



UNIVERSIDAD CENTRAL "MARTA ABREU" DE LAS VILLAS
VERITATE SOLA NOVIS INPONETUR VIRILISTOGA. 1948

Tesis para optar por el Título de
Licenciado en Ciencias Farmacéuticas.

Título.

*Evaluación de la actividad antiagregante plaquetaria y analgésica del extracto hidroalcohólico obtenido a partir de las hojas de *Boldoa purpurascens* cav.*

Diplomante. Yannel Arcelio Morales Millet.

Tutora. Dra Dulce María González Mosquera.

Santa Clara, 2010.

Exergo.

(...) *“Es justamente la posibilidad de lograr un sueño
lo que hace que la vida sea interesante.”*

Pablo Coélho.

Yanniel Arcelio Morales Millet.

Dedicatoria.

Conozco una mujer que tiene algo de Dios por la inmensidad de su amor, y un hombre que tiene mucho de ángel por la incansable solicitud de sus cuidados. Dos seres que siendo pobres se satisfacen con la felicidad de los que aman y siendo ricos darían con gusto todos sus tesoros por no sufrir en sus corazones la herida de la ingratitud...

Existe una mujer y un hombre cuyos nombres son sagrados, el primero, porque aún en su vientre la escuché decir en silencio: te amo hijo mío. Porque cuando nací encontré su mirada tierna como ninguna y su sonrisa escondiendo los problemas cotidianos.

El Segundo, porque cuando empecé a soñar estaba siempre a mi lado para llenar mis sueños con cuentos de hadas y acariciarme hasta quedarme profundamente dormido.

Existen dos seres que aparecen justo cuando los necesitas, que conocen tus secretos aunque no los compartas con ellos, que conocen tu interior aunque no le abras todo tu corazón.

Existen dos seres que comparten tus alegrías y tristezas, tus logros y fracasos....

*A esos dos seres: a mi madre **Irene de la Caridad Millet Cedeño** y a mi padre **Juan Carlos Morales Vicente**, dedico hoy el fruto de mi mayor esfuerzo.*

Agradecimientos.

A mis padres: por ser mi luz y mi razón de ser, por darme todo su amor y cariño y sobre todo por darme la vida.

A mi familia: a mis abuelos Hilaria y Arcelio por darme todo encariño que necesitaba, a mis primos Luis Daniel, Maraisis, Roidel, a mi hermana Yaimara por estar junto a mienmomentos de alegrías y tristezas, a mi tía Iris por darme buenos consejos, a mi abuela Magalís por darme su cariño, a Omar por apoyarme estando yo lejos de mi hogar y quererme como si fuera de su familia, a mis primos Arelis y Robertico y a mi tía Acela.

A mi tutora: Dulce por ayudarme profesionalmete y soportar mis malcriadeses.

A todos mis profesores: especialmente a Mario, Arelis, Monte Negro, Grau, Juan Manuel por ayudarme, a los profesores que me asesoraron en el Instituto de Angiología.

A mis amigos: especialmente a Yulier, Lili, William, Lai, Yuriam, Daikeni, Ivan, Yunier, Yuniesky y a todos mis compañeros de grupo y colegas de danzas.

A todos los que de una forma u otra me han ayudado en este empeño.

Muchas Gracias.

Resumen.

Boldoa purpuracens, Cav es una planta perteneciente a la familia Nyctaginaceae que crece en lugares húmedos, abundantes en el Caribe, en las Antillas y en América; se utiliza tradicionalmente por su efecto diurético comparable con la furosemida (González, 2006), además se demostró la actividad antiinflamatoria en estudios preclínicos, siendo similar a la indometacina. La presencia de compuestos polifenólicos en esta especie es la causa del efecto antinociceptivo y antiagregante plaquetario, pero aun no existen estudios desde punto de vista químico, ni farmacológico que justifiquen su uso en estas patologías. Se realizaron dos estudios al extracto hidroalcohólico de las hojas de esta especie. El primero estuvo dirigido a la evaluación de la actividad antiagregante plaquetaria “in vitro” mediante un método turbidimétrico, empleándose el ADP (Adenosin Difosfato) y colágeno como estímulos de agregación; se utilizó como patrón comparativo el ASA (ácido acetil salicílico). En el otro estudio se evaluó la actividad analgésica “in vivo” del mismo extracto a dosis de 200, 400, 600 y 800mg/kg empleando el método térmico de la Placa Caliente. Se utilizó como control positivo la morfina y como control negativo el cloruro de sodio al 0.9 %. La administración se realizó por vía intraperitoneal en ratones NMRI. Los estudios demostraron que la especie posee actividad antiagregante plaquetaria a las dosis de 12.5 y 20 μ L con el empleo del colágeno y el ADP respectivamente. En el test de analgesia la dosis de 800 mg/mL tiene un poder analgésico comparable e incluso ligeramente superior al clásico de la morfina, tomado como control positivo. Este poder analgésico comienza a destacarse entre otros tratamientos a los 60 minutos, se mantiene bastante estable desde el momento de la aplicación, incluyendo la no disminución significativa, como otros tratamientos, al cabo de las 3 horas.

Índice.

Introducción	1
1. Revisión Bibliográfica	
1.1. Nyctaginaceae. Generalidades botánicas de la familia.....	4
1.2. <i>Boldoa purpurascens</i> Cav.ex Lag. Generalidades botánicas de la especie...4	
1.2.1. Descripción botánica de la planta.....	5
1.2.2. Hábitat, distribución, fenología y cultivo.....	6
1.3. Antecedentes químicos de la especie.....	6
1.4. Usos en la medicina tradicional.....	7
1.5. Antecedentes farmacológicos de <i>Boldoa purpurascens</i>	7
1.6. AGREGACION PLAQUETARIA.....	8
1.6.1. Cinética.....	9
1.6.2. Activación.....	9
1.6.3. Adhesión y agregación.....	10
1.6.4. Papel en enfermedades.....	11
1.6.4.1. Recuentos altos y bajos.....	11
1.6.4.2. Medicamentos.....	12
1.7. Plantas Medicinales.....	13
1.7.1. Flavonoides. Generalidades.....	14
1.7.2. Glicósidos flavonoides con actividad antiagregante plaquetaria.....	15
1.8- Dolor.....	17
1.8.1. Tipos de Dolor.....	18
1.8.2. Fisiología del Dolor.....	18
1.9. Fármacos Analgésicos.....	19
1.10. Actividad analgésica en plantas.....	20
1.11. Métodos “in vivo” para la determinación de la actividad analgésica.....	21

Índice.

2. Materiales y Métodos.

2.1. Reactivos empleados.....	29
2.2. Preparación del material vegetal.....	29
2.2.1. Recolección.....	29
2.2.2. Selección.....	30
2.2.3. Secado.....	30
2.2.4. Molinado.....	30
2.3. Extracción.....	30
2.4. Determinación del contenido de sólidos totales.....	30
2.5. Evaluación “in vitro” de la actividad antiagregante plaquetaria del extracto hidroalcohólico.....	31
2.5.1. Preparación de las muestras de ensayo.....	31
2.5.1.2. Preparación de las suspensiones de plaquetas humanas.....	31
2.5.1.3. Modelo experimental de agregación plaquetaria.....	32
2.7. Análisis estadístico.....	33
2.6. Evaluación de la actividad analgésica del extracto hidroalcohólico.....	33
2.6.1. Preparación de las muestras de ensayo.....	33
2.6.1.1. Preparación de las dosis a administrar del extracto hidroalcohólico.....	33
2.6.1.2. Preparación de la solución de Cloruro de Sodio (0.9%) (control negativo).....	34
2.6.1.3. Modelo experimental de actividad analgésica.	34
2.6.1.3.1. Caracterización del sistema de estudio.....	34
2.6.1.3.2. Condiciones Experimentales.....	34
2.6.1.3.3. Evaluación postmortem.....	34
2.6.1.3.4. Consideraciones éticas.....	35
2.6.1.3.6. Procedimiento experimental.....	36
2.6.1.3.7. Análisis estadístico.....	36

Indice.

3. Resultados y Discusión

3.1. Recolección del material vegetal.....	39
3.1.1. Preparación del material vegetal.....	39
3.2. Extracción del material vegetal.....	39
3.3. Determinación de contenido de sólidos totales.....	40
3.4. Evaluación” in vitro” de la actividad antiagregante plaquetaria.....	40
3.5. Evaluación “in vivo” de la actividad analgésica	47
3.5.1. Cambios del poder analgésico a lo largo del tiempo en cada tratamiento.....	55
3.5.2. Diferencias entre los grupos de tratamiento en cada momento después de la aplicación.....	60

Conclusiones.....	65
--------------------------	-----------

Recomendaciones.....	66
-----------------------------	-----------

Referencias Bibliográficas.

Anexos.

Introducción.

Una planta medicinal es un recurso, cuya parte o extractos se emplean como drogas en el tratamiento de alguna afección. El uso de remedios de origen vegetal se remonta a la época prehistórica, y es una de las formas más extendidas de medicina, presente en virtualmente todas las culturas conocidas (1).

Los grandes avances científicos y tecnológicos permitieron desarrollar sustitutos artificiales a los naturales. Sin embargo, el nivel de deterioro del ambiente, a raíz de la contaminación, ha producido un vuelco de mentalidad, sobre todo en países desarrollados, donde en los últimos veinte años se ha verificado una tendencia a volver a los productos naturales, libres de contaminación; al uso de hierbas medicinales y plantas aromáticas. También la toma de conciencia de que los productos artificiales podrían ser dañinos para la salud, ha contribuido a cambiar las tendencias de la demanda (2).

La industria farmacéutica actual se ha basado en los conocimientos tradicionales para la síntesis y elaboración de fármacos, y el proceso de verificación científica de estas tradiciones continúa hoy en día, descubriéndose constantemente nuevas aplicaciones.

Las investigaciones se han dirigido hacia el conocimiento de las plantas usadas popularmente con fines medicinales, con el propósito de hacer las evaluaciones de actividades farmacológicas, toxicológicas, el aislamiento y caracterización de sus principios activos que permitan justificar sus usos.

En la población cubana se han incrementado los casos de hipertensión arterial la cual constituye el principal factor de riesgo para la aparición de enfermedades coronarias. Una vez establecidos estos dos trastornos, se genera un círculo vicioso que agrava la condición clínica del paciente y que es necesario romper atacando procesos fisiopatológicos claves en la perpetuación de los fenómenos implicados en el incremento de la resistencia vascular periférica y la formación de trombos sobre la placa ateromatosa. Por lo tanto, encontrar un fármaco que conjugue propiedades antihipertensivas y antiagregantes puede representar un avance en el arsenal terapéutico disponible frente a estos trastornos. De igual forma el dolor es uno de los

Introducción.

problemas más frecuentes con los que se enfrenta un paciente, uno de los más difíciles de evaluar y uno de los más inflexibles al tratamiento (3).

Boldoa purpurascens, Cav conocida en Cuba como Nitro blanco y perteneciente a la familia Nictaginaceae (4, 5), es una especie que ha sido utilizada por la población cubana en el tratamiento de patologías renales y se ha demostrado su actividad antiinflamatoria (6). Sin embargo no se han realizado estudios para determinar si esta planta posee actividad antiagregante plaquetaria o antinociceptiva para mejorar la morbimortalidad de los pacientes con enfermedades coronarias y aliviar el dolor como síntoma desagradable con mucha incidencia en nuestra población. Por ello se propone el siguiente **problema científico**:

La presencia de compuestos polifenólicos en varias especies vegetales es la causa del efecto antinociceptivo y antiagregante plaquetario de las mismas, de *B purpurascens* se han aislado varios compuestos de este tipo, sin embargo no se han realizado estudios que demuestren estos efectos para esta especie.

Para dar respuesta al problema planteado se establece la siguiente **hipótesis**:

Si la presencia de compuestos polifenólicos en especies vegetales es indicativo de los efectos analgésicos y antiagregante plaquetario, el extracto hidroalcohólico de *Boldoa purpurascens* debe poseer los mismos.

Es necesario proponer los objetivos que pueden proporcionar la solución al problema planteado en esta investigación.

Objetivo general:

Realizar evaluaciones biológicas que permitan comprobar los efectos analgésicos y antiagregante plaquetario al extracto hidroalcohólico de *Boldoa purpurascens*..

Introducción.

Objetivos específicos:

- 1- Realizar proceso extractivo para obtener el extracto hidroalcohólico de las hojas de la especie *B purpurascens*.
- 2- Evaluar la actividad antiagregante del extracto hidroalcohólico, empleando como estímulos ADP y colágeno.
- 3- Evaluar la actividad analgésica del extracto hidroalcohólico, empleando el test de analgesia térmica (Plato Caliente).

Capítulo 1: Revisión Bibliográfica.

1.1. Nyctaginaceae. Generalidades botánicas de la familia.

Las *Nyctaginaceae* son una familia de plantas que engloban alrededor de 350 especies repartidas en 38 géneros (7). Son en su mayoría plantas dicotiledóneas del orden de las Centrospermales, herbáceas o leñosas, por lo común con flores umbeliformes o corimbiformes, brácteas en la base de las flores, libres o soldadas, a veces petaloideas, cinco sépalos, con base persistente en la madurez, formando, alrededor del agujero, un antocarpio envolvente. Familia principalmente tropical y subtropical, pero en su mayoría Americana. *Nyctago* proviene de *nyx* (noche), que quiere decir flor de noche, o planta cuyas flores se abren en la noche y se cierran de día (8). Tienen hojas generalmente opuestas o alternadas, sin estípulas pero a veces con espinas, pudiendo alcanzar de 50 a 100cm de altura. Químicamente son muy poco conocidas y las publicaciones sobre ellas son poco abundantes. Existen seis especies dentro del género *Boldoa*: *Boldoa arenareus*, *Boldoa lanceolata*, *Boldoa ovatifolia*, *Boldoa paniculata*, *Boldoa repens* y *Boldoa purpurascens* (9).

1.2. *Boldoa purpurascens* Cav.ex Lag (nitro). Generalidades botánicas de la especie.

Boldoa purpurascens, es conocida vulgarmente en Cuba como nitro o tostón (4, 5). Fue descubierta por Cavanilles en América e introducida en Cuba en 1842. Los aspectos taxonómicos más importantes se pueden observar en la Figura 1.

Capítulo 1: Revisión Bibliográfica.



Figura 1. *Boldoa purpurascens*, Cav.

Pertenece a la familia de las Nyctaginaceae y se le conoce también como: *Boldoa ovatifolia* Lag, *Cryptocarpus globosus* H.B.K, *Salpianthus purpurascens* Hook & Arm.

1.2.1. Descripción botánica de la planta.

Boldoa purpurascens es una planta de un metro o poco más de altura, con tallo erecto, ramoso y las ramas delgadas, angulosas, lampiñas. Hojas alternas, pecioladas, anchamente ovales, agudas, enteras, con base subtruncada y decurrente en el pecíolo; lampiñas de color verde claro; flores verdosas, pequeñas, sésiles, conglomerado racemosas. El cáliz es fructífero, pubescente, cuadridentado en el ápice. Presenta cuatro estambres, con hipoginos libres, anteras biloculares, dídimas. Los ovarios son ovoideos, sésiles. Los estilos son simples, adelgazándose insensiblemente hasta terminar en el estigma aleznado,

Capítulo 1: Revisión Bibliográfica.

agudo. Aquenio comprimido, apiciolado. Embrión subanular, endospermo carnososo-farináceo(4, 5, 10).

Clasificación taxonómica de *Boldoa purpurascens* cav.

Reino: *Plantae*.

División: *Magnoliophyta*.

Clase: *Magnoliopsida*.

Subclase: *Caryophyllidae*.

Orden: *Caryophyllales*.

Familia: *Nyctaginaceae*.

Género: *Boldoa*.

Especie: *Boldoa purpurascens*.

1.2.2. Hábitat, distribución, fenología y cultivo.

El Nitro es una hierba o arbustillo silvestre que crece en terrenos de serpentina y calcáreos. Es abundante en las cercanías de La Habana, por Guanabacoa y también cerca de la costa de Marianao y Jaimanitas (5, 11) se encuentra además en otros lugares del país, entre ellos la parte norte de Villa Clara. Se le puede encontrar en México, Venezuela, Nicaragua y Guatemala (10). En Cuba florece de diciembre a mayo, las hojas alcanzan su mayor tamaño en los meses de junio y julio.

1.3. Antecedentes químicos de la especie

Se demostró que *Boldoa purpurascens* presenta en su composición un predominio de ácidos grasos como el palmítico, el esteárico, el oleico, el mirístico y el pentadecanoico entre sus metabolitos secundarios, además de poseer triterpenos y esteroides, saponinas, fenoles y/o taninos, flavonoides y

Capítulo 1: Revisión Bibliográfica.

compuestos con grupos aminos (6, 12). Además de poseer estos componentes, contiene gran cantidad de metales entre los que se encuentran: el cadmio, hierro, cobre, cromo, magnesio, níquel, sodio, manganeso, estando en mayor proporción el potasio el cual puede contribuir a la potente actividad diurética demostrada por la planta (13), aunque el sodio, magnesio y cadmio se hayan también en cantidades importantes.

De esta especie, se han aislados 6 compuestos de tipo flavonol, de los cuales 4 Resultaron ser nuevas estructuras (gonfrenol-3-O-[α -L-ramnosil-(1-2)- β -D-xilósido], 4',5- dihidroxi-6,7-metillendioxiflavona-3-O-[α -L-ramnopiranosil-(1-2)- α -L-arabinopiranosida],4',5-dihidroxi-6,7-metillendioxiflavona-3-O-[β -D-xilopiranosida] y el 4',5-dihidroxi-6,7- metillendioxiflavona-3-O-[α -L-ramnopiranosil-(1-2)- β -D-glucósido])(6, 14).

1.4. Usos en la medicina tradicional.

En los estudios etnobotánicos se informa su uso como diurético, actividad esta, demostrada científicamente por González (6, 15). Además, se emplea como antiséptico de las vías urinarias (11), evaluaron ésta acción en un extracto al 20% de las hojas de la planta frente a cepas de bacterias Gram positivas y Gram negativas. No se detectó actividad antibacteriana sobre ninguno de los 22 cultivos probados por lo que se comprobó que la planta no posee acción directa sobre los microorganismos.

En algunos lugares de Cuba se ha usado para la eliminación de cálculos renales. Dicha acción (aún no demostrada), puede deberse al potente efecto diurético que se le atribuye a la planta, lo cual lleva consigo una eliminación considerable de líquido ocasionando la fragmentación de los cálculos y pudiendo ser arrastrados del riñón, Roig informa el empleo de las hojas y renuevos (5).

Capítulo 1: Revisión Bibliográfica.

1.5. Antecedentes farmacológicos de *Boldoa purpurascens*.

En el año 2006 se comprobó el efecto diurético del extracto acuoso liofilizado de *Boldoa purpurascens* Cav. A la dosis de 400 mg/kg siguiendo una administración continuada (6).

En este propio estudio se informa el aislamiento y caracterización estructural de cuatro nuevos flavonoides que algunos contribuyen a la actividad diurética de la planta, así como informes preliminares de la actividad antiinflamatoria del extracto acuoso de la misma. En el año 2008, se evaluó la actividad antiinflamatoria de un crudo de flavonoides obtenido a partir de la especie (16).

1.6. Agregación Plaquetaria.

Las plaquetas, son células pequeñas, irregulares y carentes de núcleo, de 2-3 μm de diámetro (17) las cuales son producidas en el proceso de formación de las células sanguíneas llamado (trombopoyesis) en la médula ósea, por fragmentación en los bordes citoplasmáticos de los megacariocitos. La producción de megacariocitos y plaquetas está regulada por la trombopoyetina, una hormona producida usualmente por el hígado y los riñones. Una reserva de plaquetas es almacenada en el bazo y son liberadas cuando se necesitan por medio de contracción esplénica mediada por el sistema nervioso simpático. Las plaquetas circulan en la sangre de todos los mamíferos, manteniendo una vida media entre 8 y 12 días; juegan un papel fundamental en la hemostasia iniciando la formación de coágulos o trombos; y liberan un gran número de factores de crecimiento incluyendo el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF, por platelet derived growth factor), un potente agente quimiotáctico, y el factor de crecimiento transformante beta, (TGF-beta, por transforming growth factor) el cual estimula el depósito de matriz extracelular; Estos dos factores de crecimiento han demostrado jugar un papel significativo en la regeneración y

Capítulo 1: Revisión Bibliográfica.

reparación del tejido conectivo. Otros factores de crecimiento producidos por las plaquetas y asociados a los procesos curativos incluyen: factor de crecimiento básico del fibroblasto (basic fibroblast growth factor), factor de crecimiento-1 asociado a la insulina (IGF-1 del inglés insulin-like growth factor-1), factor de crecimiento del epitelio (EGF del inglés epithelial growth factor), factor de crecimiento del hepatocito (HGF del inglés hepatocyte growth factor) y el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF del inglés vascular endothelial growth factor). La aplicación local de estos factores de crecimiento en altas concentraciones a través del plasma rico en plaquetas (PRP del inglés platelet-rich plasma) ha sido utilizada, por varias décadas, para acelerar el proceso curativo de diferentes lesiones (18-23)

Las plaquetas son destruidas por fagocitosis (24) y por las células de Kupffer en el bazo y el hígado respectivamente.

