

Trabajo Científico

Determinación del efecto analgésico del extracto hexánico de flores de *Eupatorium arsenei* en un modelo de dolor agudo en rata

Determination of the analgesic effect of the hexane extract of flowers of *Eupatorium arsenei* in a model of acute pain in rats

Alma Delia Rojas C,¹ Julio César Pardo-Novoa,² Rosa Elva del Río T,² Mario Armando Gómez-Hurtado,² Daniel Limón,¹ Félix Luna,¹ Isabel Martínez¹

¹Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias Químicas,
Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla

²Instituto de investigaciones Químico-Biológicas,
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Michoacán

Resumen

El objetivo del trabajo fue determinar el probable efecto analgésico del extracto de flores de *Eupatorium arsenei*, empleando un modelo térmico de dolor agudo. Ratas hembras Wistar fueron administradas con 200 mg/kg de extracto disuelto en aceite de sésamo por vía intraperitoneal, el grupo control recibió vehículo. La actividad analgésica fue determinada empleando el modelo de sacudida de cola. El grupo administrado con el extracto mostró efecto analgésico 30 minutos después de la administración, la duración del efecto fue de 6 horas. Las diferentes fases del ciclo estral no modificaron la respuesta nociceptiva de los animales. La posible interacción entre los compuestos tipo cromeno presentes en el extracto con la enzima COX-2, mediadora del proceso nociceptivo, podría ser la responsable del efecto analgésico observado.

Abstract

The aim of this study was to investigate analgesic activity of extract of flowers of *Eupatorium arsenei* using a thermal model of acute pain. Wistar female rats were administered with 200 mg/kg of extract dissolved in sesame oil intraperitoneally, the control group received vehicle. The analgesic activity was determined using the model of tail flick. The group administered with the extract showed analgesic effect 30 minutes after the administration, effect duration was 6 hours. The different stage of the estrous cycle does not modify the nociceptive response of animals. The possible interaction between chromene compounds present in the extract with the COX-2, enzyme responsible for the nociceptive process, may be the source of the observed analgesic effect.

Palabras clave: *Ageratina arsenei*, sacudida de cola, dolor, rata.

Key words: *Ageratina arsenei*, Tail flick test, pain, rat.

Correspondencia:

Dra. Isabel Martínez
Departamento de Farmacia
Facultad de Ciencias Químicas
Benemérita Universidad Autónoma de Puebla
Edif. 105D, Planta Baja
Av. San Claudio y 14Sur, Col. San Manuel, Puebla
Ciudad Universitaria, CP. 72570
Tel. 01222 2295500-7362
Fax. 01222 2443106
e-mail: maria.i.martinez@correo.buap.mx

Fecha de recepción: 18 de marzo de 2015

Fecha de recepción de modificaciones: 21 de mayo de 2015

Fecha de aceptación: 27 de mayo de 2015

Introducción

En la búsqueda de nuevos tratamientos para el alivio del dolor se han investigado numerosos compuestos de origen natural, incluyendo los denominados productos naturales botánicos.¹ El género *Eupatorium* (tribu *Eupatorieae*, familia *Asteraceae*) comprende cerca de 1200 especies distribuidas en regiones tropicales de América, Europa, África y Asia.^{2,3}

Aproximadamente 69 especies de éste género se distribuye a lo largo del Estado de Michoacán (Figura 1). La especie *arsenei* B. L. Rob. [*Ageratina arsenei* (B. L. Rob.) R. M. King & H. Rob.] (Figura 2) es una de ellas. El análisis químico preliminar por resonancia magnética nuclear de extractos hexánicos de flores de nueve especies nativas (*Eupatorium spp*), permitió determinar que las familias químicas principales son cromenos y terpenos.^{4,5} Diferentes especies de éste género han mostrado poseer efecto anti-inflamatorio,^{6,7} otras presentan actividad analgésica,⁸⁻¹¹ sin embargo, no existen datos sobre la probable actividad nociceptiva del género *arsenei*, estudiado en el presente trabajo.

