



**Universidad Nacional Mayor de San Marcos**

**Universidad del Perú. Decana de América**

Dirección General de Estudios de Posgrado

Facultad de Farmacia y Bioquímica

Unidad de Posgrado

**Efecto analgésico del extracto seco atomizado de  
*Crotón lechleri* (Sangre de dragón) comparado con el  
ketoprofeno sobre el dolor inducido en ratones**

**TESIS**

Para optar el Grado Académico de Magíster en Farmacología con  
mención en Farmacología Experimental

**AUTOR**

Mario Martin PAUTA GALVEZ

**ASESOR**

Jorge Luís ARROYO ACEVEDO

Lima, Perú

2017



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

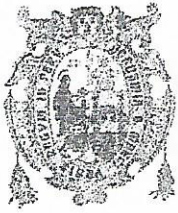
## Referencia bibliográfica

---

Pauta M. Efecto analgésico del extracto seco atomizado de *Crotón lechleri* (Sangre de dragón) comparado con el ketoprofeno sobre el dolor inducido en ratones [Tesis de maestría]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Unidad de Posgrado; 2017.

---

1369



Universidad Nacional Mayor de San Marcos  
Universidad del Perú. Decana de América  
Facultad de Farmacia y Bioquímica  
UNIDAD DE POSGRADO



12(2)  
50

**ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OPTAR  
AL GRADO ACADÉMICO DE MAGÍSTER EN FARMACOLOGÍA CON MENCIÓN EN FARMACOLOGÍA  
EXPERIMENTAL**

Siendo las 12:00 hrs. del 11 de octubre de 2017 se reunieron en el auditorio de la Unidad de Posgrado de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, el Jurado Examinador y Calificador de tesis, presidido por el Dr. Américo Jorge Castro Luna e integrado por los siguientes miembros: Dr. Jorge Luis Arroyo Acevedo (Asesor), Dr. Yovani Martin Condorhuamán Figueroa, Mg. Luis Alberto Rojas Ríos y la Mg. Carmen Gladys Peña Suasnabar; para la sustentación oral y pública de la tesis intitulada: "EFECTO ANALGÉSICO DEL EXTRACTO SECO ATOMIZADO DE *CROTÓN LECHLERI* (SANGRE DE DRAGÓN) COMPARADO CON EL KETOPROFENO SOBRE EL DOLOR INDUCIDO EN RATONES" presentado por el Bachiller en Medicina Veterinaria **MARIO MARTIN PAUTA GÁLVEZ**.

Acto seguido se procedió a la exposición de la tesis, con el fin de optar al Grado Académico de **Magíster en Farmacología con Mención en Farmacología Experimental**, formuladas las preguntas, éstas fueron absueltas por el graduando.

A continuación el Jurado Examinador y Calificador de tesis procedió a la calificación, la que dio como resultado el siguiente calificativo:

Dieciocho (18) MUY BUENO

Luego, el Presidente del Jurado recomienda que la Facultad proponga que se le otorgue al Bachiller en Medicina Veterinaria **MARIO MARTIN PAUTA GÁLVEZ** el Grado Académico de **Magíster en Farmacología con Mención en Farmacología Experimental**.

Siendo las 13:05 hrs. se levanta la sesión.

Se extiende el acta en Lima, a las 13:10 hrs. del 11 de octubre de 2017.

Dr. Américo Jorge Castro Luna (P.P., T.C.)  
Presidente

Dr. Jorge Luis Arroyo Acevedo (P.P., T.C.)  
Miembro - Asesor

Dr. Yovani Martin Condorhuamán Figueroa (P. Aux., T.C.)  
Miembro

Mg. Luis Alberto Rojas Ríos (P.P., T.C.)  
Miembro

Mg. Carmen Gladys Peña Suasnabar (P. Aux., T.C.)  
Miembro

Observaciones:

## **DEDICATORIA**

A Dios, por todo su inmenso amor para con nosotros, por guiarme y protegerme en este hermoso camino que se llama vida.

A mis padres Mario y Gladys, por apoyarme siempre desde pequeño a realizar mis metas, por todo su esfuerzo para que sea un gran profesional, este logro es para ustedes.

A mi familia, por todo el amor y apoyo que me han brindado no solo en la realización de esta tesis, sino en toda mi vida.

A mi enamorada Ernestina Price, por todo su amor en este tiempo juntos, gracias por tu apoyo y comprensión cuando mas lo necesitaba

## AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Jorge Luis Arroyo Acevedo, por ser mas que un maestro para mi, gracias por su amistad, su apoyo, su exigencia y principalmente sus enseñanzas, usted siempre nos decía que la tesis es el reflejo de uno, sin embargo siempre e pensado que la tesis es el reflejo de dos, del alumno y el maestro. Gracias por todo.

A todos los catedráticos de UNMSM-FBB, gracias a ustedes por enseñarme este maravilloso mundo de la farmacología y por cada conocimiento plasmado en esta tesis.

Al MV. Ramón Zaldívar Sobrado †, quien me introdujo en el maravilloso mundo de la farmacología y me enseñó que la farmacología va mucho mas allá del saber para que sirve un fármaco; la farmacología es el pilar de la medicina, sin ella no hay medicina. Descanse en paz maestro.

A mis amigos y colegas MV. Mauricio Jara y MVZ. Alberto Delgado, por sus consejos para seguir esta pasión hacia la farmacología, por su amistad y ayuda en la realización de esta tesis.

A la facultad de Ciencias Biológicas de la URP, en especial a la escuela de Ciencias Veterinarias, por brindarme sus instalaciones para la realización de esta tesis.

A mis amigos Flor de María, Gina, José, Enrique, Samy, Rodolfo, Alexander, con quienes compartí esta hermosa maestría y cree una bonita amistad. Gracias por todo su apoyo y amistad.

Al Laboratorio Fitofarma EIRL, por haberme legado el extracto hidroalcohólico seco atomizado de *Croton lechleri*

## ÍNDICE

	Pág.
<b>RESUMEN</b>	
<b>SUMMARY</b>	
<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
1.1 Situación problemática	1
1.2 Formulación del problema	2
1.3 Justificación de la investigación	3
1.3.1 Justificación teórica	3
1.3.2 Justificación práctica	4
1.4 Objetivos de la investigación	5
<b>II. MARCO TEÓRICO</b>	<b>6</b>
2.1 Marco filosófico o epistemológico de la investigación	6
2.2 Antecedentes del problema	6
2.3 Bases teóricas	8
<b>III. METODOLOGÍA</b>	<b>18</b>
3.1 Tipología de investigación	18
3.2 Diseño de investigación	18
3.3 Universo y muestra de trabajo	18
3.3.1 Universo	18
3.3.2 Muestra	18
3.4 Material y equipos	18
3.4.1 Material biológico	18
3.4.2 Material de laboratorio	19
3.4.3 Equipos	19
3.4.4 Material farmacológicos y reactivos	19

3.4.5 Preparación de los animales	20
3.5 Inducción del estímulo doloroso	20
3.5.1 Modelos experimentales	20
3.6 Determinación de la dosis letal (DL <sub>50</sub> )	22
3.7 Evaluación de efectos tóxicos mediante estudio histológico	23
3.8 Tratamiento estadístico de datos	23
3.9 Consideraciones éticas	24
<b>IV. RESULTADOS</b>	<b>25</b>
<b>V. DISCUSIÓN</b>	<b>34</b>
<b>VI. CONCLUSIONES</b>	<b>39</b>
<b>VII. RECOMENDACIONES</b>	<b>40</b>
<b>VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>41</b>
<b>IX. ANEXOS</b>	<b>46</b>



## LISTA DE TABLAS

	Pág.
1. <b>Tabla 1.</b> Diseño experimental para la inducción de dolor físico utilizando el método de “tail flick”.	21
2. <b>Tabla 2.</b> Diseño experimental para la inducción de dolor visceral mediante la administración de ácido acético.	22
3. <b>Tabla 3.</b> Diseño experimental para la determinación de DL <sub>50</sub>	23
4. <b>Tabla 4.</b> Estadística descriptiva del efecto analgésico del extracto hidroalcohólico seco atomizado de <i>Croton lechleri</i> comparado con ketoprofeno en ratones inducidos a dolor periférico.	26
5. <b>Tabla 5.</b> Efecto analgésico del extracto hidroalcohólico seco atomizado de <i>Croton lechleri</i> a 120 minutos post administración. Comparaciones múltiples.	26
6. <b>Tabla 6.</b> Efecto analgésico del extracto hidroalcohólico seco atomizado de <i>Croton lechleri</i> a 120 minutos post administración. Test de Fisher	27
7. <b>Tabla 7.</b> Efecto analgésico del extracto hidroalcohólico seco atomizado de <i>Croton lechleri</i> comparado con ketoprofeno en ratones inducidos a dolor visceral mediante ácido acético. Inhibición de contorciones abdominales. Prueba de Kruskal-Wallis	28
8. <b>Tabla 8.</b> Efecto analgésico del extracto hidroalcohólico seco atomizado de <i>Croton lechleri</i> comparado con ketoprofeno en ratones inducidos a dolor visceral mediante ácido acético. Inhibición de contorciones abdominales. Método de comparaciones pares (pair-wise).	28
9. <b>Tabla 9.</b> Efecto analgésico del extracto hidroalcohólico seco atomizado de <i>Croton lechleri</i> comparado con ketoprofeno en	

- ratones inducidos a dolor visceral mediante ácido acético. Signos clínicos en el pabellón auricular. Prueba de Kruskal-Wallis. 30
10. **Tabla 10** . Efecto analgésico del extracto hidroalcohólico seco atomizado de *Croton lechleri* comparado con ketoprofeno en ratones inducidos a dolor visceral mediante ácido acético. Signos clínicos en el pabellón auricular. Método de comparaciones pares (pair-wise). 30

## LISTA DE FIGURAS

- |  | Pág. |
|--|------|
| 1. <b>Figura 1.</b> Porcentaje de protección de las diferentes dosis del extracto de <i>Croton lechleri</i> comparados con ketoprofeno sobre dolor físico inducido en ratones en intervalos de tiempo específicos.   | 27   |
| 2. <b>Figura 2.</b> Expresiones faciales del ratón posterior a la administración de ácido acético sin el extracto de <i>Croton lechleri</i> . Pabellón auricular retraído y separados entre sí. Vibrisas erectas. Disminución del tamaño de globo ocular.  | 29   |
| 3. <b>Figura 3.</b> Expresiones faciales del ratón posterior a la administración de ácido acético con el extracto de <i>Croton lechleri</i> a 150 mg/kg. Pabellón auricular levemente separados entre sí. Vibrisas conserva posición normal. Globo ocular conserva posición normal                   | 29   |
| 4. <b>Figura 4.</b> Signos clínicos de DL <sub>50</sub> . A: Sujeto de experimentación con signos de sedación profunda, despertaba mediante estímulos fuertes. B. Mismo sujeto de experimentación posterior a la reacción de estímulos fuertes, presenta inmovilización y sedación.                  | 31   |
| 5. <b>Figura 5.</b> Corte histopatológico de estómago. La mucosa presenta formación papilar seguida de leve descamación epitelial mucosa acompañada de proliferación de células caliciformes. No se aprecia alteración en la capa muscular y serosa. Diagnóstico histopatológico gastritis catarral. | 32   |
| 6. <b>Figura 6.</b> Corte histopatológico de hígado. En el presente corte, el hígado mantiene su citoarquitectura trabecular se aprecia una leve a moderada proliferación canalicular. En algunas zonas se   |      |

aprecia leve congestión en los sinusoides. En algunas zonas se aprecia leve vacuolización de hepatocitos. Diagnóstico histopatológico leve congestión hepática y leve hepatitis focal. 33

7. **Figura 7.** Corte histopatológico de riñón. Se aprecia una leve congestión córtico medular. La zona cortical presenta leve tumefacción celular de los túbulos renales. La zona medular no presenta alteraciones de consideración. Diagnóstico histopatológico leve congestión renal. 34

## ANEXOS

	Pág.
1. <b>Anexo 1.</b> Efecto analgésico del extracto hidroalcohólico seco atomizado de <i>Croton lechleri</i> a 15 minutos post administración. Comparaciones múltiples y Test de Fisher	46
2. <b>Anexo 2.</b> Efecto analgésico del extracto hidroalcohólico seco atomizado de <i>Croton lechleri</i> a 30 minutos post administración. Comparaciones múltiples y Test de Fisher	46
3. <b>Anexo 3.</b> Efecto analgésico del extracto hidroalcohólico seco atomizado de <i>Croton lechleri</i> a 60 minutos post administración. Comparaciones múltiples y Test de Fisher	47
4. <b>Anexo 4.</b> Efecto analgésico del extracto hidroalcohólico seco atomizado de <i>Croton lechleri</i> comparado con ketoprofeno en ratones inducidos a dolor visceral mediante ácido acético. Signos clínicos en el Globo ocular. Prueba de Kruskal-Wallis y Método de comparaciones pares (pair-wise)	48
5. <b>Anexo 5.</b> Efecto analgésico del extracto hidroalcohólico seco atomizado de <i>Croton lechleri</i> comparado con ketoprofeno en ratones inducidos a dolor visceral mediante ácido acético. Signos clínicos en vibrissas. Prueba de Kruskal-Wallis y Método de comparaciones pares (pair-wise).	48
6. <b>Anexo 6.</b> Componentes reportados de la resina de <i>Croton lechleri</i>	49
7. <b>Anexo 7.</b> Mouse Grimace Scale	50

## RESUMEN

El tratamiento clínico del dolor crónico requiere búsqueda de nuevas sustancias porque las existentes inducen efectos adversos. **Objetivos.** Determinar el efecto analgésico del extracto hidroalcohólico seco atomizado de *Crotón lechleri* comparado con el ketoprofeno sobre el dolor inducido en ratones. **Materiales y Métodos.** Se utilizó 3 modelos experimentales, el método "tail flick", el método de torsiones abdominales y el procedimiento para determinar DL<sub>50</sub>. Treinta y seis ratones albinos fueron divididos en 6 grupos homogéneos: G1 con suero fisiológico 10 mL/kg, G2-G3-G4 sangre de dragón 100, 150 y 200 mg/kg respectivamente; G5 ketoprofeno 5mg/kg y G6 Morfina 2-5mg/kg. Para el último modelo experimental se empleó 2 etapas, con diferentes dosis tóxicas. Finalmente se evaluó los efectos tóxicos a nivel gastrointestinal, hepático y renal. **Tratamiento Estadístico.** Las diferencias entre los grupos fueron fijadas mediante ANOVA, Test de Fisher, Kluskal-Wallis y pair-wise; para determinar la DL<sub>50</sub> se empleó la fórmula propuesta en el modelo experimental. **Resultados.** El extracto hidroalcohólico seco atomizado de *Croton lechleri* fue significativamente superior al ketoprofeno en efecto analgésico visceral y somático con un  $p < 0.0001$ , sin superar a la morfina con un porcentaje de eficacia analgésica mayor al 50%. La DL<sub>50</sub> se determinó en 800mg/kg con leves cambios histopatológicos en sistema gastrointestinal y renal. **Conclusión.** El extracto hidroalcohólico seco atomizado de *Croton lechleri* es analgésico en dolor somático y visceral, superando al ketoprofeno y comparándose a la morfina.

