



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**



**MAESTRÍA EN CIENCIAS FARMACÉUTICAS**

**TESIS**

**EVALUACIÓN DE LA INFLUENCIA DE LA ADMINISTRACIÓN ORAL  
DEL EXTRACTO BRUTO DE *Phoradendron bathyoryctum* Eichler SOBRE  
MODELOS DE DOLOR E INFLAMACIÓN INDUCIDOS EN RATONES**

**ALICIA MARIELA ORTIZ RIVAS**

Tutor: Prof. Dra. María del Carmen Hellión de Ibarrola

**SAN LORENZO – PARAGUAY**  
**SEPTIEMBRE - 2021**



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**



**MAESTRÍA EN CIENCIAS FARMACÉUTICAS**

**EVALUACIÓN DE LA INFLUENCIA DE LA ADMINISTRACIÓN ORAL  
DEL EXTRACTO BRUTO DE *Phoradendron bathyoryctum* Eichler SOBRE  
MODELOS DE DOLOR E INFLAMACIÓN INDUCIDOS EN RATONES**

Tesis presentada por la Química Farmacéutica Alicia Mariela Ortiz Rivas  
a la Coordinación de Postgrado, para optar por el título de Máster en  
Ciencias Farmacéuticas

**Ciudad Universitaria, San Lorenzo**

**PARAGUAY**

**SEPTIEMBRE - 2021**

**Ortiz Rivas, Alicia Mariela**

**Evaluación De La Influencia De La Administración Oral Del Extracto Bruto De *Phoradendron Bathyoryctum* Eichler Sobre Modelos De Dolor E Inflamación Inducidos En Ratonés / Alicia Mariela Ortiz Rivas . - - San Lorenzo : La Autora, 2021.**

**54 p.: fig. ; 30 cm.**

**Tesis presentada a la Coordinación de Postgrado de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Nacional de Asunción, como Requisito para la obtención del Título de Máster en Ciencias Farmacéuticas.**

**1. ANALGESIA. 2. ANTIINFLAMATORIO I. Título.**

**CDD: 615.1**

**Or77e**

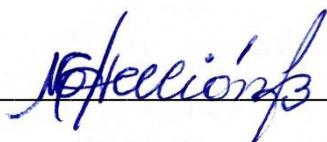
Prof. Dra. María del Carmen Hellión de Ibarrola, de la Facultad de Ciencias Químicas – Universidad Nacional de Asunción

### **TUTORA DE LA PRESENTE TESIS**

Autoriza: La presentación del trabajo titulado “EVALUACIÓN DE LA INFLUENCIA DE LA ADMINISTRACIÓN ORAL DEL EXTRACTO BRUTO DE *Phoradendron bathyoryctum* Eichler SOBRE MODELOS DE DOLOR E INFLAMACIÓN INDUCIDOS EN RATONES”.

Dado que el mismo reúne la calidad y cantidad de trabajo necesario para constituir la TESIS DE MAESTRÍA que la Q.F. Alicia Mariela Ortiz Rivas presenta para aspirar al grado de Máster en Ciencias Farmacéuticas.

San Lorenzo, 13 de agosto de 2021



---

Prof. Dra. María del Carmen Hellión de Ibarrola

Facultad de Ciencias Químicas – UNA



CONSEJO NACIONAL  
DE CIENCIA  
Y TECNOLOGÍA



**Aprobado en fecha 14 de septiembre de 2021**

**Tribunal Examinador:**

Prof. Dr. Derlis Ibarrola

Facultad de Ciencias Químicas - UNA

Prof. Dra. María Eugenia Flores

Facultad de Ciencias Químicas - UNA

Prof. Dra. Cristina Romero

Facultad de Ciencias Químicas - UNA

Prof. Dra. Yenny González

Facultad de Ciencias Químicas - UNA

## **AGRADECIMIENTO**

A Dios, por darme la fuerza para cumplir con todos mis objetivos, por no permitirme nunca bajar los brazos, por ser mi guía y poner tanta gente maravillosa en mi camino.

A mi mamá, que desde el cielo guía mis pasos y me envía fuerzas para superarme cada día y cumplir mis metas.

A mi papá, hermanas y madrina que caminaron conmigo todo este camino de alegrías y luchas, por apoyarme siempre y ser un soporte para culminar este proceso con éxito.

A mi tutora Dra. Ma. Del Carmen Hellión de Ibarrola; por el tiempo, conocimiento, consejos y todo el cariño que me ha brindado.

A Isabelle Wilson, por la predisposición y la ayuda que me brindó para poder terminar este trabajo a tiempo.

Al equipo de trabajo del Departamento de Farmacología, profesores y alumnos, por la gentileza y la amabilidad, por convertir el lugar de trabajo en un HOGAR y a su gente en una FAMILIA, siempre es un honor poder trabajar con ustedes.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por apostar por nosotros y brindarnos la posibilidad de realizar esta maestría para crecer de manera profesional y HACER ciencia a través de la investigación.

A Tere y Pachi, por la amistad, la unidad y la fuerza que nos permitió empezar y culminar este proceso JUNTAS.

A mis compañeros y amigos, por ser un soporte y colaborar con mi realización profesional y personal.

Muchas gracias

# INDICE

## Tabla de contenido

RESUMEN	6
ABSTRACT	8
1.- INTRODUCCIÓN	10
2.- MARCO TEÓRICO	13
2.1-Dolor	13
2.2- Inflamación	14
2.3.- Analgesia	16
2.4.- Antiinflamatorios	16
2.5.- Familia Santalaceae	17
2.6.- Antecedentes químicos y farmacológicos del género <i>Phoradendron</i> y otras especies de muérdago	19
3.- OBJETIVOS	21
Objetivo General	21
Objetivos Específicos	21
4.- MATERIALES Y MÉTODOS	22
4.1- Diseño	22
4.2- Material vegetal y obtención del extracto	23
4.3- Animales	23
4.4.- Drogas	24
4.5.- Tratamientos	24
4.6.- Evaluación de la influencia de la administración oral de Pb sobre el comportamiento general	24
4.7.- Evaluación de la actividad analgésica de Pb	25
4.7.1.- Determinación de la influencia de la administración oral de Pb sobre el dolor inducido por presión mecánica caudal (Randall-Selitto Test)	25

4.7.2.- Determinación de la influencia de la administración oral de Pb sobre el dolor inducido químicamente por ácido acético (contorsiones abdominales o Writhing test)	26
4.7.3.- Determinación de la influencia de la administración oral de Pb sobre la reacción al dolor inducido térmicamente (placa caliente o hot plate)	26
4.8.- Evaluación de la actividad antiinflamatoria de Pb	26
4.8.1.- Determinación de la influencia de la administración oral de Pb sobre el edema plantar inducido por carragenina	26
4.9.- Gestión y Análisis de los datos	27
4.10.- Asuntos Éticos	27
5.- RESULTADOS	29
5.1.- Determinación de la influencia de la administración oral de Pb sobre el comportamiento general de ratones	29
5.2.- Determinación de la influencia de la administración oral de Pb sobre el dolor inducido	29
5.2.1- Efecto de la administración oral de Pb sobre el tiempo de reacción al dolor en el ensayo de presión mecánica caudal	29
5.2.2- Efecto de la administración oral del extracto de Pb sobre el número total de contorsiones abdominales en ratones sometidos al estímulo doloroso con ácido acético al 0,8%	30
5.2.3- Efecto de la administración oral de Pb sobre el tiempo de latencia en la reacción al estímulo doloroso térmico en el test de la placa caliente	31
5.3.- Evaluación de la actividad antiinflamatoria de <i>P. bathyoryctum</i>	33
5.3.1- Efecto de la administración oral de Pb sobre el volumen del edema plantar inducido por carragenina	33
6.- DISCUSIÓN	35
7.- CONCLUSIÓN	39
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41
ANEXOS	49

# EVALUACIÓN DE LA INFLUENCIA DE LA ADMINISTRACIÓN ORAL DEL EXTRACTO BRUTO DE *Phoradendron bathyoryctum* Eichler SOBRE MODELOS DE DOLOR E INFLAMACIÓN INDUCIDOS EN RATONES

Autor: Alicia Mariela Ortiz Rivas  
Tutor: Prof. Dra. María del Carmen Hellión de Ibarrola  
Departamento de Farmacología. Facultad de Ciencias Químicas - UNA

## RESUMEN

*Phoradendron* es un género de la familia Santalaceae que cuenta con varias especies que presentan actividad antitumoral, citotóxica e inmunomoduladora. Previos estudios demostraron que *Phoradendron bathyoryctum* Eichler posee actividad ansiolítica y antidepressiva. El objetivo de este trabajo fue determinar la actividad analgésica y antiinflamatoria de *P. bathyoryctum*, empleando modelos de dolor inducidos por estímulos nocivos de tipo mecánico (presión caudal o Randall-Selitto), químico (ácido acético al 0.8%), y térmico (test de la placa caliente) para el estudio de la analgesia; mientras que el método del edema plantar inducido por carragenina al 1% fue empleado para evaluar la actividad anti edematosa. Dosis orales de 30 ( $p < 0.01$ ) y 300 ( $p < 0.001$ ) mg/kg de *P. bathyoryctum*, denotaron efecto analgésico estadísticamente significativo, dosis dependiente, empleando el test de Randall-Selitto. Dosis orales de 30 ( $p < 0.05$ ) y 300 ( $p < 0.01$ ) mg/kg de *P. bathyoryctum* denotaron significativa reducción del número de contorsiones abdominales y de manera dosis dependiente empleando el modelo de contorsiones abdominales, relacionado con un efecto analgésico. En adición, se observó incremento del tiempo de latencia de reacción ante el estímulo térmico tras la administración de *P. bathyoryctum* en dosis de 300 mg/kg ( $p < 0.05$ ) en el test de la placa caliente, compatible con un efecto analgésico. Finalmente, con la dosis de 30 mg/kg se evidenció reducción estadísticamente significativa del edema ( $p < 0.01$ ) inducido por carragenina al 1%, demostrando actividad antiinflamatoria en comparación con el control

positivo de edema, con una respuesta de intensidad similar al grupo tratado con 10mg/kg de indometacina ( $p < 0.01$ ). Se concluye que el extracto bruto de *P. bathyoryctum* posee la capacidad de incrementar el umbral del dolor, compatible con efecto analgésico y capacidad de reducir el edema (antiinflamatoria) inducido por carragenina en ratones. Estudios farmacológicos y químicos adicionales están en proceso a fin de dilucidar mecanismos moleculares y componentes involucrados en los efectos observados.

**Palabras clave:** *Phoradendron bathyoryctum*, analgesia, antiinflamatorio, Randall-Selitto, contorsiones abdominales, placa caliente, pletismómetro.

**EVALUATION OF THE INFLUENCE OF ORAL ADMINISTRATION OF *Phoradendron bathyoryctum* Eichler ON INDUCED PAIN AND INFLAMMATION MODELS IN MICE**

Author: Alicia Mariela Ortiz Rivas  
Advisor: Prof. Dra. María del Carmen Hellión de Ibarrola  
Pharmacology Department. Chemical Sciences Faculty - UNA

**ABSTRACT**

The genus *Phoradendron* belong to Santalaceae family and possess several species with antitumor, cytotoxic and immunomodulatory activity. Previous studies have shown that *Phoradendron bathyoryctum* Eichler has anxiolytic and antidepressant activity. The aim of this work was to determine the analgesic and anti-inflammatory activity of *P. bathyoryctum*, using pain models induced by mechanical (caudal pressure or Randall-Selitto), chemical (acetic acid 0.8%), and thermal (hot plate test) types of noxious stimuli for the study of analgesia; while the 1% carrageenan-induced plantar edema method was used to evaluate the anti-edematous activity. Oral doses of 30 ( $p < 0.01$ ) and 300 ( $p < 0.001$ ) mg/kg of *P. bathyoryctum* denoted statistically significant dose-dependent analgesic effect using the Randall-Selitto test. Oral doses of 30 ( $p < 0.05$ ) and 300 ( $p < 0.01$ ) mg/kg of *P. bathyoryctum* denoted significant reduction in the number of abdominal contortions and in a dose-dependent manner using the abdominal contortions model, related to an analgesic effect. In addition, an increase in the reaction latency time to the thermal stimulus was observed after administration of *P. bathyoryctum* at a dose of 300 mg/kg ( $p < 0.05$ ) in the hot plate test, compatible with an analgesic effect. Finally, with doses of 30 mg/kg a statistically significant reduction of edema ( $p < 0.01$ ) induced by 1% carrageenan was evidenced, demonstrating anti-inflammatory activity compared to the edema positive control with a similar intensity response to the group treated with 10mg/kg

indomethacin ( $p < 0.01$ ). It is concluded that the crude extract of *P. bathyoryctum* possesses the ability to increase pain threshold, compatible with analgesic effect and ability to reduce edema (anti-inflammatory) induced by carrageenan in mice. Further pharmacological and chemical studies are in progress to elucidate molecular mechanisms and components involved in the observed effects.