Por otro lado, el dolor tiene un papel preponderante en la protección de los seres vivos contra el daño al tejido por estímulos mecánicos, químicos y térmicos, sin la experiencia del dolor no puede haber reflejo protector, ni miedos, ni prevención de riesgos.^{12,13} La Asociación Internacional del Estudio del Dolor (IASP), define al dolor como “una experiencia sensorial y emocional desagradable asociada a un daño tisular real o potencial, o descrita en términos de dicho daño”.¹⁴ Las sensaciones dolorosas pueden explicarse sobre la base de los sustratos neuronales que median las funciones sensoriales; afectivas y nociceptivas. La rama sensorial permite la localización espacial, temporal y la cuantificación de la intensidad del estímulo nocivo.¹⁵ El término dolor incluye al proceso fisiológico denominado nocicepción, el cual incluye cuatro fenómenos neurofisiológicos: la transducción, la transmisión, la modulación y percepción del estímulo.¹⁶ Este proceso se inicia con la detección de estímulos nocivos por medio de los nociceptores.

Los analgésicos no esteroidales son ampliamente usados en el tratamiento del dolor debido a que bloquean la producción de prostaglandinas al inhibir a las enzimas responsables de su síntesis, la ciclo-oxigenasa 1 y 2 (COX-1, COX-2).¹⁷ Las prostaglandinas estimulan los nociceptores produciendo dolor localizado.

En la búsqueda de nuevos tratamientos para el alivio del dolor se requiere del uso de modelos animales, los cuales han permitido que la investigación básica haya generado conocimientos sobre del sistema nociceptivo por lo cual, estos modelos son imprescindibles. En este sentido, un modelo de dolor es el procedimiento por el cual se valora la reacción de un animal ante un estímulo nocivo de naturaleza variada o en una

situación patológica inducida.¹⁸ De igual manera los estudios genéticos, electrofisiológicos y farmacológicos nos ayudan a dilucidar los mecanismos moleculares que subyacen a la detección, codificación y modulación de los estímulos nocivos que generan el dolor.¹⁹

Se han descrito diferentes modelos experimentales en rata que permiten valorar el efecto analgésico; entre ellos se encuentran los modelos químicos, térmicos, mecánicos y eléctricos. Entre los modelos químicos de dolor encontramos la prueba de formalina, carragenina, y ácido acético, modelos térmicos como retirada de cola (tail-flick), plato caliente (hot-plate) e inmersión de la cola en agua caliente, modelos mecánicos como las pruebas de presión de patas o cola y modelos eléctricos que emplean ligeras descargas eléctricas.^{14,20,21} Tomando en cuenta los antecedentes anteriores, el presente trabajo tuvo como objetivo esclarecer si el extracto hexánico de flor de *Eupatorium arsenei* posee actividad analgésica.

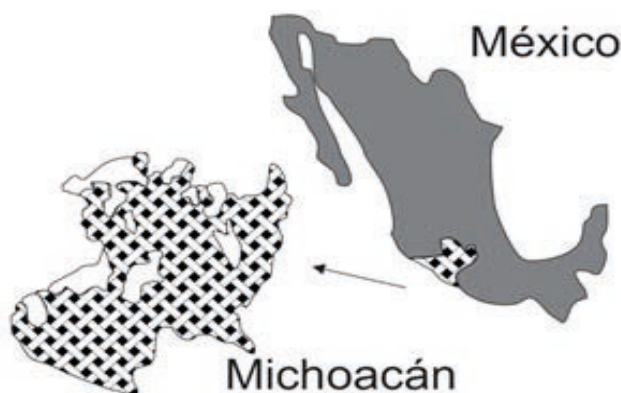


Figura 1. Estado de Michoacán de Ocampo, diferentes especies del género *Eupatorium* se distribuyen en el 69% de su territorio.⁵



Figura 2. *Eupatorium arsenei*. Fotografía Dra. Rosa E. del Río T.

Material y método

Recolección de la planta y preparación del extracto

La especie *E. arsenei* fue colectada en el km 24 de la carretera federal No 15, México-Morelia, en las coordenadas N19° 39.414', W100° 59.713; una muestra fue depositada en el herbario del Instituto de Ecología de Pátzcuaro, Michoacán, (No. 04143). Un lote de flores (285g) secadas a la sombra fueron sometidas a extracción por maceración con 1.5 litros de hexano (JT Baker) durante tres días, posteriormente se eliminó el disolvente mediante el uso de un rotavapor R114 (BUCHI), con lo que se obtuvo 30g de extracto.

Análisis del extracto por Resonancia Magnética Nuclear (RMN).

El extracto de flor de *E.arsenei* se analizó por Espectroscopia de RMN, en un equipo Varian Mercury Plus a 400 MHz empleando cloroformo deuterado (CDCl₃) como disolvente y tetrametilsilano (TMS) como referencia interna.