**Palabras clave:** *Crotón lechleri*, sangre de dragón, dolor, analgesia

## SUMMARY

The clinical treatment of chronic pain requires the search for new substances because the existing ones induce adverse effects. **Objectives.** Determine the analgesic effect of *Crotón lechleri* atomized dried hydroalcoholic extract compared to Ketoprofen on induced pain in mice. **Materials and methods.** Three experimental models were used: the tail flick method, the writhing test and the procedure to determine LD<sub>50</sub>. Thirty-six albino mice were divided into 6 homogeneous groups: G1 with physiological serum 10 mL / kg, G2-G3-G4 100, 150 and 200 mg / kg respectively; G5 ketoprofen 5mg / kg and G6 Morphine 2-5mg / kg. For the last experimental model 2 stages were used, with different toxic doses. Finally, toxic effects were evaluated at the gastrointestinal, hepatic and renal levels. Statistical Treatment. Differences between groups were determined using ANOVA, Fisher's Test, Kluskal-Wallis and pair-wise; To determine the LD<sub>50</sub>, the formula proposed in the experimental model was used. **Results.** It was observed that the atomized dried hydroalcoholic extract of *Croton lechleri* was significantly superior to ketoprofen in visceral and somatic analgesic effect with a  $p > 0.0001$ , without exceeding morphine with a percentage of analgesic efficacy greater than 50%. The LD<sub>50</sub> was determined at 800mg / kg with mild histopathological changes in the gastrointestinal and renal systems **Conclusion.** The atomized dried hydroalcoholic extract of *Croton lechleri* is analgesic in somatic and visceral pain, better than ketoprofen and comparing to morphine.

**Key words:** *Croton lechleri*, dragon's blood, pain, analgesia

## I. INTRODUCCIÓN

### 1.1 Situación problemática

El dolor es uno de los trastornos que más afecta y preocupa a las personas, y es el síntoma acompañante que con mayor frecuencia motiva una consulta médica. La demanda de atención al dolor muestra una tendencia creciente relacionada con la oferta de servicios específicos y el desarrollo de nuevos y más eficaces tratamientos. En la literatura científica se observa un aumento en la prevalencia de dolor entre la población general en los últimos años, existiendo estudios con un seguimiento superior a 40 años, que muestran un aumento entre 2 y 4 veces en el dolor de espalda, dolor en el hombro y dolor generalizado, siendo el incremento en algunos casos estadísticamente significativo (Palanca Sánchez, 2011).

Debido a que el dolor es polivalente, dinámico y un fenómeno ambiguo, es notoriamente difícil de cuantificar. Sin embargo, incluso con estas limitaciones, no hay duda en cuanto a su alta prevalencia e incidencia, en donde el 10% de la población mundial, aproximadamente 60 millones de personas sufren dolor crónico; por países y regiones se estima una prevalencia de dolor crónico cerca al 20-25%. Centros de atención primaria en Asia, África, Europa y en las Américas han tenido pacientes con dolor persistente de 10 a 25%, la prevalencia del dolor crónico en Estados Unidos se estimó en un rango de 12 a 25%, siendo en Europa de un 20%. Aunque hay pocas estimaciones de la incidencia de dolor crónico mundial, la OMS reporta que estaría de 1 por cada 10 individuos adultos anualmente (Goldberg & McGee, 2011).



El tratamiento clínico del dolor crónico con Antiinflamatorios No Esteroides (AINEs), esteroides, antidepresivos, antiepilépticos, y/o medicamentos opioides siguen siendo insatisfactoria en la mayoría de los casos y es un reto para los médicos e investigadores que se han comprometido a buscar nuevos analgésicos con gran potencia analgésica, con nulos efectos adversos o que sean relativamente menores (Li et al., 2012).

## 1.2 Formulación del problema

¿Es el efecto analgésico del extracto hidroalcohólico seco atomizado de *Croton lechleri* (*sangre de dragón*) comparable al del ketoprofeno en ratones con inducción de dolor?

## 1.3 Justificación de la investigación

### 1.3.1 Justificación teórica.

El dolor crónico se conceptualiza como un proceso de la enfermedad por sí mismo. Afecta a personas de todo el mundo y atenta gravemente la calidad de vida de los pacientes, convirtiéndose en un problema de salud. En la práctica clínica, el dolor generalmente responde a fármacos opiáceos, AINEs. El dolor neuropático de una lesión o enfermedad del sistema nervioso, suele ser más difícil de tratar que el dolor inflamatorio y su control es a menudo refractario a los opioides y requiere dosis más grandes o más de un medicamento, predisponiendo a efectos adversos peligrosos (Li et al., 2012).

La sangre de dragón o sangre de drago es un tipo de resina roja, obtenido de varios orígenes botánicos, como *Daemonorops* (Palmae), *Dracaena* (Convallariaceae), y *Croton* (Euphorbiaceae). El nombre científico de la sangre de dragón es *Sanguis Draconis* y es empleado en tratamientos de

diarrea, tumores, heridas, úlceras estomacales, infecciones por herpes, dolor e inflamación (Choy et al., 2007). Se observó también que la sangre de dragón bloquea la transmisión del dolor al cerebro además de su efecto antiinflamatorio (Liu, Yin, Chen, & Ma, 2006).

Se han identificado varios componentes en la sangre de dragón como flavonoides, esteroides, alcaloides entre otros. La taspina (alcaloide) es el principal componente de la sangre de dragón que posee diversas propiedades benéficas como: antiinflamatoria, citotóxica y cicatrización (Gupta, Bleakley, & Gupta, 2008). La presencia de flavonoides con triterpenoides puede aumentar la actividad analgésica y antiinflamatoria al inhibir las ciclooxigenasas y lipooxigenasas (Alwashli, Alaoui, Al-Sobarry, & Cherrah, 2012). Otros estudios fitoquímicos en la sangre de dragón de la especie *Dracaena cochinchinensis* revelan la presencia de un flavonoide (cochinchinenina B) que junto a algunos esteroides, parecen ser los responsables del bloqueo de la ciclooxigenasa 2, explicando así su efecto antinociceptivo (Li et al., 2012).

Por otro lado, se ha demostrado que la sangre de dragón disminuye el dolor al evitar la liberación de glutamato e inhibir los canales de sodio resistentes a tetrodotoxina, teniendo una similitud al mecanismo de acción de los opioides y los alfa-2 adrenérgicos (Rao et al., 2007).

### **1.3.2 Justificación práctica.**

Actualmente en el Perú, el uso indiscriminado de fármacos analgésicos y de fácil acceso a la población, constituyen un factor de riesgo por la presencia de efectos adversos; debido a esto se ha incrementado la investigación y el redescubrimiento de las propiedades medicinales de la flora peruana.

De todas las plantas medicinales, el *Croton lechleri* (Sangre de dragón) es un árbol que crece en la amazonía peruana del que se obtiene una resina de color rojizo con diversas propiedades medicinales: analgesia y antinociceptiva (Jones, 2003).

Los resultados de la investigación contribuyen al uso racional o científico de la sangre de dragón como antinociceptivo y analgésico en la terapéutica cotidiana, al haberse demostrado un mecanismo similar a los opioides, alfa-2 adrenérgicos y AINEs; los hallazgos sugieren que sangre de dragón sea considerado como coadyuvante en la terapia del dolor, pudiendo traer muchos beneficios: como la disminución del consumo de fármacos analgésicos y disminución de los efectos adversos (Alwashli et al., 2012; Rao et al., 2007).

## **1.4. Objetivos de la investigación**

### **1.4.1 Objetivo general**

- Determinar el efecto analgésico del extracto hidroalcohólico seco atomizado de *Crotón lechleri* comparado con el Ketoprofeno sobre el dolor inducido en ratones.

### **1.4.2 Objetivos específicos**

- Determinar el efecto analgésico sobre el dolor periférico del extracto hidroalcohólico seco atomizado de *Crotón lechleri* en ratones inducidos a dolor físico.
- Observar el efecto analgésico sobre el dolor visceral del extracto hidroalcohólico seco atomizado de *Crotón lechleri* en ratones inducidos a dolor químico.
- Determinar la dosis letal media (DL<sub>50</sub>) del extracto hidroalcohólico seco atomizado de *Crotón lechleri*.
- Evaluar posibles efectos tóxicos del extracto hidroalcohólico seco atomizado de *Crotón lechleri* a nivel gastrointestinal y renal.

## II. MARCO TEÓRICO

### 2.1 Marco filosófico o epistemológico de la investigación.

El manejo del dolor viene desde hace miles de años, mediante el uso de la acupuntura en la cultura China, el empleo del opio en Egipto, el balance del humor con los Griegos y los Romanos que reconocieron la importancia del sistema nervioso; las primeras intervenciones fueron guiadas por los diferentes orígenes del dolor que resultaron en tratamientos como la trepanación y el exorcismo. (Gatchel et al., 2014)

Durante muchos años y probablemente inspirados en las ciencias naturales, juntamente con el paradigma predominante del positivismo, los científicos se enmarcaron en la corriente conocida como cuantitativa, afirmando que el método científico de las ciencias naturales es la única actividad válida para el conocimiento y que la ciencia busca hechos (Alvarez-Gayou, 2003)

La investigación experimental perteneciente a la corriente cuantitativa, es aquella que permite con más seguridad establecer relaciones de causa-efecto; usa grupo experimental y de control; el investigador manipula el factor supuestamente causal; usa procedimientos al azar para la selección, asignación de sujetos y tratamiento; es artificial y restrictivo (Martínez, 2011)

### 2.2 Antecedentes del problema

Rao et al., en el 2007, en su investigación “Dragon’s blood from *Croton urucurana* (Baill.) attenuates visceral nociception in mice”; con el objetivo de investigar el efecto nociceptivo visceral en ratones del extracto de *Croton urucurana* (Sangre de dragón); aplicando ciclofosfamida y capsaicina para

inducir dolor visceral. Empleando dosis de 200-400 mg/kg del extracto, como control positivo N-acetilcisteína y morfina respectivamente y finalmente fueron inhibidos por naloxona; concluyeron que la sangre de dragón puede ser una buena alternativa para tratar el dolor visceral asociado a patologías gastrointestinales y del tracto urinario, y que su posible mecanismo de acción puede ser muy similar a los opioides.

Alwashli et al., en el 2012 en su investigación "Anti-inflammatory and Analgesic effects of ethanolic extract of *Dracaena Cinnabari* Balf, as endemic plant in Yemen"; con el objetivo de demostrar el efecto del extracto etanólico de *Dracaena cinnabari* (Sangre de dragón) sobre el dolor e inflamación inducida química y físicamente en ratones y ratas; aplicando los métodos de "tail flick" mediante inmersión en agua caliente (55°C) y mediante la administración de ácido acético para causar dolor visceral. Empleando dosis de 50-150 mg/kg del extracto etanólico de *Dracaena cinnabari* y como control positivo la morfina; concluyendo que el efecto antiinflamatorio es significativo principalmente en la fase aguda de la inflamación mediante la inhibición de mediadores químicos.

Li et al., en el 2012 en su investigación "Dragon's blood inhibits chronic inflammatory and neuropathic pain responses by blocking the synthesis and release of substance P in rats"; Con el objetivo de observar el efecto de la sangre de dragón (SD) extraída de *Dracaena cochinchinensis* y su componente activo, la cochinchinenina B (CB), para inhibir la inflamación crónica y el dolor neuropático; aplicando el método de carragenina para inducir edema, dolor e inflamación en ratas Wistar siendo premedicados con extracto de SD por vía intragástrica a dosis de 0.56g/kg y 1.12g/kg diluidas en agua destilada; y mediante cultivos de neuronas del ganglio de la raíz dorsal del nervio ciático, induciendo el dolor mediante la capsaicina para evaluar el grado de liberación de la sustancia P y la concentración de iones de calcio intracelular y extracelular y siendo pre-tratados diez minutos antes con concentraciones diferentes de SD a dosis de 0.3, 3 y 30 ug/ml; y CB a dosis de 0.1 1 y 10 uM; Concluyeron que el extracto de SD disminuye el edema de patas y aumenta el umbral de dolor a dosis dependiente y que

posee efecto inhibitorio de la sustancia P y de disminución de la concentración de iones de calcio, sin embargo la CB demostró un mayor poder que la SD en la inhibición de la liberación de la sustancia P.

Choy et al., en el 2007 en su investigación "Suppression of lipopolysaccharide-induced of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 by Sanguis Draconis, a dragon's blood resin, in RAW 264.7 cells; con el objetivo de investigar que la sangre de dragón suprime el óxido nítrico y ciclooxigenasa 2 en la inflamación; mediante el cultivo de células RAW 264.7 con sangre de dragón que fueron inducidas a inflamación con lipopolisacáridos (LPS); concluyendo que la sangre de dragón no afecta la viabilidad celular hasta una dosis de 200 ug/ml; suprime la producción de óxido nítrico, prostaglandinas E2, Factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e interleucina 1-B y disminuye la expresión de óxido nítrico sintetasa y ciclooxigenasa 2 (COX-2), previniendo la inflamación y que el posible mecanismo de acción de la sangre de dragón sea mediante el bloqueo de la proteína NF- $\kappa$ B.

Pereira et al., en el 2010 en su investigación "Effects of sangre de drago in an in vitro model of cutaneous neurogenic inflammation"; con el objetivo de demostrar el efecto analgésico de la sangre de dragón en la inflamación neurogénica cutánea; mediante la reducción de la liberación de sustancia P, en neuronas del ganglio dorsal y keratinocitos de cerdos; concluyeron que el efecto analgésico es dosis dependiente y que el pre-tratamiento con sangre de dragón entre 1 y 72 horas antes de la inducción fue suficiente para inhibir la inflamación neurogénica cutánea.

