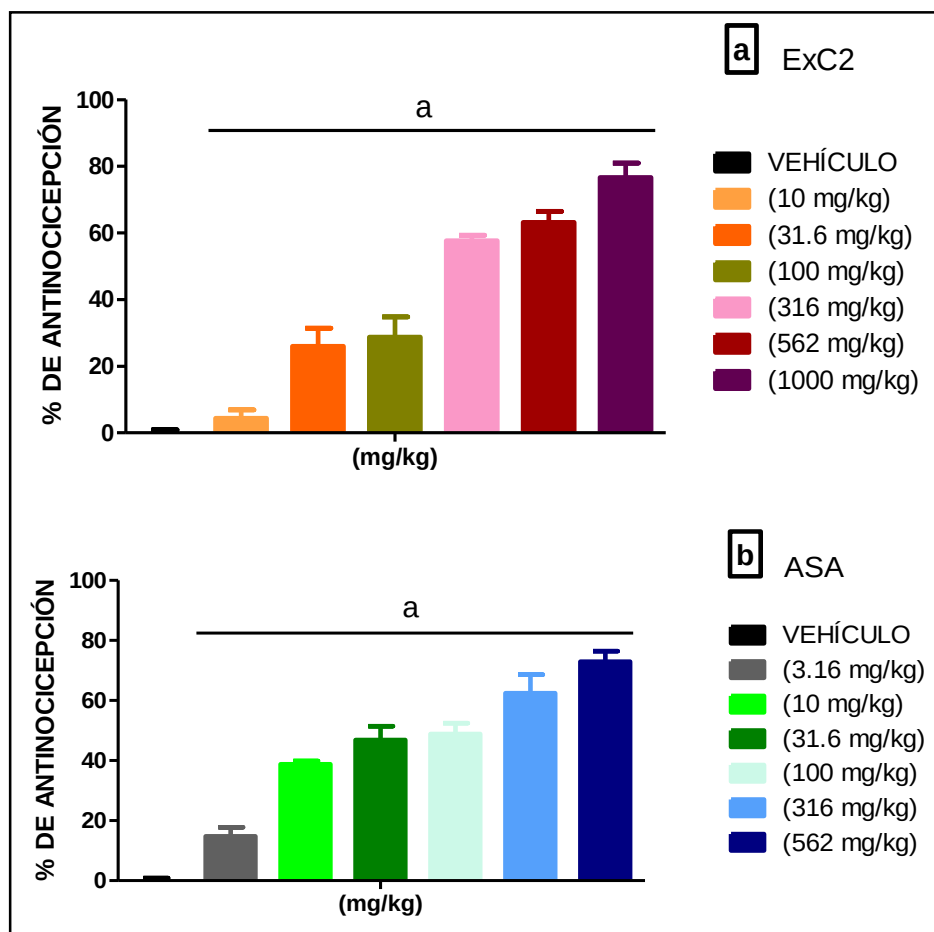


Figura 19a y 19b. Porcentaje de antinocicepción global de las diferentes dosis de estudio para la curva dosis respuesta en la prueba de formalina. Las figuras 21a y 21b muestran el efecto global de la prueba de formalina obtenidos por la administración i.g. del extracto ExC2 (21a) y ASA (21a) a distintas dosis logarítmicas. a= Diferencia estadísticamente significativa contra VEHÍCULO ($p < 0.05$).

Una vez obtenidos los datos anteriores, se construyó la curva dosis respuesta para ExC2 y ASA (Tabla 12 y Figura 20). En la Tabla 12 se muestra el porcentaje de antinocicepción por fases y global de ExC2 y ASA en la prueba de formalina, realizado en todas las dosis logarítmicas evaluadas.

Se encontró que todas las dosis de todos los grupos de ExC2 y ASA tuvieron un efecto antinociceptivo estadísticamente significativo ($p < 0.05$) en ambas fases de la prueba de formalina (dolor nociceptivo e inflamatorio) frente al grupo de VEHÍCULO excepto el ExC2 a 10 mg/kg peso.

Tabla 12. Valores de porcentaje de efecto obtenido por dosis en las curvas dosis respuesta de ExC2 y ASA

Dosis (mg/kg)	Log (D)	Efecto antinociceptivo (%)		
		<i>ExC2 Fase 1</i>	<i>ExC2 Fase 2</i>	<i>ExC2 Efecto global</i>
10	1.00	1.62	3.23*	4.83*
31.6	1.50	6.01*	19.92*	25.99*
100	2.00	6.99*	22.09*	28.69*
316	2.50	7.22*	50.23*	57.81*
562	2.75	7.32*	55.58*	60.92*
1000	3.00	7.03*	72.8*	80.22*
		<i>ASA Fase 1</i>	<i>ASA Fase 2</i>	<i>ASA Efecto global</i>
3.16	0.50	3.42*	10.71*	14.78*
10	1.00	4.47*	33.94*	38.77*
31.6	1.50	4.99*	41.73*	46.85*
100	2.00	6.47*	49.60*	56.02*
316	2.50	7.26*	55.04*	62.43*
562	2.75	9.94*	62.55*	72.94*

El efecto antinociceptivo, expresado en porcentaje, se obtuvo de la media del ABC del número de sacudidas de las patas de cada grupo de animales (n = 6) en la prueba de formalina al 2%. Los fármacos se administraron por vía intragástrica. *diferencia estadísticamente significativa (p <0.05) frente al grupo de VEHÍCULO.

Se destaca que este efecto antinociceptivo fue mayor en la fase 2 para ambos compuestos (fase de dolor inflamatorio). Luego, se construyó la curva dosis-respuesta para ExC2 y ASA a partir del efecto global de cada dosis y fármaco (Figura 20).

Al calcular la DE₃₀, donde se determina el 30% de efecto, se demostró que ASA tiene una potencia y eficacia estadísticamente mayor que ExC2 en todos los puntos excepto en la dosis de 316 mg/kg (p <0.05).

Se observa también una conducta de curva sigmoidea característica en incrementos logarítmicos. El efecto antinociceptivo encontrado para ambos fármacos fue dependiente de la dosis. A partir de la obtención de estos datos se realizó el análisis isobolográfico.

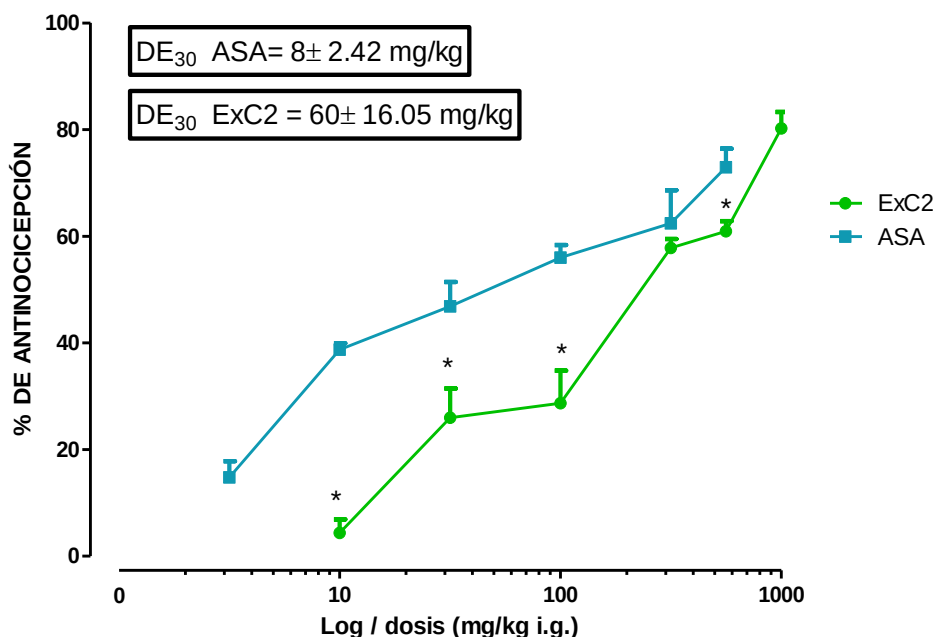


Figura 20. Curva dosis respuesta de ExC2 y ASA. Curva dosis-respuesta a partir del cual se obtuvo la DE_{30} . Cada punto corresponde a la media $\pm$ EE de 6 animales. *Diferencia estadísticamente significativa contra los grupos de ASA ($p < 0.05$).

6.4 ISOBOLOGRAMA

La ED_{30} de ExC2 y ASA se calculó a partir de los valores obtenidos de sus curvas de dosis-respuesta. Luego se realizó la curva dosis respuesta de la combinación en proporción 1:1. Las dosis utilizadas (Tabla 13) corresponden a fracciones de la proporción establecida y se detallan en los materiales y métodos; de esta manera se formuló la dosis efectiva teórica.

Posteriormente, las mismas dosis calculadas de la combinación oral se probaron experimentalmente en el modelo de formalina al 2%. La tabla 13 muestra el porcentaje de antinocicepción encontrado para cada dosis. El efecto global encontrado fue de 30.4% a 62.8% de forma dosis dependiente y se encontró un mayor

porcentaje de efecto antinociceptivo en la fase 1 que en los fármacos evaluados individualmente.

Tabla 13. Efecto de la combinación ExC2-ASA en la prueba de formalina

Grupo	Dosis (Combinación)	mg/kg	Log (D)	Efecto antinociceptivo (%)		
				Combinación Fase 1	Combinación Fase 2	Efecto global
(1)	34		1.53	25.52*	36.31*	62.80*
(2)	17		1.23	10.93*	39.21*	50.60*
(3)	8.5		0.93	12.99*	35.09*	48.70*
(4)	4.27		0.62	10.35*	33.17*	43.51*
(5)	2.12		0.32	8.96*	24.47*	33.48*
(6)	1.06		0.02	7.83*	22.57*	30.41*

El efecto antinociceptivo, expresado en porcentaje, se obtuvo de la media del ABC del número de sacudidas de pata de cada animal en cada grupo de combinación (n = 6) en la prueba de formalina al 2%. Los fármacos se administraron por vía intragástrica. *Diferencia estadísticamente significativa frente al grupo VEHÍCULO.

Se realizó el análisis isoblográfico (Figura 21). En él, se trazó la línea de aditividad entre la DE₃₀ de los fármacos individuales; en ella, la DE₃₀ teórica (DE₃₀T) se ubica en la parte central (34 ± 8.11 mg/kg peso). Tras realizar el experimento, se localizó el punto de la DE₃₀ experimental (DE₃₀E) (0.927 ± 0.63); encontramos que el mismo se ubicó por debajo de la línea de aditividad, con una diferencia estadísticamente significativa (p < 0.05) entre puntos, lo que indica que existe una interacción sinérgica de la combinación.

El índice de interacción (γ), que establece el grado de sinergismo, fue de 0.028 ± 0.20; un índice de interacción menor que 1 indica que hay una potenciación del efecto (súper aditividad).

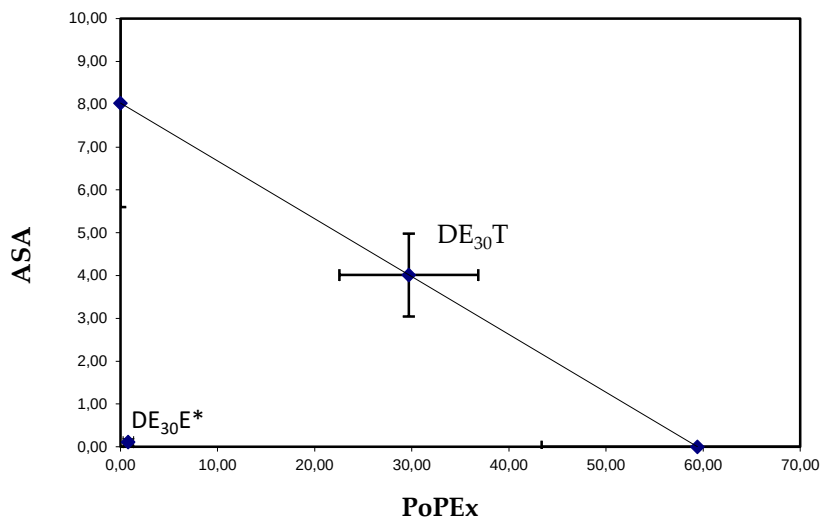


Figura 21. Isobolograma de la interacción entre ExC2 y ASA en la prueba de formalina. La línea entre los ejes X y Y representa el efecto aditivo teórico que tendría la combinación de fármacos, cuyo punto medio es el punto aditivo teórico de los valores de $DE_{30}T$ del fármaco individual. El punto experimental ($DE_{30}E$) se observa por debajo de la línea, cerca de 0, * = un efecto sinérgico estadísticamente significativo contra $DE_{30}T$ ($p < 0,05$).

6.5 IMPLICACIÓN DE LA VÍA L-ARG / NO / GMPC / ATP

Para dilucidar el mecanismo de acción del efecto antinociceptivo encontrado, se diseñaron dos experimentos con éster metílico de N^{ω} -nitro-L-arginina (L-NAME), un antagonista del óxido nítrico. Se diseñó un experimento con la dosis efectiva 50 de ExC2 (DE_{50}) y otro con la combinación 2 de ExC2-ASA (15 mg / kg y 2 mg / kg respectivamente).

Los resultados del primer experimento se muestran en la Figura 22. En ella, se observa que el pretratamiento central con L-Arginina (100 mg/kg ip), un precursor de la síntesis de óxido nítrico incrementó significativamente ($p < 0,05$) las sacudidas de pata en la prueba de formalina, reduciendo el porcentaje de antinocicepción en comparación con la DE_{50} de ExC2.