Animales

Se emplearon ratas hembras de la cepa Wistar de 9 semanas (180-240 g), provenientes del bioterio "Claude Bernard" de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Los animales fueron alojados en cajas de acrílico individuales, con agua purificada y alimento (Harlan Tekland Global Diets) *ad libitum*, ciclo de luz/oscuridad de 12/12 horas, temperatura de 24±2 °C y 45±10 % de humedad. Durante su estancia se manipularon todos los días durante 3 minutos hasta el día de prueba para habituarlas al experimentador y disminuir el estrés. El cuidado y manejo de los sujetos experimentales se realizó bajo los lineamientos del Reglamento del Comité para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (2007), el cual establece el cumplimiento de la Norma Oficial Mexicana "Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio" (NOM-062-ZOO-1999).²²

Prueba de retirada de la cola

Un gramo de extracto hexánico de flor de *E. arsenei* fue disuelto en 15 mililitros aceite de sésamo (Mitsuky), la mezcla se mantuvo en agitación constante (PC-32 Corning) a temperatura ambiente (22 °C) durante 12 horas. La dosis administrada a los sujetos de experimentación fue de 200 mg/kg (n= 8), el grupo vehículo fue administrado con 0.6 mL de aceite de sésamo (n= 8). Como control positivo se empleó Meloxicam (Boehringer Ingelheim), el cual fue administrado a una dosis de 5 mg/kg (n= 8), a partir de una solución de 15mg/1.5 mL, y el grupo control (n= 9) con 0.10 mL de solución salina isotónica (Pisa), todos los tratamientos fueron administrados por vía intraperitoneal. Tomando en cuenta las dosis y las concentraciones de los tratamientos, los volúmenes administrados son equivalentes para los grupos vehículo y solución salina.

Antes de realizar la prueba, los animales fueron habituados a la caja de restricción 5 días previos durante 30 minutos, en intervalos de 10 minutos. Para la prueba se empleó el equipo Tail-flick meter LE 7106 (Panlab Harvard Apparatus). Los animales fueron inmovilizados por medio de una caja de restricción de acrílico, la radiación térmica fue ajustada a 50 °C, el haz de luz se aplicó a 3 cm del inicio de la cola. En este modelo, cuando el animal mueve la cola, al sentir el estímulo doloroso, el haz térmico incide sobre una celda fotoeléctrica y apaga la fuente de radiación, automáticamente el contador de tiempo se detiene y registra la latencia en segundos.

El día de prueba se realizaron tres mediciones basales antes de la administración de las sustancias con un intervalo de tiempo de 10 minutos entre cada una. Después de la administración, se hicieron mediciones cada 10 minutos hasta completar 90. Posteriormente, las mediciones se realizaron cada hora, hasta completar 12 horas.^{9, 10} Al finalizar el experimento, todos los animales fueron devueltos a las cajas de cautiverio y observados durante 7 días para determinar posibles reacciones adversas por los tratamientos.²³ En el presente diseño la latencia obtenida en el grupo administrado con el vehículo fue comparada con la latencia obtenida con el grupo administrado con el extracto y, la latencia obtenida en el grupo administrado con solución salina fue comparada con la obtenida en el grupo administrado con meloxicam.

Frotis vaginales

El objetivo de esta prueba es determinar si las diferentes fases del ciclo estral influyen en la nocicepción. Para este análisis se emplearon los sujetos experimentales que formaron el grupo administrado con el vehículo y el grupo al que se le administró solución salina, 17 ratas en total. La toma de muestra se realizó a los 90 minutos y a las 6 horas después de la administración de los tratamientos. Con ayuda de un asa bacteriológica se realizó un raspado suave en el canal vaginal, una vez obtenidas las muestras se depositaron en un portaobjetos sobre una gota de solución salina isotónica, se fijaron con calor y se tiñeron con la técnica rápida de hematoxilina-eosina (Sigma). Posteriormente se observaron al microscopio de campo claro (Carl Zeiss) a 40X.

Autopsias

Las autopsias se realizaron 8 días después a la administración de los tratamientos, lo que permitió observar si los animales presentaban cambios en la ingesta de agua y alimento o conductas dolorosas como encorvamiento, vocalizaciones y postración.²³ Los sujetos fueron elegidos al azar (uno de cada grupo) y sacrificados con una sobredosis (55mg/kg) de pentobarbital sódico (Aranda) se examinó macroscópicamente el corazón, los pulmones, los riñones, el hígado y los intestinos.