Wang, Chen, Guo, & Liu, en el 2008 en su investigación "Inhibitory effect of cochinchinenin B on capsaicin-activated responses in rat dorsal root ganglion neurons; con el objetivo de investigar el efecto inhibitorio de la cochinchinenin B en el receptor de Vanilloid (VR1), mediante el uso de células entéricas con la técnica de "patch clamp" e induciendo la activación del receptor VR1 mediante capsaicina. Encontrando que la cochinchinenin B produce una inhibición reversible y no competitiva del receptor VR1 que su

sitio de unión esta a nivel extracelular, encontraron también que la inhibición del receptor no es voltaje dependiente.

Wei, Chen, Huang, Yao, & Liu, en el 2013 en su investigación “Material basis for inhibition of dragon's blood on capsaicin-induced TRPV1 receptor currents in rat dorsal root ganglion neurons; con el objetivo de demostrar el efecto analgésico de la sangre de dragón y sus componentes extraída de *Dracaena cochinchinensis* ( cochinchinenin A, cochinchinenin B y loureirin B); mediante la técnica de “patch clamp” en células completas de ganglio del asta dorsal midiendo voltaje, corriente y que fueron estimuladas con capsaicina. Concluyeron que no había diferencias entre los efectos de la sangre de dragón y la combinación de sus componentes. Observaron también que el efecto analgésico de la sangre de dragón puede deberse a la silenciamiento de la señal de dolor causada por la inhibición del receptor TRPV1 Inducido por capsaicina y a su vez podría deberse a la sinergia de sus 3 componentes.

Guo, Chen, & Liu, en el 2008 en su investigación “Material basis for inhibition of Dragon's Blood on evoked discharges of wide dynamic range neurons in spinal dorsal horn of rats; mediante el uso de un microelectrodo extracelular midieron la actividad eléctrica en neuronas de amplio rango dinámico (WDR) del asta dorsal espinal obtenidas de ratas Wistar; encontraron que el efecto analgésico de la sangre de dragón y sus componentes ( cochinchinenin A, cochinchinenin B y loureirin B) se debe a la disminución de la descarga de las neuronas WDR. A su vez observaron que sólo la combinación de cochinchinenin A, cochinchinenin B y loureirin B, tienen efecto similar a la sangre de dragón, demostrando que su efecto es sinérgico y que son los componentes básicos del efecto analgésico de la sangre de dragón.

## 2.2 Bases teóricas

El dolor, también designado nocicepción, es la sensación consciente o a nivel del sistema nervioso central de una acción física o química potencialmente dañino para el organismo. El sistema nociceptivo se extiende desde la periferia, a través del asta dorsal de la médula espinal, el tronco encefálico y el tálamo para llegar por último a la corteza cerebral donde se percibe el dolor (Otero, 2004).

Este sistema está compuesto por nociceptores que son terminaciones axonales con capacidad secretoria ante un apremio doloroso. Estos receptores son dendritas o pequeñas fibras de tipo A $\delta$  cuyos axones se encuentran en los nervios espinales, donde hacen sinapsis en la sustancia gris con neuronas nociceptivas específicas en el asta dorsal de la médula espinal. Los axones de las neuronas A $\delta$  hacen sinapsis en la lámina marginal o en la lámina V. Estas láminas poseen neuronas de rango dinámico amplio (WDR), respondiendo de forma graduada a estimulación mecánica nociva e inocua. Sus axones entran en la sustancia blanca de la porción dorsal y lateral de la médula espinal y ascienden, sin hacer sinapsis, hasta el cerebro a través del tracto espinotalámico donde los impulsos son interpretados como punzantes, dolor agudo o sensación de quemadura (Pisera, 2004).

Los nociceptores polimodales son terminaciones de fibras tipo C no-mielínicas que son activadas por estímulos térmicos, de presión o mecánicos. Las dendritas de tipo C van desde sus terminaciones sensoriales hasta la raíz dorsal, donde entran en la columna dorsal gris de la médula espinal. Los axones de estas fibras hacen sinapsis en interneuronas que simultáneamente hacen sinapsis en una amplia y dinámica neurona. Estos ascienden por la médula espinal hacia el tálamo, donde hacen sinapsis. La pesada tasa de conducción y la conexión sináptica extra, provocan que las señales provenientes de las fibras tipo C sean mas lentas que las fibras A $\delta$ , siendo esta señal mas lenta interpretada como una sensación dolorosa o pulsátil que es denominada “dolor profundo” (Pisera, 2004; Tirado, 2010)



Los nociceptores silentes son neuronas sensitivas de alto umbral ubicadas en las vísceras. Debido al alto umbral de despolarización, estas neuronas son tranquilas a menos que sean sometidas a una deformación severa. Los axones de nociceptores silentes hacen sinapsis con las mismas neuronas WDR del asta dorsal así como lo hacen las neuronas eferentes somáticas generales que van desde el tronco y el cuerpo apendicular. Los receptores silentes despolarizados estimulan neuronas comunes espinales y dan respuesta a las sensaciones de dolor persistente y poco localizado debido a la insuficiente presencia de fibras aferentes con grandes campos receptivos; se cree que la concurrencia de información nociceptiva somática y visceral en neuronas esta involucrada en los mecanismos que generan el denominado dolor referido, en donde la percepción del dolor de una víscera es desplazada hacia otra área superficial (Pisera, 2004; Tirado, 2010).

La ruta de la nocicepción que permite la percepción del dolor, se basa en un proceso neurofisiológico que consta de cuatro etapas: transducción, (estímulo doloroso es convertido en impulso eléctrico); transmisión (conducción del impulso hacia el asta dorsal para realizar sinapsis); modulación (alteración del impulso nerviosos por mecanismo inhibitorios y/o excitatorios); y la percepción, (se definen las características del estímulo doloroso en la corteza cerebral) (Salazar, 2013).

Podemos dividir al dolor en dolor fisiológico y dolor patológico. El dolor fisiológico es aquel que induce respuestas protectoras como el reflejo de retirada con el objetivo de interrumpir el estímulo nocivo hacia el cuerpo y/o tejido, es altamente localizado; mientras que el dolor patológico es aquel que al haberse sufrido un daño tisular o nervioso, y no se instauró un tratamiento analgésico e inflamatorio adecuado, produce una sensibilización periférica y central, reorganización de los elementos neuronales dentro del sistema nervioso central y una desinhibición, conllevando a un dolor espontáneo, hiperalgesia (aumento en la respuesta dolorosa ante un estímulo nocivo) y alodinia ( dolor producido por estímulos inocuos) (Muir, 2009).

La sensibilización periférica es secuela de la liberación de componentes intracelulares procedentes de células dañadas, inflamadas y hasta de la

propia fibra nerviosa (iones, prostanglandina E2, bradiquinina, ciclooxigenasa, factores de crecimiento neurotrópico y citoquinas), disminuyendo el umbral de activación de nociceptores pero a su vez activa nociceptores silentes. Por otro lado la seguida llegada de estímulos a las neuronas del asta dorsal a consecuencia de una continua activación de fibras periféricas produce lo que se denomina sensibilización central, originando zonas de hiperalgnesia en tejidos no dañados. (Tirado, 2010; Muir, 2009).

### **2.2.1 Manejo del dolor.**

Para instaurar un tratamiento es importante ponderar todas las alternativas terapéuticas y decidirse por la que mejor se adapte a la patología del paciente y al medio en el que se le implementará. Los mecanismos mediante los cuales las drogas ejercen su efecto analgésico nos permite clasificarlos en: opioides, agonistas  $\alpha$ -2 pre sinápticos, fenciclidinas, anestésicos locales, antiinflamatorios no esteroideos (AINES) y anestésicos generales (Otero, 2012).

#### **2.2.1.1 Opioides.**

Los opioides se definen como cualquier sustancia natural o sintética con actividad semejantes al opio, y mediante su interacción con los receptores opiáceos producen su principal efecto, la analgesia. Los receptores opiáceos modulan varios efectos de los opioides; se ubican en el sistema nervioso central, substancialmente en el cerebro y en el asta dorsal de la médula espinal. Se conocen 3 receptores opiáceos: mu ( $\mu$ ), kappa ( $\kappa$ ), delta ( $\delta$ ); de estos 3 receptores se conocen 3 subtipos  $\mu$ :  $\mu$ 1,  $\mu$ 2,  $\mu$ 3 (Wagner, 2002).

El receptor  $\mu$  es el receptor principal, encargado de la acción analgésica de los opioides. Sin embargo, es responsable de la mayoría de efectos adversos de los opioides, como bradicardia, bradipnea y euforia. El receptor  $\kappa$  no produce analgesia al mismo nivel que el receptor  $\mu$ , sin embargo la activación de este receptor puede antagonizar los efectos de agonistas  $\mu$ . El receptor  $\delta$  puede modificar la acción de los opioides de otros receptores (Wagner, 2002; , Borner-Weir et al., 2014).

Los opiáceos se clasifican en cuatro grupos: los agonistas puros, los agonista-antagonista, los agonistas parciales y los antagonistas. Los agonistas puros, que se unen a uno o más tipos de receptor desencadenando efectos según sea el receptor, en este grupo tenemos a la morfina, metadona, fentanilo y petidina; los agonista-antagonista, se une a uno o más tipos de receptor y desencadena efectos en uno ( $\kappa$ ), pero escasos o ninguno en el otro ( $\mu$ ), a este grupo pertenece el butorfanol; , los agonistas parciales producen efectos limitados; se unen principalmente al receptor  $\mu$ ; a este grupo pertenece la buprenorfina; los antagonistas, se unen a uno o más tipos de receptor pero no desencadenan ningún efecto, a este grupo pertenece la naloxona. Indiferentemente al receptor que se acoplen, el efecto analgésico de los opioides puede darse en varias etapas de la ruta de nocicepción. (Salazar, 2013; Lamont et al., 2011).

Los efectos adversos de los opiáceos varían según sea el fármaco que se utilice. Los efectos más frecuentes son: miosis, bradicardia, bradipnea, hipotermia, emesis y retención urinaria. Todos los opiáceos se metabolizan por vía hepática, con posterior excreción renal de los metabolitos resultantes (Sumano & Ocampo, 2006).

### **2.3.1.2 Antiinflamatorios no esteroideos.**

Los antiinflamatorios no esteroides (AINES) son fármacos que tienen acción analgésica y antiinflamatoria, en algunos casos también acción antipirética. Poseen diferentes estructuras pero el mecanismo de acción (inhibición de las enzimas ciclooxigenasas) es similar en todos. Debido a su extenso margen de acción analgésica y su poco efecto en el SNC, son ideales para tratar el dolor leve a moderado. (Budsberg, 2009; Hellyer, Robertson, & Fails, 2007).

Cuando se produce un daño tisular, se liberan fosfolípidos de membrana, los cuales por acción de la fosfolipasa A2, se transforman en ácido araquidónico, a partir del cual, mediante la acción de la lipooxigenasa (LOX) y la ciclooxigenasas (COX-1, COX-2, COX-3) se transforman en mediadores

de la inflamación como leucotrienos, prostanglandinas y tromboxanos. La COX-1 o ciclooxigenasa fisiológica interviene en la síntesis de prostanglandinas encargadas de la homeostasis celular, media los procesos gástricos y renales, e hipersensibiliza las neuronas aferentes primarias dando un efecto analgésico. La COX-2 o ciclooxigenasa patológica interviene en la síntesis de prostanglandinas encargadas de intervenir en el proceso de la inflamación y dolor (Landoni, 2004; Mathews et al., 2011).

El mecanismo de acción de los AINES se basa en la habilidad de interferir en la síntesis de eicosanoides, mediante la inhibición de la enzima ciclooxigenasa (COX) y sus isóformas, por lo cual se inhabilita la producción de prostanglandinas principalmente PGI<sub>2</sub> y PGE<sub>2</sub>, produciendo analgesia, efecto antiinflamatorio y el efecto antipirético. La analgesia se produce por la abolición de prostanglandinas que hipersensibilizaban a las vías aferentes nociceptivas. El efecto antiinflamatorio se basa en la inhibición de la vasodilatación que provoca el PGE<sub>2</sub>. El efecto antipirético se basa en el transporte del mensaje de interleucina tipo 1 (IL-1) mediante la PGE<sub>2</sub> desde el endotelio vascular al centro termorregulador (Hellyer et al., 2011, Landoni, 2004).

La clasificación de los AINES se da por su capacidad de inhibir COX-1 y COX-2; se clasifican en 4 grupos: los preferenciales COX-1, los no selectivos, los preferenciales COX-2, y los selectivos COX-2. La aspirina, el ketoprofeno, el meloxicam y el celecoxib son los principales representantes de cada grupo respectivamente. Cuanto mayor sea la selectividad por la ciclooxigenasa 2, se cree que hay un mayor margen de seguridad. (Landoni, 2004).

Los efectos adversos de mayor importancia clínica de los AINES son, probablemente, los manifestados a nivel gastrointestinal. Sin embargo, otros efectos adversos pueden observarse a nivel renal, nervioso y hepático (Sumano & Ocampo, 2006).

## **2.2.2 Marcos conceptuales.**

### **2.2.1.1 Aspectos generales de *Croton lechleri*.**

#### **2.2.1.1.1 Descripción botánica.**

El nombre científico de la sangre de drago (sangre de dragón) es *Croton lechleri* Müll. Arg. (Sin. *C. draconoides* Müll. Arg.). Especies sudamericanas estrechamente relacionadas conocidas como sangre de drago incluyen *Croton palanostigma* Klotzsch (sin. *C. benthamianus* Müll.-Arg.) y *C. erythrochilus* Müll.- Arg., ambas se encuentran en el Perú. Algunos botánicos peruanos clasifican *C. draconoides* (Müll. Arg). como sinónimo de *C. palanostigma* (Klotzschs). En el centro de Perú (Oxapampa, Pasco), otras dos especies conocidas localmente como sangre de drago son *C. perspicuosus* Croizat y la *C. rimbachii* Croizat. En Brasil, también es conocida como sangre de drago o Sangra d'Água; *Croton urucurana* Baillon se produce tanto en el sureste de Brasil y en Paraguay (Jones, 2003).