**Key words:** *Phoradendron bathyoryctum*, analgesic, anti-inflammatory, Randall-Selitto, writhing test, hot plate, pletismometer.

## 1.- INTRODUCCIÓN

El uso de plantas medicinales para el tratamiento y cura de afecciones de la salud en nuestro país data de tiempos inmemorables y hasta el día de hoy, gran número de personas recurren a la utilización de las mismas, siendo éstas su alternativa terapéutica, ya que no disponen del dinero suficiente para costear un tratamiento farmacológico.

Son un gran número de plantas aquellas que suponen una actividad benéfica para la salud, la problemática reside en que son muy pocas aquellas que presentan estudios que validan su uso y garanticen su seguridad. Dentro de las plantas medicinales que han sido estudiadas y validadas en el país se encuentran el Ñuati Pyta, Kapi'i katí, Viñal, Typychá hû, Burrito (1-5).

En un libro escrito por Barranco Ruiz et al, se infiere que el dolor generalmente está presente en la mayoría de las patologías inflamatorias agudas o crónicas del ser humano y dependiendo de su intensidad, puede interferir con el bienestar del paciente o hasta incapacitarlo. El dolor es un problema grave para muchos pacientes que se encuentran en Unidades de Cuidados Intensivos, ya sea por su patología o por la cantidad de terapias o técnicas diagnósticas a la que se los somete. A su vez, en el transcurso de la enfermedad dolorosa y los procedimientos médicos que la misma conlleva, se puede generar al paciente un nivel de estrés que conlleva a desajustes orgánicos y/o psiquiátricos relevantes como, por ejemplo, la depresión psíquica. Por otro lado, la depresión genera respuestas neuroendocrinas, metabólicas y emocionales y que inducen un nivel importante de dolor perjudicial para la recuperación, principalmente de aquellos pacientes resistentes al tratamiento, que empeora su estado general. Durante años se ha tratado el

dolor de forma insuficiente, entre otras causas por desconocimiento del vínculo del dolor con el daño físico y/o emocional o el miedo a los posibles efectos secundarios de los fármacos, como depresión respiratoria o inestabilidad cardiovascular, que pueden ser inducidas por opiáceos (6).

Existen medicamentos antidepresivos que son efectivos para tratar el dolor asociado al daño de los nervios (dolor neuropático). Al menos un tercio de los pacientes con dolor neuropático que tomaron antidepresivos tradicionales (como amitriptilina) obtuvieron un alivio del dolor moderado o mejor. También existen pruebas de que la venlafaxina, tiene una efectividad similar a los antidepresivos tradicionales. Sin embargo, aproximadamente una quinta parte de los que toman estos medicamentos para el dolor interrumpe el tratamiento debido a efectos adversos. El dolor neuropático puede tratarse con antidepresivos, cuyo efecto es independiente de cualquier efecto sobre la depresión (7).

Estudios realizados por Saarto y Wiffen en 2007 confirman la efectividad de los antidepresivos para el dolor neuropático y mencionan que, de cada tres pacientes con dolor neuropático tratados con algún antidepresivo tricíclico o venlafaxina, uno de ellos logrará al menos un alivio moderado del dolor. Existen otros antidepresivos como los ISRS que son mejor tolerados y que podrían resultar efectivos, pero se requieren más estudios. Aún no está claro la función de los mismos y si podrían utilizarse para prevenir la aparición del dolor (7).

Con estos antecedentes, y teniendo en cuenta estudios previos demostrando el efecto ansiolítico y antidepresivo del *P. bathyoryctum* Eichler (Ka'avo tyrey) realizado conjuntamente por miembros de la cátedra de Farmacología de la Facultad de Medicina (UNI) y el Departamento de Farmacología de la Facultad de Ciencias Químicas (UNA) abona y fundamenta la idea de explorar la actividad analgésica en roedores dado que drogas antidepresivas son utilizadas en condiciones dolorosas crónicas (8).

Por tanto, existe justificación académica (para generar nuevo conocimiento), médica (potencial terapia alternativa o complementaria) socioeconómica (desarrollo comercial de nuevas drogas) y de innovación para implementar el uso de esta planta o sus derivados en la generación de fitofármacos mejor tolerados y de buena eficacia para el dolor e inflamación.

Finalmente, en vista de que varios fitoterápicos antitumorales y varias especies de *Phoradendron* (muérdago) ejercen potente efecto antiinflamatorio, y basados en la intrincada asociación de depresión, dolor e inflamación, el presente trabajo propone evaluar la influencia del extracto bruto de *P. bathyoryctum* sobre modelos de dolor e inflamación inducidos en ratones tratados oralmente a fin de validar el uso de esta planta medicinal.

## 2.- MARCO TEÓRICO

### 2.1-Dolor

El comité de taxonomía de la International Association for the Study of Pain (IASP) define al dolor como “una experiencia sensorial o emocional desagradable asociada a un daño tisular real o potencial”. También se puede definir al dolor como “una experiencia perceptiva sensitiva desagradable acompañada de una respuesta afectiva, motora, vegetativa e incluso de la personalidad”. Estos componentes poseen unas vías, centros y mecanismos reguladores propios (9).

Fisiopatológicamente, el dolor se puede clasificar en:

- Dolor nociceptivo: el cual se produce cuando se activan los nociceptores periféricos, como una señal de alarma para protegernos frente a estímulos nocivos y al cual le sigue un reflejo de retirada.
- Dolor neuropático: asociado a lesiones del sistema nervioso central o periférico; una disfunción del sistema nervioso reflejada por un conjunto de síntomas.

La complejidad y heterogeneidad de estos síndromes dolorosos siguen presentando retos a la investigación tanto básica como clínica.

Existen diversos métodos para cuantificar el dolor. Al emplear procedimientos que inducen dolor, modelos análogos de la realidad, se puede evaluar la eficacia de los tratamientos y también analizar variables de la experiencia dolorosa que ejercen un efecto diferenciado (10).

En los animales, el dolor se puede apreciar por medio de sus reacciones, pero a su vez, las reacciones no necesariamente significan que haya una sensación de dolor (10).

Varios tipos de respuesta se observan en las pruebas de nocicepción, pero las que se observan la mayoría de las veces son las respuestas motoras. En los ensayos de dolor físico, las reacciones se producen mediante estímulos térmicos, como en el tail flick test (o ensayo de retirada caudal) y en el Hot Plate Test (ensayo de la placa caliente); mediante estímulos mecánicos o eléctricos, como en los ensayos de vocalización y del salto asustado (flinch-jump test). También están los ensayos del dolor tónico que utiliza inyecciones de agentes algogénicos intradérmicos como el test de la formalina (formalin test) o intraperitoneal como el test de contorsiones abdominales (writhing test) y los ensayos de dilatación de órganos huecos (10).

## **2.2- Inflamación**

En una revisión bibliográfica realizada por investigadores se establece que la inflamación surge como una respuesta de los organismos a agresiones endógenas o exógenas, donde intervienen tanto la respuesta inmune innata como la adquirida y producen numerosos efectos locales y sistémicos (11).

Los signos clínicos más evidentes son: rubor, calor, dolor, tumor e impotencia funcional. Estas manifestaciones son causadas por la acumulación de leucocitos, proteínas plasmáticas y derivados de la sangre hacia sitios de los tejidos extravasculares donde existe alguna infección o lesión, que pudo haber sido o no provocada por patógenos.

La inflamación se puede clasificar atendiendo diversas variables, en cuestión de tiempo se las puede clasificar en agudas o crónicas.

La inflamación aguda comienza en minutos u horas y participan mecanismos de respuesta inmune innata que, a su vez, activan la adquirida. Puede ser resolutive llegando a eliminar el germen, o progresar a una sepsis o Síndrome de Respuesta Inflamatoria Sistémica causado por la infección. Hoy en día se estima que la incidencia de la sepsis ha crecido en alrededor de 8,7% en Europa y los Estados Unidos. La presencia de pus en la dermis, esputo amarillento y líquido cefalorraquídeo turbio, son signos característicos de una respuesta inflamatoria aguda (11).

La inflamación crónica, por otro lado, ocurre en días, semanas o incluso meses cuando no se ha eliminado la noxa o lo que genera la inflamación. Los mecanismos de respuesta innata participan, pero la adquirida mantiene el proceso en el tiempo y causa daño tisular. Por ejemplo, las disfunciones orgánicas que se evidencian en la sepsis son debidas a los mecanismos efectores del sistema inmune (SI) que causa más de 1 millón de hospitalizaciones al año (11).

Algunos ejemplos de afecciones inflamatorias pueden ser infecciones persistentes, enfermedades autoinmunes, exposición prolongada a tóxicos, etcétera. Se pueden citar también algunas de grado más bajo como la aterosclerosis, envejecimiento, cáncer, obesidad, enfermedades metabólicas y degenerativas.

En algunas ocasiones, la respuesta inflamatoria puede ser nociva. El SI evolutivamente se desarrolló en momentos donde las principales causas de mortalidad eran extrínsecas como infecciones de escasa duración. En la actualidad las principales causas de morbilidad son enfermedades relacionadas con el envejecimiento y el estrés. Esta podría ser una de las razones por las que el SI en ocasiones mantiene una respuesta exagerada en el tiempo y causa alteración de la homeostasis (11).

En su revisión González-Costa et al, infieren que actualmente los conocimientos acerca de las causantes de una inflamación crónica como enfermedades autoinmunes y reumatológicas se comprenden parcialmente y que aún no se establece la manera en que ocurre el daño tisular y la implicancia de otros sistemas como el nervioso, el cardiovascular, el endocrino y el hematológico, entre otros (11).

La respuesta inflamatoria es compleja y son múltiples las relaciones que se establecen entre sus elementos y etapas, implicando y articulando casi todos los sistemas de órganos. Por ello, estos investigadores sostienen que se la debe estudiar y trabajar de manera integrada y dejar de mirar a la inflamación como un acontecimiento aislado o de una determinada especialidad médica, para emplearse en el tratamiento personalizado a los pacientes en un futuro (11).

### **2.3.- Analgesia**

La analgesia es alivio o ausencia de dolor ante un estímulo que normalmente se consideraría doloroso, lo cual es subjetivo debido a la individualidad y la incapacidad de comunicar directamente sobre la sensación dolorosa (12). También se lo puede definir como la pérdida de sensación del dolor que se da a consecuencia de la interrupción de la vía del sistema nervioso entre algún órgano de los sentidos y el cerebro.

Para la búsqueda de actividad analgésica generalmente utilizan modelos experimentales como las contorsiones abdominales inducidas por la inyección intraperitoneal de una solución de ácido acético al 0,8% (whriting test), el test de presión de la pata/cola (Randall y Selitto) aunque también existen otros como el test de la placa caliente o el ensayo tail-flick (retirada caudal).

El modelo de las contorsiones se basa en contar la cantidad de contracciones de la pared abdominal seguida de la torsión del tronco y la extensión de los miembros inferiores (contorsión), que se produce como respuesta a la irritación causada en el peritoneo por la administración de ácido acético u otros agentes inflamatorios. Es un método comúnmente utilizado para evaluar drogas con actividad analgésica y antiinflamatoria (13,14).

El modelo experimental de Randall-Selitto es un método bastante utilizado para evaluar la hipernocicepción y se fundamenta en la inducción de hiperalgesia a través de una presión creciente en la pata o en la cola del animal. La fuerza necesaria para que el animal manifieste respuesta al dolor se registra en gramos (14).

El modelo de reacción al calor o ensayo de la placa caliente, también es uno de los métodos comúnmente utilizados para evaluar la actividad analgésica, mide la latencia de respuesta de fuga o de autoprotección ante el estímulo doloroso. Se dispone a los animales en una placa a temperatura controlada de 55°C, midiendo el tiempo que demora el animal en expresar signos de dolor como sea lamer las patas para intentar disminuir la temperatura o saltar (13).

### **2.4.- Antiinflamatorios**

Rugel Garces, en su trabajo, los define como sustancias capaces de aliviar o mitigar las señales de alarma propiciadas por el organismo frente a manifestaciones de dolor, fiebre o tumoración que en conjunto conforman la inflamación. Menciona además que gracias al avance de la ciencia se ha podido desarrollar fármacos específicos y selectivos para

atenuar este tipo de manifestaciones de la inflamación, entre los cuales se destacan dos grupos importantes: los analgésicos antiinflamatorios no esteroideos (AINES) y los antiinflamatorios esteroideos o glucocorticoides (15).

Para evaluar la actividad antiinflamatoria de las drogas, se utilizan modelos animales. En general, la génesis de los signos y síntomas de la inflamación sirve como base para probar estos fármacos. Entre los parámetros normalmente evaluados están edema, alteración de la permeabilidad vascular, migración leucocitaria, fiebre y dolor. Esas técnicas de evaluación son generales y no dependen del compuesto a ser ensayado. A pesar de que la mayoría de las veces no se llega al mecanismo de acción definitivo de la sustancia o extracto vegetal ensayado, estos modelos experimentales son de gran importancia y representan un punto de partida para la caracterización farmacológica de nuevos compuestos capaces de interferir con el curso de la inflamación (13).