Análisis estadístico

Los tiempos de latencia de los diferentes grupos así como los tiempos de latencia respecto a la fase del ciclo estral fueron analizados por medio de una prueba estadística no paramétrica de Kruskal-Wallis. Se aceptó que hubo diferencia estadística significativa cuando el valor de la p fue menor o igual a 0.05.

Resultados y discusión

Análisis espectroscópico de RMN

Para determinar la naturaleza y abundancia de los componentes del extracto hexánico de flores de *E. arsenei*, se realizó un espectro de RMN de ^1H (Figura 3) que permitió observar señales típicas de compuestos de tipo cromoeno^{4, 24} (Figura 4) como componentes mayoritarios.

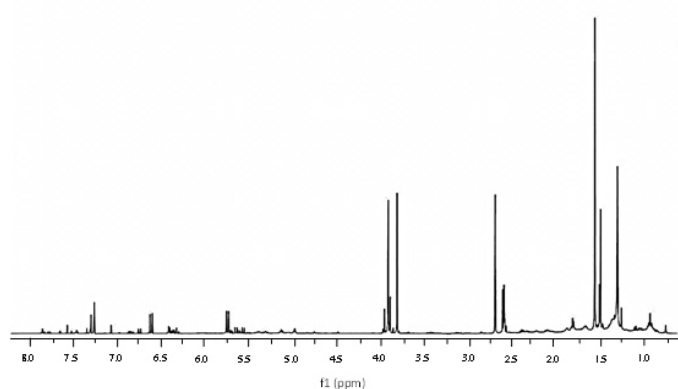


Figura 3. Espectro de RMN de ^1H del extracto hexánico de flor de *E. arsenei* a 400 MHz en CDCl_3 . Entre 5.40 y 7.90 ppm se apreciaron las señales pertenecientes a los protones vinílicos y aromáticos, así como las señales simples del sistema gem-dimetilo en aproximadamente 1.40 ppm.

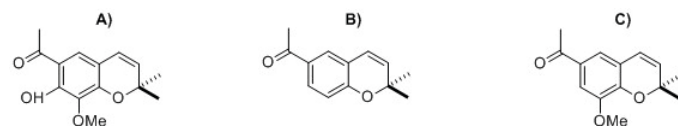


Figura 4. Estructuras presentes en el extracto hexánico de flores *E. arsenei*. A) 7-Hidroxi-8-metoxi-6-acetil-2,2-dimetilcromoeno. B), 6-acetil-2,2-dimetilcromoeno. C), 8-metoxi-6-acetil-2,2-dimetilcromoeno.

Los tiempos de latencia de los grupos controles se mantuvieron constantes durante toda la prueba. El comportamiento de estos grupos es determinante, ya que no solo permiten comparar los valores obtenidos con el grupo experimental, sino que nos permite constatar que los animales no sufren el fenómeno de hiperalgesia debido a una lesión provocada por la aplicación del estímulo térmico, puesto que hay presencia de inflamación local que puede alterar el umbral del dolor y que se manifestaría por

una disminución en los tiempos de latencia o bien habituación que se evidenciaría con un aumento en los tiempos de latencia.²⁵ El modelo animal de dolor agudo denominado “sacudida de cola” consiste en colocar la cola del animal bajo una fuente de radiación térmica que produce dolor, el animal evita el dolor moviendo la cola.²⁰ Para que se lleve a cabo el movimiento reflejo, el estímulo térmico es codificado por las aferencias de las fibras C que inervan la piel de la cola, estas aferencias están localizadas en la lámina superficial del asta dorsal de los segmentos sacro 3 y coxígeo 3 de la médula espinal que hace sinapsis con interneuronas y, éstas a su vez, con motoneuronas de los segmentos lumbar 4 y coxígeo 2 que inervan tres grupos de músculos que controlan el movimiento de la cola; el abductor caudal dorsal, el extensor caudal medial y extensor lateral.²⁶ Por otro lado, existen reportes que indican que los derivados de cromenos son altamente afines a la enzima COX-2,²⁷ responsable de la síntesis de prostaglandinas.^{28, 17} García y cols,¹⁰ propusieron un modelo *in silico* en el cual se realiza un acoplamiento entre la COX-2 y un derivado de cromoeno, concluyendo que la interacción es posible. Además, la presencia de este tipo de derivados se ha relacionado con el efecto analgésico y anti-inflamatorio.²⁹ De esta manera, el efecto analgésico del extracto de *E. arsenei* podría deberse a los abundantes derivados de cromenos metoxilados y su posible interacción con la enzima COX-2.