Es un árbol de copa amplia, que alcanza los 10-20 m de altura. Raíz de forma cilíndrica cónica, axomorfa, con la raíz principal más desarrollada que las secundarias, peridermis constituido por suber o corcho. La corteza externa del tallo posee abundantes lenticelas y el látex que presenta es de color rojo oscuro de varias tonalidades. Hojas simples con dos glándulas en la base, alternas, a veces opuestas de 12 - 20 cm de largo por 5- 14 cm de ancho, las hojas más tiernas de color blanco-rojizo y con abundante indumento, tomentosa en ambos lados, glabrescente y estelado. Inflorescencia terminal en racimos laxos. Fruto capsular globoso de 3 mm de largo por 4,5 mm de ancho. Semillas lisas con carúncula y endosperma oleaginoso (Ramirez, 2003).

### **2.2.1.1.2 Hábitat y distribución.**

Originario de las regiones tropicales y subtropicales de Sudamérica (localizada principalmente en el Perú), creciendo en estado silvestre en las cumbres montañosas y regiones selváticas; especialmente en bosques húmedos (Ramirez, 2003).

### **2.2.1.1.3 Ubicación en el Perú.**

Distribuido en la región amazónica, en un rango altitudinal de 705 - 1 660 msnm; en los departamentos de Amazonas, Cusco, Huánuco, Junín, San Martín, Madre de Dios y Loreto. En los valles de Oxapampa, Entaz, Cacazú y Palcazú del departamento de Pasco (Ramirez, 2003).

### **2.2.1.1.4 Ubicación taxonómica de sangre de dragón.**

Nombre Científico	:	<i>Croton lechleri</i>
Reino	:	Plantae
Phylum	:	Magnoliophyta
Clase	:	Magnoliopsida
Orden	:	Euphorbiales
Familia	:	Euphorbiaceae
Género	:	Croton
Epíteto Específico	:	lechleri
Nombre común	:	Sangre de dragón

### **2.2.1.1.5 Usos medicinales.**

Corteza: la savia extraída de la corteza (látex) se usa para el tratamiento de diarreas crónicas, leucorrea; gastritis, úlceras gastrointestinales, como cicatrizante, estimulante de defensas del organismo, bacteriostático, bactericida, fungicida, antiviral, antioxidante, anticancerígeno (hígado, estómago, útero), antirreumático, antiinflamatorio, antiofídico; es usado además en el tratamiento de influenza, tonsilitis, herpes, uta, anemias, tuberculosis, quemaduras, acné, resfriados, afecciones de amígdalas,

gingivitis, cervicitis; para mejorar la fertilidad , bajar de peso, controlar hemorragias (Ramirez, 2003).

### **2.2.3 Glosario de términos.**

**Nocicepción:** Es la percepción consciente o a nivel del sistema nervioso central de un estímulo físico o químico potencialmente dañino para el organismo (Hellyer et al., 2007).

**Dolor visceral:** Dolor que proviene de los órganos corporales internos (Hellyer et al., 2007).

**Dolor neuropático:** Resulta de un daño o enfermedad y afecta el sistema somatosensorial. Puede estar asociada con sensaciones anormales, dolor producido por estímulos normalmente no dolorosas (Hellyer et al., 2007).

**Ciclooxigenasas:** Es una enzima responsable de la formación de mediadores biológicos importantes llamados prostanoïdes, que incluye la prostaglandina, la prostaciclina, y los tromboxanos, a partir del ácido araquidónico. La inhibición farmacológica de la ciclooxigenasa alivia los síntomas de la inflamación (Hellyer et al., 2007).

**Analgesia:** Podría definirse como ausencia de percepción de dolor, a pesar de que en realidad clínica lo que normalmente se llega a conseguir es únicamente disminución en la percepción de dolor (Hellyer et al., 2007).

**Umbral de dolor:** Se define como la intensidad mínima de un estímulo (la fuerza más leve de un golpe) que despierta la sensación de dolor (Hellyer et al., 2007).

**Extracto:** Sustancia obtenida por extracción de una parte de materia prima, a menudo usando un solvente como etanol o agua. (Hañari, 2013).

### **III. METODOLOGÍA**

#### **3.1 Tipología de investigación**

Se realizó una investigación de tipo aplicada.

#### **3.2 Diseño de investigación**

Es una investigación de diseño experimental.

#### **3.3 Universo y muestra de trabajo**

##### **3.3.1 Universo.**

Ratones albinos de la cepa Balb/C-53 del Bioterio del Instituto Nacional de Salud.

##### **3.3.2 Muestra.**

36 ratones albinos post-destete con un peso promedio de  $33.54 \pm 1.29$  g, machos de la cepa Balb/C-53.

#### **3.4 Material y equipos**

##### **3.4.1 Material biológico.**

Se utilizó 36 ratones albinos machos de la cepa Balb/C-53; con peso promedio de  $33.54 \pm 1.29$  g procedentes del Instituto Nacional de Salud (INS) del local ubicado en el distrito de Chorrillos de la ciudad de Lima y



fueron acondicionados en el Bioterio de la Escuela de Ciencias Veterinarias de la Universidad Ricardo Palma, con acondicionamiento previo de 1 semana, con agua y alimento *ad libitum*, ciclo luz-día de doce 12 horas y temperatura de 20 – 22 °C.

La resina de *Croton lechleri* fue obtenida del departamento de Madre de Dios en el mes de mayo del 2016; fue procesada en el laboratorio Fitofarma E.I.R.L. de la siguiente manera: La resina fue sometida a sequedad a una temperatura menor de 40 °C; luego fue sometida a maceración en una solución hidroalcohólica y, después de ocho días, se filtró y el producto obtenido se sometió a una operación de atomización, resultando un polvo fino denominado extracto hidroalcohólico seco atomizado de *Croton lechleri*.

#### **3.4.2 Materiales de laboratorio.**

- Jeringas tuberculina descartables
- Viales de 10 ml con tapa rosca
- Agujas # 27 de 1”
- Beacker de 200 ml

#### **3.4.3 Equipos.**

- Balanza digital en gramos y miligramos (OHAUS, PA1502)
- Equipo de baño maría (MEMMERT, WB350)
- Equipo de disección
- Microscopio binocular (LEICA, DM500)

#### **3.4.4 Material farmacológico y reactivos.**

- Agua destilada
- Etanol al 96%
- Ketoprofeno 1% (Ketofen®)
- Morfina (MINSa)

- Ácido acético (QP - Merck)

### 3.4.5 Preparación de los animales.

Los animales fueron mantenidos en jaulas de crianza, con un ciclo de luz-oscuridad 12:12, a una temperatura ambiental aproximada de 21 °C. Igualmente recibieron una dieta balanceada para roedores preparada por el Departamento de Nutrición de la Universidad Nacional Agraria La Molina y agua *ad libitum*. Finalmente fueron sometidos a una semana de adaptación al ambiente del Bioterio.

### 3.5 Inducción del estímulo doloroso

Se realizó mediante 2 modelos experimentales.

#### 4.5.1 Modelos experimentales.

##### Inducción de dolor periférico mediante el método de “Tail-flick”

Se usó el método de (Ben-Bassat, Peretz, & Sulman, 1959) modificado. El procedimiento se basa en la observación del tiempo de reacción (en segundos) del reflejo de retirada de la cola en ratones por inmersión del extremo de la cola (2-3 cm) en agua caliente de 55 °C. La morfina (5 mg/kg ip), se utilizó como Gold Standard, el Ketoprofeno (5mg/kg sc) como control positivo y el extracto hidroalcohólico seco atomizado de *Croton lechleri* se administró en dosis de (100, 150 mg y 200mg/kg; ip).

El indicador de dolor fue la retirada de la cola, medida en segundos; por seguridad el tiempo máximo de retirada será de 15 segundos. El porcentaje de protección analgésica se determinó mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Protección} = \frac{\text{Tiempo de retirada experimental} - \text{Tiempo retirada basal}}{15 \text{ segundos} - \text{Tiempo retirada basal}} \times 100$$

**Tabla 1.** Diseño experimental para la inducción de dolor periférico utilizando el método de “tail flick”

	<b>Grupos</b>	<b>Descripción Tratamiento</b>	<b>Número de ratones / Grupos</b>
<b>1</b>	Control negativo	Suero fisiológico + Calor	6
<b>2</b>	Experimental 1	Extracto a 100mg/kg + Calor	6
<b>3</b>	Experimental 2	Extracto a 150 mg/kg+ Calor	6
<b>4</b>	Experimental 3	Extracto a 200 mg/kg+ Calor	6
<b>5</b>	Control Positivo	Ketoprofeno a 5mg/kg+ Calor	6
<b>6</b>	Gold Standard	Morfina a 5 mg/kg+ Calor	6

### **Inducción de dolor visceral mediante la administración de ácido acético**

Se utilizó el método de (Koster, Anderson, & Debeer, 1959) modificado. Se registró la presencia de contorciones abdominales y signos clínicos dolorosos después de la administración de ácido acético (al 1% a dosis 0.5 ml ip) durante un período de 20 min, comenzando 5 min después de la administración de ácido acético; los ratones fueron pre-tratados 30 min antes de la administración del ácido acético con el extracto hidroalcohólico seco atomizado de *Croton lechleri* (100, 150 y 200 mg/kg, ip ), con el Ketoprofeno como control positivo (5mg/kg, sc) y con la Morfina como Gold Standard (5 mg/kg ip).

El indicador de dolor fueron las contorciones abdominales y los signos clínicos de dolor mediante expresiones faciales según (Langford et al., 2010).

**Tabla 2.** Diseño experimental para la inducción de dolor visceral mediante la administración de ácido acético.

	<b>Grupos</b>	<b>Descripción Tratamiento</b>	<b>Número de ratones / Grupos</b>
<b>1</b>	Control negativo	Suero fisiológico + Acido Acético	6
<b>2</b>	Experimental 1	Extracto a 100mg/kg + Acido Acético	6
<b>3</b>	Experimental 2	Extracto a 150 mg/kg + Acido Acético	6
<b>4</b>	Experimental 3	Extracto a 200 mg/kg + Acido Acético	6
<b>5</b>	Control Positivo	Ketoprofeno a 5mg/kg + Acido Acético	6
<b>6</b>	Gold Standard	Morfina a 5mg/kg + Acido Acético	6

### 3.6 Determinación de la dosis letal 50 (DL<sub>50</sub>)

Se empleó el método de (Chinedu, Arome, & Ameh, 2013). El método se divide en 3 etapas secuenciales.

#### ***Etapa 1***

Se requirieron 4 ratones que fueron divididos en 4 grupos de un ratón cada uno. Se administró diferentes dosis del extracto hidroalcohólico seco atomizado de *Croton lechleri* y fueron observados por 1 hora posterior a la administración y luego durante 10 minutos cada 2 horas durante 24 horas. Los signos de toxicidad y mortalidad fueron anotados, si no se registrase mortalidad se pasa a la etapa 2

#### ***Etapa 2***

Se requirieron 3 ratones que fueron divididos en 3 grupos de 1 ratón cada uno, se administró diferentes dosis del extracto hidroalcohólico seco atomizado de *Croton lechleri* a diferentes animales (dosis mayores a la etapa 1) y fueron observados por 1 hora posterior a la administración y luego periódicamente durante 24 horas. Los signos de toxicidad y mortalidad fueron anotados; si no se registrase mortalidad se pasa a la etapa 3.

#### ***Etapa 3***

Se requirieron 3 ratones, que fueron divididos en 3 grupos de un ratón cada uno. Se administraron dosis altas de extracto hidroalcohólico seco atomizado de *Croton lechleri* (máximo de 5000 mg/kg) a cada uno de los ratones. Se observaron por 1 hora y posteriormente 10 minutos cada 2 horas por un período de 24 horas.

Los signos de toxicidad y mortalidad fueron anotados.

Para calcular la DL<sub>50</sub> se empleó la siguiente formula:

$$DL_{50} = \frac{[M_0 + M_1]}{2}$$

M<sub>0</sub> : Dosis más alta donde no se observó mortalidad  
M<sub>1</sub> : Dosis mínima donde se observó mortalidad

**Tabla 3.** Diseño experimental para la determinación de DL<sub>50</sub>.

	<b>Dosis del extracto hidroalcohólico seco atomizado de <i>Croton lechleri</i> (mg/kg)</b>			
<b>Etapa</b>	<b>Grupo 1</b>	<b>Grupo 2</b>	<b>Grupo 3</b>	<b>Grupo 4</b>
1	50	200	400	600
2	1000	1500	2000	
3	3000	4000	5000	

### 3.7 Evaluación de efectos tóxicos mediante estudio histológico

Se tomaron los animales fallecidos durante el diseño experimental para calcular DL<sub>50</sub>; los cuales fueron sometidos a necropsia. Durante la necropsia, se tomaron muestra de estómago, hígado y riñones según (Ruehl-Fehlert et al., 2003), para evaluar el efecto tóxico del extracto hidroalcohólico seco atomizado de *Croton lechleri* a nivel gastrointestinal y renal respectivamente.

Se empleó el método de (Bancroft & Cook, 1994) para la realización de las láminas histopatológicas, donde el tejido a observar será fijado adecuadamente en una solución buffer-neutral de formalina; se efectuó cortes con micrótopo, en un espesor de 3 a 5 micras, para luego ser coloreado con HE (hematoxilina-eosina) y revisados con microscopio óptico.

Las muestras fueron llevadas a un laboratorio de patología veterinaria, donde serán observadas y analizadas.

### 3.8 Tratamiento estadístico de datos

Para el procesamiento de la base de datos se empleó a manera general tablas estadísticas. En el primer método experimental del efecto analgésico sobre el dolor periférico mediante la inducción de dolor físico, se calculó los datos de acuerdo al tiempo en segundos en donde el ratón retiró la cola del agua caliente a los diferentes tiempos establecidos; con los datos obtenidos

se calculó valores estadísticos como media, desviación estándar, seguidamente se empleó un análisis de comparaciones múltiples, identificando diferencia entre los métodos experimentales y el control; finalmente se empleó el análisis de Fisher para determinar diferencia entre los grupos experimentales.

Para el segundo método experimental del efecto analgésico sobre el dolor visceral mediante la administración de ácido acético, se calculó los datos de acuerdo a la presencia de contorsiones abdominales y signos clínicos dolorosos que el ratón manifieste dentro de los primeros 20 minutos de inoculado el ácido acético al 1%; los datos obtenidos fueron evaluados estadísticamente obteniendo media, desviación estándar; al ser datos no paramétricos, se empleó la prueba de Kruskal-Wallis, la cual identificó diferencia entre los métodos experimentales y el control; finalmente se empleó el método de comparaciones pares, el cual determinó diferencias entre los grupos experimentales. Para determinar la DL50, se siguió el esquema planteado en la metodología.