El modelo del edema de la pata inducido por inyección subplantar de carragenina en la pata posterior es sensible a AINES, por ende, se lo utiliza ampliamente en la búsqueda de nuevos agentes antiinflamatorios. Se reconocen al menos 4 mediadores en la génesis de ese edema: inicialmente se forma un edema pequeño y precoz, por la acción de la histamina y la serotonina liberados de los mastocitos, luego actúan la bradicinina y prostaglandinas, causando un edema de mayor intensidad y con pico tardío y remisión lenta (13).

El modelo de la carragenina es muy efectivo para el estudio de la acción de los antiinflamatorios esteroideos e inhibidores de la ciclooxigenasa, como la aspirina, que bloquea la síntesis de prostaglandinas. Drogas que interfieren con la acción edematogénica de la histamina y serotonina son mejor estudiadas con el modelo del edema de la pata inducido por dextrano o por la inyección de histamina cuyo edema tiene una evolución más corta. El dextrano es un polímero que induce la liberación de histamina y serotonina de los mastocitos en la rata (13).

## **2.5.- Familia Santalaceae**

Es una familia del grupo de las Angiospermas o plantas con flores que incluye especies que anteriormente pertenecían a la familia Viscaceae y Eremolepidaceae.

### **1. Características**

- Porte: hierbas, arbustos, árboles o epífitas, hemiparásitas aéreas o de raíces.
  - Hojas: alternas, opuestas o verticiladas simples, sin estípulas, generalmente carnosas o coriáceas, frecuentemente escamiformes.
  - Flores: poco vistosas, imperfectas raramente perfectas, solitarias o en glomérulos terminales o axilares.
  - Perianto: con un solo verticilo de (3)4-6 sépalos, verdes o de colores vivos, unidos o no en la base, con lóbulos valvados hacia arriba.
  - Estambres: 4-5, opuestos a los sépalos, con filamentos cortos y anteras basifijas con dehiscencia longitudinal.
  - Gineceo: ovario ínfero o semi-ínfero, siempre envuelto por un disco glandular, 2-5 carpelos, unilocular con 1-5 óvulos, placentación central, estilo simple, estigma capitado o trifido.
  - Fruto: aquenios, nueces, bayas o drupas.
  - Semilla: solitarias, sin testa diferenciada, endosperma copioso, carnosos, aceitoso o amiláceo.
2. Biología floral y/o fenología: La polinización es entomófila o anemófila. La dispersión de las diásporas de *Phoradendron* y *Viscum* es por zoocoria.
  3. Distribución y hábitat: Es una familia cosmopolita, pero se encuentra mejor representada en regiones tropicales o áridas.
  4. Especies de la familia Santalaceae: Presenta aproximadamente 990 especies distribuidas en 44 géneros.
  5. Importancia: En medicina popular, les asignan diferentes propiedades curativas a las distintas partes de la planta: digestivo (hojas), para enfermedades venéreas (frutos) y cortar diarreas (corteza). Algunas como *Acanthosyris falcata* Griseb. y *Exocarpos cupressiformis* Labill. proporcionan frutos comestibles. Muchas especies de *Phoradendron* constituyen una amenaza considerable para el establecimiento de plantaciones forestales de árboles indígenas en algunas partes de los trópicos, principalmente si se hallan muchos ejemplares sobre el mismo árbol. En los Esteros del Iberá (Corrientes, Argentina) se han registrado 6 especies de *Phoradendron* citadas como hemiparásitos epífitos. En medicina popular se utiliza *Phoradendron* liga que posee propiedades hipotensoras. (16)
  6. Sinónimos de *Phoradendron bathyoryctum* Eichler (17)

- *Phoradendron alophyllum* Eichler ex Glaz.
- *Phoradendron balansae* Trel.
- *Phoradendron balansae* f. *hassleri* Trel.
- *Phoradendron balansae* f. *morongi* Trel.
- *Phoradendron hieronymi* Trel.
- *Phoradendron pinheirense* Rizzini
- *Phoradendron psittacanthobium* Rizzini
- *Phoradendron ulophyllum* Eichler

## **2.6.- Antecedentes químicos y farmacológicos del género *Phoradendron* y otras especies de muérdago**

*Phoradendron* es un género de la familia Santalaceae con aproximadamente 269 especies (18). Los muérdagos son plantas parásitas que pertenecen al orden Santalales, un orden angiospérmico que contiene 18 familias, 160 géneros y más de 2200 especies (19). Estas plantas crecen en las ramitas y ramas de las plantas hospederas (por lo general árboles) utilizando un sistema especializado de raíces, llamado haustoria, que penetran en el tejido vascular del hospedero y extraen minerales esenciales y agua (20). La distribución de este género se encuentra restringida al continente americano y la mayor diversidad de especies se concentra en América del Sur (21).

Varias especies de muérdago tienen un amplio uso en la medicina tradicional. Por ejemplo, *Phoradendron carneum* Urb., *Phoradendron galeottii* Trel., *Phoradendron reichenbachianum* (Seem.) Oliver y *Phoradendron serotinum* (Raf.) M.C. Johnst se usan para tratar trastornos dermatológicos y tumores de piel (22).

Las phoratoxinas aisladas de *Phoradendron tomentosum* manifiestan actividad citotóxica en diferentes líneas celulares (23). El extracto de metanol de las hojas de *Phoradendron vernicosum* Greenm presentó actividad contra el carcinoma nasofaríngeo (24). El extracto acuoso de las hojas de *P. serotinum* (Raf.) MC Johnst causó efectos tóxicos contra el carcinoma de mama (25) y el extracto etanólico muestra actividad citotóxica contra las células epiteliales pulmonares (26).

Los diferentes extractos de *Phoradendron microphyllum* mostraron actividad citotóxica contra las líneas celulares NCI-H292 y Hep-2, mientras que los extractos de la especie *Phoradendron mucronatum* mostraron acción inhibitoria hacia las líneas celulares de

NCI-H292, MCF-7, HEP-2. Los principales porcentajes de inhibición del crecimiento celular se observaron en la especie *P. mucronatum* posiblemente debido a la gran variedad de componentes detectados (27).

Las partes aéreas del muérdago americano *P. serotinum* (Raf.) M.C. Johnst. (sinónimo *Phoradendron tomentosum* (DC) Engelm.), se usan en la medicina tradicional mexicana para el tratamiento empírico del dolor corporal, cáncer, diabetes, infecciones del tracto urinario, varices y dismenorrea. El extracto hidro-alcohólico de sus hojas ejerce actividades antitumorales y efectos inmunomoduladores *in vivo* e *in vitro* (27).

Los extractos de muérdago europeo son clasificados como modificadores de la respuesta biológica y su acción inmunomoduladora y antitumoral ha sido ampliamente estudiada. Se ha demostrado que los extractos de muérdago matan las células cancerosas en el laboratorio y estimulan el sistema inmunológico (28-30). Tres componentes del muérdago (lectinas, viscotoxinas y alcaloides) pueden ser responsables de sus efectos biológicos (31-33). La terapia con muérdago se utiliza ampliamente en Europa como tratamiento alternativo y complementario del cáncer. Se ha demostrado que el contenido de lectina (MLI) del extracto está estrechamente relacionado con su efecto inmunomodulador/antitumoral y algunos extractos están siendo estandarizados de acuerdo con su concentración de lectina (34-36).

Los extractos de *Viscum album* L., otra especie de muérdago de la familia Santalaceae, han sido populares en Europa como un enfoque poco convencional para el tratamiento del cáncer durante siete décadas. Varios informes han señalado que ejercen efectos antiinflamatorios y antitumorales debido a la acción sobre el sistema inmune (37).

En dichos extractos se han identificado componentes reductores de tumores como lectinas, viscotoxinas, proteínas, péptidos, oligosacáridos, alcaloides, compuestos polifenólicos y flavonoides (37).

Sus actividades anti cáncer y los mecanismos se deben a la inhibición de la proliferación celular, a la inducción de citocina y a efectos inmunoadyuvantes (37).

### 3.- OBJETIVOS

#### Objetivo General

- Evaluar la influencia de la administración oral del extracto bruto de *Phoradendron bathyoryctum* Eichler sobre modelos de dolor e inflamación inducidos en ratones.

#### Objetivos Específicos

- Determinar la influencia de la administración oral del extracto bruto de *P. bathyoryctum* sobre el dolor inducido por presión en ratones.
- Determinar la influencia de la administración oral del extracto bruto de *P. bathyoryctum* sobre el dolor inducido químicamente en ratones.
- Determinar la influencia de la administración oral del extracto bruto de *P. bathyoryctum* sobre el dolor inducido por calor en ratones.
- Determinar la influencia de la administración oral del extracto bruto de *P. bathyoryctum* sobre modelos de inflamación.

## 4.- MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1- Diseño

Estudio experimental In vivo.

Población enfocada: Ratonos albinos suizos, hembras de entre 25 y 35 g (*Mus musculus*).

Población accesible: Ratonos albinos suizos hembras de entre 25 y 35 g del bioterio de la Facultad de Ciencias Químicas - Universidad Nacional de Asunción en el año 2021.

Criterio de inclusión: especímenes adultos, jóvenes, hembras de entre 25 y 35 g de peso corporal mantenidos en un ciclo de luz/oscuridad de 12 h, climatizados a 22-25°C de temperatura y una humedad relativa del 50-60%

Criterio de exclusión: animales con manifestaciones anormales de salud, conductas bizarras, o que se encuentren fuera de los rangos de pesos señalados más arriba.

Variable independiente: administración de solución salina al 0,9% como blanco; extracto hidro-alcohólico de hojas de *P. bathyoryctum* disuelto en solución salina en dosis de 3, 30 y 300 mg/kg, Indometacina 10 mg/Kg y Morfina 6 mg/kg como control positivo.

Variable dependiente: presencia o ausencia de signos de dolor e inflamación.

Instrumento de medición: Observación clínica.

Tipo de Muestreo: No probabilístico por conveniencia.

Tamaño de la muestra: 120 animales (4 grupos de 30 animales)

Hipótesis Nula: El extracto hidro-alcohólico de *P. bathyoryctum* no posee efecto analgésico y antiinflamatorio.

Hipótesis Alternativa: El extracto hidro-alcohólico de *P. bathyoryctum* posee efecto analgésico y antiinflamatorio.

#### **4.2- Material vegetal y obtención del extracto**

Plantas enteras de *P. bathyoryctum* Eichler desarrollada en ramas de los árboles de “Guajayvi” (*Patagonula americana*) fueron recolectados en el Jardín de Aclimatación de Plantas nativas y medicinales de la Facultad de Ciencias Químicas - Universidad Nacional de Asunción, San Lorenzo, Paraguay. Un ejemplar fue llevado al Dpto. de Botánica de la Facultad de Ciencias Químicas - UNA para su identificación en donde un ejemplar fue depositado en el Herbario (FCQ), ejemplar N° 4.661, R. Degen y M. Ortiz.

El material fresco recolectado (hojas y tallos) fueron secados en estufa a 40°C, luego fue sometido a molienda a fin de obtener el polvo fino; 400 g del mismo se extrajo con 2000 mL de una mezcla de etanol-agua (70:30) en frío, la mezcla se sonicó por 15 minutos a 30° y luego se dejó reposar por 30 minutos, repitiéndose este proceso tres veces para luego filtrar al vacío. Se repitió el mismo procedimiento dos veces más. Posteriormente, los filtrados fueron reunidos, homogeneizados y sometidos a evaporación a presión reducida mediante rota-vapor en un baño de 50°C. El extracto bruto de *P. bathyoryctum* (Pb) concentrado fue congelado y finalmente liofilizado para su utilización en todos los estudios biológicos. Se obtuvo 41,1 gramos de extracto liofilizado a partir de los 400 gramos de polvo con un rendimiento del 10,3 %.

#### **4.3- Animales**

Se emplearon ratones albinos suizos hembras de 70 a 90 días de vida, con pesos comprendidos entre 25 a 35 g, proveniente del bioterio del Departamento de Farmacología de la Facultad de Ciencias Químicas - UNA, criados, mantenidos y experimentados en ambiente climatizado (22-25°C de temperatura y 55 ± 5% de Humedad relativa) y ciclo de luz fluorescente/oscuridad de 12/12 horas. Los ensayos se llevaron a cabo en el Departamento de Farmacología de la Facultad de Ciencias Químicas – UNA, para ello, fueron separados en grupos de 6 ratones hembras, pesados, marcados y registrados en planilla disponible para el efecto.

La noche anterior a los experimentos, se les retiró los alimentos para que permanecieran en ayunas por 8 horas, pero con libre acceso al agua.

#### **4.4.- Drogas**

La Indometacina y la Morfina fueron utilizadas como drogas de referencia (control positivo) para la actividad antiinflamatoria y analgésica según el ensayo a realizar; solución salina al 0,9% se utilizó como blanco, una solución de Ácido acético al 0,8% se utilizó para producir las contorsiones y la Carragenina al 1% para producir la inflamación.