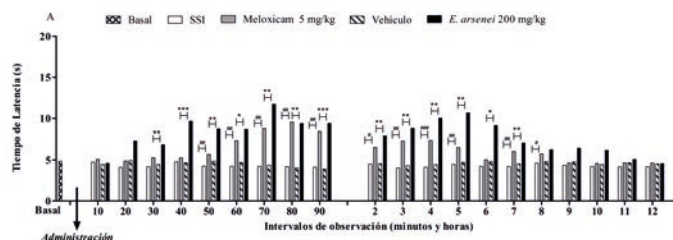


Figura 5. El extracto hexánico de flor de *E. arsenei* a una dosis de 200 mg/kg mostró actividad analgésica en la prueba de dolor. En la gráfica se muestran las medianas de cada grupo a través de las 12 horas del experimento. La prueba estadística no paramétrica de Kruskal-Wallis aplicada en cada intervalo de tiempo, reveló diferencias estadísticas significativas. El efecto analgésico del extracto se observa a partir de los 30 minutos después de la administración comparado con el grupo administrado con el vehículo (** $p=0.01$). Esta diferencia se mantiene hasta la hora 7. El efecto analgésico del meloxicam (5mg/kg) aparece 50 minutos después de la administración, el efecto se mantiene hasta la octava hora, al comparar las latencias de éste grupo con las del grupo que recibió solución salina isotónica se encontró diferencias estadísticas significativas (## $p=0.01$).

Frotis vaginales

En este análisis, sólo se emplearon las ratas de los grupos que se administraron con solución salina y vehículo debido a que el procedimiento para la obtención de la muestra puede causar

estrés en los animales el cual puede influir en la nocicepción^{30, 31,32} y alterar los resultados de los grupos administrados con el extracto y el meloxicam, fueron tomados en dos momentos diferentes durante el experimento debido a que el proestro y estro duran 12 horas.³³ Se observó que la fase del ciclo estral en el que se encuentre la rata no influye en la percepción del estímulo doloroso.

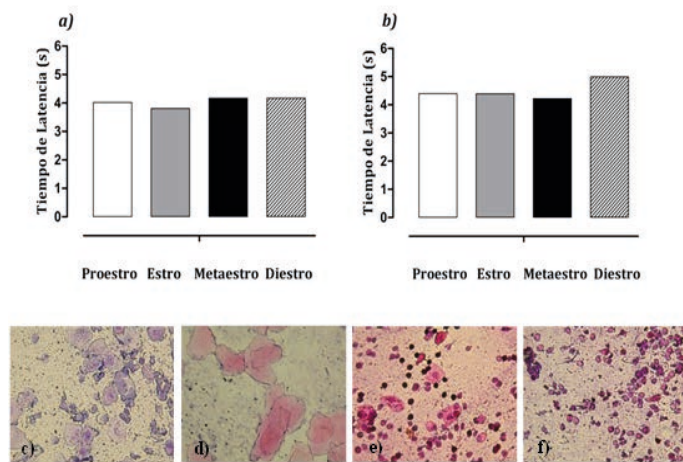


Figura 6. En las gráficas a) y b) se muestra las medianas de los tiempos de latencia de los sujetos de experimentación que formaron los grupos SSI (n = 9) y del grupo vehículo (n = 8). La prueba estadística no paramétrica de Kruskal Wallis, reveló que no existe diferencia estadística significativa entre los grupos. Los frotos se realizaron a los 90 minutos (p= 0.01) y a las 6 horas (p = 0.03) para determinar la fase del ciclo estral en el que se encontraban las ratas durante la prueba de sacudida de cola. Las características celulares de cada una de las fases del ciclo estral encontradas fueron en c) Proestro, células cornificadas nucleadas, d) Estro; células epiteliales cornificadas, e) Metaestro, células epiteliales cornificadas y leucocitos y f) Diestro, leucocitos. Tinción Hematoxilina & Eosina. 40x.