Los análisis de Comparaciones múltiples, Test Fisher, prueba de Kruskal-Wallis y método comparaciones pares se realizaron en el programa InfoStat versión estudiantil.

### **3.9 Consideraciones éticas**

Se siguieron todas las normas éticas según la guía del Comité Institucional de Uso y Cuidado de Animales (IACUC) publicadas en el año 2002. Protocolo (C.1 y C.2) (Office of Laboratory Animal Welfare, 2002).

Todos los animales estuvieron en un ambiente bajo condiciones controladas, con agua ad-libitum y comida balanceada racionada 2 veces al día. Los animales serán inducidos al dolor por un breve período de tiempo, sin comprometer su vida; en caso de notarse sufrimiento y/o agonización se separa al animal del estudio y en caso extremo se procederá al sacrificio del mismo mediante sobredosis de anestésicos.

## IV. RESULTADOS

**Tabla 4.** Estadística descriptiva del efecto analgésico del extracto hidroalcohólico seco atomizado de *Croton lechleri* comparado con ketoprofeno sobre el dolor periférico en ratones.

Tratamientos	Media de Tiempo (segundos)							
	15'	E.E	30'	E.E	60'	E.E	120'	E.E
CN	1.8	0.41	2.25	0.37	2.14	0.38	2.72	0.58
T1	4.73	0.41	5.47	0.37	6.59	0.38	7.10	0.58
T2	4.02	0.41	6.58	0.37	8.01	0.38	8.97	0.58
T3	4.10	0.41	6.49	0.37	7.45	0.38	10.93	0.58
CP	2.26	0.41	2.55	0.37	3.88	0.38	5.28	0.38
GS	15.00	0.41	15.00	0.37	15.00	0.38	15.00	0.38

CN: Control Negativo; T1: Tratamiento 1 a 100 mg/kg; T2: Tratamiento 2 a 150 mg/kg; T3: Tratamiento 3 a 200 mg/kg; CP: Control Positivo ketoprofeno a 5 mg/kg ; GS: Gold standart morfina a 5mg/kg; E.E: Error estandar. Valores medios experimentales se incrementan a mayor dosis y mayor tiempo. Valor  $p < 0.0001$

Los test de comparaciones múltiples y el test de Fisher para los tiempos de 15, 30 y 60 minutos post administración se pueden observar en el Anexo 1-3

**Tabla 5.** Efecto analgésico del extracto hidroalcohólico seco atomizado de *Croton lechleri* a 120 minutos post administración. Determinación de diferencias de las medas entre los grupos experimentales mediante el Test de comparaciones múltiples.

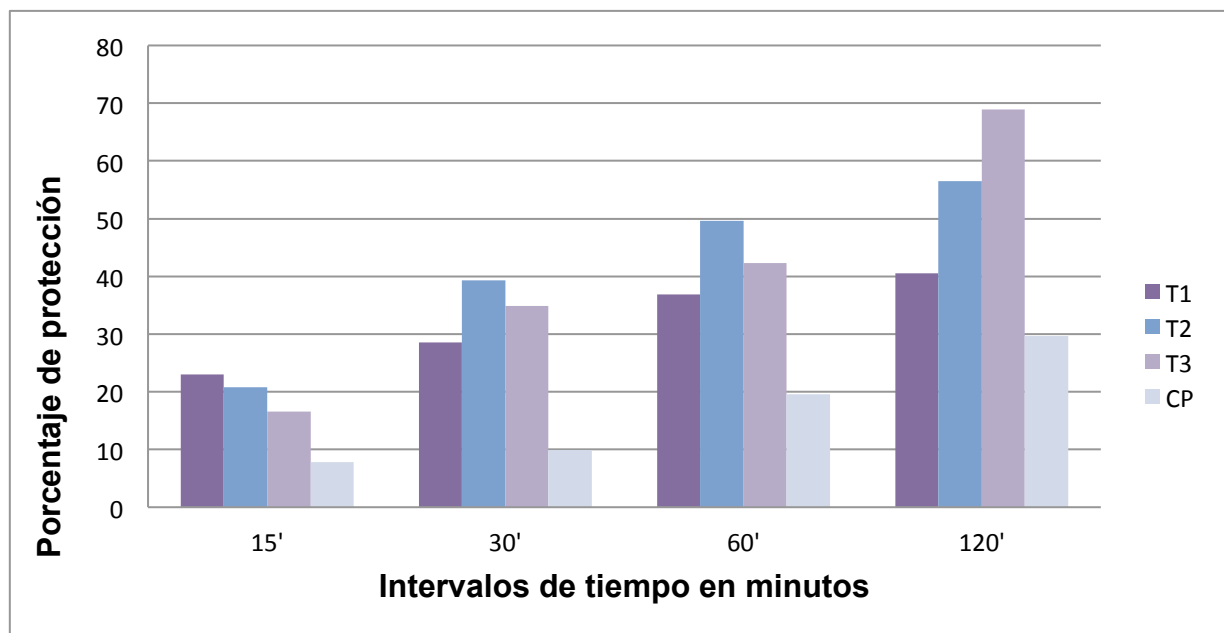
F.V	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	564.32	5	112.86	56.22	<0.0001
Tratamiento	564.32	5	112.86	56.22	<0.0001
Error	60.23	30	2.01		
Total	624.55	35			

Hay una diferencia significativa entre todos los tratamientos administrados con un  $p < 0.05$

**Tabla 6.** Efecto analgésico del extracto hidroalcohólico seco atomizado de *Croton lechleri* a 120 minutos post administración. Determinación de diferencias entre grupos experimentales mediante el Test de Fisher.

		Error:	2.0076	gl:	30		
		Tratamiento	Medias	n	E.E		
Test de Fisher	GS	15	6	0.58	A		
	T3	10.93	6	0.58	B		
	T2	8.97	6	0.58	C		
	T1	7.08	6	0.58	D		
	CP	5.28	6	0.58	E		
	CN	2.72	6	0.58	F		

CN: Control Negativo; T1: Tratamiento 1 a 100 mg/kg; T2: Tratamiento 2 a 150 mg/kg; T3: Tratamiento 3 a 200 mg/kg; CP: Control Positivo ketoprofeno a 5 mg/kg ; GS: Gold standart morfina a 5mg/kg; E.E: Error estandar. Medias con letra diferente son significativamente diferentes ( $p < 0.05$ )



T1: Método experimental a 100 mg/kg; T2: Método experimental a 150 mg/kg; T3: Método experimental a 200 mg/kg; CP: Control Positivo, ketoprofeno a 5 mg/kg. Existe una diferencia significativa entre los tratamientos con un valor de  $p < 0.0001$

**Figura 1.** Porcentaje de protección de las diferentes dosis del extracto de *Croton lechleri* comparados con ketoprofeno sobre dolor físico inducido en ratones en intervalos de tiempo específicos.



**Tabla 7.** Efecto analgésico del extracto hidroalcohólico seco atomizado de *Croton lechleri* comparado con ketoprofeno en ratones inducidos a dolor visceral mediante ácido acético. Comparación de la inhibición de contorciones abdominales mediante la prueba de Kruskal-Wallis.

	Tratamiento	N	Medias	E.E	Medianas	H	p
Prueba de Kruskal-Wallis	CN	6	2	0	2	23.35	<0.0001
	CP	6	2	0	2		
	GS	6	1	0	1		
	T1	6	1	0	1		
	T2	6	1	0	1		
	T3	6	1	0	1		

CN: Control Negativo; T1: Tratamiento 1 a 100 mg/kg; T2: Tratamiento 2 a 150 mg/kg; T3: Tratamiento 3 a 200 mg/kg; CP: Control Positivo ketoprofeno a 5 mg/kg ; GS: Gold standart morfina a 5mg/kg; E.E: Error estandar. Hay una diferencia altamente significante entre todos los tratamientos con un p valor <0.05

**Tabla 8.** Efecto analgésico del extracto hidroalcohólico seco atomizado de *Croton lechleri* comparado con ketoprofeno en ratones inducidos a dolor visceral mediante ácido acético. Comparación en la inhibición de contorciones abdominales mediante el método de comparaciones pares (pair-wise).

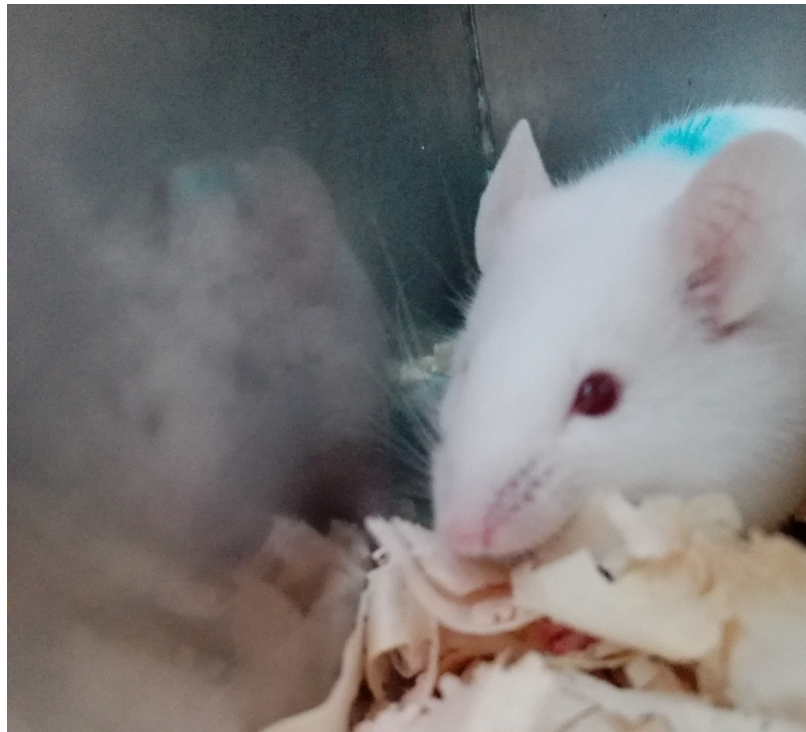
	Tratamiento	Ranks	
Método de comparaciones pares (pair-wise)	T1	12.5	A
	T2	12.5	A
	T3	12.5	A
	GS	12.5	A
	CN	30.5	B
	CP	30.5	B

CN: Control Negativo; T1: Tratamiento 1 a 100 mg/kg; T2: Tratamiento 2 a 150 mg/kg; T3: Tratamiento 3 a 200 mg/kg; CP: Control Positivo ketoprofeno a 5 mg/kg ; GS: Gold standart morfina a 5mg/kg; E.E: Error estandar. Medias con letra diferente son significativamente diferentes (p<0.05)

Los signos clínicos de dolor fueron evaluados mediante expresiones faciales, teniendo en cuenta los cambios en el globo ocular, la posición del pabellón auricular y de las vibrisas.



**Figura 2.** Expresiones faciales del ratón posterior a la administración de ácido acético sin el extracto de *Croton lechleri*. Pabellón auricular retraído y separados entre sí. Vibrisas erectas. Disminución del tamaño de globo ocular.



**Figura 3.** Expresiones faciales del ratón posterior a la administración de ácido acético con el extracto de *Croton lechleri* a 150 mg/kg. Pabellón auricular levemente separados entre sí. Vibrisas conserva posición normal. Globo ocular conserva posición normal

**Tabla 9.** Efecto analgésico del extracto hidroalcohólico seco atomizado de *Croton lechleri* comparado con ketoprofeno en ratones inducidos a dolor visceral mediante ácido acético. Comparación de signos clínicos en el pabellón auricular mediante la prueba de Kruskal-Wallis.

	Tratamiento	N	Medias	E.E	Medianas	H	p
Prueba de Kruskal-Wallis	CN	6	2.33	0.52	2	23.86	<0.0001
	CP	6	2.67	0.52	3		
	GS	6	1	0	1		
	T1	6	2.17	0.41	2		
	T2	6	1.5	0.55	1.5		
	T3	6	1	0	1		

CN: Control Negativo; T1: Tratamiento 1 a 100 mg/kg; T2: Tratamiento 2 a 150 mg/kg; T3: Tratamiento 3 a 200 mg/kg; CP: Control Positivo ketoprofeno a 5 mg/kg ; GS: Gold standart morfina a 5mg/kg; E.E: Error estandar. Hay una diferencia altamente significante entre todos los tratamientos con un p valor <0.05

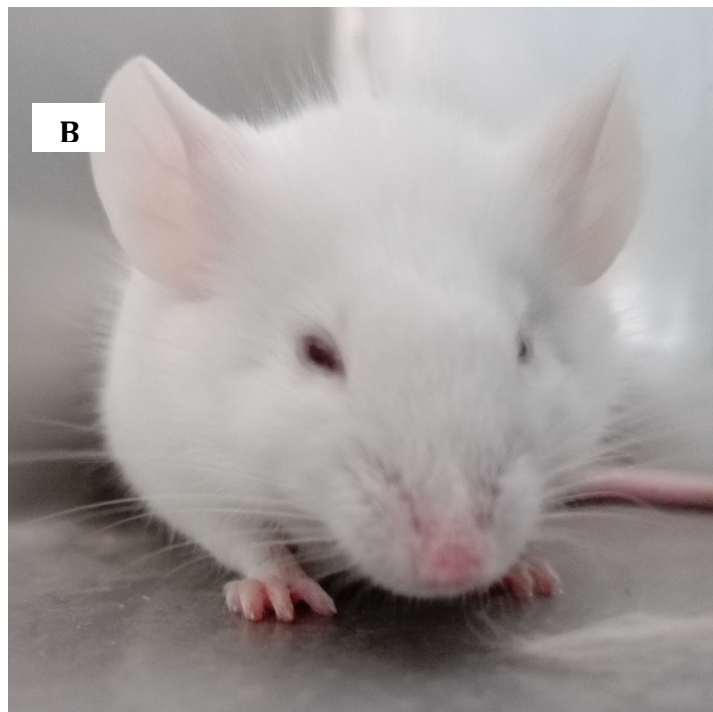
**Tabla 10.** Efecto analgésico del extracto hidroalcohólico seco atomizado de *Croton lechleri* comparado con ketoprofeno en ratones inducidos a dolor visceral mediante ácido acético. Comparación de signos clínicos en el pabellón auricular mediante el método de comparaciones pares (pair-wise).