#### **4.5.- Tratamientos**

El extracto de *P. bathyoryctum* (Pb) fue disuelto en solución salina al 0,9% para administrar a los ratones por vía oral. La indometacina (10 mg/kg de peso) fue disuelta en una solución de etanol 10%, propilenglicol 40%, agua destilada 50% y adicionando además 0,05 mL de una solución tampón de bicarbonato de sodio. La morfina, disuelta en solución salina, fue utilizada en una dosis de 6 mg/kg. Las dosis de Pb empleadas fueron seleccionadas a partir de trabajos previos ejecutados en el laboratorio (8). El volumen de todas las muestras administradas fue realizado en dosis de 0,1 mL por cada 10 g de peso corporal.

#### **4.6.- Evaluación de la influencia de la administración oral de Pb sobre el comportamiento general**

Se realiza el procedimiento según el método observacional descripta por Irwing y actualizado por Roux (39-40). En un ensayo inicial se trataron tres grupos de ratones (n=2) con Pb (3, 30 y 300 mg/kg; vía oral) más un grupo blanco que recibió solución salina 0,9%. Los animales fueron observados, acorde al grupo, por 5 minutos, cada media hora por un periodo de 4h tras recibir el extracto y el comportamiento general (signos periféricos y centrales de estimulación o depresión) fue registrado convenientemente. Para la prueba definitiva, se repitió el ensayo con un grupo tratado con la dosis más alta de Pb (300 mg/kg; vía oral, N=5) y otro grupo recibió solución salina 0,9% como grupo blanco (N=2). Se observó nuevamente a los animales por 5 minutos a cada media hora por un periodo de 4h y posteriormente de manera periódica por un lapso de 14 días para evaluar posible aparición de toxicidad retardada. Cumplido el tiempo se procedió a sacrificar a los animales, y riñones, hígado, estómago y corazón fueron disecados y comparados con los correspondientes órganos de los animales tratados con el vehículo.

## **4.7.- Evaluación de la actividad analgésica de Pb**

### **4.7.1.- Determinación de la influencia de la administración oral de Pb sobre el dolor inducido por presión mecánica caudal (Randall-Selitto Test)**

Ratones albinos suizos hembras (25 a 35 g de peso corporal) fueron seleccionados aleatoriamente en 5 grupos de 6 ratones cada uno. Un grupo recibió Indometacina (10 mg/kg, vía oral, otros tres fueron tratados oralmente con Pb (3, 30 y 300 mg/kg) y el último grupo recibió oralmente solución salina al 0,9% y constituye el grupo blanco. Después de una hora de los tratamientos, se midió la actividad analgésica utilizando un instrumento llamado Analgesiómetro, un dispositivo que ejerce una fuerza que aumenta a una velocidad constante. Esta fuerza es controlada continuamente por un puntero que se mueve a lo largo de una escala lineal (41,42).

En este ensayo la fuerza se aplica sobre el punto medio de la cola, previamente marcado con tinta, la cual se coloca sobre un pequeño zócalo bajo una cuña de punta redondeada. El zócalo está hecho de teflón, que es biológicamente inerte y tiene un coeficiente de fricción muy bajo. Por lo tanto, si el animal de repente retira su cola, se divide fácilmente sin ser herido (42).

El operador presiona un pedal para iniciar el mecanismo que ejerce la fuerza en la cola; cuando el animal percibe dolor, chillar, retira la cola o lucha para retirar, el operador suelta el pedal y lee en la escala la fuerza en la que el animal sintió dolor. La fuerza se mide en una escala calibrada de 10 gramos por centímetro, mediante un puntero remachado a la corredera (42).

La escala puede ser multiplicada por 2 o 3, colocando en el equipo uno o dos discos (de 10 gramos cada uno) proporcionados por el fabricante (42).

Las medias  $\pm$  desvío estándar de la migración del cursor hasta la respuesta del dolor en función del tiempo fueron registradas gráficamente.

#### **4.7.2.- Determinación de la influencia de la administración oral de Pb sobre el dolor inducido químicamente por ácido acético (contorsiones abdominales o Writhing test)**

Se realizó en ensayo con 5 grupos de 6 ratones cada uno, un grupo con Indometacina (10 mg/kg) vía oral, tres grupos fueron tratados oralmente con Pb en dosis de 3 mg/kg 30mg/kg y de 300 mg/kg, el último grupo constituye el blanco, tratado con solución salina al 0,9%, todos por administración intragástrica. Después de una hora de los tratamientos se inyectó en todos los animales, por vía intraperitoneal, ácido acético 0,8% diluido en solución salina. Se contaron las contorsiones cada 5 minutos durante 30 minutos (13,43,44).

Las medias  $\pm$  desviaciones estándar del número total de las contorsiones acumuladas fueron registradas y relacionadas gráficamente.

#### **4.7.3.- Determinación de la influencia de la administración oral de Pb sobre la reacción al dolor inducido térmicamente (placa caliente o hot plate)**

Se trabajó con 5 grupos conformados por 6 ratones cada uno, cada grupo recibió un tratamiento por vía oral una hora antes de realizar el ensayo, uno de ellos recibió Morfina 6mg/kg que fue el fármaco de referencia, otro grupo solución salina al 0,9% como blanco y los demás grupos recibieron Pb en dosis de 3 mg/kg 30mg/kg y de 300 mg/kg. Una vez transcurridos los 60 minutos, los animales fueron colocados individualmente en una placa caliente (55°C). El tiempo de reacción del animal al estímulo térmico se caracteriza por la reacción de lamer o levantar las patas, considerándolo como señal de nocicepción. El tiempo máximo de permanencia del animal en la placa caliente fue de 30 segundos a fin de evitar lesiones (13,45,46).

#### **4.8.- Evaluación de la actividad antiinflamatoria de Pb**

##### **4.8.1.- Determinación de la influencia de la administración oral de Pb sobre el edema plantar inducido por carragenina**

Se realizó el ensayo con 6 grupos conformados por 5 animales cada uno, a los cuales se administró de manera oral solución salina al 0,9% para el grupo blanco, extracto de *P.*

*bathoryctum* en dosis de 3 mg/kg para un grupo, dosis de 30mg/kg para otro grupo y otro más con dosis de 300 mg/kg, el quinto grupo recibió Indometacina 10 mg/kg.

Luego de 1 h del tratamiento, los animales fueron inyectados en la región sub plantar (s.p.) de las patas traseras derechas con 40  $\mu$ L de carragenina (1 %) tal como fue descrito por Kim et al (47) salvo los animales tratados con solución salina, quienes constituyen el grupo blanco, por lo cual no fueron inyectados con carragenina, a fin de validar el método para la formación del edema.

A las 3 horas posteriores a la inyección se midió el volumen del edema plantar inducido por carragenina, sumergiendo las patas traseras hasta el maléolo lateral en la vasija del pletismómetro digital (LE 7500 Panlab, Harvard Apparatus), un dispositivo eléctrico el cual traduce de manera digital el volumen de agua desplazado.

Una diferencia estadísticamente significativa entre el grupo tratado con carragenina y el grupo que recibió algún tratamiento indica actividad antiinflamatoria (13,46,48).

#### **4.9.- Gestión y Análisis de los datos**

Los resultados obtenidos en los diferentes grupos en estudio fueron expresados como media  $\pm$  desviación estándar. Para el tratamiento estadístico de los datos se usó el programa GraphPad Prism 5, realizándose el análisis de varianza (ANOVA) paramétrico, y el test de comparaciones múltiples de TUKEY con un nivel de confianza del 95%, por lo que el nivel  $p < 0.05$  se consideró como estadísticamente significativo.

#### **4.10.- Asuntos Éticos**

Al tratarse de un estudio experimental con animales de laboratorio, el protocolo fue sometido a consideración del Comité de Ética de Investigación de la Facultad de Ciencias Químicas y fue aprobado por el mismo el día 14 de abril del 2021 con el código CEI 703/2021. (Anexos)

Se consideró a los animales como reactivos biológicos y se trabajó de acuerdo a las normas establecidas en la Comisión de Ética de la Comunidad Europea (Real Decreto, 2005) (49). El manejo de los animales se realizó aplicando uno de los Principios de las 3R'S o Alternativas en el Uso de Animales de Laboratorio (Refinamiento); utilizando procedimientos estandarizados, a fin de refinar los métodos existentes, minimizar el dolor y la angustia para mantener el bienestar del animal. Acabados los ensayos biológicos los

ratones fueron sometidos a eutanasia por dislocación cervical, descrita por Clifford (1984) (50), congelados y finalmente dispuestos a una empresa especializada en desechos biológicos.

## **5.- RESULTADOS**

### **5.1.- Determinación de la influencia de la administración oral de Pb sobre el comportamiento general de ratones**

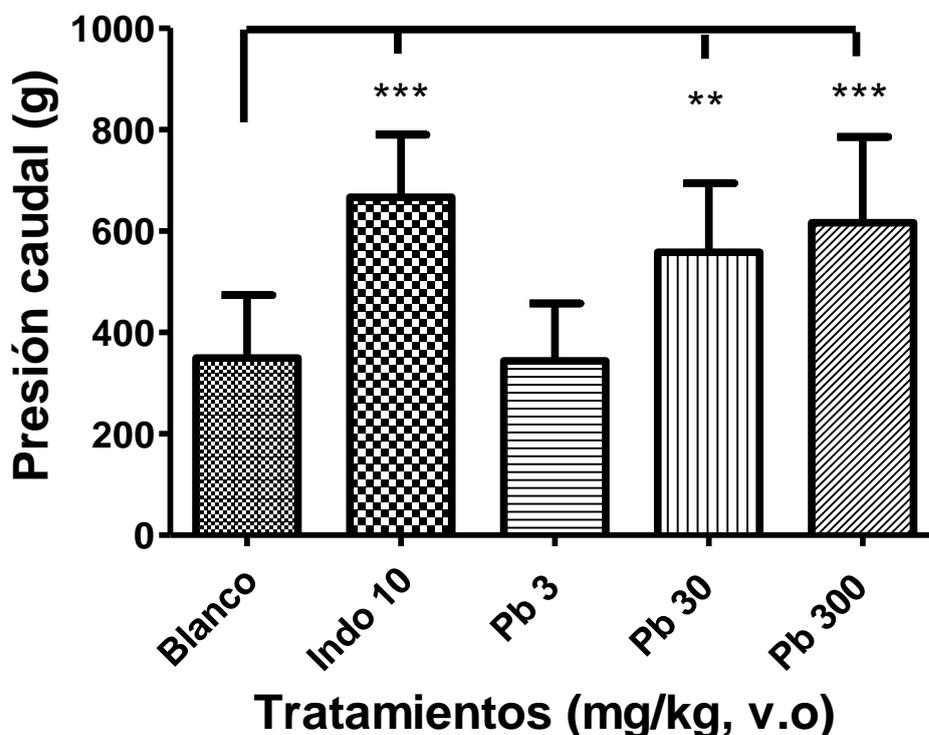
La administración oral de Pb (3, 30, y 300 mg/kg) no provocó cambios en el comportamiento general de los ratones. Además, no fue apreciado cambios morfo-anatómicos en los órganos evaluados con la dosis más alta (300 mg/kg) como por ejemplo alteraciones del tamaño de los mismos o cambios en la coloración, indicando inocuidad del producto natural en el ensayo ejecutado.

### **5.2.- Determinación de la influencia de la administración oral de Pb sobre el dolor inducido**

#### **5.2.1- Efecto de la administración oral de Pb sobre el tiempo de reacción al dolor en el ensayo de presión mecánica caudal**

En el ensayo de presión mecánica caudal (Test de Randall-Selitto) se aprecia un incremento estadísticamente significativo del umbral del dolor (inducido por presión mecánica) en un 60 y 77% con las dosis de 30 ( $558,0 \pm 136,2$  g;  $p < 0,01$ ) y 300 ( $616,5 \pm 169,2$  g;  $p < 0,001$ ) mg/kg de Pb respectivamente, en comparación al grupo blanco que representa el 100% ( $349,1 \pm 124,2$  g), compatible con efecto analgésico y se muestra en la figura 1. La menor sensibilidad al estímulo doloroso mecánico es dosis dependiente y con intensidad máxima (92%) similar al control positivo Indometacina (100%). Sin embargo, la dosis de 3 mg/kg no presentó efecto estadísticamente significativo ( $343,6 \pm$

113,1 g) comparado al grupo blanco. El aumento, estadísticamente significativo, del umbral del dolor provocado por 10 mg/kg de indometacina ( $666,6 \pm 122,9$  g;  $p < 0,001$ ), control positivo, comparado al grupo blanco, valida efectivamente el método utilizado.