1.6.1. Activación

La superficie interna de los vasos sanguíneos está revestida por una capa delgada de células endoteliales las cuales en circunstancias normales actúan inhibiendo la activación plaquetaria mediante la producción de monóxido de nitrógeno, ADPasa endotelial, y PGI₂; la ADPasa endotelial despeja la vía para la acción del activador plaquetario ADP (25, 26).

Las células endoteliales producen una proteína llamada factor de von Willebrand (FvW), un ligando que media la adhesión celular, el cual ayuda a las células endoteliales a adherir el colágeno a la membrana basal; en condiciones fisiológicas, el colágeno no está expuesto al flujo sanguíneo; el FvW es secretado esencialmente en el plasma por las células endoteliales, y almacenado en gránulos dentro de las células endoteliales y plaquetas. Cuando la capa endotelial es lesionada, el colágeno, el FvW y el factor tisular del endotelio son expuestos al flujo sanguíneo. Cuando las plaquetas hacen

Capítulo 1: Revisión Bibliográfica.

contacto con el colágeno o el FvW, son activadas; estas son activadas también por la trombina (formada con la ayuda del factor tisular).

La activación plaquetaria posterior resulta en el transporte mediado por la escramblasa, de fosfolípidos cargados a la superficie plaquetaria; estos fosfolípidos proporcionan una superficie catalítica (con la carga provista por la fosfatidilserina y fosfatidiletanolamina) para los complejos tenasa y protrombinasa. Los iones de calcio son esenciales para la activación de los factores de coagulación (27).

1.6.2. Adhesión y agregación

La agregación plaquetaria, usa el fibrinógeno y el FvW como agentes conectores. El receptor de agregación plaquetaria más abundante es la glicoproteína IIb/IIIa (gpIIb/IIIa); se trata de un receptor para el fibrinógeno dependiente del calcio, fibronectina, vitronectina, trombospondina, y factor de von Willebrand (FvW). Otros receptores incluyen el complejo GPIb-V-IX (FvW) y GPVI (colágeno). Las plaquetas activadas se adherirán, via glicoproteína (GP) al colágeno expuesto por el daño epitelial. La agregación y adhesión actúan juntos para formar el tapón plaquetario. Los filamentos de Miosina y actina en las plaquetas son estimuladas para contraerse durante la agregación, reforzando todavía más el tapón.(28-30)

La agregación plaquetaria es estimulada por el ADP, tromboxano, y la activación del receptor- α_2 , pero inhibida por agentes antiinflamatorios como las prostaglandinas PGI₂ y PGD₂. La agregación plaquetaria se ve aumentada por la administración exógena de esteroides anabólicos.(31)

1.6.3. Papel en enfermedades.

Capítulo 1: Revisión Bibliográfica.

El número de plaquetas presentes en el organismo juega un papel importante en la detección de alguna enfermedad. Si el número de plaquetas es demasiado bajo, puede devenir una hemorragia excesiva. Por otra parte si el número de plaquetas es demasiado alto, pueden formarse coágulos sanguíneos y ocasionar (trombosis), los cuales pueden obstruir los vasos sanguíneos y ocasionar un accidente cerebro vascular, infarto agudo de miocardio, embolismo pulmonar y el bloqueo de vasos sanguíneos en cualquier otra parte del cuerpo, como en las extremidades superiores e inferiores; cualquier anomalía o enfermedad de las plaquetas es denominada trombocitopatía (32) la cual puede ser, ya sea un número reducido de plaquetas (trombocitopenia), un déficit en la función (tromboastenia), o un incremento en el número (trombocitosis). Hay desórdenes que pueden reducir el número de plaquetas, como la trombocitopenia inducida por heparina o la púrpura trombocitopénica idiopática (PTI) que típicamente causan trombosis, o coágulos, en lugar de hemorragia.

1.6.3.1. Recuentos altos y bajos.

El recuento de plaquetas de un individuo sano se encuentra entre 150,000 y 450,000 por μl (microlitro) de sangre ($150-450 \times 10^9/\text{L}$)(33). El 95 % de los individuos sanos tendrán recuentos de plaquetas dentro de este rango. Algunos tendrán recuentos de plaquetas estadísticamente anormales sin tener ninguna anomalía demostrable. Sin embargo, si el recuento es muy alto o muy bajo la probabilidad de que una anomalía este presente es más alta.

El recuento normal de plaquetas no es garantía de función adecuada. En algunos estados, las plaquetas, siendo normales en número, son disfuncionales. Por ejemplo, el ácido acetilsalicílico interrumpe irreversiblemente la función plaquetaria mediante la inhibición de la ciclooxigenasa-1 (COX1), y por consiguiente la hemostasia normal(34). Las plaquetas resultantes no tienen ADN y son incapaces de producir nueva ciclooxigenasa. La función plaquetaria

Capítulo 1: Revisión Bibliográfica.

normal no se restaurara hasta que el uso de ASA haya cesado y un número suficiente de las plaquetas afectadas hayan sido reemplazadas por nuevas, lo cual suele tardar unos 7 días. El Ibuprofeno, un AINE, no tiene un período tan largo de efecto, y la función plaquetaria vuelve a la normalidad dentro de las 24 horas y tomando ibuprofeno antes que el ASA prevendrá los efectos irreversibles de esta La Uremia, a consecuencia de la insuficiencia renal, conduce a la disfunción plaquetaria que puede ser aminorada con la administración de desmopresina (28).

1.7. Actividad antiagregante plaquetaria en Plantas.

Se han realizado estudios que miden la capacidad de ciertos extractos o principios activos vegetales para evitar el fenómeno de coagulación.

Los modelos de inhibición de la agregación plaquetaria no sólo sirven para determinar el efecto antiagregante y antitrombótico de algún compuesto, sino que también permite elucidar el mecanismo de acción de algunas patologías como la migraña. De esta manera un inhibidor de la agregación plaquetaria como el partenólido (obtenido de *Tanacetum parthenium*) ha resultado útil en la prevención y abordaje de cuadros migrañosos. El método usado es el de preparar las plaquetas por centrifugado de sangre total con el agregado de un anticoagulante como la heparina o citrato. Luego se separan las plaquetas por un nuevo centrifugado para tener una solución libre de proteínas plasmáticas y anticoagulante. (26, 35)

En 1994 se realizaron estudios a ginkgólidos como el (Ginkgo biloba) y la kadsurenona de *Piper futokadsurae* (36). Los ginkgólidos del tipo B, conocidos como BN 52021 poseen un gran efecto antagonista del receptor del Factor Activador de las Plaquetas (37), un glicerofosfolípido, lo que inhibe la agregación plaquetaria normalizando la viscosidad sanguínea y así evitar la formación de

Capítulo 1: Revisión Bibliográfica.

trombos en los lechos de la microcirculación. Esta acción benéfica se ha visto también en la isquemia renal y en riñones trasplantados para evitar la agregación plaquetaria (37).

1.7.1. Flavonoides. Generalidades.

Los flavonoides son metabolitos secundarios ampliamente distribuidos en las plantas verdes (especialmente las angiospermas), y sólo algunos pocos se han detectado en hongos y algas. Se han encontrado en diferentes partes de las plantas (especialmente en las partes aéreas); y se les encuentra en forma libre (también llamados agliconas), como glicósidos (la mayoría de las veces), como sulfatos y algunas veces como dímeros y polímeros.

Se pueden clasificar en varias clases: chalconas, flavonas, flavonoles, flavanonas, flavanonoles, antocianidinas, catequinas, epicatequinas, auronas, isoflavonoides, pterocarpanos, rotenoides (13).

Los glicósidos pueden ser de dos clases: con los carbohidratos ligados a través de átomos de oxígeno (enlace hemiacetal) es decir como O-glicósidos; o con los carbohidratos ligados a través de enlaces C-C, es decir como C-glicósidos. De todas estas formas naturales, los O-glicósidos son los más comunes (13).

Estos metabolitos junto a otros pigmentos han sido responsables de la explosión otoñal, del espectro del amarillo, rojo y naranja en el florecimiento de las plantas y en general de la coloración, función que favorece la participación de estos compuestos como señales químicas. También juegan un valioso papel en la defensa de la planta frente a las radiaciones UV, bacterias, virus y animales herbívoros, además de participar en el crecimiento, desarrollo y reproducción de las plantas (3). Los flavonoides son el grupo más amplio de los fenoles naturales, conociéndose en la actualidad más de 2000 compuestos (38).

Capítulo 1: Revisión Bibliográfica.

1.7.2. Glicósidos flavonoides con actividad antiagregante plaquetaria.

La baja incidencia de enfermedad cardiovascular en Francia llevó al desarrollo de estudios sobre los efectos de los derivados de la uva roja, demostrándose que esta fruta tiene niveles altos de flavonoides, elementos polifenoles derivados de los difenilpiranos vegetales. Las uvas y sus derivados, especialmente aquellos hechos de la cáscara, semillas y pulpas, son una muy buena fuente de flavonoides. Estos últimos pueden contribuir a bajos niveles poblacionales de enfermedad vascular periférica y cardiovascular (37, 39). La uva roja ha mostrado, tanto *in-vivo* como *in-vitro*, importante inhibición plaquetaria y disminución de su acción trombótica en arterias coronarias caninas estenosadas. Recientemente, en estudios en humanos, los flavonoides mostraron también una disminución de la agregación plaquetaria, reversible tras la suspensión de la ingesta de productos de la uva (40).

La baja incidencia de enfermedad vascular periférica y cardiovascular en otras regiones del planeta donde el consumo de vino es raro, sugiere la existencia de un factor ateroprotector en la dieta de estas poblaciones. Las islas del Caribe, Centroamérica y la región norte de América del Sur, tienen un alto nivel de consumo de frijón rojo (*Phaseolus vulgaris*), el cual puede ser el responsable de dicho efecto.

Los isoflavones del frijón pueden tener efectos bioquímicos importantes; uno de estos bioflavones, la genisteína, es un potente inhibidor de proteincinasas, reduce la proliferación de las células cancerígenas (41).

Estudios *in-vitro* de cultivos de células vasculares han mostrado que el isoflavón genisteína puede inhibir el desarrollo de lesiones arterioscleróticas mediante una disminución en la adhesión celular, una alteración de la actividad de factores de

Capítulo 1: Revisión Bibliográfica.

crecimiento y finalmente una inhibición de la proliferación celular (42). La formación de trombina y la activación plaquetaria son inhibidas también por derivados de leguminosas (como la genisteína) in-vivo.

Se ha comprobado que el extracto de la hoja del Ginkgo tiene propiedades, anticancerígenas y cardioprotectoras posiblemente debido a su acción antiagregante plaquetario, antiedémico, hemorreológico; así como una acción sobre la microcirculación, donde los flavonoides y los terpenoides pudieran actuar de manera complementaria.

El extracto de Ginkgo biloba se utiliza en pacientes con insuficiencia circulatoria cerebral, cuando se detecta vértigo, acúfenos, problemas de carácter y afectivos. También está indicado en secuelas de accidentes cerebrovasculares y traumatismos del encéfalo y cráneo. En trastornos vasculares periféricos como el síndrome de Raynaud. En disminución de la memoria y del estado de alerta y atención. En el tratamiento de la isquemia cerebral (39).

En un tiempo se creyó que la combinación de Ginkgo biloba con fármacos anticoagulantes o antiplaquetarios representaba un riesgo serio para la salud. Tales preocupaciones se basan mayormente en la suposición de que el Ginkgo tiene actividad antiplaquetaria clínicamente relevante, así como evidencias de episodios de sangrado asociados al consumo de Ginkgo. Para hacer averiguaciones si estos episodios de sangrado tenían una base farmacodinámica, idiosincrática o coincidental, se hizo una revisión de estudios clínicos controlados e informes de casos. Los resultados de estudios controlados consistentemente señalan que el Ginkgo no afecta significativamente la hemostasis ni afecta seriamente la seguridad de la aspirina o la warfarina administrada concomitantemente. No obstante, la posibilidad de un

Capítulo 1: Revisión Bibliográfica.

acontecimiento idiosincrático de sangrado debido al uso de Ginkgo no puede quedar excluida con base en la información disponible (40).

Los estudios de toxicidad demuestran que el extracto de la hoja del Ginkgo es relativamente seguro para el consumo, aunque algunos efectos secundarios han sido reportados, es decir, hemorragia intracerebral, problemas gastrointestinales, cefaleas, mareo y las reacciones alérgicas de piel. Se han reportado casos, aunque raros de hipersensibilidad al fármaco.

1.8- Dolor.

El dolor se define como una experiencia sensorial desagradable que se asocia a una lesión tisular o que se describe como si esta hubiera ocurrido (3, 43). Constituye un mecanismo fundamentalmente protector que previene la aparición de lesiones permanentes del organismo y aumenta las posibilidades de supervivencia. Sin embargo no siempre es así, existen numerosas situaciones clínicas en las que el dolor pierde su capacidad protectora y se convierte en una fuente de sufrimiento inútil, incluso en la propia enfermedad (43).

Al resultar este una sensación sólo uno mismo conoce cuánto le duele algo, por lo que es una vivencia personal imposible de transmitir. De ahí que la tolerancia al mismo varía entre las personas e incluso en el tiempo. Dependiendo de las circunstancias un mismo sujeto puede reaccionar o aceptar de forma diferente la misma intensidad dolorosa. Todo dependerá si está o no preparado para ello, de la velocidad de instauración o de la existencia o no de otros estímulos emocionales simultáneos.

Su razón de existir es la de avisar al organismo sobre la presencia de problemas en algún nivel por lo que es beneficioso ya que nos alerta al daño inminente del ambiente.

Más allá de este propósito de la advertencia, la experiencia del dolor involucra la

Capítulo 1: Revisión Bibliográfica.

percepción del dolor y las sensaciones asociadas, las reacciones emocionales, y las contestaciones fisiológicas que resultan.

La importancia del dolor es tal que tiende a ser incorporado como la cuarta constante, unida a la temperatura, el pulso y la presión arterial- para conocer el estado de un paciente. El dolor es uno de los problemas del paciente que se encuentra de forma más frecuente, uno de los más difíciles de evaluar y uno de los más inflexibles al tratamiento.

1.8.1. Tipos de Dolor.

El dolor puede clasificarse en agudo-Crónico, sordo-Pulsátil-Latente, Refractario, Somático-Visceral, Nociceptivo, Psicógeno y Neuropático en dependencia de algunas de sus características tales como: la duración, la localización, la periodicidad, si responde o no al tratamiento (44).

1.8.2. Fisiología del Dolor.

El dolor comienza con la estimulación de uno o más de los numerosos receptores sensitivos especiales, denominados nociceptores, que existen en la piel y los órganos internos. Estos receptores reciben información sobre diferentes acciones que puedan provocar daño corporal (3). En los nociceptores cualquier estímulo lesivo activa receptores sensoriales específicos, cuya función principal es distinguir los estímulos inocuos de los lesivos, y esto lo realiza ignorando los estímulos de intensidad baja, mientras que codifican el estímulo lesivo dentro de un rango de intensidades y lo transmiten al SNC (43). Los nociceptores se localizan principalmente en tejidos cutáneos, subcutáneos, articulares, musculares y viscerales. Histológicamente son denominados como terminaciones periféricas de las neuronas bipolares que tienen su soma en los ganglios raquídeos y cuyo axón centrípeto penetra en el asta dorsal de la médula espinal.. Estos pueden ser de dos tipos: nociceptores A- δ y

Capítulo 1: Revisión Bibliográfica.

nociceptores C. Aunque existen diferencias entre ellos el mecanismo general por el cual desarrollan su papel fisiológico es similar.

La activación de los nociceptores alcanza la médula espinal a través de las vías aferentes primarias. Estas se agrupan dentro de las raíces dorsales en posición ventrolateral y en menor grado dorsomedial, y a continuación se introducen en el asta dorsal.

Después de llegar a la médula, el impulso pasa a diferentes áreas del cerebro donde se determina cual es la localización y la causa del dolor, y se integra la información sensitiva con el estado global del organismo produciendo la sensación emocional que se denomina dolor.

1.10 Fármacos Analgésicos

La palabra analgésico se deriva del griego an- que significa "sin" y –algnesia que significa "dolor", por lo que un analgésico es cualquier miembro del grupo de fármacos utilizados para aliviar el dolor. La analgesia se caracteriza por una alteración en la respuesta del comportamiento frente al dolor y una inferior capacidad para la percepción de los impulsos dolorosos sin pérdida de la conciencia (45). Los fármacos analgésicos se clasifican en varios grupos(3) dentro de los cuales se encuentran los analgésicos opiáceos, antiinflamatorios no esteroides, analgésicos no opioides de acción central (antidepresivos tricíclicos y drogas antiepilépticas) y los analgésicos locales y disociativos. Recordemos que a nivel cerebral existen receptores opioides específicos: δ (delta) κ (kappa) y μ (mu) (46) los cuales pueden ser activados por endorfinas, narcóticos o hipnosedantes. Compuestos como el paracetamol (acetaminofen) trabajan sobre ciclo-oxigenasa pero únicamente a nivel cerebral.

1.11. Actividad analgésica en plantas.

Capítulo 1: Revisión Bibliográfica.

La actividad analgésica evalúa la capacidad de un extracto vegetal para evitar la transmisión del dolor al SNC, o disminuir sensaciones primarias (tacto, vibración, etc). La sensación de dolor es difícil de medir o cuantificar debido a la subjetividad inherente a la persona o al hecho en sí. En experiencias in vivo existen algésímetros que miden la escala de dolor del animal.

En 1999 Souza evaluó la actividad antinociceptiva de un extracto hidroalcohólico de *Boerhaavia diffusa* (BD), perteneciente a las *nyctaginaceae* (47).

Con una dosis de $1\ 000\ \text{mg kg}^{-1}$, el jugo y la decocción liofilizados de las hojas frescas de BD mostraron una inhibición significativa del ácido acético inducido en ratones, de 50 y 47 %, respectivamente al compararlos con la Dipirona (100 %) en la prueba del plato caliente, la morfina y el jugo (JE) producen un incremento significativo durante la latencia en el tiempo de observación. La decocción (DE) sin embargo solo levanta el umbral de dolor durante el primer período (30 min.) de observación (47).

Estos datos muestran que el principio antinociceptivo de BD, está presente fundamentalmente en el jugo de las hojas frescas. El mecanismo fundamental del efecto analgésico de las hojas frescas de BD continúa desconocido, pero se cree que pueda estar relacionado por la interacción con el sistema opioide (47, 48).

Se evaluó el efecto antinociceptivo de extractos, fracciones y compuestos de *Critoniella acuminata*, *Physalis peruviana* y *Salvia rubescens* mediante los métodos de placa caliente, contorsiones abdominales inducidas por ácido acético y ensayo de la formalina. La fracción de *Critoniella acuminata* en dosis de 100 mg/kg p.o. presentó actividad antinociceptiva al aumentar el tiempo de reacción del animal ante la aplicación de un estímulo térmico (método de la placa caliente), mientras que la fracción de *Physalis peruviana*, en una dosis de 100 mg/kg p. o., ejerce un efecto antinociceptivo frente al dolor generado por estímulos químicos (dolor visceral agudo) al inhibir en un 40% las contorsiones

Capítulo 1: Revisión Bibliográfica.

abdominales inducidas por ácido acético y el número de lamidos durante la fase ii (dolor inflamatorio agudo) en el ensayo de formalina. Estos resultados sugieren que la ayapina y la fracción de *Physalis peruviana* estudiadas tienen actividad antinociceptiva, con posibles mecanismos de tipo opioide y aine, respectivamente (49, 50).

En cada experimento se emplearon ratones machos o hembras, icr, de 25 a 35 g de peso y 10-12 semanas de edad, criados y mantenidos en condiciones controladas. Los ensayos se realizaron en el bioterio de experimentación del Departamento de Farmacia de la Universidad Nacional de Colombia. Para minimizar la variabilidad circadiana y también posibles variaciones en la sensibilidad al dolor por factores rítmicos endógenos, se trabajó siempre en la misma franja horaria. Todos los experimentos fueron realizados siguiendo consideraciones éticas en cuanto al cuidado y uso de animales de experimentación (51, 52).