El uso de ratas hembras en experimentos de dolor es causa de controversia, debido a la posible influencia de las hormonas sobre la percepción dolorosa.^{30, 31, 32} Los resultados obtenidos sugieren que las diferentes fases del ciclo estral, y su relación con las concentración plasmática de hormonas hipotalámicas y ováricas³⁴ de las ratas no intervinieron en la nocicepción, resultados similares han sido reportados por otros autores.^{35, 36,10}

Autopsias

Ninguno de los sujetos experimentales mostró lesiones o depósitos de las diferentes sustancias administradas. El análisis macroscópico se realizó con ayuda de una lupa.

Conclusiones

El 6-hidroxi-8-metoxi-6-acetil-2, 2-dimetilcromeno, el 6-acetil-2, 2-dimetilcromeno y el 8-metoxi-6-acetil-2 dimetilcromeno son los compuestos más abundantes en el extracto hexánico de flores de *E. arsenei*, el cual posee propiedades analgésicas cuando es evaluado en el modelo térmico de dolor agudo en rata a una dosis de 200 mg/kg. Respecto a influencia de las diferentes fases del ciclo estral de la rata sobre la nocicepción los resultados obtenidos sugieren que son fenómenos independientes, son pertinentes más estudios en los cuales la administración del meloxicam y del extracto se realicen en fases determinadas del ciclo.

Agradecimientos

Al M.V.Z. Carlos Escamilla Weinmann, director del bioterio “Claude Bernard” de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, por haber proporcionado los animales de experimentación. Al Dr. J. Rzedowski del Instituto de Ecología de Pátzcuaro A.C., por la identificación de la *E. arsenei*. A la CIC-UMSNH, al CECTI por los proyectos aprobados, JPN Becario de CONACYT (268710).

Referencias

1. Newman DJ, Cragg M. Natural Products as Sources of New Drugs over the 30 Years from 1981 to 2010. *J Nat Prod.* 2012; 75:311-335.
2. Zhang ML, Wu M, Zhang JJ, Irwin D, Gu Y, Shi QW. Chemical Constituents of Plants from the Genus *Eupatorium*. *Chem Biodivers.* 2008; 5:40-55.
3. Lamont EE, Ferreras UF. A new species of *Eupatorium* (Asteraceae) from the Philippines. *Brittonia.* 2012; 64(4): 368-373.
4. Fang N, Yu S, Mabry TJ. Chromenes from *Ageratina arsenii* and revised structures of two epimeric chromene dimers. *Phytochemistry.* 1988; 27:1902-1905.
5. García-Sánchez E, Ramírez López CB, del Rio Torres REN, Martínez Pacheco MM. A revision of *Eupatorium* (Compositae: Eupatorieae) from Michoacán. *Phyton.* 2011; 80(2):1902-1905.
6. Clavin M, Gorzalczy S, Macho A, Muñoz E, Ferraro G, Acevedo C, Martino V. Anti-inflammatory activity of flavonoids from *Eupatorium arnottianum*. *J Ethnopharmacol.* 2007; 112: 585-589.
7. Owoyele BV, Oguntoye SO, Dare K, Ogunbiyi BA, Aruboula EA, Soladoye AO. Analgesic, anti-inflammatory and antipyretic activities from flavonoid fractions of *Chromolaena odorat*. *J Med Plants Res.* 2008; 2(9): 219-225.