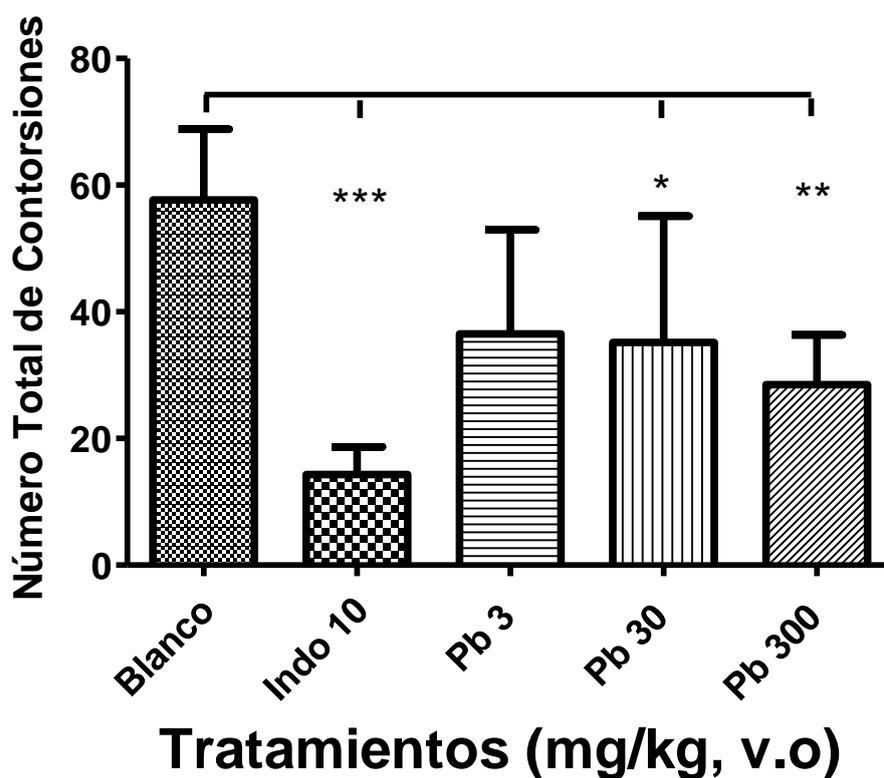


**Figura 1.** Presión mecánica caudal (gramos de desplazamiento) soportados por los animales sometidos al test de Randall-Selitto tras 1 h de la administración oral de *P. bathyoryctum*. Las barras representan los promedios  $\pm$  desvío estándar.

### 5.2.2- Efecto de la administración oral del extracto de Pb sobre el número total de contorsiones abdominales en ratones sometidos al estímulo doloroso con ácido acético al 0,8%

En la figura 2 se observa que los grupos de animales tratados oralmente con dosis de 30 ( $35,17 \pm 19,93$ ;  $p < 0,05$ ) y 300 mg/kg ( $28,50 \pm 7,84$ ;  $p < 0,01$ ) de Pb demostraron significativa reducción del número de contorsiones abdominales (39 y 51 %), compatibles con actividad analgésica, en comparación al grupo blanco ( $57,67 \pm 11,17$ ). Asimismo,

reducción, estadísticamente significativa, del número de contorsiones abdominales del 75% fue inducido al grupo de animales tratados con 10 mg/kg, por vía oral, de indometacina ( $14,33 \pm 4,32$ ;  $p < 0.001$ ) en comparación al grupo blanco, lo cual valida el experimento para la detección de sustancias con actividad analgésica. En cambio, la dosis de 3mg/kg de Pb no modificó el número de contorsiones abdominales ( $36,50 \pm 16,45$ ) provocadas por la administración de ácido acético como estímulo nocivo.

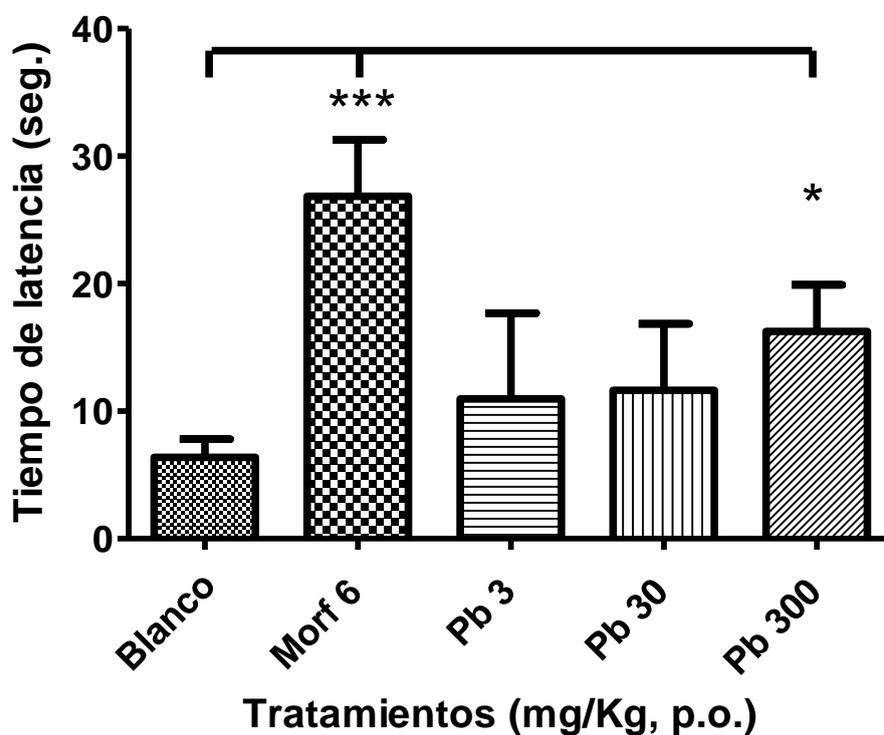


**Figura 2.** Número Total de contorsiones abdominales inducidas con ácido acético al 0,8% después de 1 h de la administración oral de *P. bathyoryctum*. Las barras representan los promedios  $\pm$  desvío estándar.

### 5.2.3- Efecto de la administración oral de Pb sobre el tiempo de latencia en la reacción al estímulo doloroso térmico en el test de la placa caliente

La dosis oral de 300 mg/kg de Pb mostró un significativo incremento de 155% del tiempo de latencia en la reacción al estímulo doloroso térmico ( $16,25 \pm 3,67$  seg;  $p < 0,05$ ) en comparación al grupo de animales tratados con el vehículo ( $6,37 \pm 1,44$  seg) y se visualiza

en la figura 3. En el mismo sentido, se observa diferencia estadísticamente significativa entre el tiempo de latencia del grupo de animales tratados con 6 mg/kg del control positivo analgésico morfina ( $26,85 \pm 4,45$  seg;  $p < 0,001$ ) incrementado en un 322% en comparación al grupo de animales tratado con el vehículo ( $6,37 \pm 1,44$  seg) (Solución salina al 0,9%), validando el método empleado. Sin embargo, grupos de animales tratados oralmente con 3 ( $10,96 \pm 6,73$  seg) y 30 ( $11,64 \pm 5,20$  seg) mg/kg de Pb no indujeron modificaciones significativas en el tiempo de latencia de reacción al estímulo doloroso térmico al compararlos con los animales tratados con el vehículo ( $6,373 \pm 1,44$  seg).

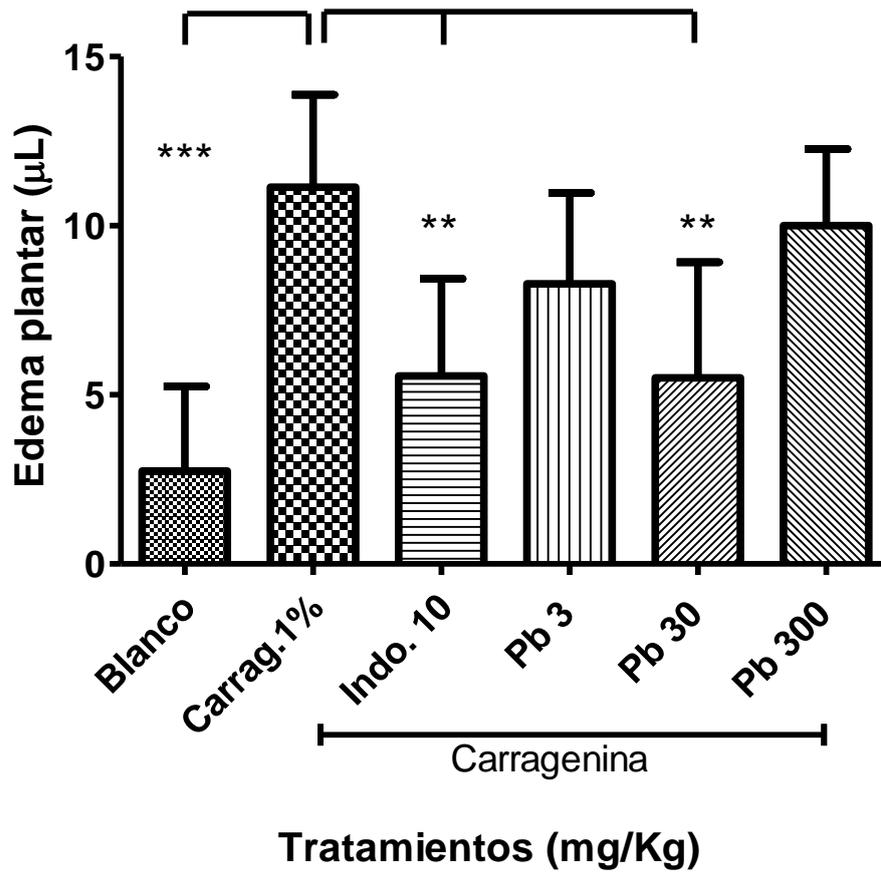


**Figura 3.** Tiempo de latencia de la reacción del animal sometido al estímulo nocivo térmico después de 1 h de la administración oral de *P. bathyoryctum*. Las barras representan los promedios  $\pm$  desvío estándar.

### **5.3- Evaluación de la actividad antiinflamatoria de *P. bathyoryctum***

#### **5.3.1- Efecto de la administración oral de Pb sobre el volumen del edema plantar inducido por carragenina**

A las 3 horas de la administración subplantar de carragenina, el grupo de animales tratados oralmente con 30 mg/kg de Pb ( $5,50 \pm 3,42 \mu\text{L}$ ;  $**p < 0.01$ ) evidenció capacidad anti edematosa (antiinflamatoria) significativa del 51 % (antiinflamatoria) con respecto al grupo control positivo del edema (carragenina) ( $11,14 \pm 2,73 \mu\text{L}$ ); como puede apreciarse en la figura 4. Las dosis de 3 ( $8,29 \pm 2,69 \mu\text{L}$ ) y 300 ( $10,00 \pm 2,27 \mu\text{L}$ ) mg/kg de Pb, no modificaron de manera significativa la capacidad edematosa de la carragenina. Por otro lado, se observa una diferencia estadísticamente significativa entre el volumen de edema plantar inducido por Carragenina ( $11,14 \pm 2,73 \mu\text{L}$ ;  $***p < 0.001$ ) a las 3 h de su administración en comparación al grupo blanco ( $2,75 \pm 2,50 \mu\text{L}$ ), tratados con solución salina al 0,9% validando de esta manera el método de inducción de edema empleado. Además, se observó diferencia antiedematosa significativa del 50 % entre los animales que recibieron 10 mg/kg de Indometacina ( $5,56 \pm 2,88 \mu\text{L}$ ;  $**p < 0.01$ ) con respecto al grupo control positivo del edema tratado con Carragenina, validando de esta manera la capacidad antiedematosa certificando la sensibilidad y eficiencia del método para la determinación de sustancias con propiedades antiinflamatorias.



**Figura 4.** Variación del volumen, en  $\mu\text{L}$ , de edema plantar inducido por carragenina y determinada a las 3 h del estímulo flogístico, a grupos de animales previamente tratados (1h antes) con solución salina, indometacina y Pb (3, 30 y 300 mg/kg, vía oral). Las barras representan los promedios  $\pm$  desvío estándar.