La coadministración de L-arginina con DE_{50} de ExC2 dio como resultado una diferencia no estadísticamente significativa, en comparación con la DE_{50} de ExC2 por sí sola. Por otro lado, L-NAME a una dosis de 10 mg/kg i.p. tuvo un efecto antinociceptivo por sí solo (con una diferencia estadísticamente significativa en comparación con DE_{50} de ExC2) y cuando se coadministró con DE_{50} de ExC2 mostró un fuerte efecto antinociceptivo con una diferencia estadísticamente significativa frente a DE_{50} ExC2 y L-NAME solo.

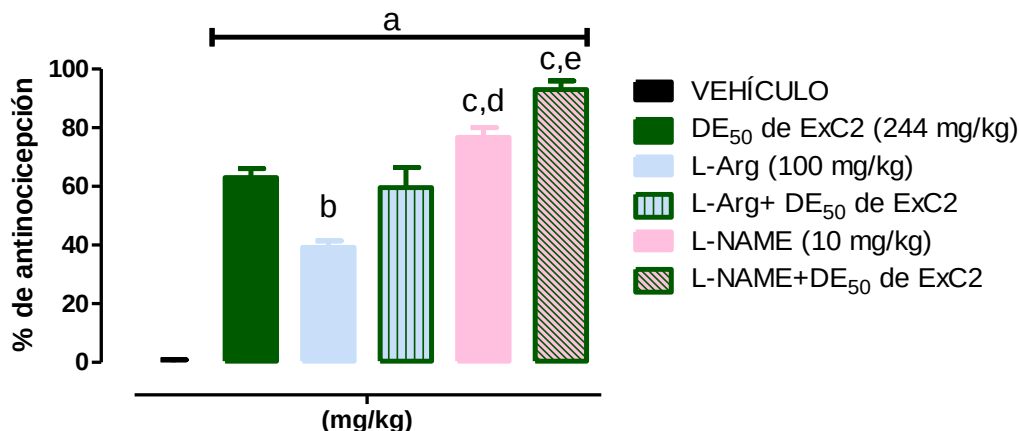


Figura 22. Implicación de la vía L-Arg/NO/GMPc/ATP en el efecto antinociceptivo de ExC2.. a = $p < 0.05$ todos contra el grupo VEHÍCULO. b = $p < 0.05$ L-arginina frente a DE₅₀ de ExC2. c, d = $p < 0.05$ L-NAME contra DE₅₀ de ExC2 y L-NAME + DE₅₀ de ExC2. e = $p < 0.05$ L-NAME + DE₅₀ de ExC2 contra L-NAME. Cada punto corresponde a la media $\pm$ EE de 6 animales.

El segundo experimento se diseñó de la misma manera (los mismos grupos de L-arginina y L-NAME) excepto que se usó la combinación 2 de ExC2-ASA en lugar de DE₅₀ de ExC2. Los resultados fueron consistentes y relativamente similares con el experimento 1 (Figura 23). Se encontró una diferencia estadísticamente significativa para todos los grupos contra el VEHÍCULO, y también con L-NAME (10 mg/kg) y L-NAME 10 + Combinación 2 contra Combinación 2. Los resultados sugieren que el efecto antinociceptivo de ExC2 solo y en combinación con ASA, es dado a través de la vía de señalización L-arginina / NO / cGMP / ATP.

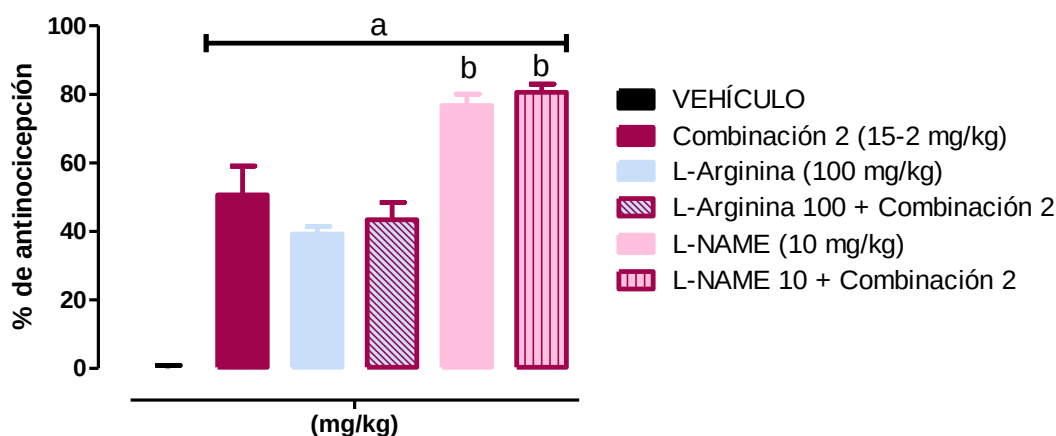


Figura 23. Implicación de la vía L-Arg/NO/GMPc/ATP en el efecto antinociceptivo de la combinación de ExC2-ASA. a = $p < 0.05$ todos frente al VEHÍCULO. b = $p < 0.05$ L-NAME (10 mg / kg) y L-NAME 10 + Combinación 2 contra Combinación 2. Cada grupo corresponde a la media $\pm$ EE de 6 animales.

6.6 ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y CONTENIDO FENÓLICO TOTAL

La Tabla 14 muestra el contenido fenólico total y la capacidad antioxidante de ExC2. En la muestra se observó actividad captadora de radicales libres en las tres pruebas (DPPH·, ABTS· y FRAP), encontrando actividad en ExC2. Los valores se expresaron como la media $\pm$ DE de DPPH· y ABTS·+ ($\mu\text{mol TE / g}$), FRAP ($\mu\text{mol Eq FeSO}_4$) y fenoles totales ($\text{mg } 100 \text{ g}^{-1} \text{ GAE}$). Las curvas de referencia fueron realizadas con Trolox, FeSO_4 y ácido gálico.

Tabla 14. Actividad antioxidante y contenido fenólico total de ExC2

Ensayo	DPPH	ABTS·+	FRAP	Contenido Fenólico Total
<i>Unidades</i>	<i>($\mu\text{mol TE/g}$)</i>	<i>($\mu\text{mol TE/g}$)</i>	<i>($\mu\text{mol Eq FeSO}_4$)</i>	<i>($\text{mg } 100 \text{ g}^{-1} \text{ GAE}$)</i>
<i>Curva Estándar</i>	<i>Trolox</i> <i>($R^2= 0.9926$)</i>	<i>Trolox</i> <i>($R^2= 0.9953$)</i>	<i>FeSO_4</i> <i>($R^2= 0.9962$)</i>	<i>Ácido gálico</i> <i>($R^2= 0.9998$)</i>
ExC2	11805.0 $\pm$ 0.03	11105.7 $\pm$ 0.03	568.8 $\pm$ 0.08	2591.0 $\pm$ 0.06

Los valores representan la media $\pm$ DE de la muestra por triplicado.

7. DISCUSIÓN

Se eligió al etanol considerando sus propiedades como disolvente, y que debe tener características químicas y estructurales similares a las del compuesto a disolver, en este contexto el etanol es un solvente prótico, con moléculas polares y por tanto puede formar puentes de hidrógeno con los solutos, a diferencia de los disolventes polares apróticos y de los no polares (226). El índice de polaridad del etanol es de 5.2, mismo que se encuentra en la medianía de las tablas de polaridades de disolventes, lo cual favorece la extracción de una mayor cantidad de solutos, tanto polares como medianamente polares.

Masci *et al.*, (227) realizaron la extracción etanólica de cuatro variedades israelitas e italianas de granada (lsr, Ita, DC1 y DC2), reportando porcentajes de 8.4, 9.2, 10.4 y 13.9%, respectivamente. El porcentaje de extracción obtenido en el presente trabajo para la cáscara de granada se puede considerar adecuado (7.11 a 12.13% peso seco). Si bien no se planteó la optimización del proceso, se obtuvo suficiente muestra para los experimentos programados. En el estudio que se citó anteriormente, Masci *et al.*, encontraron mayores porcentajes de extracción en muestras de cáscara disueltas en metanol y acetato de etilo/agua (hasta un 14.7%), por lo que es importante realizar un ensayo con la utilización de estos solventes con los cuales además, al menos de manera hipotética, se podrían extraer compuestos con otras polaridades. Finalmente, también será importante extraer compuestos con solventes no polares y evaluarlos, como en el caso de Dikmen *et al.*, quienes realizaron el estudio farmacológico de un extracto de cáscara de granada obtenido con éter de petróleo mediante la extracción por Soxhlet y cuyo porcentaje ascendió a 37.97% peso seco (228). Del jugo de granada liofilizado se obtuvieron los productos finales, los cuales tuvieron un porcentaje de extracción del 7% en promedio; al respecto no se encontraron datos publicados que puedan tomarse como referencia para comparar los resultados de este trabajo.

El segundo objetivo de este estudio, en el que se evaluó el efecto antinociceptivo de tres variedades de granada, se encontró que el extracto de cáscara de granada verde (ExC2), posee el mayor porcentaje de antinocicepción, en comparación con los extractos de cáscara de granada roja y agridulce, así como con los jugos liofilizados, por lo que fue elegido para llevar a cabo el resto de los estudios farmacológicos.

El porcentaje de antinocicepción se evaluó en dos tipos de dolor: nociceptivo e inflamatorio, mediante la prueba de formalina. La inyección subcutánea de formalina es un método preclínico bien estudiado para la evaluación de estímulos químicos dolorosos (229). Esto brinda oportunidades para comparar los efectos de una lesión periférica aguda y crónica (230).

Después de la inyección de formalina al 2% en las ratas, durante una hora, se produjo la respuesta bifásica esperada. Por tanto, esta prueba fue útil para la evaluación de los tratamientos propuestos, que incrementaron la actividad de los nociceptores y desencadenaron un proceso inflamatorio periférico inducido por la lesión.

En el transcurso del tiempo de la prueba, se encontró que principalmente ExC2 produjo una reducción en el número de sacudidas de pata de las ratas, en una forma de respuesta a la dosis, en todas las dosis administradas por vía intragástrica, en comparación con el grupo de VEHÍCULO. Este resultado coincide con el encontrado por González-Trujano *et al.*, (193) quienes evaluaron la actividad antinociceptiva de un extracto metanólico de la fruta entera de granada (10, 30 y 100 mg/kg de peso corporal intraperitoneal) en ratones. El curso temporal reportado por ellos es similar al encontrado en este estudio.

Del mismo modo, Olapour y Najafzadeh (202), evaluaron el efecto antinociceptivo de un extracto hidroalcohólico de cáscara de granada (400 mg/kg peso, intraperitoneal) en la prueba de formalina en ratones, y encontraron una reducción significativa ($p < 0.05$) de sacudidas de pata y tiempo de lamida en comparación con su grupo control.

Por otro lado, a diferencia de los opioides, que tienen un efecto marcado en ambas fases, se sabe que los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) tienen un mayor efecto en la segunda fase de la prueba de formalina (231, 232). Razón por la cual ASA tuvo un mayor efecto en esa fase. Aunque redujo el número de sacudidas de la pata en la primera fase (a una tasa de 3.4-9.9% de antinocicepción), la segunda fase mostró hasta un 62.5% de antinocicepción.

Cabe destacar que a diferencia de los estudios antes mencionados, en los que administraron sus compuestos por vía intraperitoneal, en el presente trabajo se usó la intragástrica, ya que es la vía de administración más utilizada para el ASA (233) y porque el extracto de cáscara de granada es un subproducto alimenticio, cuya utilización para el dolor se ha reportado por vía oral en infusiones en la medicina tradicional del mundo (139, 142). A pesar del efecto antinociceptivo logrado, es

importante que futuros estudios se realicen utilizando otras vías de administración en las que el efecto pueda ser más rápido, efectivo o potenciado.

Los resultados del efecto antinociceptivo por fases y global se calcularon a partir del área bajo la curva del número de sacudidas de la pata en relación al tiempo transcurrido, que se expresó posteriormente como porcentaje de antinocicepción. Los resultados confirman que el efecto analgésico de ExC2 es dosis dependiente, principalmente periférico, y que al igual que el ASA, actúan a través de la vía central y dependen de sus actividades antiinflamatorias.

El mecanismo de acción de ASA está claramente documentado (86, 233) y los resultados de este trabajo son consistentes con ello, sin embargo, en el caso de ExC2, los mecanismos de acción no son del todo claros. Existen algunos estudios donde se evaluó el efecto de la granada y especialmente los extractos de cáscara tienen actividad antinociceptiva sobre diferentes tipos de dolor (nociceptivo, inflamatorio, agudo, crónico o neuropático) (198-204).

Los autores indican que el efecto antinociceptivo está dado por fitoquímicos, presentes en la granada, principalmente polifenoles y flavonoides (taninos, antocianinas, ácido elágico y gálico, entre otros) pero también terpenoides, ácidos grasos, cumarinas, alcaloides y saponinas (234, 235).

Se ha informado que un extracto de granada pudo inhibir la producción de prostaglandina E2 (PGE2) y óxido nítrico (NO) inducida por citocinas inflamatorias *in vivo*. Estos mecanismos podrían estar mediados por la inhibición de la liberación de algunos mediadores nociceptivos endógenos y confirmarían su actividad central a través de la activación nociceptiva supraespinal (196).