	Tratamiento	Ranks			
Método de comparaciones pares (pair-wise)	T3	8	A		
	GS	8	A		
	T2	15.25	A	B	
	T1	24.25		B	C
	CN	26		B	C
	CP	29.5			C

CN: Control Negativo; T1: Tratamiento 1 a 100 mg/kg; T2: Tratamiento 2 a 150 mg/kg; T3: Tratamiento 3 a 200 mg/kg; CP: Control Positivo ketoprofeno a 5 mg/kg ; GS: Gold standart morfina a 5mg/kg; E.E: Error estandar. Medias con letra diferente son significativamente diferentes (p<0.05)

Las pruebas estadísticas de los signos clínicos del globo ocular y la posición de las vibrisas, se pueden visualizar en lo Anexos 4-5

Los ratones sometidos a la prueba de DL<sub>50</sub> en la etapa 1 no manifestaron mortalidad hasta una dosis de 600 mg/kg, sin embargo se observó mortalidad a dosis de 1000 mg/kg correspondiente a la etapa 2 del método experimental. El sujeto de experimentación fallecido, presentó signos clínicos de sedación excesiva, hipotermia, hipotensión, bradicardia y disnea (ver figura 4 A y B)

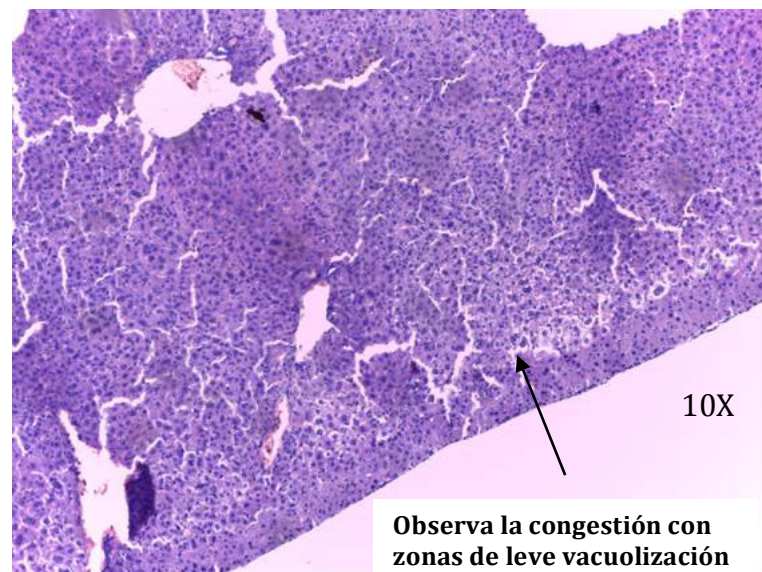


**Figura 4.** Signos clínicos de DL<sub>50</sub>. **A:** Sujeto de experimentación con signos de sedación profunda, despertaba mediante estímulos fuertes. **B.** Mismo sujeto de experimentación posterior a la reacción de estímulos fuertes, presenta inmovilización y sedación.

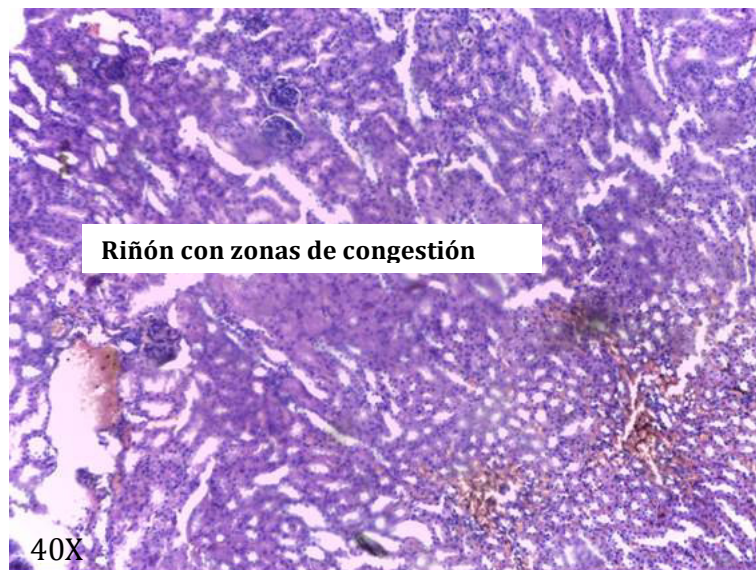
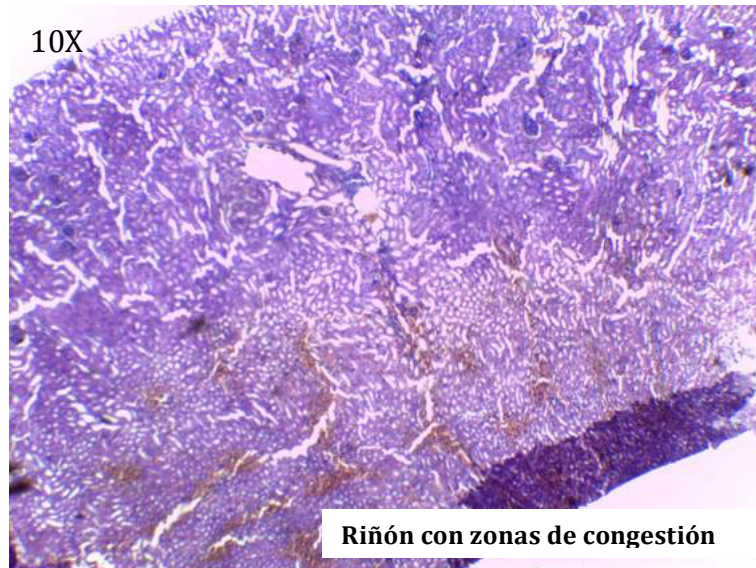
Finalmente mediante la fórmula propuesta, se obtuvo que la DL<sub>50</sub> fue de 800 mg/kg por vía intraperitoneal. Se enviaron muestras a histopatología de estómago, hígado y riñón.



**Figura 5.** Corte histopatológico de estómago. La mucosa presenta formación papilar seguida de leve descamación epitelial mucosa acompañada de proliferación de células caliciformes. No se aprecia alteración en la capa muscular y serosa. Diagnóstico histopatológico gastritis catarral.



**Figura 6.** Corte histopatológico de hígado. En el presente corte, el hígado mantiene su citoarquitectura trabecular se aprecia una leve a moderada proliferación canalicular. En algunas zonas se aprecia leve congestión en los sinusoides. En algunas zonas se aprecia leve vacuolización de hepatocitos. Diagnóstico histopatológico leve congestión hepática y leve hepatitis focal



**Figura 7.** Corte histopatológico de riñón. Se aprecia una leve congestión córtico medular. La zona cortical presenta leve tumefacción celular de los túbulos renales. La zona medular no presenta alteraciones de consideración. Diagnóstico histopatológico leve congestión renal.

## V. DISCUSIÓN

Globalmente, los AINEs son los compuestos medicamentosos más empleados para la terapéutica del dolor, edema, inflamación, osteoartritis, artritis reumatoide y desórdenes músculo-esqueléticos. Sin embargo, estos medicamentos ocasionan severos efectos adversos en la mucosa gástrica, siendo el más común la úlcera gastroduodenal (Cordeiro et al., 2016). La sangre de dragón es una resina roja extraída de diferentes familias botánicas empleada en la medicina tradicional para el tratamiento de diversas patologías por sus efectos antiulcerosos, antiinflamatorios, analgésicos, antirreumáticos, anticancerígenos y antibacteriano. (Gupta et al., 2008).

Numerosos estudios, han demostrado la presencia de cuantiosos metabolitos secundarios que conforman la resina de *Croton lechleri*, dentro de los cuales, los triterpenoides son los más abundantes, podemos encontrar también aceites volátiles, alcaloides como la taspina, diterpenoides, taninos, flavonoides entre otros. (ver Anexo 6) (Gupta et al., 2008; Salatino, Salatino, & Negri, 2007)

Los alcaloides poseen un mecanismo de acción que está determinado por 2 propiedades: la habilidad para pasar la barrera hemato-encefalica y ejercer depresión (como la morfina o codeína) o estimulación (como la cafeína y la cocaína) en el sistema nervioso central; y la habilidad de interactuar con varios receptores de neurotransmisores. Así mismo, los flavonoides poseen un mecanismo de acción que evita la formación de ciclooxygenasas y lipooxygenasas (Bone & Mills, 2013). Dichos mecanismo de acción pueden



ser el principal conjunto por el cual la sangre de dragón posee efectos analgésicos (Alwashli et al., 2012; Rao et al., 2007).

El movimiento de la cola “tail flick” es un reflejo espinal que persiste después de la sección o bloqueo de las partes superiores de la médula espinal. Sin embargo, es posible que el movimiento de la cola no sea un reflejo puramente espinal sino que sea más complicado e implique estructuras neurales superiores (Dalbo et al., 2005). Mediante la prueba analgésica del “tail flick” en agua caliente a 55 °C, se evidenció efecto analgésico significativo en ratones medicados con diferentes dosis del extracto hidroalcohólico seco atomizado de *Croton lechleri*, mostrando una mayor emanación de analgesia al aumentar la dosis experimental y al incrementarse el tiempo post-administración (ver Tabla 4, 5 y 6) (ver Anexos 1-3). Conjuntamente se obtuvo el porcentaje de protección analgésica resultando en un amplio margen de diferencia en todas las dosis experimentales empleadas con respecto al ketoprofeno (ver Figura 1).

Los resultados conseguidos de la prueba de “tail flick” concuerdan con los expuestos por (Dalbo et al., 2005), quien empleó una sub-fracción rica en proantocianidinas de la fracción soluble de etil acetato extraída del extracto crudo de *Croton celtidifolius*, dicha sub-fracción fue administrada por vía intraperitoneal a dosis de 100 y 300 mg/kg, produciendo un efecto dosis dependiente y aumentado significativamente la latencia en el “tail flick” test. Simultáneamente los autores evidenciaron el porcentaje de protección de dicha sub-fracción, obteniendo porcentajes superiores al 50%, similares a los obtenidos en nuestro experimento.

Alwashli et al., en el 2012 emplearon un extracto etanólico de sangre de dragón obtenida de *Dracaena cinnabri Balf*, y mediante la prueba de “tail flick” adquirieron resultados semejantes a los nuestros, teniendo como latencia máxima de las diferentes dosis experimentales 6 segundos; la diferencia podría atribuirse a la vía de administración usada por los autores (vía oral) y al empleo de una familia botánica diferente, mientras que en

nuestra investigación se realizó por vía intraperitoneal teniendo como latencia máxima 10 segundos (ver tabla 4)

Nuestros resultados demostraron un aumento en la latencia de la retirada de la cola, indicando un aumento del umbral nociceptivo. Desde el punto de vista farmacológico, la prueba de “tail flick” es eficaz para revelar actividad analgésica por mecanismos de opioides (Dalbo et al., 2005).

El método de contorsiones abdominales por la administración intraperitoneal de alguna sustancia irritante, provoca una conducta estereotipada en el ratón, que es caracterizada por contracciones abdominales, reducción de actividad motora, incoordinación motora etc. Este método tiene la ventaja de permitir que se obtengan pruebas de efectos producidos por analgésicos débiles. Por otro lado, carecen de especificidad. De hecho, estas pruebas funcionan no sólo para todos los analgésicos mayores y menores, sino también para muchas otras sustancias, incluyendo algunas que no tienen acción analgésica, por ejemplo, bloqueadores adrenérgicos, antihistamínicos, relajantes musculares, inhibidores de la monoaminooxidasa y neurolépticos (Le Bars, Gozariu, & Cadden, 2001).

En el reciente estudio se empleó el método de contorsiones abdominales mediante la administración de ácido acético, se observó que con todas las dosis experimentales no hubo contorsiones abdominales, sin embargo, el uso del ketoprofeno no evidenció una disminución significativa de las contorsiones (ver Tabla 6 y 7). Nuestro resultado es comparable al que obtuvo (Lopes Pereira Peres et al., 1998) con el extracto crudo de *Croton urucurana Baillon*, donde se evidenció una inhibición del  $97\% \pm 3$  de las contracciones abdominales con una dosis media de 20 mg/kg, a su vez los autores investigaron si el efecto analgésico del *Croton urucurana Baillon*, era mediante la acción de los fitoesteroles, reflejándose que la acción de estos sólo sería una parte del mecanismo de acción analgésica de la sangre de dragón.

En otra disertación, se empleó el extracto etanólico de *Croton celtidifolius Baill* para determinar el efecto antinociceptivo de dicha planta, mediante la prueba de contorsiones abdominales por ácido acético, los resultados obtenidos fueron que las dosis experimentales empleadas por vía oral (3, 10, 30, 100 y 300 mg/kg) mostraron mayor efecto analgésico a mayor dosis empleada, llegando a un máximo de 76% de inhibición de las contorsiones abdominales con respecto al ácido acetil salicílico con 67%. Dicho resultados difieren ligeramente de los nuestros, posiblemente debido a la vida de administración y a la especie de la planta empleada (Nardi, DalBó, Monache, Pizzolatti, & Ribeiro-do-Valle, 2006).

A pesar de la evidencia de que los mamíferos no humanos, incluidos los roedores, exhiben expresiones faciales de otros estados emocionales, no ha habido estudio de las expresiones faciales del dolor en ninguna especie no humana. Teniendo en cuenta la gran y continua dependencia del campo del dolor sobre los modelos de roedores y la escasez de medidas utilizables del dolor espontáneo en animales, la capacidad de detectar con fiabilidad y precisión el dolor en tiempo real usando las expresiones faciales confieren una poderosa herramienta científica, además de tener beneficios obvios para la medicina veterinaria (Langford et al., 2010).