## 6.- DISCUSIÓN

Este trabajo evalúa la actividad anti nociceptiva y antiinflamatoria de la administración oral del extracto hidro-alcohólico de *P. bathyoryctum*, con actividad antidepresiva previamente demostrada por Hellión-Ibarrola et al en nuestro laboratorio (8). Maallo et al, explican el dolor, basado en la International Association for the Study of Pain (IASP), como “una experiencia sensorial o emocional desagradable asociada a un daño tisular real o potencial” (51). El dolor, como sensación desagradable, activan vías, centros y mecanismos reguladores muy variados y según Woolf CJ puede clasificarse en a) dolor nociceptivo provocado por la normal activación de los nociceptores periféricos (“alarma” y protección del organismo frente a estímulos nocivos, de alto umbral al dolor y frecuentemente se acompaña de un reflejo de retirada); b) dolor inflamatorio provocado por daño tisular y activado por infiltración de células mediadoras de inflamación (macrófagos, mastocitos neutrófilos y granulocitos) con bajo umbral de dolor y c) el dolor patológico (neuropático y disfuncional) que aparece como consecuencia de una lesión del sistema nervioso (central o periférico) o procesamiento central anormal respectivamente (52). En la actualidad se acepta la asociación dolor-depresión o depresión-dolor como comorbilidades muy frecuentes en la población adulta general con dolor crónico. El dolor crónico en los adultos europeos es del orden del 19 % mientras que en USA es del 20.4 % y la depresión es su comorbilidad asociada más frecuente. La prevalencia de la depresión en la sociedad europea y americana es de un 7 y 7.5 % en la respectivamente (53). Publicaciones de la OMS estiman que, de los 322 millones de casos de depresión reportados a nivel mundial, 48,16 millones corresponden a los casos reportados en América (equivalente al 15% del total de casos a nivel mundial). Siendo la depresión más común entre mujeres que en hombres (5,1 y 3,6%, respectivamente) (54). En Paraguay,

se estima que alrededor del 5,23% de la población padece de trastornos depresivos, ocupando el cuarto lugar en América, superado solo por Estados Unidos, Brasil y Cuba (55). El dolor crónico severo es incapacitante, reduce la calidad de vida del paciente y es aun deficientemente manejado debido al continuo desbalance entre la analgesia farmacológica y la tolerabilidad, la cual lleva a un pobre resultado del tratamiento (56). Los modelos experimentales de dolor se separan en agudos, persistentes y neuropáticos. Los agudos están representados por los inducidos por estímulos mecánicos, químicos y térmicos. El dolor persistente está representado por el ensayo de la formalina y el neuropático por ensayos de ligación de nervios (57). Por lo mencionado, *P. bathyryctum* tiene el alegato suficiente por el cual fue evaluado su potencial actividad analgésica y antiinflamatoria en modelos pre clínicos de dolor.

En el ensayo de Randall y Selitto, empleando el analgesiómetro, la influencia de la administración oral del extracto hidro-alcohólico de *P. bathyryctum* denotó un eficiente efecto analgésico con las dosis de 30 y 300 mg/kg; no así para la dosis de 3 mg/kg. No obstante, con el aumento de la dosis se manifestó un grado creciente de la actividad, hasta resultar en valores significativos. Es importante hacer notar que la analgesia inducida por el extracto para la dosis de 30 mg/kg fue moderada en intensidad e inferior en comparación con los resultados obtenidos a partir del fármaco de referencia analgésica, la Indometacina. Para la mayor dosis utilizada (300 mg/kg), la respuesta al estímulo doloroso estuvo más estrechamente correlacionado al fármaco de referencia, manifestando una intensidad analgésica similar a la de la Indometacina para la respuesta nociceptiva periférica inducida por presión mecánica.

En adición, el efecto reductor significativo del número de contorsiones abdominales (39, 51 %) provocado por *P. bathyryctum* (30 y 300 mg/kg) al estímulo químico doloroso por ácido acético respecto al grupo blanco (100%), refuerzan los hallazgos de poseer capacidad anti nociceptiva importante. La misma tendencia dosis dependiente manifestada en los ensayos de Randall-Sellito y contorsiones abdominales, fue observado por Vasconcellos et al, al evaluar la actividad anti nociceptiva del extracto metanólico de *Phoradendron piperoides* (58). Asimismo, en el modelo de dolor inducido por agente térmico (test de la placa caliente), se pudo apreciar que las dosis más alta empleada (300 mg/kg), denotó potente capacidad de incrementar el umbral del dolor en 155%, con eficacia de menor intensidad (48%) frente al fármaco de referencia utilizado, la morfina (100%), la cual provocó un incremento del umbral del dolor en 322% comparado al

blanco. Cabe resaltar que la morfina y congéneres son los agentes con capacidad para modular con eficiencia las vías del dolor provocado por estímulo térmico y regulado a nivel del Sistema Nervioso Central, a diferencia de la indometacina, que solo regula dolores periféricos.

Contrariamente, en el estudio de Vasconcellos et al, ninguna de las dosis de extracto de *Phoradendron piperoides* empleados denotó un efecto analgésico significativo utilizando el ensayo de la placa caliente (58). Otros estudios con esa misma planta, realizado por Dias et al, discrepan de los resultados mencionados más arriba puesto que ensayos en modelos agudos (estímulos químico y térmico) y modelo de dolor persistente (test de la formalina) demostraron una disminución en el umbral del dolor apuntando a una carente actividad anti nociceptiva (59). Lógicamente, la falta de coincidencias puede deberse a muchos factores entre los que se pueden mencionar que, por un lado, son especies diferentes, también al método de extracción empleado, la época y región de colecta y por el otro, el tipo de árbol o sustrato al cual parasita la especie en estudio; todo lo mencionado puede generar variaciones en los componentes de los extractos.

Por otro lado, interesantemente *P. bathyoryctum* (30mg/kg) fue activa frente a la inflamación aguda provocada por inyección sub plantar de carragenina a las 3 h de su administración, provocando la reducción del edema en un 51 %, siendo ligeramente más potente que la droga de referencia (10mg/kg de Indometacina; 50%). El edema de pata inducido por carragenina en el ratón, se asocia con cambios nociceptivos en la pata y la migración de células inflamatorias al sitio de la inyección (60,61) y es sensible a los antiinflamatorios no esteroideos como la indometacina según estudio realizado por Lapa et al (62).

Recientemente, se ha demostrado que la segunda fase de la respuesta inflamatoria después de la inyección de carragenina en la pata de los ratones se asocia con la activación de la ciclooxigenasa 2 (COX-2), una elevada producción de prostaglandinas (por la acción de las ciclooxigenasas 1 y 2, COX-1 y COX-2), radicales libres oxigenados (NO derivados de eNOS y iNOS) e infiltración de neutrófilos (61,63,64). Por lo expuesto, *P. bathyoryctum* denota una actividad antiinflamatoria por reducir el edema y queda pendiente determinar cuál de las vías, mencionadas anteriormente, son afectadas y que componente(s) esta(n) involucrado(s) en la analgesia e inflamación. En el mismo sentido, trabajos con otras especies del género *Phoradendron* empleando el mismo modelo, obtuvieron resultados similares, pero efecto antiinflamatorio de menor intensidad (58,65).

Finalmente, los resultados de este trabajo incrementan el acervo de literatura científica disponible y validan el uso popular de este recurso natural como analgésico y antiinflamatorio.

## 7.- CONCLUSIÓN

El presente trabajo demuestra que la administración oral de *P. bathyoryctum* en ratones denotó una eficiente capacidad analgésica y antiinflamatoria en los modelos pre clínicos utilizados. En el ensayo de dolor inducido por presión mecánica (test de Randall-Sellito) se observa un eficaz efecto analgésico dependiente de la dosis, observándose mayor tiempo de latencia de antes de que el animal manifieste signos de dolor. El umbral del dolor fue incrementado en 77 % con la mayor dosis de *P. bathyoryctum* comparados al blanco, y moderada en intensidad en relación al obtenido con Indometacina (fármaco de referencia analgésica).

Se obtuvo una reducción del 51% del número de contorsiones (dolor inducido químicamente) en los animales tratados con *P. bathyoryctum* frente al blanco, evidenciando eficiente capacidad analgésica, pero de menor intensidad que el fármaco de referencia Indometacina que manifestó una potencia del 75% frente al vehículo.

Empleando el estímulo nocivo térmico (placa caliente), se observó un potente efecto analgésico de *P. bathyoryctum* por incremento del 155%, del umbral del dolor respecto al grupo Blanco mientras que la Morfina aumento en 322 % el mismo parámetro, como fármaco de referencia. Esto se evidenció mediante un eficiente aumento de tiempo de latencia antes del salto de la placa caliente o lamida plantar compatible con efecto analgésico de la máxima dosis de Pb (300 mg/kg).

Por otro lado, se determinó que el extracto bruto de *P. bathyoryctum* posee actividad antiinflamatoria, dado que evidencia capacidad de reducir al 51% el edema inducido por carragenina y manifiesta una potencia ligeramente mayor a la actividad antiinflamatoria

de 10 mg/kg de Indometacina (50%). Por lo tanto, los resultados obtenidos evidenciaron la capacidad eficiente del Pb en incrementar el umbral del dolor compatible con efecto analgésico y capacidad anti edema también relacionado a efecto antiinflamatorio adicional.

Finalmente, estos resultados plantean la necesidad de la ejecución de trabajos complementarios para determinar el posible mecanismo de acción del extracto, así como también para dilucidar la estructura(s) de la molécula(s) bioactiva(s).

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ibarrola DA, Hellión-Ibarrola MC, Montalbetti Y, Heinichen O, Campuzano MA, Kennedy ML, et al. Antihypertensive effect of nuatigenin-3-O- $\beta$ -chacotriose from *Solanum sisymbriifolium* Lam. (Solanaceae) (Ñuatî pytâ) in experimentally hypertensive (ARH+DOCA) rats under chronic administration. *Phytomedicine*. 2011;18:634–40.
2. Hellión-Ibarrola María del Carmen, Montalbetti Yenny, Heinichen Olga Y., Kennedy María L., Campuzano Miguel A., Ibarrola Derlis A.. Anxiolytic-like and sedative effects of *Kyllinga brevifolia* in mice. *Rev. bras. farmacogn*. 2012 Dec;22(6): 1323-1329.
3. Campuzano-Bublitz MA, Ibarrola DA, Hellión-Ibarrola MC, Dölz JH, Kennedy ML. Acute and chronic anti-hyperglycemic effect of *Prosopis ruscifolia* extract in normoglycemic and alloxan-induced hyperglycemic rats. *J Appl Pharm Sci*. 2016;6(5):178–84.
4. Heinichen OY, Hellión-Ibarrola MC, Montalbetti Y, Velázquez AM, Dölz-Vargas JH, Ibarrola DA. Behavioral profile and gastrointestinal evaluation of the hydro-alcoholic extract of *Sida rhombifolia* L. (typychá hû) in mice. *J Appl Pharm Sci*. 2017 Jul 1;7(7):021–9.
5. Hellión-Ibarrola MC, Ibarrola DA, Montalbetti Y, Kennedy ML, Heinichen O, Campuzano M, et al. The antidepressant-like effects of *Aloysia polystachya* (Griseb.) Moldenke (Verbenaceae) in mice. *Phytomedicine*. 2008 Jun 20;15(6–7):478–83.
6. Barranco Ruiz F, Blasco Morilla J, Mérida Morales A, Muñoz Sánchez M.A, Jareño Chaumel A, Cozar Carrasco J et al. Principios de Urgencias, Emergencias y Cuidados Críticos. SAMIUC. Capítulo 12.2 Sedación y Analgesia. Disponible en: <https://www.uninet.edu/tratado/c120202.html>.

7. Saarto T, Wiffen PJ. Antidepressants for neuropathic pain: A Cochrane review. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2007;81(12):1372–3.
8. Helli6n-Ibarrola MDC, Montalbetti Y, Heinichen OY, Ibarrola DA. Anxiolytic and Antidepressant-like Effect of the Hydroalcoholic Extract of *Phoradendron Bathyoryctum* Eichler (santalaceae) (ka'avo Tyre'y) In Mice. *J Appl Pharm Sci*. 2021;11(6):062–9.
9. Serra Catafau J, Quiles Bosque C. Antiepilepticos en el manejo del dolor neuropático. 1ª ed. España: Ed. Médica Panamericana; 2003.
10. Lima Mompó Gilda, Aldana Vilas Laura, Casanova Sotolongo Pedro, Casanova Carrillo Pedro, Casanova Carrillo Carlos. Inducción y medición del dolor experimental. *Rev Cub Med Mil [Internet]*. 2003 Mar [cited 2021 Aug 6]; 32( 1 ): . Available from: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0138-65572003000100008&lng=en](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0138-65572003000100008&lng=en).
11. González-Costa Maricarmen, González Alexander Ariel Padrón. La inflamación desde una perspectiva inmunológica: desafío a la Medicina en el siglo XXI. *Rev haban cienc méd [Internet]*. 2019 Feb [citado 2021 Ago 06]; 18( 1 ): 30-44. Disponible en: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1729-519X2019000100030&lng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1729-519X2019000100030&lng=es).
12. Guignard B. Monitoring analgesia. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol*. 2006;20(1):161–80.
13. Lapa AJ, Monteiro de Lima, TC. Métodos farmacológicos para a validação de plantas medicinais. 1ª ed. São Paulo: Cytel/Rivaplamed; 2001. p. 60-67.
14. Silva JC, Raquel S, Lima G De, Gonçalves R, Júnior DO, Guedes R. Modelos experimentais para avaliação da atividade antinociceptiva de produtos naturais: uma revisão. *Rev Bras Farm*. 2013;94(1):18–23.
15. Rugel Garces PA. Determinación de la actividad antiinflamatoria de la planta *Salvia quitensis* mediante inhibición de edema plantar inducido por carragenina en ratas *Rattus norvegicus*. 2017 [cited 2021 Aug 7]; Available from: <http://dspace.esPOCH.edu.ec/handle/123456789/6697>
16. Cabral EL. Core Eudicotiledóneas Diversidad Vegetal Biotaxonomía de Spermatofitos 2010. Corrientes (Argentina). Universidad Nacional del Nordeste – Facultad de Ciencias Exactas, Naturales y Agrimensura. 2010. p. 34-37.
17. *Phoradendron bathyoryctum* Eichler [Internet]. [cited 2021 Aug 7]. Available from: <http://www.worldfloraonline.org/taxon/wfo-0001074869>