Gainok *et al.*, (236) sugirieron que los antioxidantes optimizan las acciones biológicas del NO natural *in vivo*. De hecho, los antioxidantes estabilizan el NO y prolongan su concentración celular, protegiéndolo de los radicales libres como especie reactiva de oxígeno (ROS). El NO, como molécula de señalización, se sintetiza a partir de la óxido nítrico sintasa (NOS) que cataliza la reacción del oxígeno molecular con el aminoácido sustrato L-arginina para producir NO. El NO actúa como modulador en la médula espinal y los ganglios de la raíz dorsal a través de las vías nociceptivas y media el dolor neuropático (152, 157, 161, 235).

En estudios previos realizados se atribuyen los efectos antinociceptivos a los taninos (234, 237), en los que se llevó a cabo un experimento *in vitro* donde expusieron células endoteliales aórticas a metabolitos de elagitaninos (glucurónido de urolitina

A y sus agliconas), que son consecuencia de la acción de la microbiota intestinal sobre los elagitaninos, para determinar el efecto sobre la adhesión de monocitos y la migración de células endoteliales, que a su vez se inhibieron significativamente con respecto a los controles.

También se observó una disminución en la expresión de la quimiocina inflamatoria CCL2 e interleucina-8 (IL-8) (238). Hollebeeck *et al.*, (239) encontraron que un extracto de cáscara de granada rico en punicalaginas previene la inflamación intestinal crónica en las células Caco-2. El experimento se realizó en un modelo *in vitro* de epitelio intestinal humano, actuando a nivel de expresión génica de las moléculas proinflamatorias interleucina-6 (IL-6) y la proteína quimioatrayente de monocitos MCP-1 por atrapamiento molecular directo, y se observó una significativa disminución de la transcripción de estos genes.

Además, hay informes de cómo cuatro taninos hidrolizables libres extraídos de granada (punicalagina, punicalina, strictina A y granatina B) mostraron un efecto inhibitorio sobre la producción de NO en células RAW 264.7 inducido por lipopolisacárido (LPS). Igualmente, la granatina B inhibió, en mayor medida, la producción de PGE2 y la expresión de COX-2 en las mismas células. Estos taninos, especialmente la granatina B, funcionan como un antiinflamatorio eficaz y tienen un doble efecto antiinflamatorio, al disminuir la producción de PGE2 en la etapa inicial y la producción de NO en la etapa tardía (240).

Se ha reportado que la inhibición mediada por punicalagina de la producción de PGE2 en células de macrófagos estimuladas con LPS se asoció con la regulación negativa de las enzimas COX-2 (241). Al respecto, Jain *et al.*, (197) observaron que un pretratamiento comercial de extracto de fruta de granada atenuó significativamente el aumento del nivel de NO en un modelo de dolor neuropático inducido por transección del nervio tibial y sural.

Por otro lado, Karwasra *et al.*, (199), investigaron el efecto de la cáscara de granada sobre el umbral nociceptivo en casos agudos y crónicos de inflamación y dolor en un modelo animal de artritis reumatoide. Encontraron que 200 mg/kg de extracto de cáscara de granada mostraron una mejora significativa ($p < 0.05$) en el comportamiento nociceptivo reduciendo el dolor, lo que atribuyeron a la presencia de altos niveles de polifenoles hidrolizados, especialmente punicalaginas, los cuales pueden ser responsables por modulación de la vía NF- κ B.

Moreira *et al.*, (242), mostró que la corilagina redujo significativamente la nocicepción inducida por capsaicina, sugiriendo que este tanino puede estar

involucrado en el antagonismo del canal TRPV1, dado que la nocicepción evocada por capsaicina ocurre por activación del canal TRPV1, que favorece liberación de varios mediadores químicos (sustancia P, ácidos aspártico y glutámico, neuroquinina A, péptido relacionado con el gen de la calcitonina y NO) y proinflamatorios que contribuyen a aumentar la nocicepción a niveles central y periférico (243).

Los flavonoides inhiben la actividad de la COX-2, y se sabe que la nobiletina, flavona, resveratrol, pentaacetato de quercetina, apigenina, crisina, quercetina, galangina y kaempferol modulan la transcripción de la COX-2 en las células Caco2, por lo que desempeñan un papel en la actividad analgésica y su mecanismo es dirigirse a las prostaglandinas e inhibir la prostaglandina sintetasa y los taninos (244).

Por otro lado, Takano-Ishikawa *et al.*, (245) estudiaron 39 flavonoides y sus compuestos relacionados (comparación entre subclases), buscando una relación entre la estructura y la actividad de sus efectos inhibidores sobre la producción de prostaglandina E2 inducida por LPS en macrófagos peritoneales de rata. Descubrieron que las flavonas eran las más efectivas, seguidas de las flavanonas y los flavonoles, que eran las menos efectivas. Estos resultados sugieren que el doble enlace C2-C3 y el grupo funcional 4-oxo del anillo C son responsables de las altas actividades de inhibición. Asimismo, los flavonoides mostraron el mayor efecto inhibidor sobre la expresión del gen COX-2.

El ácido elágico (AE) y el ácido gálico (AG) pueden tener un rol importante en el efecto antinociceptivo hallado en este estudio. BenSaad y col. (195) sugieren que el ácido elágico y el ácido gálico presentes en el extracto de granada que evaluaron pueden ser los compuestos responsables de su efecto analgésico. Ghorbanzadeh *et al.*, (246), estudiaron si la vía del canal L-arginina-NO / cGMP / KATP es responsable de la antinocicepción del AE. Se sabe que el NO tiene efectos pro o antinociceptivos, según las condiciones (247).

Kawabata y colaboradores (248) mostraron que los niveles de NO aumentan en la prueba de formalina al activar la NOS en el lugar de la inyección, lo que contribuye a la inducción de respuestas nociceptivas en la segunda fase de la prueba.

El NO puede aumentar la concentración de cGMP, lo que conducirá a la activación de los canales de potasio. La apertura de estos canales induce la hiperpolarización de la membrana y reduce la despolarización y el potencial de acción. Por tanto, Ghorbanzadeh *et al.*, demostraron que el tratamiento previo con L-arginina, N^{ω} -

Nitro-L-arginina metil (L-NAME) (inhibidor no selectivo de la NOS), nitroprusiato de sodio, azul de metileno y glibenclamida, antes de la prueba de formalina, no fueron efectivos para alterar el efecto antinociceptivo de AE en la primera fase de la prueba. Demostrando que el efecto antinociceptivo de AE en esta fase no fue mediado por la activación de la vía del canal NO / GMPc / KATP.

Por otro lado, se demostró que la L-arginina y el nitroprusiato de sodio potenciaron el efecto antinociceptivo de etapa tardía, y se encontró que el efecto de EA depende de la activación de la vía L-arginina / NO / GMPc / KATP, ya que hubo una reducción significativa dependiente de la dosis en la antinocicepción periférica inducida por AE después de la administración intraplantar de L-NAME en la fase tardía de la prueba de formalina.

Cuando se aplicó solo L-NAME (100 mg) no produjo ningún cambio significativo. Por tanto, no tiene ningún efecto de hiperalgesia o antihiperalgesia, y el efecto de AE se debe en parte a la generación local de NO. En otros estudios se demostró que la administración sistémica de AE produjo claros efectos antinociceptivos dependientes de la dosis en ambas fases de la prueba de formalina, encontrando que, en la segunda fase, era más sensible a AE.

Estos resultados indicaron que los efectos analgésicos sistémicos y periféricos de AE dependen del sistema opioide, ya que el tratamiento previo con naloxona, un antagonista de los receptores opioides, revirtió la antinocicepción causada no solo por AE intraperitoneal, sino también intra plantar (145, 247, 249-252). Además, la acción analgésica del AE se ha explicado por la inhibición de la ciclooxygenasa, que sintetiza prostaglandinas en los sitios de daño celular periférico (253).

En cuanto al ácido gálico (AG), BenSaad *et al.*, (254), encontraron que el AG redujo la producción de NO en células RAW2674.7 tratadas con LPS. También se demostró que el AG inhibe la producción de PGE-2 y disminuyó de manera efectiva a IL-6 en este estudio. Todos estos efectos fueron dosis dependientes. Además, encontraron que la expresión del gen COX-2 de las células RAW264.7 no se vio afectada después del tratamiento con AG durante 24 h.

Por su parte, Santos *et al.*, (255) observaron un efecto antihiperalgésico y antinociceptivo del AG en relación a la dosis en modelos animales de nocicepción. El AG inhibió significativamente la hiperalgesia inducida por la sustancia P y la bradisinina en la pata de la rata, pero no afectó la hiperalgesia causada por la PGE o carragenina.

Además, el AG, en contraste con el fármaco de referencia (morfina), fue ineficaz en la prueba de *hot-plate* en ratones. La antinocicepción producida por AG i.p. en la prueba de formalina se invirtió significativamente con la toxina de *G. pertussis*, intracerebrovascular y por administración intratecal de bloqueadores de los canales de K⁺ tales como glibenclamida, apamina y caribotoxina, pero no por tetraetilamonio. Por el contrario, la antinocicepción de AG no se vio afectada por el tratamiento intraperitoneal con naloxona o con el precursor del NO, L-arginina, y esta acción no fue secundaria a su efecto antiinflamatorio, ni se asoció con efectos inespecíficos como la relajación muscular o sedación. Puede decirse, que el AG produce una antinocicepción sistémica, espinal y supraespinal pronunciada y dependiente de la dosis en ratones, quizás por la activación de los canales de K⁺ y por un mecanismo sensible a la toxina de *G. pertussis*.

Finalmente, en otro estudio, Trevisan *et al.*, (256) consideraron identificar al AG como un antagonista de los canales del receptor potencial transitorio anquirina 1 (TRPA1), este canal juega un papel integral en el dolor y la inflamación neurogénica a través de la activación de los nervios sensoriales tanto a nivel central como a nivel periférico (243, 257) y observando sus efectos antinociceptivos en diferentes modelos de dolor en ratones suizos. Primero, evaluaron la capacidad del AG para afectar la entrada de calcio inducida por el cinamaldehído; luego observaron la antinocicepción por administración oral de AG (3-100 mg/kg) después de la inyección intraplantar de agonistas de TRPA1 (isotiocianato de alilo, cinamaldehído o peróxido de hidrógeno) en un modelo de dolor inflamatorio (inyección de carragenina i.pl.), y un modelo de dolor neuropático (lesión por constricción crónica).

El AG redujo la entrada de calcio mediada por la activación de TRPA1, disminuyó la nocicepción causada por alilisotiocianato, cinamaldehído y peróxido de hidrógeno. La alodinia y el edema inducidos por carragenina se redujeron en gran medida con el tratamiento con AG. Además, la administración de AG también fue capaz de disminuir la alodinia mecánica y por frío en el modelo de dolor neuropático. Por lo tanto, se encontró que el AG es un antagonista de TRPA1 con propiedades antinociceptivas.

Por lo tanto, el efecto antinociceptivo del extracto utilizado en los estudios de este trabajo puede deberse a su alto contenido en este tipo de moléculas. Al respecto, se encontró en los estudios de actividad antioxidante y fenoles totales que se realizaron, que ExC2 tiene una gran cantidad de fenoles totales ($2591 \pm 0.06 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1} \text{ GAE}$).

Hay informes de contenido fenólico total de extractos de cáscara de granada en los que encontraron 166.83, 152.55 y 85.48 mg 100 g⁻¹ GAE (258) y 285-329 mg 100 g⁻¹ GAE (259) respectivamente, por lo que se puede afirmar que el extracto utilizado tiene un contenido fenólico superior a las variedades reportadas en esos estudios. Además, ExC2 tuvo una excelente capacidad antioxidante en las tres pruebas (ABTS⁺, DPPH[·] y FRAP). La actividad de ExC2 se atribuye a su capacidad de donación de hidrógeno (260).

Los resultados coinciden con Li *et al.*, (261) quienes informaron que la actividad antioxidante de los extractos metanólicos y etanólicos de cáscara de granada era mayor que aquellos extractos de pulpa en cuanto a poder reductor, por lo que concluyeron que el extracto de cáscara tiene más potencial y actividad antioxidante. Sin embargo, a pesar de la existencia de estudios previos con otros extractos de cáscara de granada (129), se recomienda realizar la separación e identificación de los compuestos de ExC2, con el fin de poder realizar su elucidación estructural para aclarar mejor el origen molecular de su efecto.

El análisis isobolográfico demostró una fuerte interacción sinérgica entre ExC2 y ASA en la antinocicepción sistémica, por lo que probablemente haya una interacción sinérgica en la que un fármaco se ha asociado a un grupo de compuestos (ExC2) con mecanismos de acción complementarios. En este contexto, ASA, como es bien sabido, produce una inhibición de la COX-2, con la consiguiente disminución de prostaglandinas. En este estudio se utilizó la DE₃₀ y no la DE₅₀ debido a que, considerando un efecto máximo del 100% como la supresión total en la prueba de formalina, ASA y ExC2 pudieron exceder una respuesta del 50% y, por tanto salirse de la escala, por lo que el cálculo de DE₅₀ no fue factible.

Por otro lado, los extractos de cáscara de granada han demostrado tener varios mecanismos de acción, como la inhibición de las ciclooxigenasas de forma no selectiva y por tanto la producción de prostaglandina E2. Estos extractos también reducen la expresión de moléculas proinflamatorias como IL-6 e IL-8, reduce la expresión de COX-2 y TRPV1, modula la vía de señalización de NF-κB, es un antagonista de los canales de TRPV1 y se sabe que estimula la vía del canal NO/GMPc /ATP K⁺, sin embargo, la totalidad de los mecanismos de acción de esta interacción merece más investigación.