1.12. Métodos “in vivo” para la determinación de la actividad analgésica.

La actividad analgésica de una sustancia se puede determinar mediante pruebas antinociceptivas que se basan en la aplicación de un estímulo doloroso (algésico) y la aparición de cambios típicos observables en la conducta del animal. No se puede asegurar en estas pruebas que el animal tenga la sensación dolorosa de la misma manera que el ser humano. La mayor parte de los métodos de estudio se fundamentan en la administración previa del problema, pasando a determinar la elevación umbral de reacción al dolor que dicha muestra posiblemente provoque al aplicar al animal un estímulo nociceptivo de intensidad conocida y condiciones determinadas. Dichos estímulos suelen ser de tipo mecánico, térmico, eléctrico y químico. Casi todos los test ponen de manifiesto la actividad de los analgésicos narcóticos pero no la de los antiinflamatorios/antipiréticos administrados a dosis normales. Los

Capítulo 1: Revisión Bibliográfica.

primeros bloquean intensamente sinapsis a nivel central, mientras que los no narcóticos actúan con un componente periférico mayor (53).

En algunos laboratorios se utiliza la llamada triple prueba analgésica. Cada ratón se somete a tres pruebas, en las que se observa la reacción al estímulo doloroso térmico, mecánico, y eléctrico. Este dispositivo diferencia los analgésicos de otros depresores del sistema nervioso central. La morfina y la peptidina son ligeramente más potentes frente al dolor de origen térmico que frente a los de origen mecánico o eléctrico. El ácido acetilsalicílico es activo frente a los tres tipos de estímulos dolorosos, pero solamente a dosis que se aproximan al nivel letal (54, 55).

Analgesia química.

Estimulación química: La estimulación química involucra la administración de agentes algogénicos, y representa un proceso lento o incluso muy lento. Los estímulos químicos son claramente diferentes de otras formas de estimulación. Son de mayor duración y tienen un carácter ineludible una vez que se han aplicado.

Utilizando sustancias químicas que pueden provocar dolor se desarrolla el test de contorsiones reportado inicialmente por Koste (55) y colaboradores en 1959 que luego ha sido modificado, empleando como agente algésico 10 mL/kg de ácido acético del 0.3-7%, benzoquinona 0,2 mg/mL y peróxido de benzoilo al 10% por vía intraperitoneal (i.p.) El fármaco patrón es el ácido acetilsalicílico generalmente a una dosis de 100 mg/Kg (i.p.) Inmediatamente después de la

Capítulo 1: Revisión Bibliográfica.

administración del agente algésico, cada animal se aísla en una caja individual para observar el número de retorcimientos y estiramientos que realiza el animal durante 15-20 minutos. Se describe como contorsión, a la contracción de los músculos abdominales, acompañados por una elongación del cuerpo y extensión de las patas traseras (55).

Analgesia eléctrica.

La estimulación eléctrica tiene la ventaja de ser cuantificable, reproducible y no invasivo. Sin embargo tiene serias desventajas, los estímulos eléctricos no son un tipo de estímulo natural como los encontrados por el animal en su entorno normal. Más importante aún, los estímulos eléctricos intensos excitan de una manera no diferencial todas las fibras periféricas incluidas las fibras de grandes de diámetro que no están directamente implicadas en la nocicepción, así como las fibras alfa y C las cuales están mediadas por sensaciones de frío y calor, así como la información nociceptiva (56).

Uso de los estímulos eléctricos de larga duración.

A) Estimulación eléctrica del la cola: Las intensidades de los estímulos eléctricos pueden aumentar de forma gradual y se pueden liberar en forma secuencial (que dura desde ciento hasta milisegundos) a través de electrodos subcutáneos de la rata o el ratón. Cuando la intensidad de los estímulos eléctricos que se aplican aumentan gradualmente se puede observar sucesivamente un movimiento reflejo de la cola, la vocalización en el momento de la estimulación, y luego continuar la vocalización más allá del período de estimulación. Estas respuestas están organizadas en una jerarquía que depende de los distintos niveles de integración de la señal nociceptiva en el sistema nervioso central, la médula espinal, el tronco cerebral, el tálamo y el riencéfalo. La sensibilidad a la morfina en los umbrales de estas respuestas aumenta con los mismos niveles.

Capítulo 1: Revisión Bibliográfica.

B) La estimulación eléctrica de la pata (y cola): En estas pruebas, los estímulos eléctricos de intensidades cada vez mayores se realizan en forma secuencial en el piso de una jaula en la que el animal puede moverse libremente. Las mediciones se hacen en los umbrales para varios comportamientos: la crispación, contracción, tratar de escapar saltando. Un método en el cual se aplican incrementos continuos de corriente, permite determinar el tiempo de reacción para una amplitud dada a partir de la obtención de un chirrido en el animal. Al igual que en la prueba de plato caliente, la estimulación concomitante de las cuatro patas y la cola del animal es sin duda la fuente de los controles inhibitorios difusos que pueden modificar la respuesta que se está supervisando. Esta prueba cayó en desuso (56).

Analgesia térmica

Estimulación térmica: El calor estimula más selectivamente los receptores cutáneos. En consecuencia, categorías específicas de los axones periféricos, tales como fibras termosensibles y nociceptivas, pueden ser excitados. Sin embargo, el débil poder calórico de los estimuladores que se utilizan generalmente (lámparas radiantes) siempre ha sido una limitación de este método. De hecho, la velocidad de calentamiento cutáneo inducido de esta manera es lento ($10^{\circ} \text{C} / \text{s}$), lo que resulta una asíncrona activación de las neuronas periféricas y centrales. Por lo tanto no permite un adecuado estudio de los nervios, fenómeno clásicamente visto en otros sistemas sensoriales.

El objetivo de las técnicas a realizar es comprobar el efecto analgésico de las muestras frente a diferentes formas de calor (57).

Capítulo 1: Revisión Bibliográfica.

Método del foco calorífico.

Este método fue uno de los primeros en implementarse y el estímulo algésico es el foco calorífico. A la media hora de administración del fármaco, se dirige un foco calorífico a la cola de la rata, observándose el tiempo de resistencia al calor, considerando que este no ha terminado cuando la rata está inquieta y mueve la cola (57).

Tail-flick o latigazo en la cola

En este caso se desarrolla un dispositivo especial que permite aplicar sobre la cola del animal, que se encuentra dentro de este para mantenerlo constreñido y en reposo, un estímulo de calor radiante regulable, que proviene de una fuente de poder infrarroja. En el momento de iniciar la aplicación del calor se activa un cronómetro digital sensible al movimiento, que permite determinar el tiempo que demora el ratón en retirar la cola de la zona y es la medida que se usará para evaluar el efecto analgésico (57). |

Método de la placa caliente

Este test es muy empleado para evaluar la analgesia a nivel central (Callado, 2006). Los resultados que se obtienen con este método son fiables y reproducibles, siendo igualmente válido para rata como para ratón. La desventaja es que no da resultados positivos con analgésicos no narcóticos débiles, del tipo salicilato. De modo general se utiliza un aparato que consiste en una placa conectada a una resistencia termostataada de modo que se consiga la temperatura deseada (55 ± 1 °c). Para evitar que el animal huya, está provisto de un cilindro de plástico transparente que permite observar una reacción de incomodidad del animal (lamerse las patas posteriores e incluso saltar). Cada individuo puede considerarse como su propio control y después de administrar los productos se evalúa el tiempo de la reacción y este valor viene determinado

Capítulo 1: Revisión Bibliográfica.

por los segundos que tarda en reaccionar el ratón después del tratamiento(3, 53, 58).

Inmersión de la cola

Este test se desarrolla en ratas. Al cabo de 30, 60, 90 y 120 min de la administración de cada tratamiento, se sumerge 1/3 de la cola del animal en agua a temperatura de 50- 60 °C. El animal es sujetado de forma que puede mover libremente la cola. Cuando el animal experimenta dolor, como consecuencia de la elevada temperatura del agua, desarrolla una respuesta de retirada de la cola. Se cuantificó el tiempo de reacción o tiempo que el animal tardó en retirar la cola, expresado en centésimas de segundo. Se emplea Indometacina 10 mg/kg como control (58).

Analgesia mecánica

Estimulación mecánica: La aplicación de los estímulos mecánicos nocivos pueden ser progresivos o gruesos. Las respuestas producidas por estímulos nocivos mecánicos son clasificados en relación con la intensidad y / o la duración del estímulo, de los reflejos a través de vocalizaciones, en última instancia a las conductas motoras complejas, pero tiene la desventaja de la activación de los mecanorreceptores bajo umbral, así como nociceptores. En consecuencia, el estímulo no es específico. También hay dificultades técnicas en la aplicación de los estímulos mecánicos, sobre todo cuando los animales se mueven libremente. Por otra parte, cuando los estímulos mecánicos son realmente nociceptivos es probable que se produzcan cambios en los tejidos (sensibilización o lesiones reales). Por último en pequeños animales como roedores las partes del cuerpo que se estimulan son pequeñas lo que puede producir problemas para el científico en separar la causa (estímulo) y efecto (reacción) (58).

Capítulo 1: Revisión Bibliográfica.

Test de Randall y Selitto

En este test, una pieza cónica acabada en punta roma ejerce una presión que se va incrementando de forma lineal sobre la región central de la pata posterior derecha del animal. El incremento de la presión se produce al incrementar el desplazamiento de un peso a través de una barra escalada en centímetros sobre la que realice un efecto de palanca que se transmite a la extremidad del animal. El animal es sujetado durante todo el test de forma que puede mover libremente la pata. Cuando el animal experimenta dolor, como consecuencia del incremento de la presión, desarrolla una respuesta de retirada de la pata

Dicho test ha sido modificado usando como agente algésico una solución de carragenina al 1%. Los fármacos que actúan a nivel central producen una elevación del umbral doloroso en ambas patas, mientras que los que actúan a nivel periférico no modifican el umbral doloroso en la pata normal y si en la inflamada, como ocurre con los analgésicos-antiinflamatorios. Transcurrido una hora de la administración de los productos se mide la resistencia a la presión en cada una de las patas posteriores de la rata. Con los valores medios, se calcula el porcentaje de analgesia de la misma manera que en la prueba del foco calorífico, a partir de las unidades de presión que resisten los animales (58).

Otros.

Test basado en el uso de estímulos de larga duración (dolor tónico).

Básicamente, estas pruebas involucran el uso de sustancias irritantes, algogénicas, agentes químicos como en el estímulo nociceptivo. Ellas se diferencian de la gran mayoría de otras pruebas porque abandonan el principio de la determinación del umbral nociceptivo y ello implica una aproximación cuantitativa de los comportamientos observados después de la aplicación de un estímulo donde su potencia va a variar con el tiempo. Pueden considerarse

Capítulo 1: Revisión Bibliográfica.

como una especie de modelo para el dolor tónico, pero no para el dolor crónico debido a su corta duración (58).

Inyección intradérmica: La sustancia más utilizada para inyecciones intradérmicas es la formalina.

Test de formalina

La prueba de formalina es considerada por Dalal y Melzack como un excelente modelo de dolor prolongado de moderada intensidad, que semeja al dolor clínico en humanos, cabalga sobre los modelos de dolor agudo y crónico, pues desencadenan una respuesta bifásica conductual que en un primer tiempo refleja un dolor nociceptivo en respuesta a la noxa química aguda y en un segundo tiempo refleja un dolor inflamatorio con la sensibilización espinal inducida por la agresión donde median estructuras espinales y supraespinales. La ventaja de usar el modelo de formalina plantea que se puede diferenciar el dolor a nivel central y periférico. La prueba consiste en dos fases diferentes las cuales son separadas en el tiempo, la primera se genera en la periferia a través de la activación de las neuronas del dolor por la acción directa de la formalina 1% (Formaldehído) que dura de 0-15 min y la segunda ocurre a través de las neuronas del cuerno ventral a nivel del cordón espinal, con tiempo de 20-25 min o de 15-30 min. La primera fase representa un modelo de dolor agudo como reacción directa a la inyección de formalina, mientras que la segunda fase se considera un modelo de dolor persistente (crónico). Los animales reciben previamente morfina y los compuestos a evaluar antes de la administración intraplantar de formalina. Este test se realiza en ratas y ratones y se registra el tiempo al cual los animales se lamen o muerden la pata durante cada fase.

La morfina una droga narcótica típica, inhibe el dolor en ambas fases pero drogas con acción periférica, como la indometacina y corticosteroides inhiben solo la segunda fase. Drogas como el ácido acetilsalicílico y paracetamol, los

Capítulo 1: Revisión Bibliográfica.

cuales inhiben la síntesis de prostaglandinas, bloquen la primera fase del test de formalina (59).

La estimulación de los órganos huecos

Además de estas pruebas de la nocicepción peritoneal o visceral, otras pruebas implican la inyección de sustancias algogénicas directamente en los órganos huecos, y como tal, puede ser considerada como modelo para el dolor visceral verdadero. Por ejemplo, la administración de formalina en el colon de la rata puede producir un tipo complejo bifásico de conducta de dolor "" que implica una fase inicial de estiramiento del cuerpo y la contracción de cualquiera de los flancos o el cuerpo entero, y una segunda fase que consiste en lamer y mordisquear, también producen constricciones abdominales al igual que en las infusiones intracolónica de glicerol. Del mismo modo se han desarrollado una serie de modelos para el dolor de la vejiga, por lo que los reflejos y/o más comportamientos complejos se han observado. Modelos de la nocicepción visceral también se han utilizado en la estimulación mecánica del sistema genitourinario en animales conscientes, a pesar de que estos estímulos son más comunes en las prueba, incluyendo los animales anestesiados. Además estos autores observaron una concomitante hiperalgesia en los músculos abdominales, que junto con sus propios datos electrofisiológicos proporcionaron evidencia clara de convergencia visceromuscular a un nivel de la columna (59).

El estudio se realizó en el Departamento de Farmacia de la Universidad Central Marta Abreu de Las Villas (UCLV) y en el Instituto de Angiología y Cirugía Vascular” Fructuoso Rodríguez” de Ciudad de la Habana en el período comprendido desde septiembre 2009 hasta mayo 2010.

2.1. Reactivos empleados.

Para el desarrollo de la investigación se emplearon reactivos como el cloroformo (Scharlan chem), etanol(UniChem), ADP (CMP,S.A), colágeno(CMP,S.A), ácido acetil salicílico (ASA), cloruro de sodio(Uni Chem), morfina (QUIMEFA) citrato de sodio 3.8% w/v(Uni Chem), éter de petróleo(Uni Chem) y agua destilada.

2.2. Preparación del material vegetal.

2.2.1. Recolección.

El material vegetal empleado en el estudio se recolectó en áreas cercanas a la Universidad Central Marta Abreu de Las Villas, específicamente en la estación experimental “Las Antillas” en los meses de septiembre de 2009 a octubre de 2009. Comprendió ejemplares que se encontraban en estado de floración y fructificación y se realizó en horas tempranas de la mañana tomando partes aéreas de la planta procedentes de un suelo carbonatado.

Para el desarrollo del trabajo sólo se utilizaron las hojas de la planta, por ser las que presentan informes sobre su uso en la medicina tradicional. La planta se conservó en el herbario del Jardín Botánico de la propia Universidad Central identificada con el número 3012.

2.2.2. Selección.

El material recolectado fue trasladado en bolsas de nylon al Laboratorio de Química Farmacéutica y Farmacognosia, del departamento de Farmacia donde se procedió a la selección de las hojas y eliminación de las materias extrañas.

2.2.3. Secado.

El secado se realizó mediante calor artificial durante 3 días a una temperatura de 40°C con aire recirculado, utilizando estufa marca Binder

2.2.4. Molinado.

La droga secada se trituró en un molino de cuchillas de 5 pulgadas, marca Chisty Norris con un tamaño de partículas de 0.75 mm (Ortega, 2008).

2.3. Extracción.

Se pesaron 70g del material vegetal seco y molinado (hojas) en balanza analítica Sartorius. Después de ser sometido a un desengrase con éter de petróleo se realizó una extracción continua (soxhlet) primeramente con cloroformo (200mL), una vez agotada la droga se expuso la misma al aire para secar y luego se procedió a realizar otro proceso de extracción continua (soxhlet) con etanol al 80% (400mL). Luego se rotoevaporó (BÜCHI R-100), el extracto etanólico hasta 200 mL. Posteriormente el extracto etanólico se llevó a sequedad.

2.4. Determinación del contenido de sólidos totales del extracto hidroalcohólico.

De la muestra de ensayo previamente homogeneizada se transfieren 5 mL a una cápsula de porcelana limpia, seca y previamente tarada; la cápsula se coloca en un baño de agua y se evapora hasta que el residuo esté aparentemente seco, posteriormente se pasa a una estufa a una temperatura de 105 °C durante 3h. Se

retira la cápsula de la estufa, se coloca en una desecadora hasta que alcance la temperatura ambiente y se pesa. Se repite el proceso anterior, pero empleando solo 60 minutos de secado, las veces necesarias ,hasta obtener masa constante.

Se determina por la siguiente fórmula:

$St = (Pt - P) / V$ donde:

P es la masa de la capsula vacía.

Pt es la masa de la cápsula más el residuo.

V es volumen de ensayo.

2.5. Evaluación “in vitro” de la actividad antiagregante plaquetaria del extracto hidroalcohólico.

Para comprobar la actividad antiagregante plaquetaria se empleó el método Turbidimétrico utilizando sangre humana.

2.5.1. Preparación de las muestras de ensayo.

2.5.1.2. Preparación de las suspensiones de plaquetas humanas.

Las muestras de sangre fueron tomadas de humanos adultos de ambos sexos, los cuales se sometían a un estudio de rutina en el Instituto de Angiología y Cirugía Vascul ar “Fructuoso Rodríguez”, Ciudad de la Habana. Todos ofrecieron el consentimiento informado de no haber consumido ningún medicamento con actividad antrombótica, al menos ,dos semanas antes de la toma de muestra de sangre. La muestra se obtuvo de una de las venas situadas en la flexura del codo usando una jeringa con una aguja de 9 mm de diámetro.

Se recogió la sangre, evitando la contaminación con líquidos tisulares de acuerdo con lo establecido en el documento NCCLS M 29-T2, e introducir en un tubo que contenga citrato sódico al 3,8% en una relación sangre: anticoagulante

de 9:1. Para preparar un plasma rico en plaquetas (PRP), centrifugar la muestra con anticoagulante a 150 x g durante 10 minutos.

Eliminar con cuidado el PRP con una pipeta de transferencia de plástico. Expeler el plasma en un tubo de plástico etiquetado como PRP. Cubrir o cerrar el tubo y mantener a temperatura ambiente (18-26 °C) durante todo el ensayo.

Para preparar el plasma pobre en plaquetas (PPP), volver a centrifugar la muestra original de sangre a 1000 x g durante 20 minutos. Transferir el PPP al tubo etiquetado, cubrir o cerrar el tubo y mantener a temperatura ambiente (18 - 26 °C) durante todo el ensayo.

El conteo de plaquetas del plasma rico en plaquetas (PRP) se ajustó a una concentración de 2.5×10^{-4} mol/L por dilución con plasma pobre en plaquetas (PPP). Ambos plasmas se usaron hasta 3h después de su preparación.

2.5.1.3. Modelo experimental de agregación plaquetaria.

Se empleó el método Turbidimétrico para medir la agregación plaquetaria del extracto hidroalcohólico aislado a partir de *Boldoa Purpurascens* Cav; usando un agregómetro CLOT-2S. El equipo fue regulado a una temperatura de 37°C y luego las muestras de Plasma Pobre en Plaquetas (PPP) y Plasma Rico en Plaquetas (PRP) fueron colocadas en los canales para ser ajustadas. El producto se preparó disolviendo 14.8mg en 2 ml de agua destilada (blanco). Se tomó como control positivo una solución de ácido acetil salicílico (ASA) al 1% 1mg/ml en el medio de incubación; para medir el efecto anticoagulante. El PRP se incubó durante 2 minutos previo a la adición del estímulo. Se emplearon como estímulos ADP y colágeno que se prepararon acorde a las instrucciones establecidas para estos fines (se disolvieron 0.1ml de ADP en 0.5 ml de agua destilada y 25 microlitros de colágeno en 475 microlitros del mismo disolvente. Los volúmenes de estímulos se adicionaron en 500 microlitros del PRP

utilizándose 5,10 y 20 microlitros de ADP y del colágeno se tomaron volúmenes de 5,10 y 12.5 microlitros a una concentración de 1mmol/L.

Se comenzó a leer el ensayo dejando correr el papel alrededor de 300 segundos y posteriormente se comprobó que el porcentaje de inhibición plaquetaria estuviese por encima del 50% de agregación, para proceder luego con la adición 10 microlitros de la dilución del extracto a 1molar. Se lee el ensayo nuevamente y se procesan los datos.