18. The Plant List [Internet]. 2013. [cited 2020 Oct 29]. Available from: <http://www.theplantlist.org/1.1/browse/A/Santalaceae/Phoradendron/>
19. Nickrent DL, Malécot V, Vidal-Russell R, Der JP. A revised classification of Santalales. *Taxon* [Internet]. 2010 Apr 1 [cited 2020 Dec 1];59(2):538–58. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/tax.592019>
20. Messias PA, Vidal J de D, Koch I, Christianini A V. Host specificity and experimental assessment of the early establishment of the mistletoe *Phoradendron crassifolium* (Pohl ex DC.) Eichler (Santalaceae) in a fragment of Atlantic Forest in southeast Brazil. *Acta Bot Brasilica* [Internet]. 2014 [cited 2020 Dec 1];28(4):577–82. Available from: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0102-33062014000400012&lng=en&nrm=iso&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-33062014000400012&lng=en&nrm=iso&tlng=en)
21. González Y, González de García M, Britos L, Delmás de Rojas G y Degen de Arrúa R. Morfoanatomía foliar de *Phoradendron obtusissimum* (Miq.) Eichler (Viscaceae), “ka'avotyre'y”, utilizado con fines medicinales en una comunidad de Colonia Independencia, Paraguay. *ROJASIANA* [Internet]. 2015 Dic ROJASIANA [cited 2020 Dec 3]; 14 (2): 33-39. Available from: [http://200.10.229.229/files/publicaciones/rojasiana/Vol%2014%20\(2\)/4ROJASIAN\\_A\\_142\\_Diciembre\\_2015.pdf](http://200.10.229.229/files/publicaciones/rojasiana/Vol%2014%20(2)/4ROJASIAN_A_142_Diciembre_2015.pdf)
22. Alonso-Castro AJ, Villarreal ML, Salazar-Olivo LA, Gomez-Sanchez M, Dominguez F, Garcia-Carranca A. Mexican medicinal plants used for cancer treatment: Pharmacological, phytochemical and ethnobotanical studies. *J Ethnopharmacol* [Internet]. 2011 [cited 2019 Nov 29];133(3):945–72. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2010.11.055>
23. Johansson S, Gullbo J, Lindholm P, Ek B, Thunberg E, Samuelsson G, et al. Small, novel proteins from the mistletoe *Phoradendron tomentosum* exhibit highly selective cytotoxicity to human breast cancer cells. *Cell Mol Life Sci*. 2003;60(1):165–75.
24. Caamal-Fuentes E, Torres-Tapia LW, Simá-Polanco P, Peraza-Sánchez SR, Moo-Puc R. Screening of plants used in Mayan traditional medicine to treat cancer-like symptoms. *J Ethnopharmacol* [Internet]. 2011 [cited 2019 Nov 30];135(3):719–24. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2011.04.004>
25. Jacobo-Salcedo Mdel R, Alonso-Castro AJ, Salazar-Olivo LA, Carranza-Alvarez C, González-Espíndola LA, Domínguez F, Maciel-Torres SP, García-Lujan C, González-Martínez Mdel R, Gómez-Sánchez M, Estrada-Castillón E, Zapata-Bustos R, Medellín-Milán P, García-Carranca A. Antimicrobial and cytotoxic effects of Mexican medicinal plants. *Nat Prod Commun*. 2011 Dec;6(12):1925-8. PMID: 22312741
26. Alonso-Castro AJ, Juárez-Vázquez MDC, Domínguez F, González-Sánchez I, Estrada-Castillón E, López-Toledo G, et al. The antitumoral effect of the American

- mistletoe *Phoradendron serotinum* (Raf.) M.C. Johnst. (Viscaceae) is associated with the release of immunity-related cytokines. *J Ethnopharmacol.* 2012;142(3):857–64.
27. Bastos Isla VGA, De Oliviera TB, Rodrigues MD, Militão GCG, Da Silva TG, Turatti ICC et al. Use of GC/MS to identify chemical constituents and cytotoxic activity of the leaves of *Phoradendron mucronatum* and *Phoradendron microphyllum* (Viscaceae). *An. Acad. Bras. Ciênc.* [Internet]. 2017 June [cited 2019 Nov 29]; 89( 2 ): 991-1001. Available from: <http://dx.doi.org/10.1590/0001-3765201720160586>
  28. Khwaja TA, Dias CB, Pentecost S. Recent studies on the anticancer activities of mistletoe (*Viscum album*) and its alkaloids. *Oncology.* 1986;43(1):42-50. doi: 10.1159/000226419. PMID: 3543783.
  29. Ribereau-Gayon, G., Dumont, S., Müller, C., Jung, M.L., Poindron, P., Beck, J.P., 1986. Effects of mistletoe (*Viscum album* L.) extracts on cultured tumor cells. *Experientia* 42, 594–599.
  30. Hajto T, Lanzrein C. Natural killer and antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity activities and large granular lymphocyte frequencies in *Viscum album*-treated breast cancer patients. *Oncology.* 1986;43(2):93-7. doi: 10.1159/000226342. PMID: 3951791.
  31. Stirpe F, Sandvig K, Olsnes S, Pihl A. Action of viscumin, a toxic lectin from mistletoe, on cells in culture. *J Biol Chem* [Internet]. 1982 Nov 25 [cited 2019 Dec 6];257(22):13271–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7142145>
  32. Stein GM, Schaller G, Pfüller U, Schietzel M, Büssing A. Thionins from *Viscum album* L: influence of the viscotoxins on the activation of granulocytes. *Anticancer Res* [Internet]. [cited 2019 Dec 6];19(2A):1037–42. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10368652>
  33. Mengs U, Göthel D, Leng-Peschlow E. Mistletoe extracts standardized to mistletoe lectins in oncology: review on current status of preclinical research. *Anticancer Res* [Internet]. [cited 2021 Dec 6];22(3):1399–407. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12168816>
  34. Friess H, Beger HG, Kunz J, Funk N, Schilling M, Büchler MW. Treatment of advanced pancreatic cancer with mistletoe: Results of a pilot trial. *Anticancer Res.* 1996;16(2):915–20.
  35. Braun JM, Ko HL, Schierholz JM, Beuth J. Standardized mistletoe extract augments immune response and down-regulates local and metastatic tumor growth in murine models. *Anticancer Res* [Internet]. [cited 2019 Dec 6];22(6C):4187–90. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12553054>

36. Varela BG, Fernández T, Ricco RA, Zolezzi PC, Hajos SE, Gurni AA, et al. *Phoradendron liga* (Gill. ex H. et A.) Eichl. (Viscaceae) used in folk medicine: Anatomical, phytochemical, and immunochemical studies. *J Ethnopharmacol.* 2004;94(1):109–16.
37. Fernández T, Wagner ML, Varela BG, Ricco RA, Hajos SE, Gurni AA, et al. Study of an Argentine mistletoe, the hemiparasite *Ligaria cuneifolia* (R. et P.) Tiegh. (Loranthaceae). *J Ethnopharmacol.* 1998;62(1):25–34.
38. Tatiana RAA, Umar H, Taradipa PS, Pernikahan H, Paramita I, et al. Test No. 420: Acute Oral Toxicity - Fixed Dose Procedure. *Angew Chemie Int Ed* 6(11), 951–952 [Internet]. 2017;2(1):1–8. Available from: [https://ejournal.unisba.ac.id/index.php/kajian\\_akuntansi/article/view/2615%0Ahttp://scholar.unand.ac.id/60566/](https://ejournal.unisba.ac.id/index.php/kajian_akuntansi/article/view/2615%0Ahttp://scholar.unand.ac.id/60566/)
39. Irwin S. Comprehensive observational assessment: Ia. A systematic, quantitative procedure for assessing the behavioral and physiologic state of the mouse. *Psychopharmacologia.* 1968 Jan;13(3):222–57.
40. Roux S, Sablé E, Porsolt RD. Primary Observation (Irwin) Test in Rodents for Assessing Acute Toxicity of a Test Agent and its Effects on Behavior and Physiological Function. *Curr Protoc Pharmacol.* 2004;27(1):1–23.
41. Santos-Nogueira E, Castro ER, Mancuso R, Navarro X. Randall-Selitto Test: A New Approach for the Detection of Neuropathic Pain after Spinal Cord Injury. *J Neurotrauma.* 2012; 29(5):898–904.
42. Ugo Basile [Internet]. Available from: <http://www.ugobasile.com/>
43. Lucena Josefina E.X., Bispo Magna D., Nunes Rogéria S., Cavalcanti Sócrates C.H., Teixeira-Silva Flávia MRM et al. Efeito antinociceptivo e antiinflamatório do extrato aquoso da entrecasca de *Coutarea hexandra* Schum. (Rubiaceae). *Rev Bras Farmacogn* [Internet]. 2006;16(1):67–72. Available from: <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2006000100012>.
44. Díaz Reissner C, Osorio MS, Paciello MR, Ferro E, Ibarrola D, Montalbetti Y, Hellón M del C, Degen R, Burgos Edward A. Evaluación de la actividad analgésica del *Aloe arborescens* en roedores. *Invest. y Est. - UNA* [Internet]. 30 de junio de 2017 [citado 7 de agosto de 2021];10(1):61-72. Disponible en: <https://revistascientificas.una.py/ojs/index.php/rdgic/article/view/190>

45. Cabral Silva J, Gomes de Lima SR, Gonçalves de Oliveira Júnior R, Guedes da Silva JR. Modelos experimentais para avaliação da atividade antinociceptiva de produtos naturais : uma revisão. *Rev Bras Farm.* 2013;94(1):18–23.
46. Porto CRC, Soares LAL, Souza TP, Petrovick PR, Lyra IL, Araújo Júnior RF, et al. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of *Phyllanthus niruri* spray-dried standardized extract. *Rev Bras Farmacogn.* 2013;23(1):138–44.
47. Kim HS, Kwon OK, Park JW, Jeong HG, Oh SR, Lee HK, et al. Anti-inflammatory activities of methanol extract of *mastixia arborea* c.b. clarke as to mouse macrophage and paw edema. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2013;77(12):2356–61.
48. Rugel Garces PA. Determinación de la actividad antiinflamatoria de la planta *Salvia quitensis* mediante inhibición de edema plantar inducido por carragenina en ratas *Rattus norvegicus*. 2017 [cited 2021 Aug 7]; Available from: <http://dspace.esPOCH.edu.ec/handle/123456789/6697>.
49. REAL DECRETO 1201/2005, de 10 de octubre, sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos. *Boletín Oficial del Estado*, 21 octubre 2005. 252: 34367-34391. <https://www.boe.es/boe/dias/2005/10/21/pdfs/A34367-34391.pdf> (último acceso 6 agosto 2021).
50. Clifford D. Preanesthesia, anesthesia, analgesia and euthanasia. *Laboratory Animal Medicine* / Edited By J.G. Fox, B.J. Cohen, F.M. Loew [serial on the Internet]. (1984), [cited August 7, 2021]; Available from: AGRIS.
51. Maallo AMS, Moulton EA, Sieberg CB, Giddon DB, Borsook D HS. A lateralized model of the pain-depression dyad. *Neurosci Biobehav Rev* [Internet]. 2021 Aug 1 [cited 2021 Aug 12];127:876–83. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34090918/>
52. Woolf CJ. What is this thing called pain? *J Clin Invest.* 2010;120(11):3742–4.
53. Tenti M, Raffaelli W, Gremigni P. A Narrative Review of the Assessment of Depression in Chronic Pain. *Pain Manag Nurs* [Internet]. 2021 [cited 2021 Aug 13]; Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33962870/>

54. OPS. Depresión y otros trastornos mentales comunes. Organ Panam la Salud Organ Mund la Salud [Internet]. 2017;1–24. Available from: <http://iris.paho.org/xmlui/bitstream/handle/123456789/34006/PAHONMH17005-spa.pdf>
55. Organización Mundial de la Salud. The Global Health Observatory. Estimated population-based prevalence of depression [Internet]. Ginebra: Organización Mundial de la Salud;2021 [citado 2021 sep 26] Disponible en: <https://www.who.int/data/gho/data/indicators/indicator-details/GHO/estimated-population-based-prevalence-of-depression>
56. Barroso J, Branco P, Apkarian AV. Brain mechanisms of chronic pain: critical role of translational approach. *Transl Res* [Internet]. 2021 Jun [cited 2021 Aug 13]; Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34182187/>
57. Bannon AW, Malmberg AB. Models of nociception: hot-plate, tail-flick, and formalin tests in rodents. *Curr Protoc Neurosci*. 2007;Chapter 8(October):1–16.
58. Vasconcellos CLC, Vitorio KCD, Andrade PA, Cambuí ÉVF, Lira AF, Cavalcante SCH, et al. Antinociceptive, anti-inflammatory, and antioxidant properties of *Phoradendron piperoides* leaves. *Pharm Biol*. 2009;47(7):645–52.
59. Dias KS, Almeida DS, Silva ABL, Marques MS, Igor A, Marçal RM. Avaliação dos efeitos miorelaxante, antiespasmódico e antinociceptivo do extrato aquoso da *Phoradendron piperoides* (Kunt.) Trel. (Viscaceae). *Rev Bras Farmacogn*. 2007;17(3):373–7.
60. Gregory N, Harris A, Robinson C, Dougherty P, Fuchs P, Sluka K. An overview of animal models of pain: disease models and outcome measures. *J Pain* [Internet]. 2013 [cited 2021 Aug 13];14(11):1255–69. Available from: [/pmc/articles/PMC3818391/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2418391/)
61. McCarron KE. Models of Inflammation: Carrageenan- or Complete Freund's Adjuvant (CFA)–Induced Edema and Hypersensitivity in the Rat. *Curr Protoc Pharmacol*. 2015;70(1):5.4.1-5.4.9.
62. Lapa AJ, Souccar C, Lima-Landman MT, De Lima TC. Métodos de avaliação da atividade farmacológica de plantas medicinais. 2002. 119 p.