El NO es un gas simple formado por un átomo de nitrógeno y un átomo de oxígeno con muchas funciones fisiológicas; en el dolor, la inflamación, el sistema inmunológico y como un vasodilatador; derivado de la L-arginina y una molécula

de oxígeno, que se convierten en una molécula de NO y una molécula de L-citrulina mediante enzimas llamadas óxido nítrico sintasas (NOS) (262). Se sabe que el NO tiene un efecto tanto antinociceptivo como pronociceptivo, dependiendo de la concentración, el tejido o la región donde se estimula su síntesis (263).

Chen y Levine (66) han confirmado que el NO tiene un papel pronociceptivo en estados de dolor inducidos por estímulos como carragenina, capsaicina, glutamato, formalina o estímulos mecánicos. Lee *et al.*, encontraron que cuatro polifenoles abundantes en la granada inhiben la expresión de NOS (240), por lo que esto da una idea del comportamiento del extracto.

En este trabajo, se sugirió que la vía L-Arginina / NO / cGMP-K⁺ está involucrada en el efecto ExC2, por lo que se llevaron a cabo los experimentos pertinentes para su comprobación. Se encontró que la L-arginina (precursor de la NOS), generó un porcentaje moderado a alto de antinocicepción (alrededor del 40%) con diferencias significativas frente al VEHÍCULO ($p < 0.05$); este resultado es contradictorio con lo reportado por Chen y Levine (66), ya que un aumento de NO generaría teóricamente hiperalgesia.

Este resultado controvertido puede explicarse asumiendo que la L-arginina puede reducir (264) o inducir (265) la hiperalgesia, dependiendo de las dosis que se administren, ya que las dosis bajas aumentan y las dosis altas inhiben la antinocicepción en la segunda fase de la prueba de formalina (248).

En este caso se utilizó una de las dosis más bajas reportadas en la literatura (100 mg/kg), por lo que se puede sugerir que el resultado se debió a la dosis, la vía de administración, la especificidad del fármaco o la farmacocinética (266). Cuando se coadministró L-arginina con la DE₅₀ de ExC2 y la combinación ExC2 -ASA, hubo un aumento en el porcentaje de antinocicepción, lo que consolida la hipótesis de que ExC2 puede estar actuando a través de la vía L-Arg / NO / cGMP.

En este estudio, L-NAME tuvo un efecto antinociceptivo (diferencias estadísticamente significativas frente a DE₅₀ de ExC2 y la combinación ExC2 -ASA). Los informes indican que L-NAME, considerado como un antagonista del NO, también se considera un agonista parcial, actuando como un sustrato que provoca una rápida inducción de la expresión génica de óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) (264, 267).

Un agonista parcial antagoniza la síntesis de NO en algunos tejidos, pero la estimula en otros (264). La estimulación de la síntesis de NO puede explicar la antinocicepción observada de L-NAME, en modelos como los utilizados en esta investigación.

Duarte y Ferreira informaron que L-NAME causa analgesia en la prueba de whirling y en la prueba de carragenina y PG2 en ratones y ratas. Descubrieron que la N^G-monometil-L-arginina (L-NMMA), otro inhibidor de la NOS, bloqueaba significativamente las acciones antinociceptivas centrales y periféricas de L-NAME, así como el azul de metileno (AM), un inhibidor de la activación de la guanilato ciclasa; en este mismo estudio el efecto del L-NAME se vió potenciado por la arginina y por un inhibidor de la fosfodiesterasa cGMP (ODQ) (264).

En el presente trabajo, al coadministrar L-NAME con la DE₅₀ de ExC2 y la combinación ExC2 -ASA, se observó un aumento en el porcentaje de nocicepción, siendo estadísticamente significativo en la DE₅₀ de ExC2 contra todos los grupos y en la combinación ExC2 -ASA (excepto contra el grupo L-NAME). Esto sugiere una participación a través de la vía L-Arg / NO / cGMP.

Es necesario que en el futuro se profundice en este mecanismo y se utilicen los antagonistas L-NMMA y AM para confirmar que L-NAME realmente está induciendo la expresión de iNOS. Es importante notar que el grupo de combinación tuvo un efecto similar a la DE₅₀ de ExC2, con una dosis mucho más baja.

Cabe señalar que ExC2 presentó antinocicepción leve (1.6-9-9%) en la fase 1 de la prueba de formalina (Tabla 12). Este efecto en la fase 1 aumentó en la combinación con ASA y este aumento se considera un efecto sumativo, ya que también contribuye al efecto global, y se ha informado que ASA tiene un efecto mínimo o nulo en la fase 1 (220, 268).

En el presente estudio se propone que ExC2 tiene este efecto en fase 1 y contribuye al efecto sinérgico debido al contenido de alcaloides que en la literatura se ha reportado, siendo la más importante la pseudopeletierina (235, 269). Esto tendrá que probarse con un antagonista específico en el futuro o aislando los alcaloides del ExC2.

El consumo de cáscara de granada y sus extractos se considera seguro (168, 213, 214). En este sentido, es necesario escalar el estudio a nivel clínico y evaluar si la potencia y eficacia de la combinación genera los beneficios derivados de la administración de esta combinación en el modelo preclínico.

Finalmente, es ampliamente conocido que la mayoría de los AINE inducen daño gastrointestinal (270, 271); por lo tanto, una estrategia para reducir las lesiones es reducir la dosis de AINE o utilizar agentes gastroprotectores al mismo tiempo (232). Relacionado con esto, se conoce el efecto gastroprotector de la cáscara de granada (200, 205, 272), por lo que la combinación estudiada cumple con ambas estrategias (dosis bajas de ASA y gastroprotección). Sin embargo, se sugiere que se realice un estudio del efecto gastroprotector de la combinación realizada, en comparación con la administración de ASA en un modelo de lesión gástrica, para demostrarlo y generar un interés genuino por la administración de la combinación en estudios clínicos.

8. CONCLUSIONES

Los extractos etanólicos de cáscara y los jugos liofilizados de tres variedades de granada de Hidalgo tienen efecto antinociceptivo en la prueba de formalina.

El extracto etanólico de granada verde, posee un efecto antinociceptivo mayor que las otras variedades, en la prueba de formalina.

El extracto de cáscara de granada verde tiene un efecto sinérgico (súper aditivo) en combinación con ASA, y su mecanismo de acción por el cual actúa la combinación está relacionado con la vía de L-Arginina/ NO/ GMPc/ ATP K⁺ así como con su alta capacidad antioxidante y cantidad de fenoles totales.

9. REFERENCIAS

1. Fontelles MIM, García CG. Mecanismos periféricos y centrales del dolor. *Reumatol Clin*. 2006;2(1):5-9.
2. Zilliox LA. Neuropathic pain. *Continuum: Lifelong Learning in Neurology*. 2017;23(2):512-32.
3. Torres Bugarin O, Ramos Ibarra ML, Zamora Pérez AL, Saenz A. Consideraciones bioéticas en la investigación del dolor en animales de experimentación. *Invest Salud*. 2003 (1).
4. Merskey H, Bogduk N. Classification of chronic pain. International Association for the Study of Pain. Seattle (WA). 1994:3-4.
5. Williamsa ACdC, Craigb KD. Updating the definition of pain. *Pain*. 2016;157:2420-3.
6. Pedrajas Navas JM, Molino González ÁM. Bases neuromédicas del dolor. *Clin Salud*. 2008;19(3):277-93.
7. Jones JB. Pathophysiology of acute pain: implications for clinical management. *Emerg Med*. 2001;13(3):288-92.
8. Julius D, Basbaum AI. Molecular mechanisms of nociception. *Nature*. 2001;413(6852):203-10.
9. Baba H, Doubell TP, Woolf CJ. Peripheral inflammation facilitates Abeta fiber-mediated synaptic input to the substantia gelatinosa of the adult rat spinal cord. *J Neurosci*. 1999;19(2):859-67.
10. Campbell JN, Raja SN, Meyer RA, Mackinnon SE. Myelinated afferents signal the hyperalgesia associated with nerve injury. *Pain*. 1988;32(1):89-94.
11. Noe CE. Pain Management for Clinicians: A Guide to Assessment and Treatment: Springer Nature; 2020.
12. Campbell JN, Meyer RA. Mechanisms of neuropathic pain. *Neuron*. 2006;52(1):77-92.
13. Jankowska E, Lundberg A. Interneurons in the spinal cord. *Trends Neurosci*. 1981;4:230-3.
14. Pak DJ, Yong RJ, Kaye AD, Urman RD. Chronification of pain: mechanisms, current understanding, and clinical implications. *Curr Pain Headache Rep*. 2018;22(2):9.
15. Perena M, Perena M, Rodrigo-Royo M, Romera E. Neuroanatomía del dolor. *Rev Soc Esp Dolor*. 2000;7(supl II):5-10.
16. Sosnowski M, Lebran P, Fodderie L. Receptores; vías nerviosas y mecanismos. Sandler A *Anest Clinics of North America México: Interamericana*. 1992;10:2.

17. Fields H, Basbaum A, Heinricher M. Textbook of pain. London, GB: Churchill Livingstone. 1999.
18. Woolf CJ. Pain: moving from symptom control toward mechanism-specific pharmacologic management. *Ann Intern Med.* 2004;140(6):441-51.
19. Costigan M, Woolf CJ. Pain: molecular mechanisms. *J Pain.* 2000;1(3):35-44.
20. Melzack R. From the gate to the neuromatrix. *Pain.* 1999;82:S121-S6.
21. Lewis T. Pain. New York: The Macmillan Company; 1942. p. 1- 192.
22. Ji R-R, Kohno T, Moore KA, Woolf CJ. Central sensitization and LTP: do pain and memory share similar mechanisms? *Trends Neurosci.* 2003;26(12):696-705.
23. Ma Q-P, Woolf CJ. Noxious stimuli induce an N-methyl-D-aspartate receptor-dependent hypersensitivity of the flexion withdrawal reflex to touch: implications for the treatment of mechanical allodynia. *Pain.* 1995;61(3):383-90.
24. Melzack R, Casey KL. Sensory, motivational, and central control determinants of pain: a new conceptual model. *Skin Senses.* 1968;1:423-43.
25. Fields HL, Levine JD. Pain—Mechanisms and management. *West J Med.* 1984;141(3):347.
26. Melzack R, Wall PD, Ty TC. Acute pain in an emergency clinic: latency of onset and descriptor patterns related to different injuries. *Pain.* 1982;14(1):33-43.
27. Yaksh TL. Calcium channels as therapeutic targets in neuropathic pain. *J Pain.* 2006;7(1):S13-S30.
28. Heinricher MM, Pertovaara A, Ossipov M, editors. Descending modulation after injury. Tenth World Congress on Pain; 2003: IASP Press.
29. García de Lorenzo y Mateos A, López Martínez J, Sánchez Castilla M. Respuesta inflamatoria sistémica: fisiopatología y mediadores. *Med Intensiva (Madr, Ed impr).* 2000;24(8):353-60.
30. Villalba Herrera EW. Inflamación I. *Rev Actual Clin Invest.* 2014;43:2261.
31. Bone RC. Immunologic dissonance: a continuing evolution in our understanding of the systemic inflammatory response syndrome (SIRS) and the multiple organ dysfunction syndrome (MODS). *Ann Intern Med.* 1996;125(8):680-7.
32. Sun W, Chen C. Roles of proton-sensing receptors in the transition from acute to chronic pain. *J Dent Res.* 2016;95(2):135-42.
33. Numazaki M, Tominaga M. Nociception and TRP channels. *CNS Neurol Disord- Drug Targets.* 2004;3(6):479-85.
34. Pérez Cruz N, Martínez Torres MdC, Díaz Mato I. Channelopathies, a novel approach to pain physiology. *Rev Cubana Pediatr.* 2017;89(3):381-94.
35. Yoneda T, Hiasa M, Nagata Y, Okui T, White FA. Acidic microenvironment and bone pain in cancer-colonized bone. *BoneKEy Rep.* 2015;4-14.
36. Yam MF, Loh YC, Tan CS, Khadijah Adam S, Abdul Manan N, Basir R. General pathways of pain sensation and the major neurotransmitters involved in pain regulation. *Int J Mol Sci.* 2018;19(8):2164.