2.7. Análisis estadístico.

El procesamiento estadístico se realizó a partir de la información obtenida en los modelos de recogida primaria de datos, con los cuales se confeccionaron bases de datos para la técnica empleada. Se utilizó el paquete estadístico SPSS, versión 11.5 para Windows. A los datos se le aplicaron los estadígrafos descriptivos media y desviación estándar. La comparación entre los grupos se realizó mediante la aplicación de técnicas no paramétricas, utilizando test de ANOVA con un intervalo de confianza del 95%.

2.6. Evaluación de la actividad analgésica del extracto hidroalcohólico.

Para comprobar la actividad analgésica a nivel central se empleó el método “in vivo” de la Placa Caliente, en ratones.

2.6.1. Preparación de las muestras de ensayo.

2.6.1.1. Preparación de las dosis a administrar del extracto hidroalcohólico.

Se administraron dosis de 200, 400, 600 y 800mg/Kg de peso vivo, utilizando como vehículo agua destilada. Para la preparación de las muestras se utilizaron volumétricos de 50 y100 mL y las pesadas se realizaron en balanza analítica Sartorius.

2.6.1.2. Preparación de la solución de Cloruro de Sodio (0.9%) (control negativo).

Se preparó una solución de Cloruro de Sodio disolviendo 0.9g en cantidad suficiente de agua destilada (100mL).

2.6.1.3. Modelo experimental de actividad analgésica.

2.6.1.3.1 Caracterización del sistema de estudio.

Se realizó el ensayo para comprobar el efecto analgésico de un extracto hidroalcohólico obtenido a partir de *Boldoa purpurascens*, Cav. Para ello se utilizaron 20 ratones machos y 16 hembras de la línea NMRI con un intervalo de peso inicial entre 19 y 29g. Los animales se suministraron por el Centro Nacional de Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB) acompañados del correspondiente certificado de calidad Genética e Higiénico Sanitaria (Anexo 1).

2.6.1.3.2. Condiciones Experimentales.

Los animales fueron mantenidos durante 7 días en adaptación a las condiciones experimentales con una temperatura de $27\pm 1^{\circ}\text{C}$, humedad relativa de $60\pm 5\%$ y ciclos de luz/oscuridad de 12 horas/12 horas. Recibieron alimentación controlada (Alimento concentrado EMO 1002 en forma de pellet con su correspondiente Certificado de Calidad emitido por el CENPALAB, Anexo 2) y agua potable apta para consumo *ab libitum*. Se alojaron en jaulas de polietileno con rejilla metálica a razón de 6 animales por jaula. Fueron privados de alimentación 18 horas antes de iniciar el experimento y de agua potable 1 hora antes.

2.6.1.3.3. Evaluación postmortem.

La eutanasia se realizó a las 24 horas de culminado el estudio, los animales fueron sacrificados mediante la dislocación cervical, cumpliendo con los procedimientos internacionales bioéticos establecidos para ello.

2.6.1.3.4. Consideraciones éticas

Todos los investigadores respetaron los principios éticos que rigen la experimentación animal, garantizando el bienestar y la protección de los mismos, tanto por la sensibilidad humana ante el sufrimiento animal, como por garantizar la validez de los resultados obtenidos, cumpliéndose con las Normas de Bioética y Bioseguridad establecidas (Dueñas, 2000).

2.6.1.3.6. Procedimiento experimental.

Se utilizaron 6 grupos de 6 animales cada uno, de ambos sexos. El grupo I (control negativo) recibió una solución salina NaCl 0,9% por vía intraperitoneal utilizando una jeringuilla de 1-ml en volúmenes de 0.2 y 0.3 según el peso. Para el grupo II (control positivo) se utilizó como referencia 7.5 mg/kg, i.p. de morfina que fue suministrada por vía intraperitoneal en un volumen de 0.2ml. y a los grupos III, IV y V y VI se les aplicaron dosis de 200, 400, 600 y 800 mg/Kg del extracto hidroalcohólico. La administración a todos los grupos restantes se realizó sobre la base del peso vivo de cada animal. Las determinaciones de la analgesia se realizaron en un equipo denominado Placa Caliente (Hot-plate) marca UGO BASILE. El aparato consiste en una placa conectada a una resistencia termostatada de modo que se consigue la temperatura deseada (55 ± 1 °c). Para evitar que el animal huya, está provisto de un cilindro de plástico transparente que permite observar una reacción de incomodidad del animal (lamerse las patas trasera e incluso saltar). Cada individuo puede considerarse como su propio control y se efectúan dos medidas espaciadas en 10 min y se calcula la media (tiempo antes). Luego después de administrar los productos se evalúa el tiempo de la reacción a los 30, 60, 90, 120 y 180 min y este valor viene determinado por los segundos que tarda en reaccionar el ratón después del tratamiento(tiempo después).

$\% \text{ Analgesia} = \frac{T \text{ después} - T \text{ antes} \times 100}{T \text{ antes}}$

2.6.1.3.7 Análisis estadístico.

Los datos sobre los tiempos de soporte ante el estímulo térmico por grupos de tratamiento y en cada momento fueron vaciados en Excel. Ellos fueron importados al SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*) y procesados en el Centro de Estudios de Informática de la Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas, en una computadora Intel, Centrino Duo.

Para facilitar su interpretación, el procesamiento se realizó de la siguiente forma:

1. Análisis descriptivo de datos. Determinación de un índice relativo de poder analgésico de las diferentes dosis para su comparación adecuada.
2. Cambios del poder analgésico a lo largo del tiempo en cada tratamiento
3. Diferencias entre los grupos de tratamiento en cada momento después de la aplicación

En la primera parte, se utiliza un análisis descriptivo de los datos comenzando con el peso de los ratones en cada grupo, y se comparan estadísticamente con un análisis de varianza paramétrico de grupos independientes. Se describen además los tiempos de soporte o resistencia ante el estímulo térmico en cada grupo y en cada momento. Ello sugiere la necesidad de trabajar datos relativos a los tiempos de soporte en el momento basal. Se define este índice y se muestran las estadísticas descriptivas del mismo. Como este índice es un porcentaje, no tiene distribución normal, y a continuación, todas las pruebas a aplicar tendrán un carácter no paramétrico

En la segunda parte se comparan, para cada tratamiento por separado, los cambios en el poder analgésico a lo largo del tiempo. Se trata de comparaciones apareadas y por ello se utiliza el análisis de varianza no paramétrico de segunda vía (muestras relacionadas) de Friedman y como test de rangos para comparar parejas de momentos, se utiliza consecuentemente el test de Wilcoxon.

En la tercera parte se buscan las diferencias entre los grupos de tratamiento, fijando en este caso el momento. Se trata de comparaciones de muestras independientes y por ello se utiliza el análisis de varianza no paramétrico de primera vía (muestras independientes) de Kruskal-Wallis y como test de rangos, para comparar parejas de grupos, se utiliza el test de Mann-Whitney.

Finalmente se intenta reflejar, con análisis descriptivo de datos, en qué medida las conclusiones anteriores sobre el poder analgésico, son visibles desde el punto de vista de las variables originales, relativas a los tiempos de soporte de estímulos térmicos, entre los grupos de tratamiento que demostraron el mejor desempeño.

Todas las comparaciones por los test estadísticos se consideran significativas si la significación es menor que 0.05. Si la significación es menor que 0.01, se consideran altamente significativas. Si la significación no es menor que 0.05; pero al menos menor que 0.10, se consideran medianamente significativas. En todas las pruebas no paramétricas se intenta calcular la significación exacta, mientras la memoria del procesador lo permita, y como alternativa (en el caso de los tests de Kruskal-Wallis), se calcula la significación a partir de técnicas de Monte Carlo que simulan 10000 tablas con la misma distribución de los datos reales a comparar, calcula entonces la significación de estas 10000 comparaciones, y reporta la significación media y su intervalo de confianza del

99%. Todo ello brinda gran confiabilidad a la estimación como tal de la significación, incluso cuando las muestras sean pequeñas.

3.1. Recolección del material vegetal.

Las hojas de la planta se recolectaron en áreas de suelos ricos en carbonatos ubicados en la estación experimental “Las Antillas”. Un ejemplar de la especie se identificó en el Jardín Botánico de la Universidad Central Marta Abreu de Las Villas por el especialista (Dr. Cristóbal Albuerne), se comparó con otro ejemplar depositado en la institución denotado con el número 3012, lo cual permitió comprobar la autenticidad de la especie.

3.1.1. Preparación del material vegetal.

El material vegetal una vez secado se molinó de tal forma que la materia prima conservara las características macromorfológicas establecidas para la droga. Se almacenó en bolsas de polietileno dentro de una desecadora protegida de la luz y la humedad, hasta el momento de su utilización.

3.2. Extracción del material vegetal.

El material vegetal se extrajo en un equipo soxhlet durante 20h con el cloroformo para garantizar el agotamiento total de la droga y así eliminar los componentes grasos y pigmentos que podían interferir en el posterior trabajo experimental y que no constituían metabolitos de interés en para este estudio, además esto permitió lograr la mayor concentración de los metabolitos extraíbles con cada disolvente empleado. Se decidió posteriormente realizar una extracción con etanol al 80% para eluir del material vegetal los componentes de mediana y alta polaridad y así obtener compuestos polihidroxilados (flavonoides, carbohidratos y glicósidos flavonoides) presentes en las hojas de la especie. De esta forma se obtuvo un extracto rico en componentes polifenólicos, que podía tener relación con los efectos biológicos propuestos para esta especie.

3.3. Determinación de contenido de sólidos totales del extracto hidroalcohólico.

Se procedió a la determinación de los sólidos totales contenidos en el extracto hidroalcohólico de *Boldoa purpurascens*. ya que el conocimiento de este parámetro, se hace necesario para establecer las dosis a emplear cuando se realizan estudios biológicos a partir de extractos de plantas medicinales, en este caso se obtuvo un valor equivalente a 41.4mg/mL.

3.4. Evaluación "in vitro" de la actividad antiagregante plaquetaria.

Se empleó el método Turbidimétrico para medir la agregación plaquetaria del extracto etanólico obtenido a partir de *Boldoa purpurascens Cav*,

El extracto se redisolvió en agua destilada en el momento de los experimentos y así se evitó cualquier efecto no deseado provocado por el disolvente de extracción.

Se utilizó como blanco el agua destilada al cual se le añadió diversas dosis de estímulos (ADP Y colágeno) a las concentraciones mínimas en las cuales un individuo normal agrega (1mmol/L). Dentro de los datos obtenidos se puede observar que a mayor dosis de estímulos mayores es el porcentaje de inhibición de agregación plaquetaria. **(Tabla 1 y Tabla 2).**

Tabla 1. Resultados del porcentaje de inhibición de la agregación plaquetaria del ADP en agua destilada (Control)

Dosis de ADP (μ L)	Inhibición de Agregación Plaquetaria (%)
5	0
10	50
20	60

Tabla 2. Resultados del porcentaje de Inhibición de la agregación plaquetaria del colágeno en agua destilada (Control)

Dosis de Colágeno (μL)	Inhibición de Agregación Plaquetaria (%)
5	0
10	60
12.5	70

Sin embargo a pesar de que el colágeno también mostró un mayor porcentaje de inhibición de agregación plaquetaria en su máxima dosis (12.5 μL), lo hace en un mayor porcentaje que el ADP, teniendo en cuenta que la máxima dosis del mismo es menor que la del colágeno. **(Tabla 3).**

Tabla 3. Resultados del porcentaje de inhibición de agregación plaquetaria de ADP y Colágeno en control a dosis máximas.

Estímulos	Dosis (μL)	Inhibición de Agregación Plaquetaria (%)
ADP	20	60
Colágeno	12.5	70

El colágeno es inhibidor de la formación de tromboxanos evita la formación de trombos en un 70% mientras que el ADP activa el receptor purinérgico P2Y12 e inhibe la agregación plaquetaria en un 60%. (**Gráfico 1**).

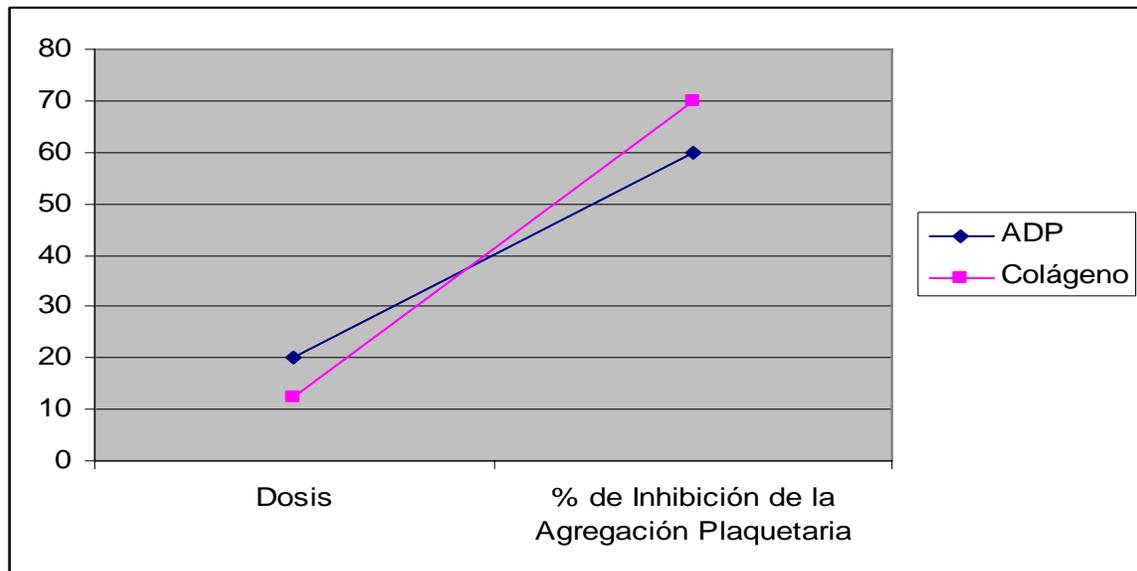


Gráfico 1. Resultados del porcentaje de inhibición de agregación plaquetaria de ADP y Colágeno en control a dosis máximas.

Después de haberse realizado el control con agua destilada se tomaron los valores de porcentaje de Inhibición de Agregación Plaquetaria que se encontraban por encima del 50%. Posteriormente se adicionaron 10 μ L de extracto a las dosis de estímulos de ADP (10 Y 20 μ L) y de Colágeno (10 y 12.5 μ L) manteniendo el procedimiento anterior. Las mayores dosis (dosis2) mostraron un mayor porcentaje de Inhibición de Agregación Plaquetaria tanto para el ADP como para el Colágeno. (**Tabla 4**)

Tabla 4. Comparación del porcentaje de Inhibición de la Agregación Plaquetaria de colágeno y ADP en 10 μ L de extracto.

Producto	Dosis1 (μ L)	PI1 (%)	Dosis2 (μ L)	PI2 (%)
ADP+	10	20	20	60
Extracto				
Colágeno +	10	30	12.5	70
Extracto				

PI – Porcentaje de inhibición de agregación plaquetaria.

El perfil antiagregante dosis-respuesta del extracto de *Boldoa*, fue comparado con el de ácido acetil salicílico (ASA) (Patrón), precursor clave en la síntesis de prostaglandinas. Evidentemente el ASA mostró una inhibición del 90% de agregación a una dosis de 1 μ L; pues su acción antiplaquetaria se atribuye principalmente a la inhibición irreversible de la ciclooxygenasa (COX), lo que reduce la producción de TxA2 y, con ello, la agregación de plaquetas.

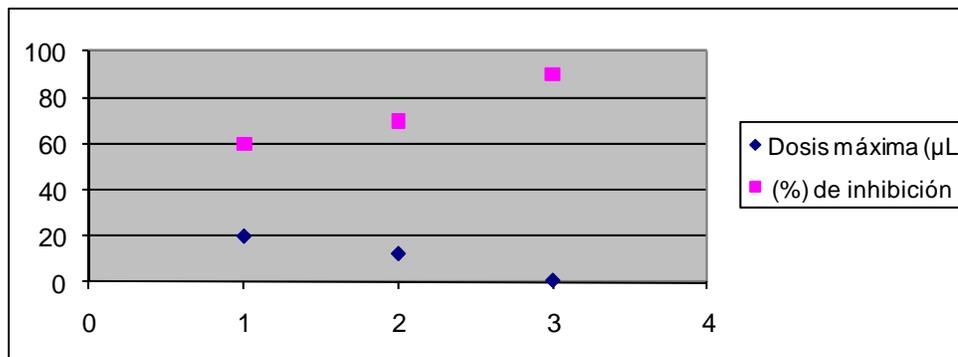


Gráfico 2. Efecto de *Boldoa purpurascens* sobre la Agregación plaquetaria “in vitro” inducida por ADP Y Colágeno a la dosis máxima frente al patrón ASA.

Posteriormente se determinó que no había diferencias significativas ($p < 0,05$ frente al control con un intervalo de confianza del 95%) en el porcentaje de inhibición plaquetaria entre el ADP control (A) y ADP más extracto (B) a la máxima dosis (20 μL) (**Tabla 5**), ocurriendo de igual forma para el colágeno (12,5 μL) (**Tabla 6**). Sin embargo en los porcentajes obtenidos entre el colágeno control (A) y colágeno más extracto (B) a partir de la dosis de 10 μL , existen diferencias significativas. (**Gráfico 3 y 4**).

Tabla 5. Análisis de varianza del efecto de *Boldoa purpurascens* sobre la agregación plaquetaria “in vitro” inducida por ADP.

Agrupación	Media	F	P
A:ADP (Control)	4450.0	27.00	0.306
B:ADP (Extracto)	5105.56	306.33	0.328
AB	616.667	37.00	0.298

Tabla 6. Análisis de varianza del efecto de *Boldoa purpurascens* sobre la agregación plaquetaria “in vitro” inducida por Colágeno.

Agrupación	Media	F	P
A:Colág (Control)	7450.0	640.50	0.308
B:Colág (Extracto)	7316.67	658.50	0.320
AB	316.667	28.50	0.300

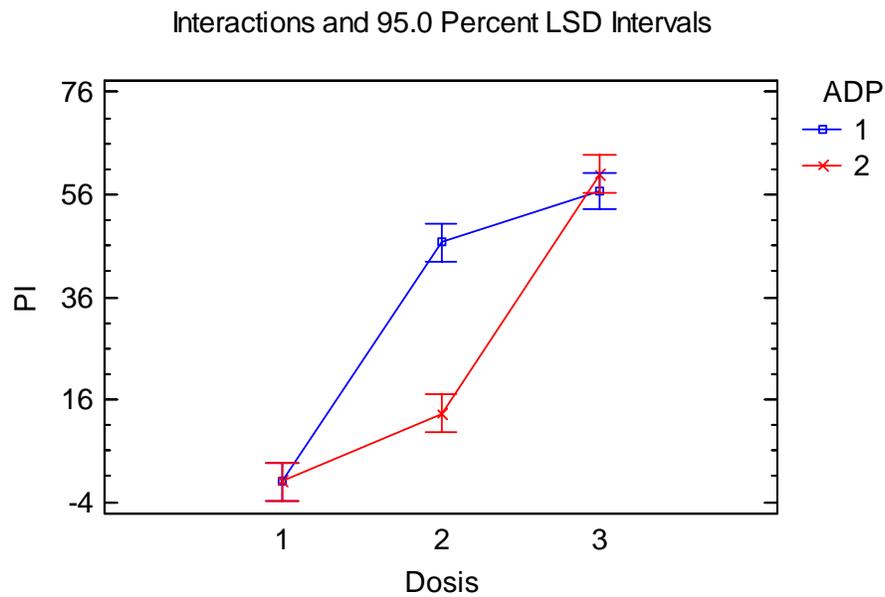


Gráfico 3. Análisis de varianza del efecto de *Boldoa purpurascens* sobre la agregación plaquetaria “in vitro” inducida por ADP.

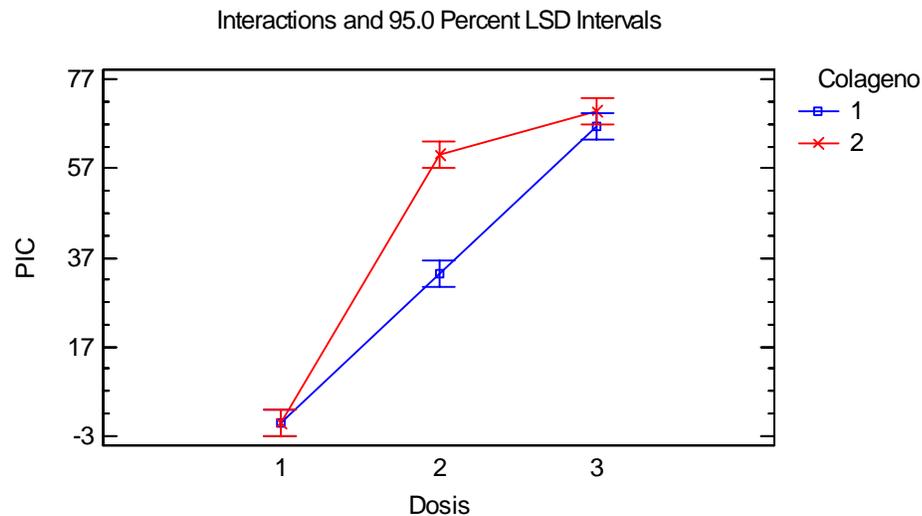


Gráfico 4. Análisis de varianza del efecto de *Boldoa purpurascens* sobre la agregación plaquetaria “in vitro” inducida por Colágeno.