En el presente estudio, se evidenció el efecto analgésico del extracto hidroalcohólico seco atomizado de *Croton lechleri* comparado al ketoprofeno sobre el dolor visceral inducido por la administración de ácido acético, utilizando la escala de expresiones faciales de dolor en el ratón ( ver Anexo 7). Los hallazgos muestran que las diferentes dosis experimentales del extracto hidroalcohólico seco atomizado de *Croton lechleri*, disminuyen las expresiones faciales de dolor (ver Figura 2 y 3); las dosis empleadas de 150 y 200 mg/kg produjeron efectos analgésicos similares a los de la morfina; el ketoprofeno no atenuó los signos clínicos de dolor (ver Tabla 8 y 9) (ver Anexos 4-5)

Matsumiya et al., en el 2012 emplearon la escala de expresiones faciales de dolor en ratones en el dolor postoperatorio a una laparotomía, utilizando

buprenorfina (0.001, 0.01, 0.05, and 0.1 mg/kg), ketoprofeno (1, 5, 10, 15, 20 mg/kg), carprofeno (5, 10, 15, 20, 25), polietilenglicol y acetaminofén (100, 300 y 450 mg/kg). Se evidenció que solo la buprenorfina disminuyó los signos faciales de dolor, mientras que en el caso de los otros fármacos empleados se necesitó mayores dosis a las terapéuticas (mayor a 5 mg/kg en el caso del ketoprofeno y carprofeno) para la inhibición del dolor. Estos datos son similares a los nuestros donde el ketoprofeno a una dosis de 5 mg/kg no produjo modificación alguna en los signos clínicos faciales del dolor.

Los hallazgos de la dosis letal, evidenció una  $DL_{50}$  de 800 mg/kg por vía intraperitoneal, difiriendo con el estudio de (Lopes, Félix, Schons, & Nobre, 2013) donde encontraron que la  $DL_{50}$  del extracto de *Croton lechleri* fue de 356 mg/kg por vía intraperitoneal y de 500 mg/kg por vía oral. La divergencia puede atribuirse al tipo de extracto utilizado.

No existen antecedentes de estudios histopatológicos del test de toxicidad aguda del extracto hidroalcohólico seco atomizado de *Croton lechleri* a nivel gástrico, hepático y renal. Sin embargo según (Repetto & Repetto, 2009) la toxicidad del extracto hidroalcohólico seco atomizado de *Croton lechleri* sería ligera.

## VI. CONCLUSIONES

- El extracto hidroalcohólico seco atomizado de *Croton lechleri* presentó efecto analgésico sobre el dolor somático ejerciendo mayor efecto analgésico que el ketoprofeno
- El extracto posee efecto analgésico sobre el dolor visceral, superando al ketoprofeno y comparándose al de la morfina.
- La dosis letal media (DL<sub>50</sub>) en ratones que recibieron por vía intraperitoneal el extracto se encuentra sobre los 800 mg/kg.
- Histopatológicamente se demostró que el extracto posee leves efectos adversos sobre la mucosa gástrica, el tejido hepático y el tejido renal.

## VII. RECOMENDACIONES

- Profundizar la investigación del extracto de *Croton lechleri* y aislar los posibles metabolitos secundarios responsables del efecto analgésico.
- Ampliar los estudios de toxicidad crónica y genotoxicidad.

## VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Alvarez-Gayou, J. (2003). *Cómo hacer investigación Cualitativa. Fundamentos Y Metodología*, (pp. 1 – 11). Mexico: Colección Paidós Educador.
2. Alwashli, A., Alaoui, K., Al-Sobarry, M., & Cherrah, Y. (2012). Anti-inflammatory and Analgesic effects of ethanolic extract of *Dracaena Cinnabri* Balf ,as endemic plant in Yemen. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 3(2), 96–106.
3. Bancroft, J. D., & Cook, H. C. (1994). *Manual of histological techniques and their diagnostic application*. Churchill Livingstone.
4. Ben-Bassat, J., Peretz, E., & Sulman, F. G. (1959). Analgesimetry and ranking of analgesic drugs by the receptacle method. *Archives Internationales de Pharmacodynamie et de Thérapie*, 122, 434–47.
5. Borer-Weir, K., Clarke, K., Trim, C., & Hall, L. (2014). Analgesia. En KW Clarke, CM Trim y LW Hall (Eds.), *Veterinary Anaesthesia* (pp 101-133). London, UK: Saunders
6. Bone, K., & Mills, S. (2013). Principles of herbal pharmacology En *Principles and practice of phytotherapy: modern herbal medicine*. (pp. 17 - 82). Elsevier Health Sciences. <http://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-443-06992-5.00002-5>.
7. Budsberg, S. (2009). Nonsteroidal Antiinflammatory Drugs. En: J. Gaynor, W. Muir, (Eds.), *Handbook of Veterinary Pain Management*. (pp. 183 - 209), Missouri: Elsevier.
8. Chinedu, E., Arome, D., & Ameh, F. (2013). A new method for determining acute toxicity in animal models. *Toxicology International*, 20(3), 224–6. <http://doi.org/10.4103/0971-6580.121674>.
9. Choy, C., Hu, C., Chiu, W., Lam, C., Ting, Y., Tsai, S., & Wang, T. (2007). Suppression of lipopolysaccharide-induced of inducible nitric

- oxide synthase and cyclooxygenase-2 by Sanguis Draconis, a dragon's blood resin, in RAW 264.7 cells. *Journal of Ethnopharmacology*, 115(3), 455–462. <http://doi.org/10.1016/j.jep.2007.10.012>
10. Cordeiro, K. W., Felipe, J. L., Malange, K. F., Do Prado, P. R., De Oliveira Figueiredo, P., Garcez, F., De Cássia, K., Garcez, W., Toffoli-Kadri, M. (2016). Anti-inflammatory and antinociceptive activities of *Croton urucurana* Baillon bark. *Journal of Ethnopharmacology*, 183, 128–135.
  11. Dalbo, S., Jurgensen, S., Horst, H., Ruzza, A., Soethe, D., Santos, A., Pizzolatti, M., Ribeiro-do-Valle, R. (2005). Antinociceptive effect of proanthocyanidins from *Croton celtidifolius* bark. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 57(6), 765–771. DOI 10.1211/0022357056091
  12. Gatchel, R. J., McGeary, D. D., McGeary, C. A., & Lippe, B. (2014). Interdisciplinary chronic pain management: past, present, and future. *American Psychologist*, 69(2), 119 - 130. DOI: 10.1037/a0035514
  13. Goldberg, D., & McGee, S. (2011). Pain as a global public health priority. *BioMedCentral public health*, 11(1), 770.
  14. Guo, M., Chen, S., & Liu, X. (2008). Material basis for inhibition of Dragon's Blood on evoked discharges of wide dynamic range neurons in spinal dorsal horn of rats. *Science in China, Series C: Life Sciences*, 51(11), 1025–1038.
  15. Gupta, D., Bleakley, B., & Gupta, R. (2008). Dragon ' s blood : Botany , chemistry and therapeutic uses. *Journal of Ethnopharmacology*, 115, 361–380. doi:10.1016/j.jep.2007.10.018
  16. Hañari, R. (2013). Efecto protector del extracto hidroalcohólico atomizado de maíz morado ( *zea mays* L .) sobre lesiones hepáticas inducidas en ratas. Tesis de Maestría en Farmacología con mención en Farmacología Experimental, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima.
  17. Hellyer, P., Robertson, S., & Fails, A. (2007). Pain and its management. En W. J. Tranquilli; J. C. Thurmon; K. A. Grimm (Eds.), *Lumb & Jones' Veterinary anesthesia and analgesia* (pp. 31–57). Oxford, UK: Blackwell Publishing.



18. Jones, K. (2003). Review of sangre de drago (Croton lechleri)--a South American tree sap in the treatment of diarrhea, inflammation, insect bites, viral infections, and wounds: traditional uses to clinical research. *Journal of Alternative and Complementary Medicine*, 9(6), 877–896.
19. Koster, R., Anderson, M., & Debeer, E. J. (1959). Acetic acid for analgesic screening. *Federation Proceedings*, 18, 412–430.
20. Lamont, L., & Mathews, K. (2007). Opioids, nonsteroidal anti-inflammatories, and analgesic adjuvants. En W. J. Tranquilli; J. C. Thurmon; K. A. Grimm (Eds.), *Lumb & Jones' Veterinary anesthesia and analgesia* (pp. 241 - 271). Oxford, UK: Blackwell Publishing.
21. Landoni, M. (2004). Antiinflamatorios No Esteroides. En: P. Otero, (Eds.), *Dolor: Evaluación y Tratamiento en Pequeños Animales* (pp.109 - 113). Buenos Aires: Inter-Medica.
22. Langford, D., Bailey, A., Chanda, M., Clarke, S., Drummond, T., Echols, S., Glick, S., Ingrao, J., Klassen-Ross, T., Lacroix-Fralish, M., Matsumiya, L., Sorge, R., Sotocinal, S., Tabaka, J., Wong, D., van den Maagdenberg, A., Ferrari, M., Craig, K., Mogil, J. (2010). Coding of facial expressions of pain in the laboratory mouse. *Nature Methods*, 7(6), 447–449. doi:10.1038/nmeth.1455
23. Le Bars, D., Gozariu, M., & Cadden, S. (2001). Animal models of nociception. *Pharmacological Reviews*, 53(4), 597–652.
24. Li, Y.-S., Wang, J.-X., Jia, M.-M., Liu, M., Li, X.-J., & Tang, H.-B. (2012). Dragon's blood inhibits chronic inflammatory and neuropathic pain responses by blocking the synthesis and release of substance P in rats. *Journal of Pharmacological Sciences*, 118(1), 43–54. <http://doi.org/10.1254/jphs.11160FP>
25. Liu, X., Yin, S., Chen, S., & Ma, Q. (2006). Loureirin B: an effective component in dragon's Blood modulating sodium currents in TG neurons. *Conference Proceedings IEEE Engineering in Medicine and Biology Society*. 5:4962–5. DOI: [10.1109/IEMBS.2005.1615588](https://doi.org/10.1109/IEMBS.2005.1615588)
26. Lopes, T., Félix, S., Schons, S. de V., & Nobre, M. de O. (2013). Dragon's blood (Croton lechleri Mull., Arg.): an update on the chemical composition and medical applications of this natural plant extract. A

- review. *Revista Brasileira de Higiene E Sanidade Animal*, 7(2), 167-191. <http://dx.doi.org/10.5935/1981-2965.20130016>
27. Lopes Pereira Peres, M., Delle Monache, F., Pizzolatti, M., Santos, A. R., Beirith, A., Calixto, J., & Yunes, R. (1998). Analgesic compounds of *Croton urucurana* Baillon. Pharmaco-chemical criteria used in their isolation. *Phytotherapy Research*, 12(3), 209–211.
28. Martínez, J. (2011). Métodos de Investigación Cualitativa. *Revista de Investigación Silogismo*, 1(8), 2–43.
29. Mathews, K. A., Pettifer, G., Foster, R., & McDonell, W. (2001). Safety and efficacy of preoperative administration of meloxicam, compared with that of ketoprofen and butorphanol in dogs undergoing abdominal surgery. *American journal of veterinary research*, 62(6), 882-888. <https://doi.org/10.2460/ajvr.2001.62.882>
30. Matsumiya, L., Sorge, R., Sotocinal, S., Tabaka, J., Wieskopf, J., Zaloum, A., King, O., Mogil, J. (2012). Using the Mouse Grimace Scale to reevaluate the efficacy of postoperative analgesics in laboratory mice. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, 51(1), 42–9.
31. Muir, W. (2009). Physiology and Pathophysiology of Pain. En J. Gaynor, W. Muir (Eds.), *Handbook of Veterinary Pain Management* (pp. 13-41). Missouri: Elsevier.
32. Nardi, G., DalBó, S., Monache, F., Pizzolatti, M., & Ribeiro-do-Valle, R. (2006). Antinociceptive effect of *Croton celtidifolius* Baill (Euphorbiaceae). *Journal of Ethnopharmacology*, 107(1), 73–78. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2006.02.012>
33. Office of Laboratory Animal Welfare. (2002). En M. Pitts, K. Bayne, L. Anderson, D. Bernhardt, M. Greene, H. Klemfuss, G. Oki, R. Rozmiarek, P. Theran, R. Van Sluyters (Eds.) *Institutional Animal Care and Use Committee Guidebook* ( pp. 109 - 114). Maryland: ARENA
34. Otero, P. (2004). El manejo del dolor y la medicina veterinaria. En: P. Otero, (Eds.), *Dolor: Evaluación y Tratamiento en Pequeños Animales* (pp.1 - 4). Buenos Aires: Inter-Medica.
35. Otero, P. (2012). Protocolos anestésicos y manejo del dolor en

- pequeños animales: reporte de casos. Buenos Aires: Inter-Médica.
36. Palanca Sánchez I (dir.), Puig Riera de Conías MM (coord. cient.), Elola Somoza J (dir.), Bernal Sobrino JL (comit. redac.), Paniagua Caparrós JL (comit. redac.). (2011). Grupo de Expertos. Unidad de tratamiento del dolor: estándares y recomendaciones. Madrid: Ministerio de Sanidad, Política Social e Igualdad
37. Pereira, U., Garcia-Le Gal, C., Le Gal, G., Boulais, N., Lebonvallet, N., Dorange, G., Lefeuvre, L., Gougerot, A., Misery, L. (2010). Effects of sangre de drago in an in vitro model of cutaneous neurogenic inflammation. *Experimental Dermatology*, 19(9), 796–799. DOI: 10.1111/j.1600-0625.2010.01090.x
38. Pisera, D. (2004). Fisiología del dolor. En: P. Otero, (Eds.), *Dolor: Evaluación y Tratamiento en Pequeños Animales* (pp. 29 - 71). Buenos Aires: Inter-Médica.
39. Ramirez, G. (2003). Sangre de drago ( *Croton lechleri* Muell . Arg ). *Natura Medicatrix*, 21(4), 213–217.
40. Rao, V., Gurgel, L., Lima-Júnior, R., Martins, D., Cechinel-Filho, V., & Santos, F. (2007). Dragon's blood from *Croton urucurana* (Baill.) attenuates visceral nociception in mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 113(2), 357–360. doi:10.1016/j.jep.2007.06.009
41. Repetto, M., & Repetto, G. (2009). Conceptos y Definiciones: Toxicología. Toxicidad. En: M. Repetto, G. Repetto (Eds.), *Toxicología Fundamental* (pp. 34 - 40), Madrid: Diaz de Santos
42. Ruehl-Fehlert, C., Kittel, B., Morawietz, G., Deslex, P., Keenan, C., Mahrt, C., Nolte, T., Robinson, M., Stuart, B., Deschl, U. (2003). Revised guides for organ sampling and trimming in rats and mice. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 55(2-3), 91-106. <https://doi.org/10.1078/0940-2993-00311>
43. Salatino, A., Salatino, M., & Negri, G. (2007). Traditional uses, chemistry and pharmacology of *Croton* species (Euphorbiaceae). *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 18(1), 11–33. <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-50532007000100002>