37. Nakamura T, Yamazato M, Ohya Y. Abstract P152: Amino peptidase A in the Brain Exerts Cardiovascular Action via Degradation of Kallidin to Bradykinin. Hypertension. 2016;68(suppl_1):AP152-69.
38. Dutra RC. Kinin receptors: key regulators of autoimmunity. Autoimmun Rev. 2017;16(2):192-207.
39. Vergne-Salle P, Beaulieu P, Coutaux A, Sichère P, Perrot S, Bertin P. Aspectos fisiopatológicos del dolor en reumatología. EMC-Ap Loc. 2015;48(1):1-8.
40. England S, Heblich F, James I, Robbins J, Docherty R. Bradykinin evokes a Ca²⁺-activated chloride current in non-neuronal cells isolated from neonatal rat dorsal root ganglia. Physiol J. 2001;530(Pt 3):395.
41. Coleman R, Woodroffe A, Clark K, Toris CB, Fan S, Wang J, et al. The affinity, intrinsic activity and selectivity of a structurally novel EP2 receptor agonist at human prostanoid receptors. Br J Pharmacol. 2019;176(5):687-98.
42. Zeilhofer HU. Prostanoids in nociception and pain. Biochem Pharmacol. 2007;73(2):165-74.
43. Khalid S, Tubbs RS. Neuroanatomy and neuropsychology of pain. Cureus. 2017;9(10).
44. Wongrakpanich S, Wongrakpanich A, Melhado K, Rangaswami J. A comprehensive review of non-steroidal anti-inflammatory drug use in the elderly. A&D. 2018;9(1):143.
45. Alles SR, Smith PA. Etiology and pharmacology of neuropathic pain. Pharmacol Rev. 2018;70(2):315-47.
46. Fukui M, Nakagawa T, Minami M, Satoh M, Kaneko S. Inhibitory role of supraspinal P2X3/P2X2/3 subtypes on nociception in rats. Mol. Pain. 2006;2:1744-8069-2-19.
47. Burnstock G, Wood JN. Purinergic receptors: their role in nociception and primary afferent neurotransmission. Curr Opin Neurobiol. 1996;6(4):526-32.
48. Oliveira-Fusaro MC, Gregory NS, Kolker SJ, Rasmussen L, Allen L-AH, Sluka KA. P2X4 Receptors on Muscle Macrophages Are Required for Development of Hyperalgesia in an Animal Model of Activity-Induced Muscle Pain. Mol Neurobiol. 2020:1-13.
49. Taylor C, Muller M. ATP evokes Ca²⁺ signals in cultured foetal human cortical astrocytes entirely through G protein-coupled P2Y receptors. J Neurochem. 2017;142(6):876-85.
50. Martins D. Serotonin and nociception: from nociceptive transduction at the periphery to pain modulation from the brain. The Serotonin System: Elsevier; 2019. p. 203-24.
51. Cortes-Altamirano JL, Olmos-Hernandez A, Jaime HB, Carrillo-Mora P, Bandala C, Reyes-Long S, et al. 5-HT₁, 5-HT₂, 5-HT₃ and 5-HT₇ Receptors and their

Role in the Modulation of Pain Response in the Central Nervous System. *Curr Neuropharm.* 2018;16(2):210-21.

52. Dawson L, Djali S, Gonzales C, Vinegra M, Zaleska M. Characterization of transient focal ischemia-induced increases in extracellular glutamate and aspartate in spontaneously hypertensive rats. *Brain Res Bull.* 2000;53(6):767-76.

53. Ozdemir E. The pathophysiological role of serotonin receptor systems in opioid analgesia and tolerance. *Int J Basic Clin Pharmacol.* 2017;6:217-28.

54. Plassat J, Amlaiky N, Hen R. Molecular cloning of a mammalian serotonin receptor that activates adenylate cyclase. *Mol Pharmacol.* 1993;44(2):229-36.

55. Obara I, Telezhkin V, Alrashdi I, Chazot PL. Histamine, histamine receptors, and neuropathic pain relief. *Br J Pharmacol.* 2020;177(3):580-99.

56. Nakagawa K, Mochizuki H, Koyama S, Tanaka S, Sadato N, Kakigi R. A transcranial direct current stimulation over the sensorimotor cortex modulates the itch sensation induced by histamine. *Clin Neurophysiol.* 2016;127(1):827-32.

57. Mobarakeh JI, Takahashi K, Sakurada S, Nishino S, Watanabe H, Kato M, et al. Enhanced antinociception by intracerebroventricularly administered orexin A in histamine H1 or H2 receptor gene knockout mice. *Pain.* 2005;118(1-2):254-62.

58. Giardina G, Gagliardi S, Martinelli M. Antagonists at the neurokinin receptors--recent patent literature. *IDrugs.* 2003;6(8):758-72.

59. Vergnolle N, Bunnett N, Sharkey K, Brussee V, Compton S, Grady E, et al. Proteinase-activated receptor-2 and hyperalgesia: a novel pain pathway. *Nat Med.* 2001;7(7):821-6.

60. Kleczkowska P, Nowicka K, Bujalska-Zadrozny M, Hermans E. Neurokinin-1 receptor-based bivalent drugs in pain management: The journey to nowhere?. *Pharmacol Ther.* 2019;196:44-58.

61. López Jaramillo P. Óxido nítrico y dolor. *MedUNAB.* 2001;4(10):31-7.

62. Cury Y, Picolo G, Gutierrez VP, Ferreira SH. Pain and analgesia: The dual effect of nitric oxide in the nociceptive system. *Nitric Oxide.* 2011;25(3):243-54.

63. Holthusen H, Arndt JO. Nitric oxide evokes pain in humans on intracutaneous injection. *Neurosci Lett.* 1994;165(1-2):71-4.

64. Ferreira SH, Duarte I, Lorenzetti BB. The molecular mechanism of action of peripheral morphine analgesia: stimulation of the cGMP system via nitric oxide release. *Eur J Pharmacol.* 1991;201(1):121-2.

65. Duarte ID, Ferreira SH. The molecular mechanism of central analgesia induced by morphine or carbachol and the L-arginine-nitric oxide-cGMP pathway. *Eur J Pharmacol.* 1992;221(1):171-4.

66. Chen X, Levine JD. NOS inhibitor antagonism of PGE2-induced mechanical sensitization of cutaneous C-fiber nociceptors in the rat. *J Neurophysiol.* 1999;81(3):963-6.

67. Luo ZD, Cizkova D. The role of nitric oxide in nociception. *Curr Rev Pain.* 2000;4(6):459-66.
68. Oliveira CMBd, Sakata RK, Issy AM, Gerola LR, Salomão R. Citocinas y dolor. *Rev Bras Anest.* 2011;61(2):260-5.
69. Cook AD, Christensen AD, Tewari D, McMahon SB, Hamilton JA. Immune cytokines and their receptors in inflammatory pain. *Trends Immunol.* 2018;39(3):240-55.
70. Lee K, Kim YJ, Choi LM, Choi S, Nam H, Ko HY, et al. Human salivary gland cells express bradykinin receptors that modulate the expression of proinflammatory cytokines. *Eur J Oral Sci.* 2017;125(1):18-27.
71. Lewin GR, Rueff A, Mendell LM. Peripheral and central mechanisms of NGF-induced hyperalgesia. *Eur J Neurosci.* 1994;6(12):1903-12.
72. Malik-Hall M, Dina OA, Levine JD. Primary afferent nociceptor mechanisms mediating NGF-induced mechanical hyperalgesia. *Eur J Neurosci.* 2005;21(12):3387-94.
73. Mannion R, Costigan M, Decosterd I, Amaya F, Ma Q-P, Holstege J, et al. Neurotrophins: peripherally and centrally acting modulators of tactile stimulus-induced inflammatory pain hypersensitivity. *Proc Natl Acad Sci.* 1999;96(16):9385-90.
74. Mouraux A, Plaghki L, Le Bars D. Fisiología del dolor: mecanismos centrales y controles. *EMC Anest-Reanim.* 2018;44(4):1-22.
75. Colloca L, Ludman T, Bouhassira D, Baron R, Dickenson AH, Yarnitsky D, et al. Neuropathic pain. *Nat Rev Dis Primers.* 2017;3(1):1-19.
76. Bernal DS, Tabasco MM, Riera MH, Pedrola MS. Etiología y manejo de la neuropatía diabética dolorosa. *Rev de la Soc Española del Dolor.* 2010;17(6):286-96.
77. Carr DB, Goudas, LC. Acute Pain *Lancet.* 1999;353(9169):2051-8.
78. Muñoz J. Manual de dolor agudo postoperatorio: Ergon Madrid; 2010.
79. Prieto J. Antiinflamatorios No Esteroideos (AINEs). *Cient Dent.* 2007;4(3):203-12.
80. Rodríguez MF. Analgésicos antipiréticos y antiinflamatorios no esteroideos. *Medicine.* 1998;78105:4891-907
81. Foley M. Evaluación de la escala analgésica de la OMS en su 20° aniversario. 2006.
82. Bistre Cohen S. Antiinflamatorios no Esteroideos Indicaciones de los analgésicos. *Rev Mex del Dolor.* 2007;1(1).
83. Chaverri F. Antiinflamatorios No Esteroidales Ciclooxygenasa (COX) Selectivos. Efectividad y seguridad clínica: Más allá de la COX Centro de Inf De Medicamentos Fac Farmacia Univ Costa Rica. 2004.
84. Pradilla OE. Ciclooxygenasa 3: La nueva iso-enzima en la familia. *MedUNAB.* 2004;7(21):181-4.

85. Arif H, Aggarwal S. Salicylic Acid (Aspirin): StatPearls Publishing, Treasure Island (FL); 2020 2020.
86. Montinari MR, Minelli S, De Caterina R. The first 3500 years of aspirin history from its roots—A concise summary. *Vasc Pharmacol.* 2019;113:1-8.
87. Aspirin Monograph for Professionals [Internet]. American Society of Health-System Pharmacists,. 2020 [cited 03/03/20]. Available from: <https://www.drugs.com/monograph/aspirin.html>
88. Jeffreys D. Aspirin: The Extraordinary Story of a Wonder Drug: Bloomsbury Publishing; 2010.
89. PubChem Database. Aspirin, CID=2244. [Internet]. National Center for Biotechnology Information. [cited 03/03/2020]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Aspirin>
90. Christiansen M, Grove EL, Hvas A-M, editors. Contemporary Clinical Use of Aspirin: Mechanisms of Action, Current Concepts, Unresolved Questions, and Future Perspectives. *Semin Thromb Hemost*; 2021: Thieme Medical Publishers, Inc.
91. Handa O, Takayama S, Mukai R, Suyama Y, Majima A, Fukui A, et al. A review of the mechanism and prophylaxis of acetyl salicylic acid-induced injury of the small intestine. *Free Radic Res.* 2018;52(11-12):1266-70.
92. Kosinski P, Sarzynska-Nowacka U, Fiolna M, Wielgos M. The practical use of acetylsalicylic acid in the era of the ASPRE trial. Update and literature review. *Ginekologia Pol.* 2018;89(2):107-11.
93. Mount M, Toltzis P. 50 Years Ago in The Journal of Pediatrics: Aspirin and Reye Syndrome. *J Pediatrics.* 2020;222:192.
94. Blanca-Lopez N, Perez-Alzate D, Canto G, Blanca M. Practical approach to the treatment of NSAID hypersensitivity. *Expert Rev Clin Immunol.* 2017;13(11):1017-27.
95. Boyd EM. The acute oral toxicity of acetylsalicylic acid. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1959;1(3):229-39.
96. Kristensen DM, Mazaud-Guittot S, Gaudriault P, Lesné L, Serrano T, Main KM, et al. Analgesic use—prevalence, biomonitoring and endocrine and reproductive effects. *Nat Rev Endocrinol.* 2016;12(7):381-93.
97. Patrignani P, Patrono C. Cyclooxygenase inhibitors: from pharmacology to clinical read-outs. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids.* 2015;1851(4):422-32.
98. McEvoy L, Carr DF, Pirmohamed M. Pharmacogenomics of NSAID-induced upper gastrointestinal toxicity. *Front Pharmacol.* 2021;12:1302.
99. Tafur-Betancourt LA. El mundo oculto de las interacciones farmacológicas en anestesia. *Rev Colomb de Anestesiología.* 2017;45(3):216-23.
100. Ritter JM, Flower RJ, Henderson G, Loke YK, MacEwan D, Rang HP. Rang Y Dale. *Farmacología*: Elsevier; 2020.

101. Lohr JW, Willsky GR, Acara MA. Renal drug metabolism. *Pharmacol Rev.* 1998;50(1):107-42.
102. Tallarida RJ. Drug synergism and dose-effect data analysis: Chapman and Hall/CRC; 2000.
103. Tallarida RJ. Drug synergism: its detection and applications. *J Pharmacol Exp Ther.* 2001;298(3):865-72.
104. Tallarida RJ. An overview of drug combination analysis with isobolograms. *J Pharmacol Exp Ther.* 2006;319(1):1-7.
105. Tallarida RJ. Statistical analysis of drug combinations for synergism. *Pain.* 1992;49(1):93-7.
106. Loewe S. Die quantitativen probleme der pharmakologie. *Ergeb Physiol.* 1928;27(1):47-187.
107. Tallarida RJ. Drug combinations: tests and analysis with isoboles. *Curr Protoc Pharmacol.* 2016;72(1):9.19. 1-9..
108. Tallarida RJ. The interaction index: a measure of drug synergism. *Pain.* 2002;98(1-2):163-8.
109. Tallarida RJ. Revisiting the isobole and related quantitative methods for assessing drug synergism. *J Pharmacol Exp Ther.* 2012;342(1):2-8.
110. Tallarida RJ, Jacob LS. The dose—Response relation in pharmacology: Springer Science & Business Media; 2012.
111. Botti C, Prat L, Carrasco O, Loannidis D, Franck N, Osses D. El Granado (*Punica granatum* L.). Agronómicas SC, editor. Santiago de Chile: Facultad de Ciencias Agronómicas U de Chile; 2002. 50-6 p.
112. ITIS Standard Report Page: *Punica granatum* [Internet]. Integrated Taxonomic Information System. 2019 [cited 04/02/20]. Available from: https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=27278#null
113. Stover E, Mercure EW. The pomegranate: a new look at the fruit of paradise. *HortScience.* 2007;42(5):1088-92.
114. Graham SA, Hall J, Sytsma K, Shi S-H. Phylogenetic analysis of the Lythraceae based on four gene regions and morphology. *Int J Plant Sci.* 2005;166(6):995-1017.
115. Shilkina I. On the xylem anatomy of the genus *Punica* L. *Bot Zh.* 1973;58:1628-30.
116. Kosenko V. Palynomorphology of representatives of the family Punicaceae. *Bot Zh.* 1985.
117. Guerrero-Solano JA, Jaramillo-Morales OA, Jiménez-Cabrera T, Urrutia-Hernández TA, Chehue-Romero A, Olvera-Hernández EG, et al. *Punica protopunica* Balf., the Forgotten Sister of the Common Pomegranate (*Punica granatum* L.): Features and Medicinal Properties—A Review. *Plants.* 2020;9(9):1214.