El extracto etanólico de las hojas de *Boldoa Purpurascens*, provocó un mayor efecto antiagregante en plaquetas, en el ensayo cuando se empleó como estímulo de agregación al colágeno a la dosis (12.5 μL), donde se observó un 70% de inhibición con respecto a la dosis de ADP (20 μL) que inhibió el 60%. Estos resultados sugieren que el extracto evaluado actúa sobre la Glucoproteína VI inhibiendo la formación de tromboxanos.

Los resultados obtenidos en este estudio permiten demostrar que el extracto etanólico de *Boldoa Purpurascens*, ejerce un efecto antiagregante plaquetario *in vitro* en plaquetas humanas. Llama la atención, en particular, el comportamiento

descrito por el extracto frente a la inducción con colágeno, cercano al descrito para el ASA. Por lo cual podría tener repercusiones potenciales en clínica, si se tienen en cuenta los beneficios aportados por el ASA en la profilaxis de eventos coronarios agudos.

El efecto antiagregante plaquetario ha sido descrito en gran número de fuentes de origen natural. Entre ellos *Salix cortex*, *Galea officinalis*, *Piper futokadsura*, *Reboulia hemisphaerica*. No obstante, *Boldoa purpurascens* señala una potencia inhibitoria, que de acuerdo con la revisión de la literatura, no había sido descrita con anterioridad.

3.5. Evaluación “in vivo” de la actividad analgésica del extracto hidroalcohólico.

En la **Tabla 7** se muestran las estadísticas descriptivas del peso en gramos de los animales por grupos. Puede observarse que el peso medio en general es de 25.05 gramos con una desviación estándar de 2.10 gramos. Sin embargo se aprecia a simple vista, que el peso medio (y también la desviación estándar) pueden variar por grupos de tratamiento. También son diferentes consecuentemente los valores mínimo y máximo dentro de los grupos.

Un análisis de varianza demuestra, con significación 0.01, que efectivamente hay diferencias significativas en los pesos medios entre grupos, y el test de Levene muestra además que hay diferencias significativas también en su

desviación estándar (significación 0.04). Los test de Scheffe y Dunnet C (el primero conservador y el segundo aplicable cuando hay falta de homogeneidad de varianzas) arrojan idénticos resultados y distinguen dos subgrupos homogéneos: en el primero, con pesos promedios más bajos, están francamente los ratones que recibieron dosis de 400 mg/mL, dosis de 800 mg/mL y Morfina, todos con peso promedio inferior a los 24.5 gramos. En el segundo subgrupo está francamente el grupo de ratones que recibió dosis de 600 mg/mL con peso promedio superior a 27.5 gramos. En una situación intermedia, sin diferenciarse significativamente del primer subgrupo ni del segundo, están los ratones que recibieron dosis de 200 mg/mL y los que recibieron el placebo de cloruro de sodio, ambos con peso promedio entre 24.5 y 27.5 gramos. El gráfico ayuda a visualizar estas diferencias (**Anexo 6**).

Tabla 7. Estadísticas descriptivas del peso en gramos de los animales por grupos.

Estadísticas descriptivas del peso en gramos de los animales, a nivel de grupos de tratamiento

	N	Media	Desviación estándar	Error estándar	Intervalo de confianza 95% para la media		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
Cloruro de sodio (Control)	6	26.05	1.09	.45	24.90	27.20	24.60	27.82
Morfina (Control +)	6	24.18	1.73	.71	22.36	26.00	22.38	26.50
Dosis 200 mg/ml	6	24.63	2.25	.92	22.27	26.99	22.30	26.75
Dosis 400 mg/ml	6	23.68	.46	.19	23.19	24.16	23.02	24.40
Dosis 600 mg/ml	6	27.73	1.03	.42	26.64	28.82	26.26	28.90
Dosis 800 mg/ml	6	24.02	2.44	1.00	21.46	26.59	19.90	26.90
Total	36	25.05	2.10	.35	24.33	25.76	19.90	28.90

Análisis de varianza del Peso entre los grupos de tratamiento

	Suma de cuadrados	gl	Cuadrado medio	F	Sig.
Entre grupos	72.397	5	14.479	5.26	.001
Dentro de grupos	82.522	30	2.751		
Total	154.918	35			

Sig. del test de Levene de homogeneidad de varianzas=0.004

Subconjuntos homogéneos de acuerdo al peso en gramos

Scheffe y Dunnet C

Tratamiento	N	Subconjuntos para alfa = 0.05	
		1	2
Dosis 400 mg/ml	6	23.68	
Dosis 800 mg/ml	6	24.02	
Morfina (Control +)	6	24.18	
Dosis 200 mg/ml	6	24.63	24.63
Cloruro de sodio (control -)	6	26.05	26.05
Dosis 600 mg/ml	6		27.73

En la **Tabla 8** se muestran las estadísticas descriptivas, por grupos, de los tiempos que los animales soportan el estímulo térmico. El tiempo promedio basal está calculado como media de los tiempos observados a los 0 minutos y a los 10 minutos, ambos antes de aplicar cualquier tratamiento. Véase que hay una aparente variabilidad en los mismos. Hay por supuesto también variabilidad en

los tiempos reportados a los 30 minutos, los 60, los 90, 120 y 180; pero resulta difícil apreciar cuáles con los comportamientos mejores porque se parte de tiempos basales promedios diferentes. Además, como se muestra en el gráfico, **(Anexo 7)** los tiempos promedio basales varían con el peso en gramos y ya se demostró que el peso promedio en gramos de los grupos no es homogéneo.

Tabla 8. Estadísticas descriptivas del tiempo que soportan ante estímulo térmico.

Estadísticas descriptivas del tiempo que soporta ante estímulo térmico

	Tratamiento	Media	Desv.Est.
Tiempo promedio basal	Cloruro de sodio (Control -)	7.18	.96
	Morfina (Control +)	12.00	1.46
	Dosis 200 mg/ml	9.78	1.45
	Dosis 400 mg/ml	11.13	2.44
	Dosis 600 mg/ml	7.59	1.43
	Dosis 800 mg/ml	7.10	1.47
Tiempo que soporta a los 30 min	Cloruro de sodio (Control -)	5.05	2.53
	Morfina (Control +)	22.98	9.17
	Dosis 200 mg/ml	12.37	5.92
	Dosis 400 mg/ml	15.57	6.38
	Dosis 600 mg/ml	15.57	4.76
	Dosis 800 mg/ml	10.62	6.92
Tiempo que soporta a los 60 min	Cloruro de sodio (Control -)	6.20	1.92
	Morfina (Control +)	19.68	1.51
	Dosis 200 mg/ml	9.55	4.33
	Dosis 400 mg/ml	8.17	2.96
	Dosis 600 mg/ml	5.13	1.99
	Dosis 800 mg/ml	10.13	3.57
Tiempo que soporta a los 90 min	Cloruro de sodio (Control -)	4.63	1.78
	Morfina (Control +)	13.47	3.03
	Dosis 200 mg/ml	8.03	1.46
	Dosis 400 mg/ml	7.42	2.72
	Dosis 600 mg/ml	6.48	2.76
	Dosis 800 mg/ml	10.07	3.05
Tiempo que soporta a los 120 min	Cloruro de sodio (Control -)	4.72	1.83
	Morfina (Control +)	12.78	2.21
	Dosis 200 mg/ml	7.33	1.51
	Dosis 400 mg/ml	7.28	2.48
	Dosis 600 mg/ml	6.00	2.14
	Dosis 800 mg/ml	9.55	2.64
Tiempo que soporta a los 180 min	Cloruro de sodio (Control -)	4.30	1.57
	Morfina (Control +)	9.32	2.66
	Dosis 200 mg/ml	6.33	1.52
	Dosis 400 mg/ml	6.77	2.52
	Dosis 600 mg/ml	5.32	2.14
	Dosis 800 mg/ml	7.22	3.10

Esto indica la necesidad de trabajar con un índice que sea expresión del poder analgésico a partir de la relación entre el tiempo de soporte del estímulo térmico en una determinada dosis y al cabo de un tiempo determinado y el tiempo promedio basal de soporte a tal estímulo. Las estadísticas descriptivas de una tal medida se muestran en la **Tabla 9**. Como quiera que:

$$\text{Poder Analgesico} = \frac{\text{Tiempo de soporte en tratamiento X al cabo de Y minutos}}{\text{Tiempo de soporte promedio basal}}$$

resulta claro, que si este valor es superior a 1, existe efectivamente poder analgésico y en caso contrario, no. Observando entonces la tabla y el gráfico (**Anexo 8**) puede comprobarse en principio que:

- El placebo de Cloruro de Sodio, no tiene poder analgésico en ninguno de los momentos (todos los valores promedios son inferiores a 1)
- La morfina, control positivo, tiene poder analgésico desde los 30 minutos y hasta los 120; lo pierde a los 180 minutos.
- El tratamiento con dosis de 200 mg/mL tiene poder analgésico a los 30 minutos pero lo pierde posteriormente. Lo mismo ocurre con el tratamiento con dosis de 400 y 600 mg/mL.
- El tratamiento con dosis de 800 mg/mL mantiene su poder analgésico desde el principio hasta los 180 minutos. Si bien desciende al cabo de las 3 horas, resulta relativamente superior a la morfina, pues no llega a perderlo.

Tabla 9. Estadísticas descriptivas del poder analgésico por grupos.

Estadísticas descriptivas del poder analgésico por grupos^a

Tratamiento		Media	Desv.Est.
Cloruro de sodio (Control -)	Poder analgésico relativo a los 30 min	.708	.350
	Poder analgésico relativo a los 60 min	.870	.250
	Poder analgésico relativo a los 90 min	.660	.261
	Poder analgésico relativo a los 120 min	.653	.235
	Poder analgésico relativo a los 180 min	.593	.194
Morfina (Control +)	Poder analgésico relativo a los 30 min	1.982	.977
	Poder analgésico relativo a los 60 min	1.671	.327
	Poder analgésico relativo a los 90 min	1.122	.214
	Poder analgésico relativo a los 120 min	1.079	.218
	Poder analgésico relativo a los 180 min	.804	.307
Dosis 200 mg/ml	Poder analgésico relativo a los 30 min	1.268	.597
	Poder analgésico relativo a los 60 min	.957	.345
	Poder analgésico relativo a los 90 min	.839	.197
	Poder analgésico relativo a los 120 min	.760	.181
	Poder analgésico relativo a los 180 min	.661	.195
Dosis 400 mg/ml	Poder analgésico relativo a los 30 min	1.444	.617
	Poder analgésico relativo a los 60 min	.758	.276
	Poder analgésico relativo a los 90 min	.688	.256
	Poder analgésico relativo a los 120 min	.672	.233
	Poder analgésico relativo a los 180 min	.623	.238
Dosis 600 mg/ml	Poder analgésico relativo a los 30 min	2.153	.860
	Poder analgésico relativo a los 60 min	.694	.285
	Poder analgésico relativo a los 90 min	.883	.395
	Poder analgésico relativo a los 120 min	.820	.338
	Poder analgésico relativo a los 180 min	.732	.348
Dosis 800 mg/ml	Poder analgésico relativo a los 30 min	1.783	1.819
	Poder analgésico relativo a los 60 min	1.474	.514
	Poder analgésico relativo a los 90 min	1.451	.443
	Poder analgésico relativo a los 120 min	1.401	.501
	Poder analgésico relativo a los 180 min	1.028	.375

a. Poder analgésico=Tiempo de resistencia a estímulo térmico / Tiempo de resistencia basal

Es bueno enfatizar que esta tabla (y el gráfico correspondiente) muestran tendencias medias a nivel de grupos de tratamiento. Ellas no son

necesariamente las tendencias con que evoluciona cada ratón individual dentro del grupo. Para analizar los cambios del poder analgésico a lo largo del tiempo en cada tratamiento es necesario aplicar test estadísticos que consideren las tendencias individuales y esto es lo que se realiza en el siguiente epígrafe.

3.5.1. Cambios del poder analgésico a lo largo del tiempo en cada tratamiento.

En la **Tabla 10** se resumen los resultados de muchas pruebas, en particular un test de Friedman de muestras apareadas para cada uno de los tratamientos (en total 6), a los fines de evaluar la significación individual de los cambios a lo largo del tiempo. Asociado a cada tratamiento y cada test de Friedman, se hacen entonces tests de Wilcoxon, para encontrar las diferencias por parejas de momentos, por tanto, 10 tests por cada tratamiento, en total 60 tests de este tipo. Para representar los resultados se reflejan los rangos medios del test de Friedman ordenados de forma descendente, y agrupados según los submomentos homogéneos que determina el test de Wilcoxon.

Tabla 10. Cambios del poder analgésico a lo largo del tiempo en cada tratamiento.

Submomentos homogéneos según el poder analgésico del cloruro de sodio (control negativo) ^a

	N	1	
A los 60 minutos	6	4.17	
A los 30 minutos	6	3.33	
A los 90 minutos	6	2.83	
A los 120 minutos	6	2.67	
A los 180 minutos	6	2.00	

Sig. exacta del test de Friedman=0.187

a. Se reportan los rangos medios del test de Friedman. Todos los momentos son homogéneos

Submomentos homogéneos según el poder analgésico de la morfina (control positivo) ^a

	N	1	2	3
A los 60 minutos	6	4.50		
A los 30 minutos	6	4.17	4.17	
A los 90 minutos	6		2.67	
A los 120 minutos	6		2.50	2.50
A los 180 minutos	6			1.17

Sig. exacta del test de Friedman=0.000

a. Se reportan los rangos medios del test de Friedman y los submomentos homogéneos se determinan con el test de Wilcoxon y alfa=0.05

Submomentos homogéneos según el poder analgésico de la dosis 200 mg/ml

	N	1	2
A los 30 minutos	6	4.17	
A los 90 minutos	6	2.92	
A los 60 minutos	6	3.67	3.67
A los 120 minutos	6	2.67	2.67
A los 180 minutos	6		1.58

Sig. exacta del test de Friedman=0.039

a. Se reportan los rangos medios del test de Friedman y los submomentos homogéneos se determinan con el test de Wilcoxon y alfa=0.05

Submomentos homogéneos según el poder analgésico de la dosis 400 mg/ml

	N	1	2
A los 30 minutos	6	4.58	
A los 60 minutos	6	4.00	
A los 90 minutos	6	2.67	2.67
A los 120 minutos	6	2.58	2.58
A los 180 minutos	6		1.17

Sig. exacta del test de Friedman=0.000

a. Se reportan los rangos medios del test de Friedman y los submomentos homogéneos se determinan con el test de Wilcoxon y alfa=0.05

Submomentos homogéneos según el poder analgésico de la dosis 600 mg/ml

	N	1	2	3
A los 30 minutos	6	5.00		
A los 120 minutos	6		3.33	
A los 90 minutos	6		3.17	
A los 60 minutos	6		2.08	2.08
A los 180 minutos	6			1.42

Sig. exacta del test de Friedman=0.000

a. Se reportan los rangos medios del test de Friedman y los submomentos homogéneos se determinan con el test de Wilcoxon y alfa=0.05

Submomentos homogéneos según el poder analgésico de la dosis 800 mg/ml

	N	1
A los 60 minutos	6	3.67
A los 90 minutos	6	3.33
A los 30 minutos	6	3.17
A los 120 minutos	6	2.83
A los 180 minutos	6	2.00

Sig. exacta del test de Friedman=0.450

a. Se reportan los rangos medios del test de Friedman. Todos los momentos son homogéneos

La primera subtabla de la columna izquierda refleja que cuando se utiliza el cloruro de sodio no hay cambios significativos en el poder analgésico a lo largo del tiempo (significación del test de Friedman 0.187). En este caso, no hay diferencias entre ninguna pareja de momentos y por tanto todos ellos pertenecen al mismo subgrupo.

En la segunda subtabla de la columna izquierda (**Tabla 10**) se reflejan los resultados cuando se utiliza la Morfina. Obsérvese que en este caso si hay una variación altamente significativa a lo largo del tiempo (significación del test de Friedman: 0.000). Por lo que se aplica el test de Wilcoxon y se encuentran tres submomentos homogéneos:

- A los 60 y los 30 minutos, con los rangos mayores
- A los 30, 90 y 120 minutos, con rangos intermedios (a los 30 el rango no difiere de los anteriores y a los 120 no difiere de los posteriores)
- A los 120 o 180 minutos, con rangos menores

Es particularmente interesante, que los mayores rangos medios evolutivos se obtienen a los 60 minutos a pesar, que de acuerdo a las estadísticas descriptivas, los valores medios del poder analgésico son máximos a los 30 minutos. Después se comprobará que esto es consecuencia de que hay particularmente un ratón dentro de este grupo que incrementa su tiempo de soporte de manera muy notable a los 30 minutos y él incide entonces sobre la media. Pero los rangos de Friedman no son susceptibles a valores extremos y por tanto ellos son mejor expresión de la tendencia individual.

En la tercera subtabla de la columna izquierda (**Tabla 10**) se reflejan los resultados cuando se utiliza el analgésico con dosis 200 mg/mL. Existe una variación significativa del poder analgésico a lo largo del tiempo, aunque menos

marcada que en la morfina (significación del test de Friedman 0.039). Con el test de Wilcoxon se encuentran dos submomentos homogéneos:

- A los 30, 90, 60 y 120 minutos con los rangos mayores
- A los 60, 120 y 180 minutos con los rangos intermedios o menores (60 y 120 son rangos que no difieren de los anteriores).

Los resultados con la dosis de 400 mg/mL se muestran en la primera tabla superior derecha. También aquí se detecta una variación altamente significativa del poder analgésico (significación del test de Friedman: 0.000). El test de Wilcoxon clasifica dos submomentos homogéneos:

- A los 30, 60, 90 y 120 minutos, con los valores mayores
- A los 90, 120 y 180 minutos con valores intermedios o menores (90 y 120 son rangos que no difieren de los anteriores)

De manera similar en la segunda subtabla de la columna derecha (**Tabla 10**) se muestra el cambio del poder analgésico a lo largo del tiempo cuando se utiliza la dosis de 600 mg/mL. Dicho cambio es altamente significativo (significación del test de Friedman: 0.000). Según el test de Wilcoxon se encuentran tres grupos teniendo en cuenta los rangos de analgesia en los diferentes tiempos:

- Los mejores rangos se obtienen a los 30 minutos
- A los 120, 90 y 60 minutos se obtienen rangos intermedios
- A los 60 y 180 minutos se obtienen los rangos menores (el rango a los 60 minutos no difiere de los anteriores intermedios)

Por último en la tercera subtabla de la columna derecha se demuestra que los rangos medios del poder analgésico con la dosis de 800 mg/mL se mantiene

estable a lo largo del tiempo (significación del test de Friedman 0.450) por lo que se puede concluir que esta dosis es la que produce una analgesia más estable desde las 0 a las 8 horas (más estable inclusive que la morfina, que constituye el control positivo).

3.5.2. Diferencias entre los grupos de tratamiento en cada momento después de la aplicación.

En la **Tabla 11** se hace la comparación de los grupos (tratamientos) en cada momento. En esta tabla se resumen también muchas pruebas, en particular un análisis de varianza de Kruskal-Wallis en cada uno de los momentos y asociados con cada uno, 15 pruebas de Mann-Whitney entre parejas de grupos para detectar los que difieren. Para representar los resultados se reflejan los rangos medios del test de Kruskal-Wallis ordenados de forma descendente y agrupados según los subgrupos homogéneos que determina el test de Mann-Whitney. El estilo de resumir los datos es similar a la de la tabla anterior, salvando el hecho de que se trata aquí de muestras independientes y allá de muestras apareadas y que se consideró preferible presentar los rangos del análisis de varianza en orden ascendente en lugar de descendente, lo cual es puramente convencional.

Tabla 11. Comparación de los grupos según tratamiento en cada momento.