63. Duarte DB, Vasko MR, Fehrenbacher JC. Models of inflammation: Carrageenan air pouch. *Curr Protoc Pharmacol.* 2016;2016(March):5.6.1-5.6.9.
64. Fehrenbacher JC, Vasko MR, Duarte DB. Models of inflammation: Carrageenan- or complete freund's adjuvant (CFA)-induced edema and hypersensitivity in the rat. *Curr Protoc Pharmacol.* 2012; Chapter 5: Unit5.4.
65. Wang Z, Hwang SH, Guillen Quispe YN, Gonzales Arce PH, Lim SS. Investigation of the antioxidant and aldose reductase inhibitory activities of extracts from Peruvian tea plant infusions. *Food Chem [Internet].* 2017;231:222–30. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.03.107>

## **ANEXOS**

# Resolución del Comité de Ética de la Facultad de Ciencias Químicas-UNA



UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN  
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS  
COMITÉ DE ÉTICA EN LA  
INVESTIGACIÓN

## Informe de evaluación de protocolo de investigación

**Título de la investigación:** EVALUACION DE LA INFLUENCIA DE LA ADMINISTRACIÓN ORAL DEL EXTRACTO BRUTO DE *Phoradendron bothryoryctum* SOBRE MODELOS DE DOLOR E INFLAMACIÓN INDUCIDOS EN RATONES.

Trabajo de grado     Proyecto de investigación     Trabajo de Posgrado

**Carrera / Departamento:** Posgrado.

**Autor:** Alicia Mariela Ortiz Rivas.

**Tutor/cotutor:** Prof. Dra. María del Carmen Hellión – Ibarrola.

**Fecha:** 14/04/2021

**Código:** CEI 703/2021

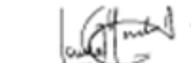
### Declaración de la decisión tomada:

<input checked="" type="checkbox"/>	Protocolo Aprobado
<input type="checkbox"/>	Protocolo Rechazado (Propuesta de investigación éticamente inaceptable)
<input type="checkbox"/>	Solicitud de enmienda (no se aprueba hasta una modificación del protocolo o el CI)
<input type="checkbox"/>	Protocolo Aprobado con Recomendación
<input type="checkbox"/>	Aprobación con condicionamiento (Falta de documentación requerida)

**Sugerencia del CEI:** Ninguna.

### En el caso de una decisión positiva el investigador deberá:

Notificar al CEI sobre enmiendas al protocolo, al material de reclutamiento, a la información para los potenciales participantes en la investigación o al formato de CI. Reportar eventos adversos inesperados relacionados con la conducción del estudio. Informar al CEI la terminación del estudio si esta fuera anticipada y las razones por las que se lo hizo y toda circunstancia no esperada o decisiones significativas.

  
**Presidente**

  
**Evaluador**  
Miguel Campuzano.



**Tabla 2** - Análisis estadístico de los resultados obtenidos con los animales que recibieron tratamiento con *Phoradendron bathyoryctum* en el ensayo de contorsiones abdominales

Parameter					
Table Analyzed	Contorsiones Abdominales				
One-way analysis of variance					
P value		0,0002			
P value summary	***				
Are means signif. different? (P < Q05)	Yes				
Number of groups		5			
F		8,453			
R squared		0,5749			
Bartlett's test for equal variances					
Bartlett's statistic (corrected)		10,9			
P value		0,0277			
P value summary	*				
Do the variances differ signif. (P < 0.05)	Yes				
ANOVA Table	SS	df	MS		
Treatment (between columns)	5903	4	1476		
Residual (within columns)	4365	25	174,6		
Total	10270	29			
Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	Significant?	Summary	95% CI of diff
Blanco vs Indometacina 10 mg/Kg	43,33	8,033	Yes	***	20.92 to 65.75
Blanco vs Pb 3 mg/kg	21,17	3,924	No	ns	-1.248 to 48.58
Blanco vs Pb 30 mg/kg	22,5	4,171	Yes	*	0.08558 to 44.91
Blanco vs Pb 300 mg/kg	29,17	5,407	Yes	**	6.752 to 51.58
Indometacina 10 mg/Kg vs Pb 3 mg/kg	-22,17	4,109	No	ns	-44.58 to 0.2478
Indometacina 10 mg/Kg vs Pb 30 mg/kg	-20,83	3,862	No	ns	-43.25 to 1.581
Indometacina 10 mg/Kg vs Pb 300 mg/kg	-14,17	2,626	No	ns	-36.58 to 8.248
Pb 3 mg/kg vs Pb 30 mg/kg	1,333	0,2472	No	ns	-21.08 to 23.75
Pb 3 mg/kg vs Pb 300 mg/kg	8	1,483	No	ns	-14.41 to 30.41
Pb 30 mg/kg vs Pb 300 mg/kg	6,667	1,236	No	ns	-15.75 to 29.08
	Blanco	Indometacina 10 mg/Kg	Pb 3 mg/kg	Pb 30 mg/kg	Pb 300 mg/kg
Number of values	6	6	6	6	6
Minimum	37	9	20	8	13
25% Percentile	49	10,5	20,75	17	25,75
Median	62,5	14	34,5	34	30
75% Percentile	65,25	18,5	53,75	57,25	34
Maximum	66	20	56	58	34
Mean	57,67	14,33	36,5	35,17	28,5
Std. Deviation	11,17	4,32	16,45	19,93	7,842
Std. Error	4,558	1,764	6,717	8,138	3,202
Lower 95% CI of mean	45,95	9,799	19,23	14,25	20,27
Upper 95% CI of mean	69,38	18,87	53,77	56,09	36,73
Sum	346	86	219	211	171

**Tabla 3-** Análisis estadístico de los resultados obtenidos con los animales que recibieron tratamiento con *Phoradendron bathyoryctum* en el test de la placa caliente

Parameter					
Table Analyzed	Hot plate				
One-way analysis of variance					
P value	< 0.0001				
P value summary	***				
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes				
Number of groups	5				
F	19,73				
R squared	0,6989				
Bartlett's test for equal variances					
Bartlett's statistic (corrected)	10,36				
P value	0,0348				
P value summary	*				
Do the variances differ signif. (P < 0.05)	Yes				
ANOVA Table	SS	df	MS		
Treatment (between columns)	1977	4	494,3		
Residual (within columns)	851,7	34	25,05		
Total	2829	38			
Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff. q		Significant?	Summary	95% CI of diff
Blanco vs Morfina 6 mg/kg	-20,48	10,98	Yes	***	-28.08 to -12.87
Blanco vs Pb 3 mg/kg	-4,588	2,554	No	ns	-11.91 to 2.735
Blanco vs Pb 30 mg/kg	-5,271	2,677	No	ns	-13.30 to 2.756
Blanco vs Pb 300 mg/kg	-9,873	4,832	Yes	*	-18.20 to -1.543
Morfina 6 mg/kg vs Pb 3 mg/kg	15,89	9,989	Yes	***	9.404 to 22.37
Morfina 6 mg/kg vs Pb 30 mg/kg	15,21	8,526	Yes	***	7.935 to 22.48
Morfina 6 mg/kg vs Pb 300 mg/kg	10,6	5,685	Yes	**	2.999 to 18.21
Pb 3 mg/kg vs Pb 30 mg/kg	-0,6834	0,3994	No	ns	-7.659 to 6.292
Pb 3 mg/kg vs Pb 300 mg/kg	-5,286	2,943	No	ns	-12.61 to 2.037
Pb 30 mg/kg vs Pb 300 mg/kg	-4,602	2,337	No	ns	-12.63 to 3.425
	Blanco	Morfina 6 mg/kg	Pb 3 mg/kg	Pb 30 mg/kg	Pb 300 mg/kg
Number of values	6	9	11	7	6
Minimum	4,59	17,65	6,03	6,1	13,2
25% Percentile	4,905	24	7,27	6,37	13,69
Median	6,46	29,08	9,77	12,84	14,29
75% Percentile	7,84	30	12,61	16,75	20,67
Maximum	7,9	30	30	18,87	21,46
Mean	6,373	26,85	10,96	11,64	16,25
Std. Deviation	1,444	4,452	6,732	5,199	3,672
Std. Error	0,5896	1,484	2,03	1,965	1,499
Lower 95% CI of mean	4,858	23,43	6,439	6,836	12,39
Upper 95% CI of mean	7,889	30,27	15,48	16,45	20,1
Sum	38,24	241,7	120,6	81,51	97,48

**Tabla 4-** Análisis estadístico de los resultados obtenidos con los animales que recibieron tratamiento con *Phoradendron bathyoryctum* en el ensayo del edema de la pata inducido con carragenina

Parameter						
Table Analyzed	Efecto Antiinflamatorio 3 horas					
One-way analysis of variance						
P value	< 0.0001					
P value summary	***					
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes					
Number of groups	6					
F	7,71					
R squared	0,5102					
ANOVA Table	SS	df	MS			
Treatment (between columns)	303,4	5	60,69			
Residual (within columns)	291,3	37	7,872			
Total	594,7	42				
Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	Significant?	Summary	95% CI of diff	
Blanco vs Carragenina	-8,393	6,749	Yes	***	-13.68 to -3.104	
Blanco vs Indometacina	-2,806	2,353	No	ns	-7.876 to 2.265	
Blanco vs Pb 3 mg/kg	-5,536	4,452	Yes	*	-10.82 to -0.2472	
Blanco vs Pb 30 mg/kg	-2,75	2,264	No	ns	-7.917 to 2.417	
Blanco vs Pb 300 mg/kg	-7,25	5,968	Yes	**	-12.42 to -2.083	
Carragenina vs Indometacina	5,587	5,588	Yes	**	1.335 to 9.839	
Carragenina vs Pb 3 mg/kg	2,857	2,694	No	ns	-1.653 to 7.367	
Carragenina vs Pb 30 mg/kg	5,643	5,496	Yes	**	1.276 to 10.01	
Carragenina vs Pb 300 mg/kg	1,143	1,113	No	ns	-3.224 to 5.510	
Indometacina vs Pb 3 mg/kg	-2,73	2,731	No	ns	-6.982 to 1.522	
Indometacina vs Pb 30 mg/kg	0,05556	0,05763	No	ns	-4.044 to 4.155	
Indometacina vs Pb 300 mg/kg	-4,444	4,61	Yes	*	-8.544 to -0.3445	
Pb 3 mg/kg vs Pb 30 mg/kg	2,786	2,713	No	ns	-1.581 to 7.153	
Pb 3 mg/kg vs Pb 300 mg/kg	-1,714	1,67	No	ns	-6.081 to 2.653	
Pb 30 mg/kg vs Pb 300 mg/kg	-4,5	4,536	Yes	*	-8.719 to -0.2812	
	Blanco	Carragenina	Indometacina	Pb 3 mg/kg	Pb 30mg/kg	Pb 300 mg/kg
Number of values	4	7	9	7	8	8
Minimum	0	9	0	4	0	7
25% Percentile	0,5	9	3,5	7	2,25	8,25
Median	2,5	10	6	8	6,5	9,5
75% Percentile	5,25	15	7,5	11	8,75	11,75
Maximum	6	15	9	12	9	14
Mean	2,75	11,14	5,556	8,286	5,5	10
Std. Deviation	2,5	2,734	2,877	2,69	3,423	2,268
Std. Error	1,25	1,033	0,959	1,017	1,21	0,8018
Lower 95% CI of mean	-1,228	8,614	3,344	5,798	2,639	8,104
Upper 95% CI of mean	6,728	13,67	7,767	10,77	8,361	11,9
Sum	11	78	50	58	44	80