118. Bouroncle Mc Evoy G. Diálogo entre masones: La Granada [Internet]. masones De, editor. Perú: Bouroncle Mc Evoy, Gerardo. 2016. [cited 2019]. Available from: <http://dialogo-entre-masones.blogspot.com/2016/12/la-granada.html>
119. Heber D, Schulman RN, Seeram NP. Pomegranates: ancient roots to modern medicine: CRC Press; 2006.
120. Morton JF, Dowling CF. Fruits of warm climates: JF Morton Miami, FL; 1987.
121. Mars M. Pomegranate plant material: Genetic resources and breeding, a review. Opt Mediterr S A. 2000;42:55-62.
122. Seelig R. Fruit & vegetable facts & pointers: Pomegranates. United Fresh Fruit Association, Washington, DC. 1970.
123. Labbe M, Ulloa PA, Lopez F, Saenz C, Pena A, Salazar FN. Characterization of chemical compositions and bioactive compounds in juices from pomegranates ('Wonderful', 'Chaca' and 'Codpa') at different maturity stages. Chil J Agric Res. 2016;76(4):479-86.
124. Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural. Granada, sabor y salud en cada fruta: Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural, Gobierno de México,; 2020 [cited 2021 02/08/21]. Available from: <https://www.gob.mx/agricultura/articulos/granda-sabor-y-salud-en-cada-fruta>.
125. INEGI. Cultivos Perennes de México: VII Censo Agropecuario, 1991: INEGI,; 1992 [cited 2021 03/08/21]. Available from: http://internet.contenidos.inegi.org.mx/contenidos/productos/prod_serv/contenidos/espanol/bvinegi/productos/historicos/380/702825118280/702825118280_15.pdf.
126. SEDAGROH. Granada|SEDAGROH: SEDAGROH,; 2019. Available from: http://indicadores.sedagrohidalgo.site/compendio/Agricola/index.php?id_producto=53.
127. Novartis. Tabla de Composición de Alimentos España: Novartis Medical Nutrition; 1996 [cited 2020 14/02/20]. Available from: <https://farmacia.ugr.es/nutrire/tabla/pdf/tabla.pdf>.
128. Mirdehghan SH, Rahemi M. Seasonal changes of mineral nutrients and phenolics in pomegranate (*Punica granatum* L.) fruit. Sci Hort. 2007;111(2):120-7.
129. Akhtar S, Ismail T, Fraternali D, Sestili P. Pomegranate peel and peel extracts: Chemistry and food features. Food Chem. 2015;174:417-25.
130. Gil MI, Tomás-Barberán FA, Hess-Pierce B, Holcroft DM, Kader AA. Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing. J Agr Food Chem. 2000;48(10):4581-9.
131. Bhandari PR. Pomegranate (*Punica granatum* L). Ancient seeds for modern cure? Review of potential therapeutic applications. Int J Nut Pharmacol Neurol Dis. 2012;2(3):171.

132. Seeram NP, Heber D. Purifications of pomegranate ellagitannins and their uses thereof. Google Patents; 2011.
133. Al-Muammar MN, Khan F. Obesity: The preventive role of the pomegranate (*Punica granatum*). *Nutrition*. 2012 6;28(6):595-604.
134. Nainwani R, Singh D, Soni PK, Gupta A, Gautam R. Chemical constituents of various parts of *Punica granatum* and their anti-inflammatory activity: a review. *Asian J Pharm Res Dev*. 2013:48-53.
135. Carvalho Filho JM. Pomegranate seed oil (*Punica granatum* L.): a source of punicic acid (conjugated α -linolenic acid). *J Human Nutri Food Sci*. 2014;2(1):1-11.
136. Mousavinejad G, Emam-Djomeh Z, Rezaei K, Khodaparast MHH. Identification and quantification of phenolic compounds and their effects on antioxidant activity in pomegranate juices of eight Iranian cultivars. *Food Chem*. 2009;115(4):1274-8.
137. Fischer UA, Carle R, Kammerer DR. Identification and quantification of phenolic compounds from pomegranate (*Punica granatum* L.) peel, mesocarp, aril and differently produced juices by HPLC-DAD-ESI/MSn. *Food Chem*. 2011;127(2):807-21.
138. Poyrazoğlu E, Gökmen V, Artık N. Organic acids and phenolic compounds in pomegranates (*Punica granatum* L.) grown in Turkey. *J Food Comp Anal*. 2002;15(5):567-75.
139. Lansky E, Shubert S, Neeman I. Pharmacological and therapeutic properties of pomegranate. Martínez-Nicolás JJ(ed), Martínez-Tomé J, ed *Production, processing and marketing of pomegranate in the Mediterranean region: Advances in research and technology* Zaragoza: CIHEAM. 2000:231-5.
140. Mérat F, De Lens A. *Dictionnaire universel de matière médicale et thérapeutique....* Bruxelles, Société belge de Librairie, Hauman et Comp. 1838.
141. Aguilar A, Camacho JR, Chino S, Jácquez P, López ME. *Herbario Medicinal del Instituto Mexicano del Seguro Social. Información Etnobotánica*, México. 1994:107-9.
142. Tanveer A, Farooq U, Akram K, Hayat Z, Shafi A, Nazar H, et al. Pomegranate extracts: A natural preventive measure against spoilage and pathogenic microorganisms. *Food Rev Int*. 2015;31(1):29-51.
143. Amin G. *Popular medical plants of Iran*. Farhang Publication, Tehran. 1991:51-2.
144. Cáceres A, Girón LM, Alvarado SR, Torres MF. Screening of antimicrobial activity of plants popularly used in Guatemala for the treatment of dermatomucosal diseases. *J Ethnopharm*. 1987;20(3):223-37.
145. King H. *Eve's herbs: a history of contraception and abortion in the West*. Medical history. 1998;42(3):412-13.

146. Prioreschi P. Contraception and abortion in the Greco-Roman world. *Vesalius*. 1995;1(2):77-87.
147. Ma K, Du M, Liao M, Chen S, Yin G, Liu Q, et al. Evaluation of wound healing effect of punica granatum L Peel extract on deep second-degree burns in rats. *Trop J Pharm Res*. 2015;14(1):73-8.
148. Jain S, Puri H. Ethnomedicinal plants of jaunsar-bawar hills, uttar pradesh, india. *J Ethnopharm*. 1984;12(2):213-22.
149. Villavicencio Nieto MÁ, Pérez Escandón BE. Plantas medicinales del estado de Hidalgo: Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo; 2013.
150. Das AK, Mandal SC, Banerjee SK, Sinha S, Saha B, Pal M. Studies on the hypoglycaemic activity of Punica granatum seed in streptozotocin induced diabetic rats. *Phytother Res*. 2001;15(7):628-9.
151. Esmailzadeh A, Tahbaz F, Gaieni I, Alavi-Majd H, Azadbakht L. Concentrated pomegranate juice improves lipid profiles in diabetic patients with hyperlipidemia. *J Med Food*. 2004;7(3):305-8.
152. Hontecillas R, O'Shea M, Einerhand A, Diguado M, Bassaganya-Riera J. Activation of PPAR γ and α by punicic acid ameliorates glucose tolerance and suppresses obesity-related inflammation. *J Am College Nutr*. 2009;28(2):184-95.
153. Huang TH, Peng G, Kota BP, Li GQ, Yamahara J, Roufogalis BD, et al. Anti-diabetic action of Punica granatum flower extract: activation of PPAR- γ and identification of an active component. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2005;207(2):160-9.
154. Huang TH, Yang Q, Harada M, Li GQ, Yamahara J, Roufogalis BD, et al. Pomegranate flower extract diminishes cardiac fibrosis in Zucker diabetic fatty rats: modulation of cardiac endothelin-1 and nuclear factor-kappaB pathways. *J Cardiovasc Pharm*. 2005;46(6):856-62.
155. Karasik A. Glycaemic control is essential for effective cardiovascular risk reduction across the type 2 diabetes continuum. *Ann Med*. 2005;37(4):250-8.
156. Parmar HS, Kar A. Antidiabetic potential of Citrus sinensis and Punica granatum peel extracts in alloxan treated male mice. *Biofactors*. 2007;31(1):17-24.
157. Rosenblat M, Hayek T, Aviram M. Anti-oxidative effects of pomegranate juice (PJ) consumption by diabetic patients on serum and on macrophages. *Atherosclerosis*. 2006;187(2):363-71.
158. Bagri P, Ali M, Aeri V, Bhowmik M, Sultana S. Antidiabetic effect of Punica granatum flowers: effect on hyperlipidemia, pancreatic cells lipid peroxidation and antioxidant enzymes in experimental diabetes. *Food Chem Toxicol*. 2009;47(1):50-4.
159. Hossin FLA. Effect of pomegranate (Punica granatum) peels and it's extract on obese hypercholesterolemic rats. *Pak J Nutr*. 2009;8(8):1251-7.
160. McFarlin BK, Strohacker KA, Kueht ML. Pomegranate seed oil consumption during a period of high-fat feeding reduces weight gain and reduces type 2 diabetes risk in CD-1 mice. *Brit J Nutr*. 2008;102(1):54-9.

161. Mirmiran P, Fazeli MR, Asghari G, Shafiee A, Azizi F. Effect of pomegranate seed oil on hyperlipidaemic subjects: a double-blind placebo-controlled clinical trial. *Brit J Nutr.* 2010;104(3):402-6.
162. Yamasaki M, Kitagawa T, Koyanagi N, Chujo H, Maeda H, Kohno-Murase J, et al. Dietary effect of pomegranate seed oil on immune function and lipid metabolism in mice. *Nutrition.* 2006;22(1):54-9.
163. Aviram M, Dornfeld L. Pomegranate juice consumption inhibits serum angiotensin converting enzyme activity and reduces systolic blood pressure. *Atherosclerosis.* 2001;158(1):195-8.
164. Aviram M, Rosenblat M, Gaitini D, Nitecki S, Hoffman A, Dornfeld L, et al. Pomegranate juice consumption for 3 years by patients with carotid artery stenosis reduces common carotid intima-media thickness, blood pressure and LDL oxidation. *Clin Nutr.* 2004;23(3):423-33.
165. Mohan M, Waghulde H, Kasture S. Effect of pomegranate juice on Angiotensin II-induced hypertension in diabetic wistar rats. *Phytother Res.* 2010;24(S2):S196-S203.
166. Stowe CB. The effects of pomegranate juice consumption on blood pressure and cardiovascular health. *Comp Ther Clin Prac.* 2011;17(2):113-5.
167. Wang Z, Chen Y. Antihypertensive Effect of Pomegranate Polyphenols in Spontaneously Hypertensive Rats. *Chin Pharm.* 2016;19(2):255-8.
168. Cerdá B, Cerón JJ, Tomás-Barberán FA, Espín JC. Repeated oral administration of high doses of the pomegranate ellagitannin punicalagin to rats for 37 days is not toxic. *J Agric Food Chem.* 2003;51(11):3493-501.
169. Lei F, Zhang X, Wang W, Xing D, Xie W, Su H, et al. Evidence of anti-obesity effects of the pomegranate leaf extract in high-fat diet induced obese mice. *International J Obesity.* 2007;31(6):1023.
170. Al-Jarallah A, Igdoura F, Zhang Y, Tenedero CB, White EJ, MacDonald ME, et al. The effect of pomegranate extract on coronary artery atherosclerosis in SR-BI/APOE double knockout mice. *Atherosclerosis.* 2013;228(1):80-9.
171. Betanzos-Cabrera G, Guerrero-Solano J, Martínez-Pérez M, Calderón-Ramos Z, Belefant-Miller H, Cancino-Diaz JC. Pomegranate juice increases levels of paraoxonase1 (PON1) expression and enzymatic activity in streptozotocin-induced diabetic mice fed with a high-fat diet. *Food Res Int.* 2011;44(5):1381-5.
172. Azadzo KM, Schulman RN, Aviram M, Siroky MB. Oxidative stress in arteriogenic erectile dysfunction: prophylactic role of antioxidants. *J Urology.* 2005;174(1):386-93.
173. Ismail T, Sestili P, Akhtar S. Pomegranate peel and fruit extracts: a review of potential anti-inflammatory and anti-infective effects. *J Ethnopharm.* 2012;143(2):397-405.