Subgrupos de tratamientos homogéneos según poder analgésico a los 30 minutos

	N	1	2
Cloruro de sodio (Control -)	6	8.17	
Dosis 200 mg/ml	6	17.00	
Dosis 800 mg/ml	6	17.00	
Dosis 400 mg/ml	6	19.00	
Morfina (Control +)	6		23.67
Dosis 600 mg/ml	6		26.17

Sig. de Monte Carlo del test de Kruskal-Wallis=0.047, IC=(0.042,0.053)^b

- a. Se reportan los rangos medios del test de Kruskal-Wallis y los subgrupos homogéneos se determinan con el test de Mann-Whitney y alfa=0.05
- b. IC=Intervalo de confianza del 99% para la significación

Subgrupos de tratamientos homogéneos según poder analgésico a los 60 minutos

	N	1	2
Dosis 600 mg/ml	6	10.00	
Dosis 400 mg/ml	6	11.83	
Cloruro de sodio (Control -)	6	15.17	
Dosis 200 mg/ml	6	16.67	16.67
Dosis 800 mg/ml	6		26.50
Morfina (Control +)	6		30.83

Sig. de Monte Carlo del test de Kruskal-Wallis=0.000, IC=(0.000,0.001)^b

- a. Se reportan los rangos medios del test de Kruskal-Wallis y los subgrupos homogéneos se determinan con el test de Mann-Whitney y alfa=0.05
- b. IC=Intervalo de confianza del 99% para la significación

Subgrupos de tratamientos homogéneos según poder analgésico a los 90 minutos

	N	1	2	3
Cloruro de sodio (Control -)	6	10.50		
Dosis 400 mg/ml	6	11.00		
Dosis 200 mg/ml	6	15.83	15.83	
Dosis 600 mg/ml	6	19.00	19.00	19.00
Morfina (Control +)	6		25.17	25.17
Dosis 800 mg/ml	6			29.50

Sig. de Monte Carlo del test de Kruskal-Wallis=0.002, IC=(0.001,0.003)^b

- a. Se reportan los rangos medios del test de Kruskal-Wallis y los subgrupos homogéneos se determinan con el test de Mann-Whitney y alfa=0.05
- b. IC=Intervalo de confianza del 99% para la significación

Subgrupos de tratamientos homogéneos según poder analgésico a los 120 minutos

	N	1	2
Cloruro de sodio (Control -)	6	11.00	
Dosis 400 mg/ml	6	11.33	
Dosis 200 mg/ml	6	14.83	
Dosis 600 mg/ml	6	18.00	18.00
Morfina (Control +)	6		26.50
Dosis 800 mg/ml	6		29.33

Sig. de Monte Carlo del test de Kruskal-Wallis=0.002, IC=(0.001,0.004)^b

- a. Se reportan los rangos medios del test de Kruskal-Wallis y los subgrupos homogéneos se determinan con el test de Mann-Whitney y alfa=0.05
- b. IC=Intervalo de confianza del 99% para la significación

Subgrupos de tratamientos homogéneos según poder analgésico a los 180 minutos

	N	1
Cloruro de sodio (Control -)	6	13.00
Dosis 400 mg/ml	6	14.67
Dosis 200 mg/ml	6	16.33
Dosis 600 mg/ml	6	19.33
Morfina (Control +)	6	21.00
Dosis 800 mg/ml	6	26.67

Sig. de Monte Carlo del test de Kruskal-Wallis=0.249,
 IC=(0.238,0.260)^b

- a. Se reportan los rangos medios del test de Kruskal-Wallis. Todos los los grupos son homogéneos
- b. IC=Intervalo de confianza del 99% para la significación

En la tabla superior izquierda, se compara el poder analgésico de los grupos al cabo de 30 minutos de tratamiento. El test de Kruskal-Wallis encuentra que hay diferencias al menos medianamente significativas entre ellos (significación 0.047 con un intervalo de confianza que abarca a 0.05)) y el test de Mann-Whitney detecta dos grupos homogéneos:

- El que recibe cloruro de sodio o dosis del analgésico de 200, 800, o 400 mg/mL con rangos menores
- El que recibe morfina, o dosis de 600 mg/mL con rangos mayores

Los resultados al cabo de los 60 minutos se muestran en la segunda subtabla de la izquierda. Las diferencias entre los grupos son altamente significativas (significación 0.000). El test de Wilcoxon detecta otra vez dos subconjuntos homogéneos:

- El que recibe dosis de 600, 400 mg/mL, cloruro de sodio, o dosis de 200 mg/mL con poder analgésico menor
- El que recibe dosis de 200, 800 mg/mL o morfina con poder analgésico mayor (el que recibe 200 no se diferencia del subgrupo anterior)

Capítulo 3: Resultados y Discusión.

Obsérvese en particular que al cabo de los 60 minutos, ya el grupo de 800 mg/mL se despega francamente del grupo que recibe el placebo (control negativo) y comienza a acercarse al grupo que recibe morfina (control positivo). En la primera tabla de la columna derecha se muestran los resultados al cabo de 90 minutos. La significación del test de Kruskal Wallis es alta (significación 0.002 con intervalo de confianza francamente a la izquierda de 0.01). Mann-Whitney ordena tres subgrupos homogéneos.

- El control negativo, los de dosis de 400, 200 y 600 mg/mL con rangos menores
- Los de dosis de 200, 600 mg/mL y morfina, con rangos intermedios (los de dosis de 200 no se diferencian del anterior y los de 600 y morfina no se diferencian del siguiente)
- Los de dosis con 600 mg/mL, Morfina, u 800 mg/mL con poder analgésico en rangos mayores.

Es interesante aquí que el grupo con dosis de 600 mg/mL es completamente intermedio, en el sentido de que no se diferencia de los que muestran rangos de poder analgésico menor ni tampoco mayor. Por otra parte, el grupo con dosis de 800 mg/mL llega a sobrepasar, aun cuando no significativamente al control positivo con morfina.

En la segunda subtabla de la columna derecha se muestra análogamente la comparación de los grupos a los 120 minutos. Ella resulta también altamente significativa (significación del test de Kruskal-Wallis: 0.002 con intervalo de confianza a la izquierda de 0.01). Aquí el test de Mann-Whitney encuentra dos subgrupos homogéneos:

- El control negativo, los de dosis de 400, 200 y 600 mg/mL con rangos menores como ocurrió a los 90 minutos
- Los de dosis con 600 mg/mL, Morfina, u 800 mg/mL con poder analgésico en rangos mayores

Capítulo 3: Resultados y Discusión.

Así, al cabo de los 120 minutos se “especializan” los resultados de los diferentes tratamientos en relación con los 90 minutos, acentuando los valores extremos. Se mantiene el grupo de dosis 800 mg/mL con poder analgésico similar al de la morfina y hasta ligeramente (no significativamente) superior. El grupo con dosis de 600 mg/mL también se acerca (ligeramente por debajo) al grupo de morfina pero este grupo había mostrado una posición relativa muy inestable en momentos anteriores.

Por último, en la parte inferior central de la tabla se muestran los resultados al cabo de los 180 minutos. Aquí resulta que no hay diferencias significativas entre los distintos tratamientos (significación del test de Kruskal-Wallis: 0.249) porque el grupo placebo se mantiene y todos los diferentes de éste ya tienden a descender su poder analgésico al cabo de las tres horas. Consecuentemente hay un único subgrupo homogéneo pero de todas maneras se aprecia la tendencia de rangos mínimos del poder analgésico en el grupo de cloruro de sodio, rangos crecientes con el incremento de las dosis y en particular rangos ligeramente superior, incluso respecto a la morfina, con la dosis de 800 mg/mL.

De los resultados de este epígrafe y del anterior podría concluirse en primer lugar que las dosis inferiores a 600 mg/mL no muestran un poder analgésico (en el sentido de que no se diferencian mucho del control negativo). La dosis de 600 mg/mL comienza a ser interesante a partir de los 90 minutos porque su poder analgésico se acerca, aunque sea inferior, al de la morfina y al de la dosis de 800 mg/mL. Pero tales conclusiones requieren un muestreo mayor

Por otra parte, sí se puede concluir que:

1. La dosis de 800 mg/mL tiene un poder analgésico comparable e incluso ligeramente superior al clásico de la morfina, tomado como control positivo
2. Este poder analgésico comienza a destacarse entre otros tratamientos a los 60 minutos, se mantiene bastante estable desde el momento de la aplicación, incluyendo la no disminución significativa, como otros tratamientos, al cabo de las 3 horas.

Capítulo 3: Resultados y Discusión.

No obstante, debe observarse que estas conclusiones se refieren al poder analgésico tal como se definió operacionalmente, y requieren alguna aclaración desde el punto de vista de los datos originales, en los cuales hablamos, no de poder analgésico, sino de tiempo de soporte o resistencia al estímulo térmico. Para ello comparamos los resultados individuales de los 6 ratones de cada grupo que reciben el tratamiento con dosis de 800 mg/mL y dosis de morfina, incluyendo sus tiempos de soporte promedio basal. Los resultados se muestran en la **Tabla 12**.

Tabla 12. Tiempos individuales de soporte ante el estímulo térmico, de los ratones que reciben tratamiento de morfina y los que reciben dosis de 800 mg/mL

Dosis 800 mg/ml	Basal	30 min	60 min	90 min	120 min	180 min
Ratón D800_1	7.30	12.20	10.20	7.60	6.60	6.90
Ratón D800_2	8.40	5.50	5.00	11.50	9.70	12.30
Ratón D800_3	4.40	23.90	8.10	8.50	9.40	5.40
Ratón D800_4	6.95	6.20	14.30	13.40	12.70	9.20
Ratón D800_5	8.45	8.50	14.00	13.20	12.30	5.90
Ratón D800_6	7.10	7.40	9.20	6.20	6.60	3.60
Media de ratones	7.10	10.62	10.13	10.07	9.55	7.22

Morfina (control positivo)	Basal	30 min	60 min	90 min	120 min	180 min
Ratón Morf_1	10.05	19.60	22.50	9.50	11.70	10.10
Ratón Morf_2	10.30	39.40	19.40	13.10	13.00	12.80
Ratón Morf_3	13.25	26.30	18.50	15.10	9.20	8.60
Ratón Morf_4	12.80	21.70	18.40	10.40	13.80	8.20
Ratón Morf_5	13.30	12.90	20.10	15.50	13.20	5.10
Ratón Morf_6	12.30	18.00	19.20	17.20	15.80	11.10
Media de ratones	12.00	22.98	19.68	13.47	12.78	9.32

Capítulo 3: Resultados y Discusión.

En la tabla anterior se muestran los datos de los tiempos individuales de soporte ante el estímulo térmico, de los ratones que reciben tratamiento de morfina y los que reciben dosis de 800 mg/mL y en el **anexo 9** se ilustran claramente. Véase en particular que en ambos grupos, hay algunos ratones (en el grupo de morfina, hay varios) que tienen una respuesta muy marcada en los primeros 30 o 60 minutos lo cual puede confundir en el análisis de la media de los resultados en esos momentos.

De cualquier manera, en la parte inferior de la tabla se muestra el comportamiento de la media de los 6 ratones en ambos grupos. Es obvio, que desde el punto de vista absoluto, los que recibieron la dosis de morfina alcanzan en todos los momentos valores superiores del tiempo de resistencia respecto a los que recibieron dosis de 800 mg/mL. Pero obsérvese que el grupo que recibió morfina partió de una ventaja no despreciable por un tiempo basal mayor, además de tener más ratones con un peso mejor y algunos que respondieron de manera muy marcada en los primeros momentos.

Por todo ello, los resultados enfocados desde el punto de vista del poder analgésico como medida relativa respecto al tiempo de resistencia basal, son más ilustrativos, y se consideran válidas las dos conclusiones anteriores. Para hacer comparaciones de medidas absolutas se recomienda un diseño experimental en el cual los grupos de animales se conformaran de manera homogénea desde el punto de vista del peso, del tiempo basal de resistencia al estímulo o de otros factores que pudieran influir en los resultados de los diferentes tratamientos a lo largo del tiempo

1- El extracto hidroalcohólico de las hojas de *Boldoa purpurascens* obtenido por el fraccionamiento propuesto provocó un mayor efecto de inhibición sobre la agregación plaquetaria “in vitro” a las dosis de 12.5 y 20 μ L con el empleo del colágeno y el ADP respectivamente.

2- La dosis de 800 mg/mL tiene un poder analgésico comparable e incluso ligeramente superior al clásico de la morfina, tomado como control positivo, esta dosis comienza a destacarse a los 60 minutos, se mantiene bastante estable desde el momento de la aplicación, incluyendo la no disminución significativa al cabo de las 3 horas.

3- Todas las dosis evaluadas demostraron efecto analgésico durante los primeros 30 minutos.

1-Continuar la evaluación del efecto analgésico de la especie empleando otras técnicas descritas en la literatura.

2- Ampliar los estudios de la evaluación del efecto antiagregante plaquetario, utilizando otros estímulos y compuestos aislados a partir del extracto evaluado.

3- En futuros estudios se recomienda un diseño experimental en el cual los grupos de animales se conformaran de manera homogénea desde el punto de vista del peso, del tiempo basal de resistencia al estímulo o de otros factores que pudieran influir en los resultados de los diferentes tratamientos a lo largo del tiempo.

Referencias Bibliográficas.

1. Miranda J, Díaz NP, Isada, ML. Efecto hipoglicemiante de extractos de Aloe Vera L en ratas. . Correo científico médico de Holguín. 2001;5(3).
2. Ateche A. Vanaclocha B and Guenechea JL. Fitoterapia, Vademécum de prescripción de plantas medicinales. 4ta Edición. Barcelona. 2003.
3. Rang HP DM. Analgésicos. Pharmacology. 2 ed. Edinburgh London: Churchill Livingstone; p. 706-31. 1991
4. 3ra. ed . La Habana 1988. Diccionario botánico de nombres vulgares cubanos; p. 225.
5. Roig Mesa J. Plantas medicinales, aromáticas o venenosas de Cuba. Rev Científico Técnica. 1988.
6. González D. Evaluación fitoquímica y farmacológica de las hojas de la especie *Boldoa purpurascens*, Cav. Servicios de Publicaciones e Intercambios Científicos. 2006.
7. Font Quer P. Características de la familia Nictaginaceae. Barcelona 1985.
8. Pérez L, Fernández R, Arreguín M. La familia *Nyctaginaceae* en la cuenca del río Balsas, México. . Polibotánica. 2000;11:49-109.
9. Dequan L. *Nyctaginaceae*. Popularis Sin 1996;26(3):114.
10. León A. Contribuciones ocasionales del Museo de Historia Natural del Colegio La Salle. Flora de Cuba. 1957.
11. Rojas N, Aguilera M, Romeu B. Actividad antibacteriana de *Boldoa purpurascens* Cav. Rev Cubana Plant Med. 2004;9(2).
12. Rodríguez E. Avances en el estudio fitoquímico de dos especies vegetales: *Boldoa purpurascens* y *Portulaca olerácea*. Santa Clara: UCLV; 2001.
13. Martínez A. Flavonoides. Medellín, Colombia. <http://farmacia.udea.edu.co/~ff/flavonoides2001.pdf>. (13 junio 2008). 2005.
14. Ortega Y. Caracterización y comprobación de la actividad antiinflamatoria de una nueva flavona aislada a partir de *Boldoa purpurascens*. Santa Clara: Universidad Central "Marta Abreu" de las Villas; 2008.

Referencias Bibliográficas.

15. González D, Cuéllar A, Cid M, Cabrera K, Hernández P. Evaluación del efecto diurético del extracto acuoso de *Boldoa purpurascens*. *Rev Cubana Farm.* 2001;35:174-6.
16. Prieto T. Diseño preliminar del libro "Fitoterapia Antinflamatoria". Santa Clara: Universidad Central Marta Abreu de Las Villas; 2008.
17. Campbell, Neil A. Platelets are pinched-off cytoplasmic fragments of specialized bone marrow cells. They are about 2-3 μ m in diameter and have no nuclei. Platelets serve both structural and molecular functions in blood clotting. London: Pearson Education; 2008.
18. O'Connell S, Impeduglia T, Hessler K, Wang X, Carroll R, Dardik H. Autologous platelet-rich fibrin matrix as cell therapy in the healing of chronic lower-extremity ulcers. *Wound Rep Reg* 2008;16:749-56.
19. Sánchez M, Anitua E, Azofra J, Andía I, Padilla S, Mujika I. Comparison of surgically repaired Achilles tendon tears using platelet-rich fibrin matrices. *The American Journal of Sports Medicine.* 2007;35 (2):245-51.
20. Celotti F, Colciago A, Negri-Cesi P, Pravettoni A, Zaninetti R, Sacchi M. Effect of platelet-rich plasma on migration and proliferation of SaOS-2 osteoblasts: role of platelet-derived growth factor and transforming growth factor- β . *Wound Rep Regen.* 2006;14:195-202.
21. McAleer JP SS, Kaplan EM, Perisch G. Use of autologous platelet concentrate in a nonhealing lower extremity wound. *Adv Skin Wound Care* ; 19:354-63. 2006.
22. Knighton D, Ciresi K, Fiegel V, Schumerth S, Butler E, Cerra F. Stimulation of repair in chronic, non healing, cutaneous ulcers using platelet-derived wound healing formula. *Surg Gynecol Obstet.* 1990;170:56-60.
23. Driver VR HJ, Fylling CP, Beriou JM. A prospective, randomized, controlled trial of autologous platelet-rich plasma gel for the treatment of diabetic foot ulcers. *Ostomy Wound Manage* 2006;;52:68-87.
24. Movat HZ. Platelet Phagocytosis and Aggregation» *Journal of Cell Biology.* Vol. 27. pp. 531-543. . 1965).
25. Platelet Function, DA Triplett, Editor, American Society of Clinical Pathologist, . 1978.

Referencias Bibliográficas.

26. Human Blood Coagulation, Haemostasis and Thrombosis, 2nd ed. Rosemary Biggs, Editor, Blackwell Scientific Publications Oxford London 1976.
27. Diacovo T. Platelet-mediated lymphocyte delivery to high endothelial venules. *Science*. 1996;273:252-5.
28. Sunitha R MN. Platelet-rich fibrin: Evolution of a second-generation platelet concentrate. *Indian J Dent Res*. 2008;19(1):42-6.
29. Wagner D. Platelets in inflammation and thrombosis. *Thromb Vasc Biol*. 2003;23:2131-7.
30. Weyrich A. Platelets: signaling cells inside the immune continuum. *Trends Immunol* 2004; 25:489-95.
31. Iannacone M. Platelets mediate cytotoxic T lymphocyte-induced liver damage. *Nat Med* 2005;11:1167-9.
32. Matón, Anthea, Hopkins J, McLaughlin CW, Johnson S, Warner MQ, et al. *Human Biology and Health* Englewood Cliffs, New Jersey, USA: Prentice Hall. 1993.
33. Arvind Kumar K, Manoharachorye C. Biochemical changes in the white rust infected leaves of *Boerhaavia diffusa*. *Curr Sci*. 1985;54(14):704-5.
34. Woolfe G, MacDonald, LA. . The evaluation of the analgesic action of pethidine. hydrochloride. *J Pharmacol Exp Ther*. 1994;80:300-7. .
35. Born G. Aggregation of Blood Platelet by Adenoside Diphosphate and its Reversal. *Nature* 1962;194 (4832): 927-9.
36. Shen T, Hwang, SB, Chang, MN, Doebber, TW, Lam, MH, Wu, MS, . Characterization of a Platelet-activating Factor Receptor Antagonist Isolated from Haifenteg (*Piper futokadsura*): Specific Inhibition of *in vitro* and *in vivo* Platelet-activating Factor induced Effects. *PNAS*. 1985;82(3):672-6.
37. Josep M. Grino: BN 52021: A Platelet Activating Factor Antagonist for Preventing Post-Transplant Renal Failure: A Double-Blind, Randomized Study. 1994; 121.
38. Evans W. Farmacognosia. Editorial Interamericana S.A. 1991.
39. Mahadevan S, Park Y. Multifaceted therapeutic benefits of Ginkgo biloba L.: chemistry, efficacy, safety, and uses. *J Food Sci*. 2008 73(1):14-9.

Referencias Bibliográficas.