44. Salazar, V. (2013). Analgesia. En E. Rioja, V. Salazar, M. Martínez y F. Martínez, (Eds.), *Manual de anestesia y analgesia de pequeños animales* (pp.69 - 84), Zaragoza: Servet.
45. Sumano, H; Ocampo, L. (2006). En *Farmacología Veterinaria* (pp. 669 – 804), Mexico: McGraw-Hill Interamericana.
46. Tirado, Ó. C. (2010). *Fármacos y técnicas alternativos para la anestesia y analgesia espinal dirigida a la cirugía del tercio posterior en equinos* (Tesis doctoral). Universidad de León.
47. Wagner, A. E. (2002). Opioids. En J. Gaynor, W. Muir, (Eds.), *Handbook of Veterinary Pain Management* (pp. 164-184), Missouri: Elsevier.
48. Wang, S., Chen, S., Guo, M., & Liu, X.-M. (2008). Inhibitory effect of cochininenin B on capsaicin-activated responses in rat dorsal root ganglion neurons. *Brain Research*, 1201, 34–40. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2007.12.068>
49. Wei, L., Chen, S., Huang, X., Yao, J., & Liu, X. (2013). Material basis for inhibition of dragon's blood on capsaicin-induced TRPV1 receptor currents in rat dorsal root ganglion neurons. *European Journal of Pharmacology*, 702(1–3), 275–284. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2013.01.052>

## IX. ANEXOS

### Anexo 1

Efecto analgésico del extracto hidroalcohólico seco atomizado de *Croton lechleri* a 15 minutos post administración. Comparaciones múltiples y Test de Fisher

F.V	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	722.46	5	144.49	141.21	<0.0001
Tratamiento	722.46	5	144.49	141.21	<0.0001
Error	30.7	30	1.02		
Total	753.16	35			

Hay una diferencia significativa entre todos los tratamientos administrados con un  $p < 0.05$

	Error: Tratamiento	1.0232 Medias	gl: n	30 E.E	
Test de Fisher	GS	15	6	0.41	A
	T3	4.1	6	0.41	B
	T2	4.02	6	0.41	B
	T1	3.9	6	0.41	B
	CP	2.26	6	0.41	C
	CN	1.82	6	0.41	C

CN: Control Negativo; T1: Tratamiento 1 a 100 mg/kg; T2: Tratamiento 2 a 150 mg/kg; T3: Tratamiento 3 a 200 mg/kg; CP: Control Positivo ketoprofeno a 5 mg/kg ; GS: Gold standart morfina a 5mg/kg; E.E: Error estandar. Medias con letra diferente son significativamente diferentes ( $p < 0.05$ )

### Anexo 2

Efecto analgésico del extracto hidroalcohólico seco atomizado de *Croton lechleri* a 30 minutos post administración. Comparaciones múltiples y Test de Fisher

F.V	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	659.28	5	131.86	160.3	<0.0001
Tratamiento	659.28	5	131.86	160.3	<0.0001
Error	24.68	30	0.82		
Total	683.95	35			

Hay una diferencia significativa entre todos los tratamientos administrados con un  $p < 0.05$

Error:		0.8225	gl:	30		
Tratamiento		Medias	n	E.E		
Test de Fisher	GS	15	6	0.37	A	
	T2	6.58	6	0.37		B
	T3	6.49	6	0.37		B
	T1	4.38	6	0.37		C
	CP	2.55	6	0.37		D
	CN	2.25	6	0.37		D

CN: Control Negativo; T1: Tratamiento 1 a 100 mg/kg; T2: Tratamiento 2 a 150 mg/kg; T3: Tratamiento 3 a 200 mg/kg; CP: Control Positivo ketoprofeno a 5 mg/kg ; GS: Gold standart morfina a 5mg/kg; E.E: Error estandar. Medias con letra diferente son significativamente diferentes ( $p < 0.05$ )

### Anexo 3

Efecto analgésico del extracto hidroalcohólico seco atomizado de *Croton lechleri* a 60 minutos post administración. Comparaciones múltiples y Test de Fisher

F.V	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	596.28	5	119.26	135.92	<0.0001
Tratamiento	596.28	5	119.26	135.92	<0.0001
Error	26.32	30	0.88		
Total	622.61	35			

Hay una diferencia significativa entre todos los tratamientos administrados con un  $p < 0.05$

Error:		0.8774	gl:	30		
Tratamiento		Medias	n	E.E		
Test de Fisher	GS	15	6	0.38	A	
	T2	7.51	6	0.38		B
	T3	7.45	6	0.38		B
	T1	5.75	6	0.38		C
	CP	3.88	6	0.38		D
	CN	2.14	6	0.38		E

CN: Control Negativo; T1: Tratamiento 1 a 100 mg/kg; T2: Tratamiento 2 a 150 mg/kg; T3: Tratamiento 3 a 200 mg/kg; CP: Control Positivo ketoprofeno a 5 mg/kg ; GS: Gold standart morfina a 5mg/kg; E.E: Error estandar. Medias con letra diferente son significativamente diferentes ( $p < 0.05$ )

## Anexo 4

Efecto analgésico del extracto hidroalcohólico seco atomizado de *Croton lechleri* comparado con ketoprofeno en ratones inducidos a dolor visceral mediante ácido acético. Signos clínico en el Globo ocular. Prueba de Kruskal-Wallis y Método de comparaciones pares (pair-wise).

	Tratamiento	N	Medias	E.E	Medianas	H	p
Prueba de Kruskal-Wallis	CN	6	3	0	3	23.26	<0.0001
	CP	6	3	0	3		
	GS	6	1	0	1		
	T1	6	1.67	0.82	1.5		
	T2	6	1.17	0.41	1		
	T3	6	1	0	1		

CN: Control Negativo; T1: Tratamiento 1 a 100 mg/kg; T2: Tratamiento 2 a 150 mg/kg; T3: Tratamiento 3 a 200 mg/kg; CP: Control Positivo ketoprofeno a 5 mg/kg ; GS: Gold standart morfina a 5mg/kg; E.E: Error estandar. Hay una diferencia altamente significante entre todos los tratamientos con un p valor <0.05

	Tratamiento	Ranks	
Método de comparaciones pares (pair-wise)	T3	10.5	A
	GS	10.5	A
	T2	12.42	A
	T1	17.58	A
	CP	30	B
	CN	30	B

CN: Control Negativo; T1: Tratamiento 1 a 100 mg/kg; T2: Tratamiento 2 a 150 mg/kg; T3: Tratamiento 3 a 200 mg/kg; CP: Control Positivo ketoprofeno a 5 mg/kg ; GS: Gold standart morfina a 5mg/kg; E.E: Error estandar. Medias con letra diferente son significativamente diferentes (p<0.05)

## Anexo 5

Efecto analgésico del extracto hidroalcohólico seco atomizado de *Croton lechleri* comparado con ketoprofeno en ratones inducidos a dolor visceral mediante ácido acético. Signos clínico en vibrisas. Prueba de Kruskal-Wallis y Método de comparaciones pares (pair-wise).

	Tratamiento	N	Medias	E.E	Medianas	H	p
Prueba de Kruskal-Wallis	CN	6	2.33	0.52	2	22.97	<0.0001
	CP	6	2.67	0.52	3		
	GS	6	1	0	1		
	T1	6	1.5	0.55	1.5		
	T2	6	1	0	1		
	T3	6	1	0	1		

CN: Control Negativo; T1: Tratamiento 1 a 100 mg/kg; T2: Tratamiento 2 a 150 mg/kg; T3: Tratamiento 3 a 200 mg/kg; CP: Control Positivo ketoprofeno a 5 mg/kg ; GS: Gold standart morfina a 5mg/kg; E.E: Error estandar. Hay una diferencia altamente significante entre todos los tratamientos con un p valor <0.05

	Tratamiento	Ranks			
Método de comparaciones pares (pair-wise)	T3	11	A		
	T2	11	A		
	GS	11	A		
	T1	18.5	A	B	
	CN	28.5		B	C
	CP	31			C

CN: Control Negativo; T1: Tratamiento 1 a 100 mg/kg; T2: Tratamiento 2 a 150 mg/kg; T3: Tratamiento 3 a 200 mg/kg; CP: Control Positivo ketoprofeno a 5 mg/kg ; GS: Gold standart morfina a 5mg/kg; E.E: Error estandar. Medias con letra diferente son significativamente diferentes (p<0.05)

## Anexo 6

### Componentes reportados de la resina de *Croton lechleri*

<i>Croton lechleri</i> Mull. Arg. Taspine (1)	Anti-inflammatory activity, wound healing activity, cytotoxic activity	Perdue et al. (1979), Vaisberg et al. (1989), Itokawa et al. (1991), Pieters et al. (1993), Porras-Reyes et al. (1993), Chen et al. (1994), Milanowski et al. (2002)
3',4'-O-Dimethylcedrusin (7)	Wound healing activity, inhibition of cell proliferation	Pieters et al. (1990, 1992, 1993, 1995)
Procyanidin B-1 and B-4 (27)		Cai et al. (1991)
Catechin; epigallocatechin; epicatechin; gallocatechin		Cai et al. (1991), Chen et al. (1994)
Catechin (4- $\alpha$ -8)-gallocatechin (4- $\alpha$ -6) gallocatechin; catechin (4- $\alpha$ -8)-gallocatechin (4- $\alpha$ -8)-gallocatechin; gallocatechin (4- $\alpha$ -6)-epigallocatechin; gallocatechin (4- $\alpha$ -8)-epi-catechin; gallocatechin (4- $\alpha$ -8)-gallocatechin (4- $\alpha$ -8)-epi-galocatechin		Cai et al. (1991), Phillipson (1995)
Benzofuran-5-yl,2-3-dihydro:2-(3-dimethoxy-phenyl) 7-methoxy-3-methoxy-carbonyl-propan-1-oic acid methyl ester; benzofuran-5-yl,2-3-dihydro:2-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-7-methoxy-3-methoxy-carbonyl-propen-1-oic acid methyl ester		Pieters et al. (1992)
$\beta$ -Sitosterol; bincatriol; crolechinol (10); crolechinic acid (11); daucosterol; hardwickiic acid		Cai et al. (1993a), Chen et al. (1994)
1,3,5-Trimethoxybenzene	Cytotoxic activity, antibacterial activity	
2,4,6-Trimethoxyphenol	Antibacterial activity	
3,4-Dimethoxybenzyl alcohol; 3,4-dimethoxy phenol; 4-hydroxyphenethyl alcohol and its acetate; $\beta$ -sitostenone; sitosterol- $\beta$ -D-glucopyranoside		Cai et al. (1993a)
Korberin A (5); korberin B (6)	Antibacterial activity	Cai et al. (1993b), Chen et al. (1994)
4-O-Methylcedrusin (8)		Pieters et al. (1993)
SP-303 (MW = 2200 Da)	Antiviral activity	Ubillas et al. (1994), Sidwell et al. (1994)
Catechin-(4- $\alpha$ -8)-epigallocatechin		Phillipson (1995)
Ethyl acetate; ethyl propionate; 2-methyl butanol; 2-methylbutyl acetate; propyl acetate; 3-methylbutyl acetate; eucalyptol; 1-butyl acetate; 3-methyl-2-pentanol		Bellesia et al. (1996)
Isoboldine (13); norisoboldine (12); magnoflorine (14)		Milanowski et al. (2002)
SB-300 (MW = 3000 Da)	Antidiarrhoeal activity	Fischer et al. (2004)

Fuente: D. Gupta et al. 2008 .Journal of Ethnopharmacology 115, 361–380



## Anexo 7

### Mouse Grimace Scale

NC  
3R<sup>S</sup>



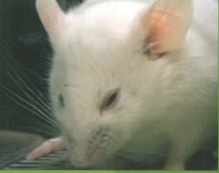










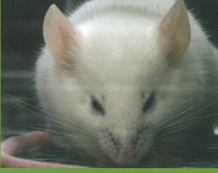

National Centre  
for the Replacement  
Refinement & Reduction  
of Animals in Research

# The Mouse Grimace Scale

Research has demonstrated that changes in facial expression provide a means of assessing pain in mice.

The specific facial action units shown below have been used to generate the Mouse Grimace Scale. These action units increase in intensity in response to post-procedural pain and can be used as part of a clinical assessment.

The action units should only be used in awake animals. Each animal should be observed for a short period of time to avoid scoring brief changes in facial expression that are unrelated to the animal's welfare.

	Not present "0"	Moderately present "1"	Obviously present "2"
<p><b>Orbital tightening</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Closing of the eyelid (narrowing of orbital area)</li> <li>▪ A wrinkle may be visible around the eye</li> </ul>			
<p><b>Nose bulge</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Bulging on the bridge of the nose</li> <li>▪ Vertical wrinkles on the side of the nose</li> </ul>			
<p><b>Cheek bulge</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Bulging of the cheeks</li> </ul>			
<p><b>Ear position</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Ears rotate outwards and/or backwards, away from the face</li> <li>▪ Ears may fold to form a 'pointed' shape</li> <li>▪ Space between the ears increases</li> </ul>			
<p><b>Whisker change</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Whiskers are either pulled back against the cheek, or pulled forward to 'stand on end'</li> <li>▪ Whiskers may clump together</li> <li>▪ Whiskers lose their natural 'downward' curve</li> </ul>			

Read the original paper:  
Langford DJ, Bailey AL, Chanda ML, Clarke SE, Drummond TE, Echols S, Glick S, Ingrao J, Klassen-Ross T, LaCroix-Fralish ML, Matsumiya L, Sorge RE, Sotocinal SG, Tabaka JM, Wong D, van den Maagdenberg AMJM, Ferrari MD, Craig KD, Mogil JS. 2010. Coding of facial expressions of pain in the laboratory mouse. *Nature Methods* 7(6): 447-449.  
doi:10.1038/nmeth.1455

For guidance on using the Mouse Grimace Scale, research papers that underpin this technique, and for grimace scales in other species, visit: [www.nc3rs.org.uk/grimacescales](http://www.nc3rs.org.uk/grimacescales)  
To request copies of this poster, please email: [enquiries@nc3rs.org.uk](mailto:enquiries@nc3rs.org.uk)  
The NC3RS provides a range of 3Rs resources at: [www.nc3rs.org.uk/resources](http://www.nc3rs.org.uk/resources)  
Images kindly provided by Dr Jeffrey Mogil, McGill University

Fuente: Langford, D. J et al., (2010). Coding of facial expressions of pain in the laboratory mouse. *Nat Methods*, 7(6), 447–449.