174. Neyrinck AM, Van Hée VF, Bindels LB, De Backer F, Cani PD, Delzenne NM. Polyphenol-rich extract of pomegranate peel alleviates tissue inflammation and hypercholesterolaemia in high-fat diet-induced obese mice: potential implication of the gut microbiota. *Brit J Nutr.* 2013;109(5):802-9.
175. Hashemi M, Kelishadi R, Hashemipour M, Zakerameli A, Khavarian N, Ghatrehsamani S, et al. Acute and long-term effects of grape and pomegranate juice consumption on vascular reactivity in paediatric metabolic syndrome. *Cardiol Young.* 2010;20(1):73-7.
176. Medjakovic S, Jungbauer A. Pomegranate: a fruit that ameliorates metabolic syndrome. *Food Funct.* 2013;4(1):19-39.
177. Wang J, Rong X, Um IS, Yamahara J, Li Y. 55-week treatment of mice with the unani and ayurvedic medicine pomegranate flower ameliorates ageing-associated insulin resistance and skin abnormalities. *Evid Based Complementary Altern Med.* 2012;2012:350125.
178. Adams LS, Seeram NP, Aggarwal BB, Takada Y, Sand D, Heber D. Pomegranate juice, total pomegranate ellagitannins, and punicalagin suppress inflammatory cell signaling in colon cancer cells. *J Agric Food Chem.* 2006;54(3):980-5.
179. Deng Y, Li Y, Zheng T, Hu M, Ye T, Xie Y, et al. The Extract from Punica Granatum (Pomegranate) Leaves Promotes Apoptosis and Impairs Metastasis in Prostate Cancer Cells. *J Sichuan Univ Med Sci Ed.* 2018;48(1):8-12.
180. Hora JJ, Maydew ER, Lansky EP, Dwivedi C. Chemopreventive effects of pomegranate seed oil on skin tumor development in CD1 mice. *J Med Food.* 2003;6(3):157-61.
181. Khan N, Hadi N, Afaq F, Syed DN, Kweon M-H, Mukhtar H. Pomegranate fruit extract inhibits prosurvival pathways in human A549 lung carcinoma cells and tumor growth in athymic nude mice. *Carcinogenesis.* 2007;28(1):163-73.
182. Kim ND, Mehta R, Yu W, Neeman I, Livney T, Amichay A, et al. Chemopreventive and adjuvant therapeutic potential of pomegranate (*Punica granatum*) for human breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2002;71(3):203-17.
183. Malik A, Afaq F, Sarfaraz S, Adhami VM, Syed DN, Mukhtar H. Pomegranate fruit juice for chemoprevention and chemotherapy of prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci.* 2005;102(41):14813-8.
184. Mehta R, Lansky E. Breast cancer chemopreventive properties of pomegranate (*Punica granatum*) fruit extracts in a mouse mammary organ culture. *Eur J Cancer Prev.* 2004;13(4):345-8.
185. Pacheco-Palencia LA, Noratto G, Hingorani L, Talcott ST, Mertens-Talcott SU. Protective effects of standardized pomegranate (*Punica granatum* L.) polyphenolic extract in ultraviolet-irradiated human skin fibroblasts. *J Agric Food Chem.* 2008;56(18):8434-41.

186. Miguel MG, Neves MA, Antunes MD. Pomegranate (*Punica granatum* L.): A medicinal plant with myriad biological properties-A short review. *J Med Plant Res.* 2010;4(25):2836-47.
187. Silva N, Fernandes Júnior A. Biological properties of medicinal plants: a review of their antimicrobial activity. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis.* 2010;16(3):402-13.
188. Adiga S, Tomar P, Rajput R. Effect of *Punica granatum* peel aqueous extract on normal and dexamethasone suppressed wound healing in wistar rats. *Int J Pharm Sci Rev Res.* 2010;5(2):34-7.
189. Abdollahzadeh S, Mashouf R, Mortazavi H, Moghaddam M, Roozbahani N, Vahedi M. Antibacterial and antifungal activities of *Punica granatum* peel extracts against oral pathogens. *J Dent.* 2011;8(1):1.
190. Bhadbhade SJ, Acharya AB, Rodrigues SV, Thakur SL. The antiplaque efficacy of pomegranate mouthrinse. *Quint Inter.* 2011;42(1).
191. Guo C, Wei J, Yang J, Xu J, Pang W, Jiang Y. Pomegranate juice is potentially better than apple juice in improving antioxidant function in elderly subjects. *Nut Res.* 2008;28(2):72-7.
192. Rajan S, Ravi J, Suresh A, Guru S. Hidden secrets of *Punica granatum* use and its effects on oral health: A short review. *J Orofac Res.* 2013;3(1):38-41.
193. González-Trujano ME, Pellicer F, Mena P, Moreno DA, García-Viguera C. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of a pomegranate (*Punica granatum* L.) extract rich in ellagitannins. *Int J Food Sci Nutr.* 2015;66(4):395-9.
194. Bensaad L, Hwi KK, Alsereti M, Shahimi M. Evaluation of the analgesic effects of Libyan fresh pomegranate fruit of *Punica granatum*. *PharmaNutrition.* 2014;2(3):108-9.
195. BenSaad LA, Kim KH. Phytochemical constituents and analgesic activity of ethyl acetate fraction of *Punicagranatum* L (Punicaceae). *Trop J Pharm Res.* 2015;14(1):87-93.
196. Zeghad N, Madi A, Helmi S, Belkhiri A. In vivo analgesic activity and safety assessment of *Vitis vinifera* L and *Punica granatum* L fruits extracts. *Trop J Pharm Res.* 2016;15(9):1915-21.
197. Jain V, Pareek A, Bhardwaj YR, Singh N. Attenuating effect of standardized fruit extract of *punica granatum* L in rat model of tibial and sural nerve transection induced neuropathic pain. *BMC Comp Altern Med.* 2013;13(1):274.
198. Rafraf M, Hemmati S, Jafarabadi MA, Moghaddam A, Haghighian MK. Pomegranate (*Punica Granatum* L.) Peel Hydroalcoholic Extract Supplementation Reduces Pain and Improves Clinical Symptoms of Knee Osteoarthritis: A Randomized Double-Blind Placebo Controlled Study. *Iran Red Crescent Med J.* 2017;19(1).

199. Karwasra R, Singh S, Sharma D, Sharma S, Sharma N, Khanna K. Pomegranate supplementation attenuates inflammation, joint dysfunction via inhibition of NF- κ B signaling pathway in experimental models of rheumatoid arthritis. *J Food Biochem*. 2019:e12959.
200. Labib RM, El-Ahmady SH. Antinociceptive, anti-gastric ulcerogenic and anti-inflammatory activities of standardized egyptian pomegranate peel extract. *J Appl Pharm Sci*. 2015;5(1):48-51.
201. Ouachrif A, Khalki H, Chaib S, Mountassir M, Aboufatima R, Farouk L, et al. Comparative study of the anti-inflammatory and antinociceptive effects of two varieties of *Punica granatum*. *Pharm Biol*. 2012;50(4):429-38.
202. Olapour S, Najafzadeh H. Evaluation Analgesic, Anti-Inflammatory and Antiepileptic Effect of Hydro Alcoholic Peel Extract of" *Punica granatum* (pomegranate)". *Asian J Med Sci*. 2010;2(6):266-70.
203. Mo J, Panichayupakaranant P, Kaewnopparat N, Nitiruangjaras A, Reanmongkol W. Topical anti-inflammatory and analgesic activities of standardized pomegranate rind extract in comparison with its marker compound ellagic acid in vivo. *J Ethnopharm*. 2013;148(3):901-8.
204. Raafat K, Samy W. Amelioration of diabetes and painful diabetic neuropathy by *Punica granatum* L. Extract and its spray dried biopolymeric dispersions. *Evid Based Complementary Altern Med*. 2014;2014:1-12.
205. Ajaikumar K, Asheef M, Babu B, Padikkala J. The inhibition of gastric mucosal injury by *Punica granatum* L.(pomegranate) methanolic extract. *J Ethnopharm*. 2005;96(1-2):171-6.
206. Kumar S, Maheshwari KK, Singh V. Central nervous system activity of acute administration of ethanol extract of *Punica granatum* L. seeds in mice. *Indian J Exp Biol*. 2008;46:811-16.
207. Ferreira LM, Sari MHM, Cervi VF, Gehrcke M, Barbieri AV, Zborowski VA, et al. Pomegranate seed oil nanoemulsions improve the photostability and in vivo antinociceptive effect of a non-steroidal anti-inflammatory drug. *Colloids Surf B: Biointerfaces*. 2016;144:214-21.
208. Malek Z, Dara SM, Jahromy MH. Antinociceptive effects of pomegranate (*Punica granatum* L.) juice and seed extracts on acute corneal pain in mice. *World J Neurosci*. 2014;4(02):99-105.
209. Chakraborty GS. Analgesic activity of various extracts of *Punica granatum* (Linn) flowers. *Int J Green Pharm*. 2008;2(3):45-9.
210. Sarker M, Das SC, Saha SK, Al Mahmud Z, Bachar SC. Analgesic and anti-inflammatory activities of flower extracts of *Punica granatum* Linn.(Punicaceae). *J Appl Pharm Sci*. 2012;2(4):133-36.

211. Salwe KJ, Sachdev D. Evaluation of Antinociceptive and Anti-inflammatory Effect of the Hydroalcoholic Extracts of Leaves and Fruit Peel of *P. Granatum* in Experimental animals. *Asian J Pharm Clin Res.* 2014;7(2):137-41.
212. Patel C, Dadhaniya P, Hingorani L, Soni M. Safety assessment of pomegranate fruit extract: acute and subchronic toxicity studies. *Food Chem Toxicol.* 2008;46(8):2728-35.
213. El Deeb KS, Eid HH, Ali ZY, Shams MM, Elfiky AM. Bioassay-guided fractionation and identification of antidiabetic compounds from the rind of *Punica Granatum* Var. *nana*. *Nat Prod Res.* 2019:1-4.
214. Gautam RK, Sharma S, Sharma K, Gupta G. Evaluation of Antiarthritic Activity of Butanol Fraction of *Punica granatum* Linn. Rind Extract Against Freund's Complete Adjuvant-Induced Arthritis in Rats. *J Environ Path Toxicol Oncology.* 2018;37(1).
215. Vidal A, Fallarero A, Peña BR, Medina ME, Gra B, Rivera F, et al. Studies on the toxicity of *Punica granatum* L.(Punicaceae) whole fruit extracts. *J Ethnopharm.* 2003;89(2-3):295-300.
216. Kulkarni AP, Mahal H, Kapoor S, Aradhya S. In vitro studies on the binding, antioxidant, and cytotoxic actions of punicalagin. *J Agric Food Chem.* 2007;55(4):1491-500.
217. Álvarez-Cervantes P, Izquierdo-Vega JA, Morán-León J, Guerrero-Solano JA, García-Pérez BE, Cancino-Díaz JC, et al. Subacute and subchronic toxicity of microencapsulated pomegranate juice in rats and mice. *Toxicol Res.* 2021.
218. Zimmermann M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain.* 1983;16(2):109-10.
219. Secretaría de Agricultura G, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. *Diario Oficial de la Federación.* 2001;75:113-60.
220. Wheeler-Aceto H, Cowan A. Standardization of the rat paw formalin test for the evaluation of analgesics. *Psychopharmacology.* 1991;104(1):35-44.
221. Purves RD. Optimum numerical integration methods for estimation of area-under-the-curve (AUC) and area-under-the-moment-curve (AUMC). *J Pharm Biopharm.* 1992;20(3):211-26.
222. Zakaria ZA, Sulaiman MR, Somchit MN, Jais AMM, Ali DI. The effects of L-arginine, D-arginine, L-name and methylene blue on *Channa striatus*-induced peripheral antinociception in mice. *J Pharm Pharm Sci.* 2005;8(2):199-206.
223. Pérez-Jiménez J, Arranz S, Tabernero M, Díaz-Rubio ME, Serrano J, Goñi I, et al. Updated methodology to determine antioxidant capacity in plant foods, oils and beverages: Extraction, measurement and expression of results. *Food Res Int.* 2008;41(3):274-85.

224. Kuskoski EM, Asuero AG, Troncoso AM, Mancini-Filho J, Fett R. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Food Sci Tech*. 2005;25(4):726-32.
225. Morales FJ, Jiménez-Pérez S. Free radical scavenging capacity of Maillard reaction products as related to colour and fluorescence. *Food Chem*. 2001;72(1):119-25.
226. Núñez C. Comentarios sobre Solventes y Solubilidades de Sustancias orgánicas. Texto libre, Argentina. 2008. Recuperado de <http://www.cenunez.com.ar/archivos>
227. Masci A, Coccia A, Lendaro E, Mosca L, Paolicelli P, Cesa S. Evaluation of different extraction methods from pomegranate whole fruit or peels and the antioxidant and antiproliferative activity of the polyphenolic fraction. *Food Chem*. 2016;202:59-69.
228. Dikmen M, Ozturk N, Ozturk Y. The antioxidant potency of *Punica granatum* L. Fruit peel reduces cell proliferation and induces apoptosis on breast cancer. *J Med Food*. 2011;14(12):1638-46.
229. Vierck Jr CJ. Modelos animales del dolor. Wall y Melzack Tratado del Dolor: Elsevier; 2007. p. 177-87.
230. Meunier CJ, Burton J, Cumps J, Verbeeck RK. Evaluation of the formalin test to assess the analgesic activity of diflunisal in the rat. *Eur J Pharm Sci*. 1998;6(4):307-12.
231. Choi S-S, Lee J-K, Suh H-W. Antinociceptive profiles of aspirin and acetaminophen in formalin, substance P and glutamate pain models. *Brain Res*. 2001;921(1-2):233-9.
232. Ortiz MI, Fernández-Martínez E, Soria-Jasso LE, Lucas-Gómez I, Villagómez-Ibarra R, González-García MP, et al. Isolation, identification and molecular docking as cyclooxygenase (COX) inhibitors of the main constituents of *Matricaria chamomilla* L. extract and its synergistic interaction with diclofenac on nociception and gastric damage in rats. *Biomed Pharmacother*. 2016;78:248-56.
233. Vane J, Botting R. The mechanism of action of aspirin. *Thromb Res*. 2003;110(5-6):255-8.
234. Saad LB, Hwi KK, Quah T. Evaluation of the antinociceptive effect of the ethanolic extract of *Punica granatum*. *Afr J Tradit Complement Altern Med*. 2014;11(3):228-33.
235. Wang R, Ding Y, Liu R, Xiang L, Du L. Pomegranate: constituents, bioactivities and pharmacokinetics. *Fruit Veg Cereal Sci Biotech*. 2010;4(2):77-87.
236. Gainok J, Daniels R, Golembiowski D, Kindred P, Post L, Strickland R, et al. Investigation of the anti-inflammatory, antinociceptive effect of ellagic acid as measured by digital paw pressure via the Randall-Selitto meter in male Sprague-Dawley rats. *AANA J*. 2011;79(4).