40. Bone K. Potential interaction of Ginkgo biloba leaf with antiplatelet or anticoagulant drugs: What is the evidence? *Mol Nutr Food Res Jan Agregacion plaquetaria*. 2008.
41. Akiyama T IJ, Nakagawa S, . *Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases. J Biol Chem*. 1987;262:5592-5.
42. Fotsis T PM, Adlercreutz H, . *a dietary ingested isoflavonoid, inhibits cell proliferation and in-vitro angiogenesis. J Nutr*. 1995;125:790S-7S.
43. Clark B. Drugs That Provide Pain Relief. In: Kuhn MA, editor. *Pharmacotherapeutics: A Nursing Process Approach 3ed*. Philadelphia: F. A. Davis Company. 1994:334-97.
44. Marhuenda E. Síndromes dolorosos. In: Bravo L, Marhuenda E, editors. *Manual de Farmacoterapia*. Madrid: ELSEVIER. 2005: 2-18.
45. Hite G. Analgésicos. In: Foye WG, editor. *Principios de Química-Farmacéutica*. 1980:272-317.
46. Fernández-Fernandez CC, L.F.; Girón, R.; Goya, P.; Meana, J.J.; Martín, M.I.; Jagerovic, N. . Potent Novel Pyrazolecarboxamide-based Cannabinoid Receptor Inverse Agonists with Opioid Receptor Affinity tested in Post-mortem Human Brain and in Vivo Behaviour in Mouse". *Journal of "Medicinal Chemistry"* .
47. Souza Brito ARM RL, Bighetti BJE, Gracioso JS, Hiruma-Lima CA. Antinociceptive effect of *Boerhaavia diffusa* L. (Nyctaginaceae) in mice. *J Ethnopharmacol*. 1999
48. Ojewole J, Adesina S. Isolation, identification and some cardiovascular actions of a purine nucleoside from the roots of *Boerhaavia diffusa*. *Fitoterapia*. 1985;6(1):31-6.
49. Brito S, Robineau L, Bighetti B, Gracioso J, Hiruma-Lima. Antinociceptive effect of *Boerhaavia diffusa* L. Nyctaginaceae. *J Ethnopharmacol* 1999.
50. Chandan B, Sharman A, Anand K. *Boerhaavia diffusa*: a study of its hepatoprotective activity. *J Ethnopharmacol*. 1991;31(3):299-307.
51. Olfert E C, B and McWilliams ,A. . *Manual sobre el cuidado y uso de los animales de experimentación*. 2da ed. t. 1. Ontario: Consejo Canadiense de Protección de Animales. 1988.

Referencias Bibliográficas.

52. Le Bars D, Gozariu, M, Cadden, S. Animal models of nociception. *Pharmacol Rev.* 2001;53:597-652.

53. Grotto M, Sulman, FG. Modified receptacle method for animal analgesimetry. *Arch Int Pharmacodyn.* 1997;165:152-9.

54. Analgésicos Opioides In: COMRA, editor. *Formulario nacional de Argentina* 9ed. Belgrano: Confederación Médica de la República Argentina; p. 99-103. . 2003.

55. Koste rR, Anderson, M, De Beer, EJ. Acetic acid for analgesic screening. *Fed Proc.* 1999;18:412.

56. A. Ortega ARyJAM. Modelos animales de dolor: una visión crítica, . *Rev Soc Esp Dolor,*. 2002;9:447.

57. J. M. González-Dader. Modelos animales de dolor y aspectos éticos de la experimentación animal, . *Rev Soc Esp Dolor,*. 2000;7:3131.

58. Dardonville CG, S.L.; Ryan, G.J.; Jagerovic, N.; Gabilondo, A.M.; Meana, J.J.; Callado, L.F. Synthesis and pharmacological studies of new hybrid derivatives of fentanyl active at the μ -opioid "receptor and I2-imidazoline binding sites". *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 14:6570-6580 2006.

59. Hunnskaar y K. Hole. The formalin test in mice: Dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain, *Pain*, 30, 103. 1987.

60. González D. Estudio fitoquímico y farmacológico del extracto acuoso de *Boldoa purpurascens* La Habana: Instituto de Farmacia y Alimentos de la Universidad de La Habana; 2000

61. [NCCLS]. Performance Goals for the Internal Quality Control of Multichannel Hematology Analyzers; Approved Standard. NCCLS document H26-A (ISBN 1-56238-312-4). NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087. 1996.

62. Zucker M. Platelet Aggregation Measured by the Photometric Method. *Methods Enzymol.* 1989;169:118-33.

63. Mazzucco L MD, Serra M, Panizza R, Rivara G, Orecchia S, Libener R, Cattna E, Levis A, Betta PG, Borzini P. The use of autologous platelet gel to treat difficult to heal wounds: a pilot study. *Transfusion* 2004;44:1013-8.

Referencias Bibliográficas.

64. Bizzozero J. Über einen neuen Formbestandteil des Blutes und dessen Rolle bei der Thrombose und Blutgerinnung. *Arch Pathol Anat Phys Klin Med.* 1882;90:261-332.

65. Ely SV JM. Comparison of methods for point of care preparation of autologous platelet gel. *JECT* 2004;36:28-35.

66. Marx RE CE, Eichstaedt RM, Schimmele ST, Strauss JE, Georgeff KR. Platelet-rich plasma: Growth factor enhancement for bone grafts. *J Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1998;85:638-46.

67. Gasper H. Collagen-platelet interaction. *Thrombosis and Haemostasis.* 1978;63.

68. Gosch C ZA, Carroll R, Bois J. Evaluation of an autologous platelet rich fibrin matrix technology for diabetic foot ulcer treatment. *Wound Rep Regen.* 2007;15.

69. Krivoy N, Pavlotzky, E, Chrubasik, S, Eisenberg, E, Brook, G,. Effects of Salicis cortex Extract on Human Platelet Aggregation. *Planta Med.* 2001;67 209-12.

70. M ZGaF-R. Significance of the LD50 test for Toxicological Evaluation of the Chemical Substance. *Arch Toxicology* 1991:47-77.

71. McCarty O. Immobilized platelets support human colon carcinoma cell tethering, rolling, and firm adhesion under dynamic flow conditions. *Blood.* 2000;96:1789-197.

72. Ko F, Liao C, Wu C. Marchantinquinone, Isolated from *Reboulia hemispherica*, as Inhibitor of Lipid Peroxidation and as Free Radical Scavenger. *Chem Biol Interact.* 1995;98(2):131- 43.

73. Dueñas R. El sistema Nacional de Bioseguridad. Identificación de prioridades y necesidades. La Habana: Centro Nacional de Seguridad Biológica. 2000.

Anexos.

Anexo 1 Certificado de Calidad de los Alimentos Concentrados.



División de Alimentación y Nutrición
CENPALAB
CENTRO NACIONAL PARA LA PRODUCCIÓN DE ANIMALES DE LABORATORIO

Certificado de Calidad de los Alimentos Concentrados

FP.CC.01.95

Folio: 075

Fórmula	Lote	Ciclo Prod.	Fecha de prod.	Presentación	Cantidad bulto	Centro Destino
EMO 1002	0631102	20	6/4/2010	Pellet	4	CEDEXAS MEXICALT
Especificaciones para su uso						
<p>Dieta completa concentrada para la alimentación de ratas y ratones . Todo propósito. Esterilizable. No requiere suplemento dietético. Conservar en lugar fresco y ventilado, protegido de la humedad y de vectores. Este alimento conserva sus propiedades nutritivas durante 45 días a partir de la fecha de fabricación</p>						
Componentes						
<p>Trigo , Soya harina, Pescado harina, Levadura torula, aceite vegetal, miel final B, CaHPO⁴ ,CaCO³ ,NaCl, Pre-mezcla minero vitamínica.</p>						
Características de Fabricación		Dosificación	+/- 1 Kg	Pelletización	Veloc.1 Temp. 36 °C	

Control de Calidad de los Parámetros Físicos*		
Descripción	UM	Valor emitido
Diámetro medio del pellet	mm	16.0
Longitud media del pellet	mm	26.30
Peso medio del pellet	g	7.55
Polución	%	0.95
Abrasión	%	97.0
Granulometría		
Partículas grandes	%	NP
Partículas medianas	%	
Partículas pequeñas	%	

Parámetros Bromatológicos*		
Descripción	UM	Valor emitido
Materia Seca	%	86.93
Humedad	%	13.07
Proteína Bruta	%	26.58
Cenizas	%	6.85
Calcio	%	3.20
Fósforo	%	0.93
Calcio/ Fósforo	relación	3.44

Parámetros Microbiológicos**		
	UFC/ ml	
Microorganismos viables	UFC/ ml	10 ⁴
Coliformes totales	UFC/ ml	-10 ²
Coliformes fecales	UFC/ ml	NP
Microorganismos proteolíticos	UFC/ ml	NP
Salmonellas	UFC/ ml	No detectable
Shigellas	UFC/ ml	No detectable
Hongos	UFC/ ml	-10 ¹

Elementos minerales de interés*		
	ppm	
Cobre	ppm	17.10

Según lo certificado por la Dirección de Aseguramiento de la Calidad del CENPALAB y que consta en los archivos de nuestra institución. Este Certificado es válido para el presente ciclo.

	Nombre y Apellidos	Cargo	Firma
Realizado por	Ing. Cándida Forte Miranda, Inv. Aux.	Esp. Control de Proceso de la Industria	 CENPALAB <small>CENTRO NACIONAL PARA LA PRODUCCIÓN DE ANIMALES DE LABORATORIO</small> Grupo Aseguramiento de la Calidad
Aprobado por	Dra. MV. Hiana Sosa Testé, Msc.	Director de Aseguramiento de la calidad	

Anexo 2. Certificado de calidad Genética e Higiénico Sanitaria

Dirección de Aseguramiento de la Calidad



GC.CC.09.09

Certificado de Calidad
Producción de Roedores SPF

No. 00037

Especie: Ratón		Sistema protegido de origen: SPE	
Línea: Cemp: NMRI	Número de lote: 15003510	Total de cajas: 4	
Total: 200 Machos 100 Hembras 100	Peso: 16-18g	Edad: 4-5 Sem	
Centro de destino: UC/Villas			
Fecha de expedición: 8/04/10		Hora de expedición: 10:15 AM	

EXAMEN CLINICO:

Los animales a la inspección clínica no muestran desviaciones de los parámetros de salud establecidos para esta especie y línea, cumpliendo con las especificaciones de calidad dadas por el productor.

BACTERIOLOGIA * RESULTADOS						RESULTADOS					
Entidad	Método	Neg	Pos	No testado	Fecha	Entidad	Método	Neg	Pos	No testado	Fecha
Salmonella spp.	Cult/Sert	X			1/2/10	Streptococcus pneumoniae	Cult/Serot	X			1/2/10
Streptococcus β hemolítico	Cult/Sert	X			1/2/10	Pasteurella pneumotropica	Cult/ELISA	X			1/2/10
Bordetella bronchiseptica	Cult/ELISA	X			1/2/10	Clostridium piliformis	Inp.Clinica	X			1/2/10
Corynebacterium kutscheri	Cultivo	X			1/2/10	Leptospira sp	ELISA	X			20/06/08
Helicobacter sp	Cultivo	X			1/2/10	Cytobacter freundii	Cultivo	X			1/2/10
Streptobacillus moniliformis	Cultivo			X	-	Mycoplasma pulmonis	Cult/ELISA			X	9/12/09
Dermatofitos	Inspección Clínica/ cultivo	x			27/1/10						
PARASITOLOGIA RESULTADOS						PATOLOGIA RESULTADOS					
Entidad	Método	Pos	Neg	No testado	Fecha	Examen macroscópico: (Fecha) 28/1/10					
Endoparásitos.	DIR/FLOT		X		27/1/10	No se observan lesiones macroscópicas compatibles con alteraciones patológicas					
Toxoplasma gondii	ELISA			X	-						
Ectoparásitos	INSPECCION		X		27/1/10						
VIROLOGIA * (SEROLOGIA) RESULTADOS						RESULTADOS					
Entidad	Método	Pos	Neg	No testado	Fecha	Entidad	Método	Pos	Neg	No testado	Fecha
Virus de la Hepatitis (MHV)	ELISA/IFA			X	-	Coriomeningitis inf. (LCM)	ELISA/IFA			X	-
Reovirus Reo Tipo 3 (REO 3)	IFA			X	-	Sendai	ELISA/IFA			X	-
Encefalomielititis (TEMV)	IFA			X	-	Polyoma	IFA			X	-
Pneumonía del ratón (PVM)	ELISA/IFA			X	-	Adenovirus (MAD)	ELISA/IFA			X	-
Virus diminuto del ratón (MVM)	ELISA/IFA			X	-	Citomegalovirus (MCMV)	IFA			X	-
Rotavirus (EDIM)	ELISA/IFA			X	-	Deshidrogenada Láctica (LDH)	Test LDH Plasma			X	-
Ectromelia	ELISA/IFA			X	-	Virus K	IFA			X	-
Hantaan	IFA			X	-	Virus Timico (MTV)	IFA			X	-

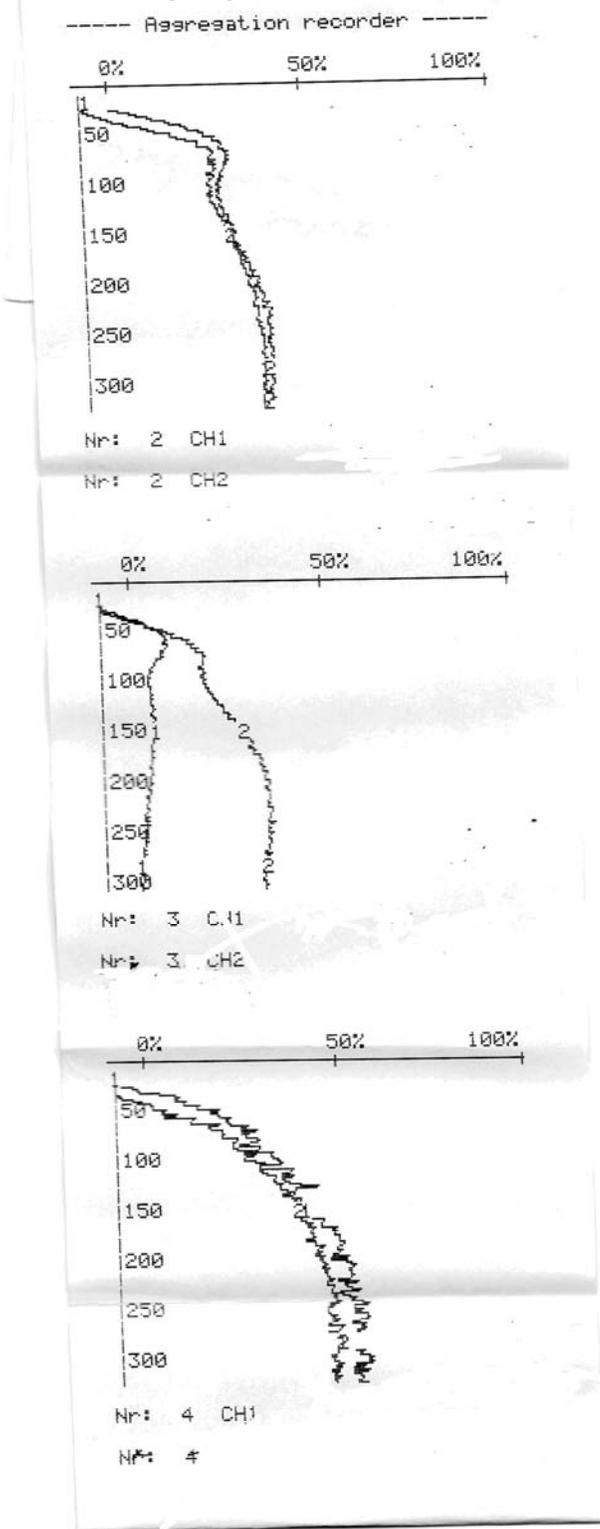
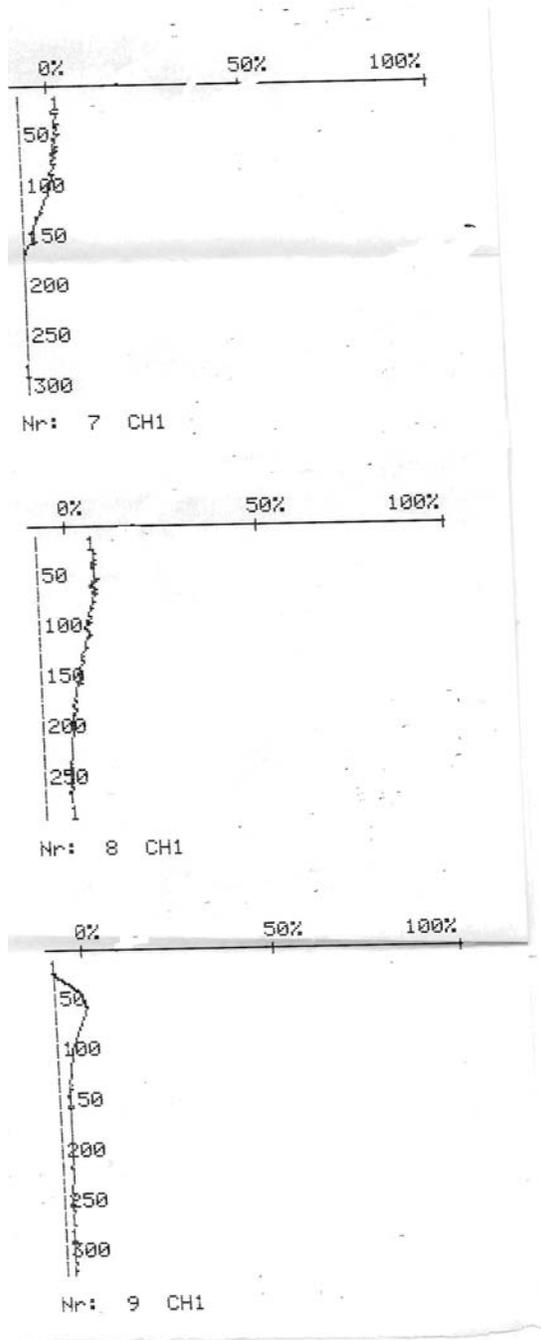
* Según lo certificado por la División de Aseguramiento de la Calidad del Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio, de acuerdo al cronograma de monitoreo de los roedores criados y producidos en sistemas protegidos, en los archivos de nuestra Institución. Válido a partir de Febrero /2010 hasta el mes de mayo del 2011.

Aprobado por:
Especialista de Liberación de Aseguramiento de la Calidad

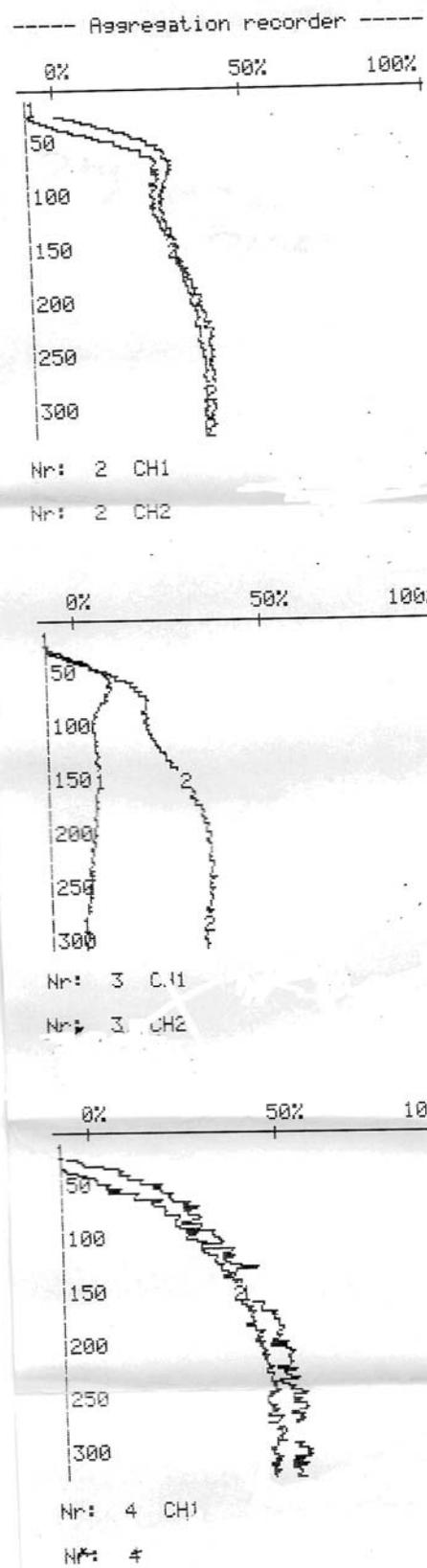
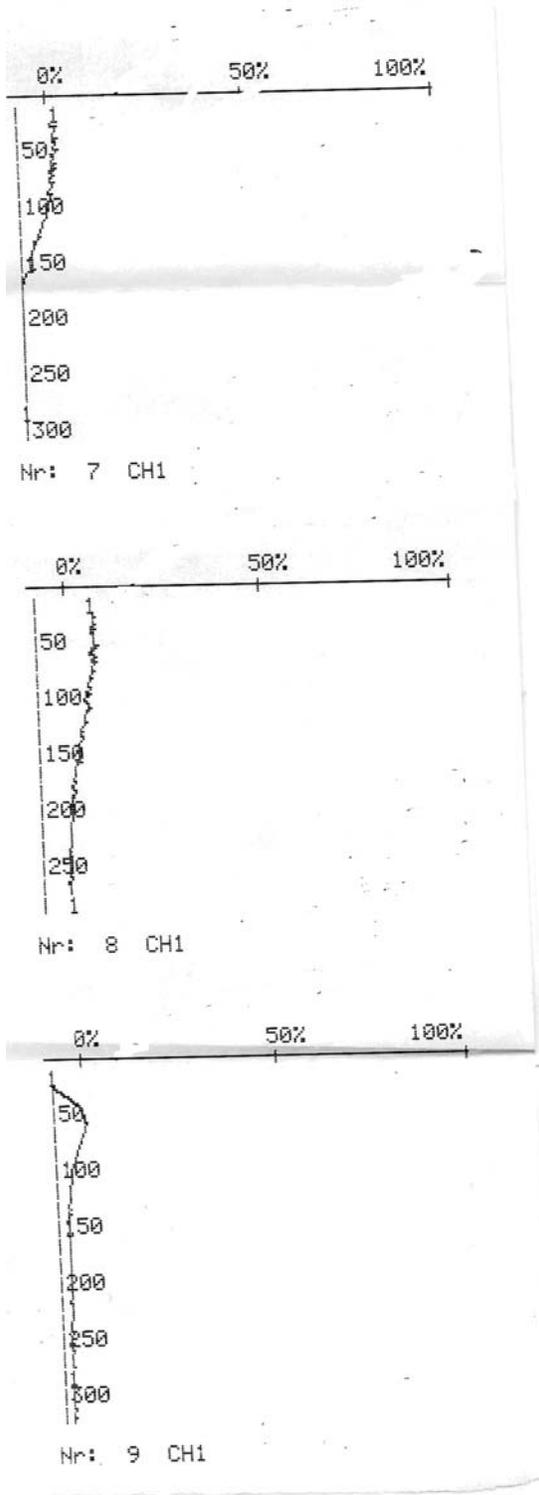
Vto. Bno.:
Dirección de Animales Gnotobióticos

Anexos.

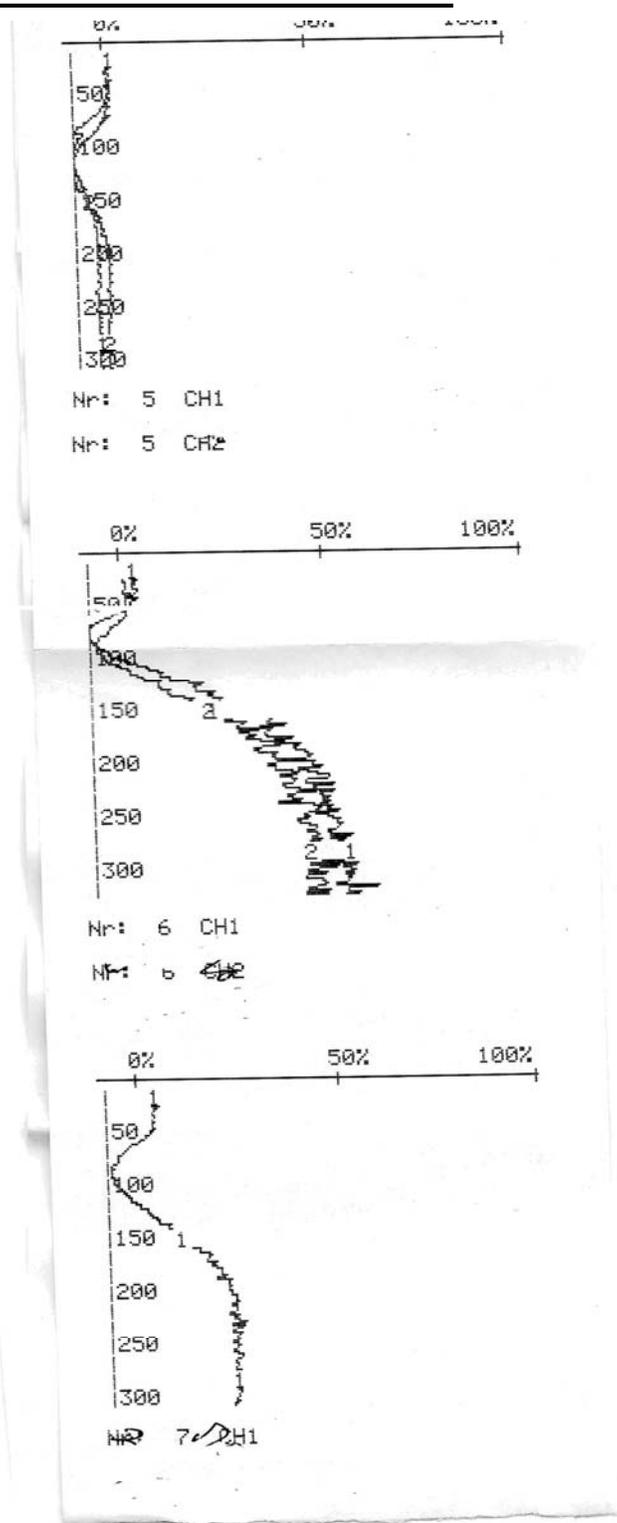
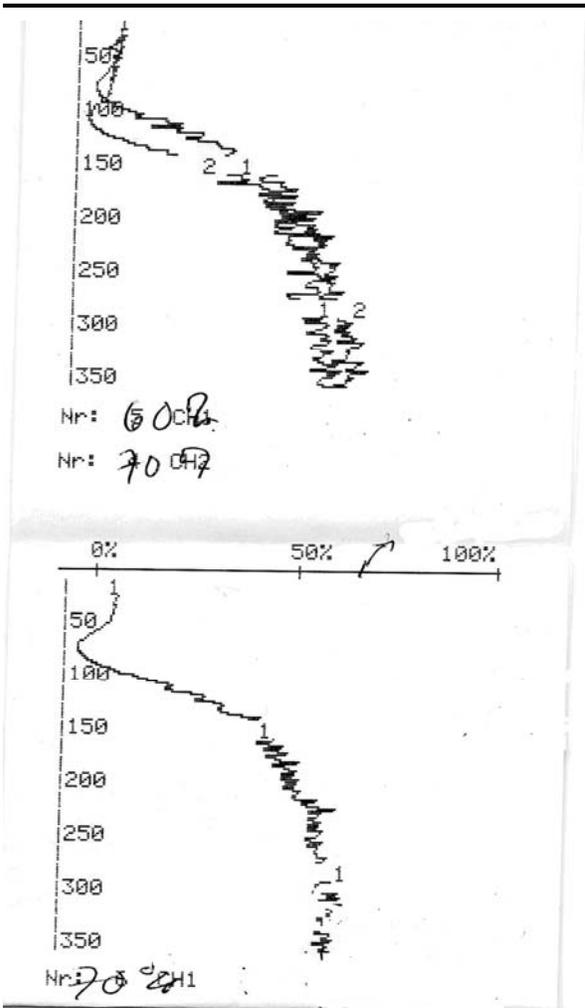
Anexo 3. Resultados de la lectura del % de inhibición plaquetaria.



Anexos.



Anexos.



----- Aggregation recorder -----
Coagulation Analyzer

Anexos.

Anexo 4. Resultados del test de analgésica (Tiempo antes) a nivel de grupos de tratamientos.

Control negativo	Peso(g)	0 min	10 min	Promedio
1	24.6	3.7	8.2	5.9
2	26.4	7.9	7.5	7.7
3	25.3	8.7	6.5	7.6
4	27.8	7.5	5.8	6.6
5	26.2	11.9	5.3	8.6
6	25.9	9.4	3.8	6.6
T. antes				7.1

Control Positivo (Morfina)	Peso(g)	0 min	10 min	Promedio
1	23.0	9.4	10.7	10.0
2	23.0	10.6	10.0	10.3
3	22.3	13.1	13.4	13.2
4	26.1	10.7	14.9	12.8
5	26.5	22.1	4.5	13.3
6	24.0	17.8	6.8	12.3
T. antes				11.9

Anexos.

Dosis 200mg/kg(BP)	Peso(g)	0 min	10 min	Promedio
1	22.4	6.8	13.0	9.9
2	23.0	9.8	6.5	8.1
3	22.3	13.1	6.0	9.5
4	26.6	9.6	9.7	9.6
5	26.6	12.1	5.9	9.0
6	26.7	15.9	9.0	12.4
T. antes				9.7

Dosis 400mg/kg (BP)	Peso(g)	0 min	10 min	Promedio
1	23.7	14.3	10.4	12.3
2	23.3	12.9	3.6	8.2
3	23.7	9.8	8.6	9.2
4	23.8	7.5	13.1	10.3
5	24.4	15.5	7.8	11.6
6	23.0	17.7	12.4	15.0
T. antes				11.1

Dosis 600mg/kg(BP)	Peso(g)	0 min	10 min	Promedio
1	26.2	13.4	5.7	9.5
2	26.7	10.5	4.3	7.4
3	28.9	11.3	4.6	7.9
4	28.5	11.3	2.5	6.9
5	28.0	10.8	6.0	8.4
6	27.9	8.3	2.0	5.0
T. antes				7.5

Anexos.

Dosis 800mg/kg(BP)	Peso(g)	0 min	10 min	Promedio
1	19.6	7.4	7.2	7.2
2	23.4	10.0	6.8	8.4
3	24.7	4.9	3.9	4.4
4	25.8	8.0	5.9	6.9
5	23.3	8.9	8.0	8.4
6	26.9	5.7	8.5	7.1
T. antes				7.0

Anexo 5. Resultados del test de analgésica (Tiempo después) a nivel de grupos de tratamientos.

Control Negativo	30 min.	60 min.	90 min.	120 min.	180 min.
1	6.1	4.4	4.1	3.0	2.8
2	8.2	8.0	4.7	4.2	6.0
3	7.5	8.7	6.9	6.8	5.3
4	2.4	6.1	3.5	2.3	2.0
5	3.2	3.8	2.2	4.2	4.5
6	2.9	6.2	6.4	5.8	5.2
Promedio Tiempo después	5.0	6.2	4.6	4.7	4.3

Anexos.

Control Positivo	30 min.	60 min.	90 min.	120 min.	180 min.
1	19.6	22.5	9.5	11.7	10.1
2	39.4	19.4	13.1	13.0	12.8
3	26.3	18.5	15.1	9.2	8.6
4	21.7	18.4	10.4	13.8	8.2
5	12.9	20.1	15.5	13.2	5.1
6	18.0	19.2	17.2	15.8	11.1
Promedio Tiempo después	22.9	19.6	13.4	12.7	9.3

Dosis 200mg/kg(BP)	30 min.	60 min.	90 min.	120 min.	180 min.
1	21.1	14.4	6.9	6.0	5.2
2	8.1	6.8	6.9	5.4	6.0
3	14.7	7.9	10.0	9.2	8.3
4	3.8	4.5	9.2	8.0	4.5
5	13.7	8.4	8.7	8.6	8.0
6	12.8	15.3	6.5	6.8	6.0
T. después	12.3	9.5	8.0	7.3	6.3

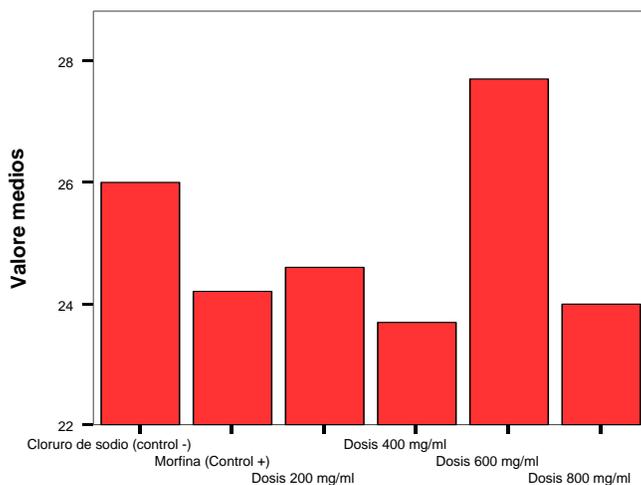
Anexos.

Dosis 400mg/kg(BP)	30 min.	60 min.	90 min.	120 min.	180 min.
1	8.7	10.1	9.3	8.7	8.0
2	10.0	4.9	4.2	4.0	3.2
3	14.7	8.0	7.4	7.2	7.0
4	23.2	10.7	10.0	9.5	9.0
5	23.4	11.0	9.6	9.7	9.2
6	13.4	4.3	4.0	4.6	4.2
T. después	15.5	8.1	7.4	7.2	6.7

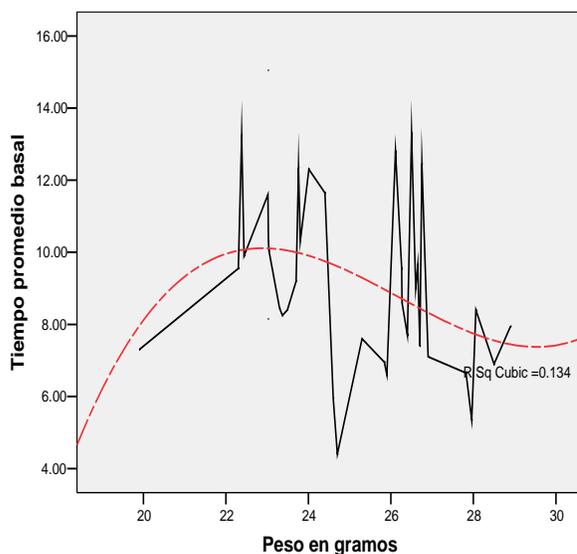
Dosis 800mg/kg(BP)	30 min.	60 min.	90 min.	120 min.	180 min.
1	12.2	10.2	7.6	6.6	6.9
2	5.5	5.0	11.5	9.7	12.3
3	23.9	8.1	8.5	9.4	5.4
4	6.2	14.3	13.4	12.7	9.2
5	8.5	14.0	13.2	12.3	5.9
6	7.4	9.2	6.2	6.6	3.6
T. después	10.6	10.1	10.0	9.5	7.2

Anexos.

Medias del peso en gramos de los animales por grupos

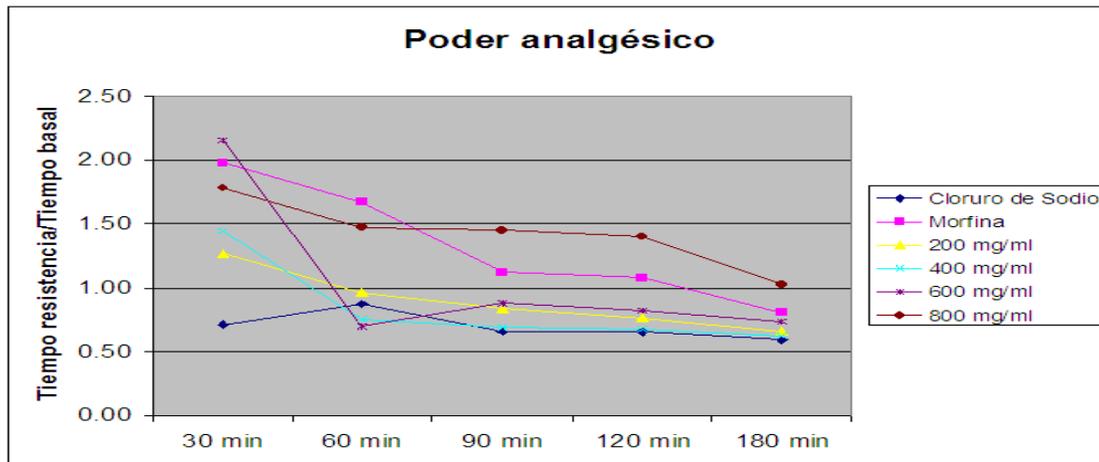


Anexo 6. Medias de peso en gramos de los animales por grupos.

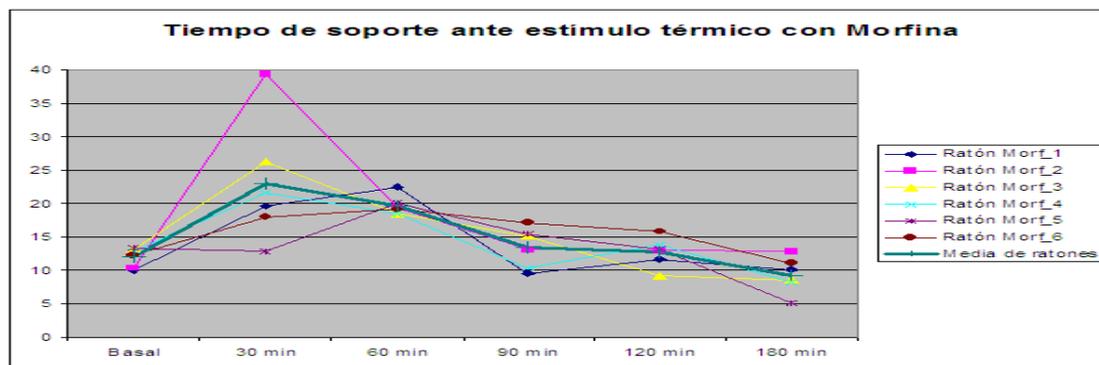
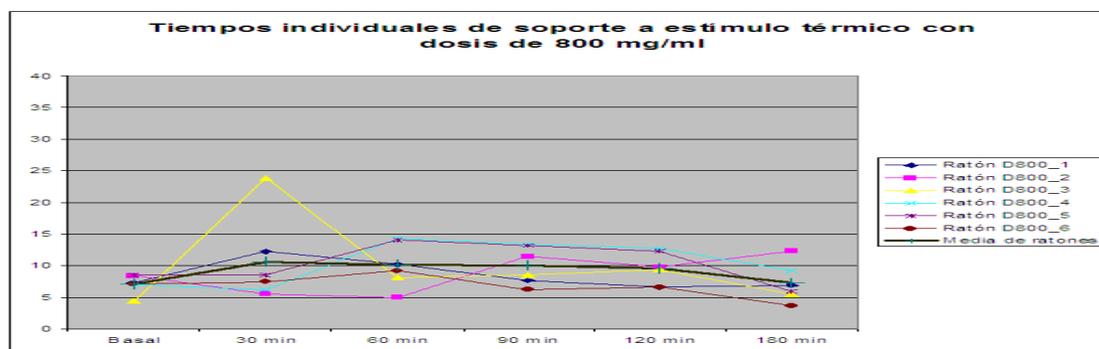


Anexo 7. Tiempo promedio basal de los animales por grupos

Anexos.

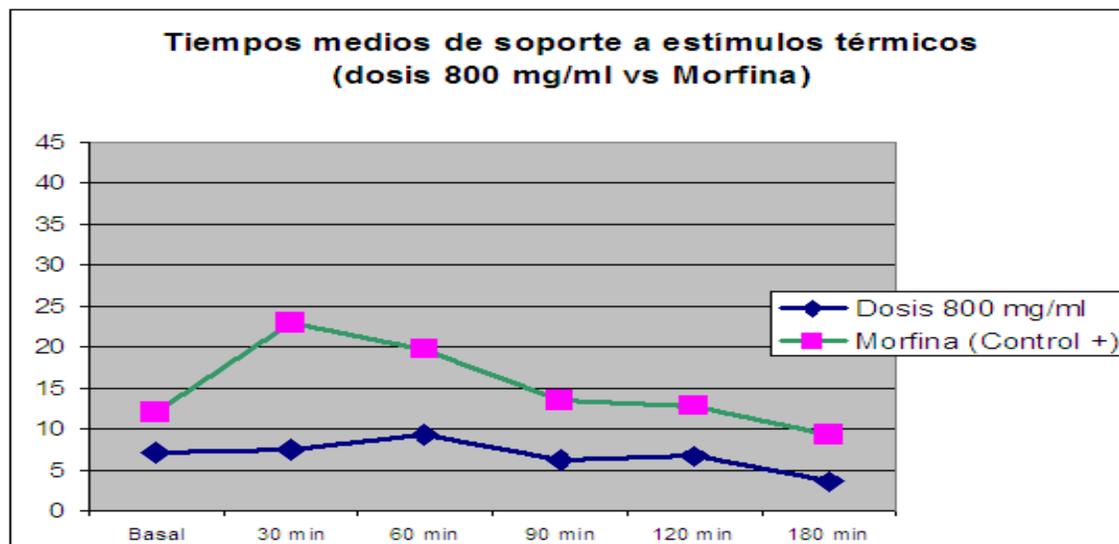


Anexo 8. Poder Analgésico por grupos.



Anexo 9. Tiempos individuales de soporte ante el estímulo térmico, de los ratones que reciben tratamiento de morfina y los que reciben dosis de 800 mg./mL.

Anexos.



Anexo 9. Tiempos individuales de soporte ante el estímulo térmico, de los ratones que reciben tratamiento de morfina y los que reciben dosis de 800 mg./mL.