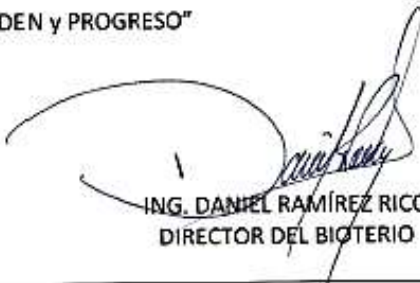
237. Rosillo MA, Sánchez-Hidalgo M, Cárdeno A, Aparicio-Soto M, Sánchez-Fidalgo S, Villegas I, et al. Dietary supplementation of an ellagic acid-enriched pomegranate extract attenuates chronic colonic inflammation in rats. *Pharmacol Res.* 2012;66(3):235-42.
238. Giménez-Bastida JA, González-Sarrías A, Larrosa M, Tomás-Barberán F, Espín JC, García-Conesa MT. Ellagitannin metabolites, urolithin A glucuronide and its aglycone urolithin A, ameliorate TNF- α -induced inflammation and associated molecular markers in human aortic endothelial cells. *Mol Nutr Food Res.* 2012;56(5):784-96.
239. Hollebeeck S, Winand J, Hérent M-F, During A, Leclercq J, Larondelle Y, et al. Anti-inflammatory effects of pomegranate (*Punica granatum* L.) husk ellagitannins in Caco-2 cells, an in vitro model of human intestine. *Food Funct.* 2012;3(8):875-85.
240. Lee C-J, Chen L-G, Liang W-L, Wang C-C. Anti-inflammatory effects of *Punica granatum* Linne in vitro and in vivo. *Food Chem.* 2010;118(2):315-22.
241. Olajide OA, Kumar A, Velagapudi R, Okorji UP, Fiebich BL. Punicalagin inhibits neuroinflammation in LPS-activated rat primary microglia. *Mol Nutr Food Res.* 2014;58(9):1843-51.
242. Moreira J, Klein-Júnior LC, Cechinel Filho V, de Campos Buzzi F. Anti-hyperalgesic activity of corilagin, a tannin isolated from *Phyllanthus niruri* L.(Euphorbiaceae). *J Ethnopharmacol.* 2013;146(1):318-23.
243. Fernandes E, Fernandes M, Keeble J. The functions of TRPA1 and TRPV1: moving away from sensory nerves. *Brit J Pharmacol.* 2012;166(2):510-21.
244. O'Leary KA, de Pascual-Tereasa S, Needs PW, Bao Y-P, O'Brien NM, Williamson G. Effect of flavonoids and vitamin E on cyclooxygenase-2 (COX-2) transcription. *Mutat Res - Fundam Mol Mech Mutagen.* 2004;551(1-2):245-54.
245. Takano-Ishikawa Y, Goto M, Yamaki K. Structure-activity relations of inhibitory effects of various flavonoids on lipopolysaccharide-induced prostaglandin E2 production in rat peritoneal macrophages: Comparison between subclasses of flavonoids. *Phytomedicine.* 2006;13(5):310-7.
246. Ghorbanzadeh B, Mansouri MT, Hemmati AA, Naghizadeh B, Mard SA, Rezaie A. Involvement of L-arginine/NO/cGMP/KATP channel pathway in the peripheral antinociceptive actions of ellagic acid in the rat formalin test. *Pharmacol Biochem Behav.* 2014;126:116-21.
247. Miclescu A, Gordh T. Nitric oxide and pain: 'Something old, something new'. *Acta Anaesthesiol Scand.* 2009;53(9):1107-20.
248. Kawabata A, Manabe S, Manabe Y, Takagi H. Effect of topical administration of l-arginine on formalin-induced nociception in the mouse: a dual role of peripherally formed NO in pain modulation. *Br J Pharmacol.* 1994;112(2):547-50.

249. Mansouri MT, Naghizadeh B, Ghorbanzadeh B. Ellagic acid enhances morphine analgesia and attenuates the development of morphine tolerance and dependence in mice. *Eur J Pharmacol.* 2014;741:272-80.
250. Mansouri MT, Naghizadeh B, Ghorbanzadeh B. Involvement of opioid receptors in the systemic and peripheral antinociceptive actions of ellagic acid in the rat formalin test. *Pharmacol Biochem Behav.* 2014;120:43-9.
251. Mansouri MT, Naghizadeh B, Ghorbanzadeh B. Ellagic acid enhances the antinociceptive action of venlafaxine in mouse acetic acid-induced pain: An isobolographic analysis. *Pharmacol Rep.* 2015;67(3):473-7.
252. Mansouri MT, Naghizadeh B, Ghorbanzadeh B, Farbood Y. Central and peripheral antinociceptive effects of ellagic acid in different animal models of pain. *Eu J Pharmacol.* 2013;707(1-3):46-53.
253. El-Shitany NA, El-Bastawissy EA, El-desoky K. Ellagic acid protects against carrageenan-induced acute inflammation through inhibition of nuclear factor kappa B, inducible cyclooxygenase and proinflammatory cytokines and enhancement of interleukin-10 via an antioxidant mechanism. *Int Immunopharm.* 2014;19(2):290-9.
254. BenSaad LA, Kim KH, Quah CC, Kim WR, Shahimi M. Anti-inflammatory potential of ellagic acid, gallic acid and punicalagin A&B isolated from *Punica granatum*. *BMC Complement Alter Med.* 2017;17(1):47.
255. Santos AR, De Campos RO, Miguel OG, Cechinel-Filho V, Yunes RA, Calixto JB. The involvement of K⁺ channels and Gi/o protein in the antinociceptive action of the gallic acid ethyl ester. *Eu J Pharm.* 1999;379(1):7-17.
256. Trevisan G, Rossato MF, Tonello R, Hoffmeister C, Klafke JZ, Rosa F, et al. Gallic acid functions as a TRPA1 antagonist with relevant antinociceptive and antiedematogenic effects in mice. *Naunyn-Schmiedeb Arch Pharmacol.* 2014;387(7):679-89.
257. Bevan S, Andersson DA. TRP channel antagonists for pain--opportunities beyond TRPV1. *Curr Opin Investig Drugs.* 2009;10(7):655-63.
258. Nuamsetti T, Dechayuenyong P, Tantipaibulvut S. Antibacterial activity of pomegranate fruit peels and arils. *Sci Asia.* 2012;38(3):319-22.
259. Pande G, Akoh CC. Antioxidant capacity and lipid characterization of six Georgia-grown pomegranate cultivars. *J Agric Food Chem.* 2009;57(20):9427-36.
260. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951;193:265-75.
261. Li Y, Guo C, Yang J, Wei J, Xu J, Cheng S. Evaluation of antioxidant properties of pomegranate peel extract in comparison with pomegranate pulp extract. *Food Chem.* 2006;96(2):254-60.
262. Kumar S, Singh RK, Bhardwaj T. Therapeutic role of nitric oxide as emerging molecule. *Biomed Pharmacother.* 2017;85:182-201.

263. Sousa AM, Prado WA. The dual effect of a nitric oxide donor in nociception. *Brain Res.* 2001;897(1-2):9-19.
264. Duarte I, Ferreira S. L-NAME causes antinociception by stimulation of the arginine-NO-cGMP pathway. *Mediators of Inflamm.* 2000;9(1):25-30.
265. Aley K, McCarter G, Levine JD. Nitric oxide signaling in pain and nociceptor sensitization in the rat. *J Neurosci.* 1998;18(17):7008-14.
266. Mansouri MT, Naghizadeh B, Ghorbanzadeh B, Rajabi H, Pashmforoush M. Pharmacological evidence for systemic and peripheral antinociceptive activities of pioglitazone in the rat formalin test: Role of PPAR γ and nitric oxide. *Eur J Pharm.* 2017;805:84-92.
267. Archer SL, Hampl V. NG-monomethyl-L-arginine causes nitric oxide synthesis in isolated arterial rings: trouble in paradise. *Biochem Biophys Res Commun.* 1992;188(2):590-6.
268. Shibata M, Ohkubo T, Takahashi H, Inoki R. Modified formalin test: characteristic biphasic pain response. *Pain.* 1989;38(3):347-52.
269. Usha T, Goyal AK, Lubna S, Prashanth H, Mohan TM, Pande V, et al. Identification of anti-cancer targets of eco-friendly waste Punica granatum peel by dual reverse virtual screening and binding analysis. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2015;15(23):10345-50.
270. Arroyo M, Lanas A. NSAIDs-induced gastrointestinal damage. Review. *Minerva Gastroenterol Dietol.* 2006;52(3):249-59.
271. García-Rayado G, Navarro M, Lanas A. NSAID induced gastrointestinal damage and designing GI-sparing NSAIDs. *Expert Rev Clin Pharmacol.* 2018;11(10):1031-43.
272. Kamali M, Tavakoli H, Khodadoost M, Daghighzadeh H, Kamalinejad M, Gachkar L, et al. Efficacy of the Punica granatum peels aqueous extract for symptom management in ulcerative colitis patients. A randomized, placebo-controlled, clinical trial. *Complement Ther Clin Pract.* 2015;21(3):141-6.

10. ANEXOS

DICTAMEN COMITÉ DE ÉTICA

	UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO COORDINACIÓN ACADÉMICA DIRECCIÓN DE SERVICIOS ACADÉMICOS DIRECCIÓN DEL BIOTERIO COMITÉ INTERNO PARA EL CUIDADO Y USO DE ANIMALES DE LABORATORIO	
		
DICTAMEN DE EVALUACIÓN		10 de febrero de 2021
ESTIMADO DRA. MIRANDELI BAUTISTA ÁVILA Por medio de la presente, le informo que su solicitud de extensión del proyecto "Efecto anticonceptivo de extractos etanólicos y liofilizados de granada (<i>Punica granatum</i> L.)", donde participa el MCBS. José Antonio Guerrero Solano, ha sido aceptada y queda registrado con el Número de Aprobación CICUAL/005/2020/E-2021. Sin más otro particular, aprovechamos la ocasión desearle el mejor de los éxitos en su proyecto. ATENTAMENTE "AMOR, ORDEN y PROGRESO"  DR. LUIS DELGADO OLIVARES PRESIDENTE DEL CICUAL  ING. DANIEL RAMÍREZ RICO DIRECTOR DEL BIOTERIO		



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO
COORDINACIÓN ACADÉMICA
DIRECCIÓN DE SERVICIOS ACADÉMICOS
DIRECCIÓN DEL BIOTERIO
COMITÉ INTERNO PARA EL CUIDADO Y USO DE ANIMALES DE
LABORATORIO



DICTAMEN DE EVALUACIÓN

Área Académica de Farmacia Instituto de Ciencias de la Salud		FOLIO: CICAL/005/22020/E-021	
PROYECTO: Efecto anticonceptivo de extractos etanólicos y liofilizados de granada (<i>Punica granatum</i> L.).		FECHA DE SOLICITUD: 03 de febrero de 2021	
ALUMNOS O PASANTES QUE PARTICIPAN EN EL PROYECTO: MCBS. José Antonio Guerrero Solano		RESPONSABLE DEL PROYECTO: Dr. Mirandell Bautista Ávila Email: mibautista@uah.edu.mx Teléfono: 771 2316 442	
ASPECTOS A EVALUAR:	RESULTADO		
	ACEPTABLE	NO ACEPTABLE	SUGERENCIAS
JUSTIFICACIÓN DEL USO DE ANIMALES DE LABORATORIOS	X		
BIENESTAR Y ESTRÉS ANIMAL	X		
PROCEDIMIENTOS Y CUIDADOS APLICADOS EN EL ANIMAL	X		
ASPECTOS ÉTICOS DEL PROTOCOLO	X		
PUNTO FINAL Y EUTANASIA	X		
OBSERVACIONES GENERALES			
FECHA DE REVISIÓN	RESULTADO	SI	NO
05 de marzo del 2021	APROBADO	X	
FECHA DE APROBACIÓN	NEGADO		
09 de marzo del 2021	PROPUESTAS O CAMBIO		
Extensión de proyecto			
Fecha de inicio: marzo del 2021		Fecha de término: diciembre de 2021	
CARACTERÍSTICAS DE LOS ANIMALES QUE SE PROPORCIONARÁN: 24 ratas macho de la línea Wistar, de 8 semanas y un peso de 180 a 200 gramos			
INVESTIGADOR PRINCIPAL	PRESIDENTE DEL CICAL	DIRECTOR DEL BIOTERIO	
 DRA. MIRANDELL BAUTISTA ÁVILA	 DR. LUIS DELGADO OLIVARES	 ING. DANIEL RAMÍREZ RICO	