8. Jena PK, Chakraborty AK. Evaluation of analgesic activity studies of various extracts of leaves of *Eupatorium odoratum* Linn. IJPT. 2010; 2(3): 612-616.
9. García PG, del Río RE, Guzmán MR, Martínez GMI, Scior TRF. Estudios preliminares sobre el efecto analgésico del extracto de hojas de *Ageratina glabrata* en dos modelos térmicos de dolor agudo. Rev Mex Cienc Farm. 2011; 41(1): 45-51.
10. García PG, García SE, Martínez GI, Scior TRF, Salvador J L, Martínez PMM. del Río R E. Analgesic effect of leaf extract from *Ageratina glabrata* in the hot plate test. Rev Bras Farmacogn. 2011b; 21(5):928-935.
11. Parimala K, Cheriyan BV, Viswanathan S. Antinociceptive and anti-inflammatory activity of Petroleum- ether extract of *Eupatorium triplinerve* vahl. J Pharm Sci. 2012; 2(3):12-18.
12. Julius D, Basbaum AI. Molecular Mechanisms of Nociception. Nature. 2001; 413: 203-210.
13. Yoshimura M, Furue H. Mechanisms for the Anti-Nociceptive Actions of the Descending Noradrenergic and Serotonergic Systems in the Spinal Cord. J Pharmacol Sci. 2006; 101:107-117.
14. Le Bars D, Cadden WS. Pain. In: The behavior of the laboratory rat a handbook with tests. Whishaw Q.I, Kolb B, editores. Oxford University Press: 2005, p. 69.
15. Almeida TF, Roizenblatt S, Tufik S. Afferent Pain Pathways: A Neuroanatomical Review. Brain Res. 2004; 1000:40-56.
16. Kidd BL, Urban LA. Mechanisms of inflammatory pain. Br J Anaesth. 2001; 87(1): 3-11.
17. Chopade AR, Sayyad FJ, Naikwade NS. Pharmacological characterization of carrageenan induced heat muscle hyperalgesia in rats using non-selective, preferential and selective COX-2 inhibitors. Pharmacol Rep. 2015; 66: 353-362
18. Micó J A, Ortega-Álvaro A. Modelos animales de dolor. Reumatol Clin. 2006; 2 (1): 2-4.
19. Basbaum AI, Bautista DM, Scherrer G, Julius D. Cellular and Molecular Mechanisms of Pain. Cell. 2009; 139: 267-284.
20. Barrot M. Tests and Models of Nociception and Pain in Rodents. Neuroscience. 2012; 211:39-50.
21. González-Darder JM. Modelos animales de dolor y aspectos éticos de la experimentación animal. Rev Soci Esp Dolor. 2000; 7: 313-318.
22. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. 2001. Diario Oficial de la Federación de México. Estados Unidos Mexicanos.
23. Committee on Recognition and Alleviation of Distress in Laboratory Animals. Institute for Laboratory Animal Research. Recognition and alleviation of distress in laboratory animals. Washington, DC. 2008. The national Academies Press.
24. Gómez-Hurtado MA, Aviña-Verduzco JA, González-Campos JB, López-Castro Y, Rodríguez-García G, Cerda-García-Rojas CM, del Río R E. X-Ray diffraction and NMR studies of two chromenes from the roots of *Ageratina arsenei*. Rev Latinoam Quím. 2012; 40(3):199-209.
25. Sandkühler J. Models and Mechanisms of Hyperalgesia and Allodynia. Physiol Rev. 2009; 89: 707-758.
26. Jasmin L, Carstens E, Basbaum AI. Interneurons presynaptic to rat tail-flick motoneurons as mapped by transneuronal transport of pseudorabies virus: few have long ascending collaterals. Neuroscience. 1996; 76(3):859-876.
27. Wang JL, Aston K, Limburg D, Ludwig C, Hallinan AE, Koszyk F, Hamper B, Brown D, Graneto M, Talley J, Maziasz T, Masferrer J, Carter J. The novel benzopyran class of selective cyclooxygenase-2 inhibitors. Part III: The three microdose candidates. Bioorg Med Chem Lett. 2010; 20:7164-7168.
28. Vane JR, Botting RM. New insights into the mode of action of antiinflammatory drugs. Review Inflam Res. 1995; 44: 1-10.
29. Johnson AJ, Kumar RA, Rasheed SA, Chandrika SP, Chandrasekhar A, Baby S. Subramoniam A. Antipyretic, analgesic, anti-inflammatory and antioxidant activities of two major chromenes from *Melicope lunu-ankenda*. J Ethnopharmacol. 2010; 130(2): 267-71.
30. Carneiro de Araújo PC, Ashmaw, AH, Posso PI. Sexo y Percepción del Dolor y Analgesia. Rev Bras Anestesiología. 2011; 61(6): 449-458.
31. Kuba T, Wu HBK, Nazarian A, Festa ED, Barr GA, Jenab S, Inturrisi CE, Quinones-Jenab V. Estradiol and progesterone differentially regulate formalin-induced nociception in ovariectomized female rats. Horm Behav. 2006; 49 (4): 441-449.
32. Vinogradova EP, Zhukov DA, Batuev AS. The Effects of Stages of the Estrous Cycle on Pain Thresholds in Female White Rats. Neurosci Behav Physiol. 2003; 33(3): 269-272.
33. Paccola CC, Resende CG, Stumpp T, Miraglia SM, Cipriano I. The rat estrous cycle revisited: a quantitative and qualitative analysis. Anim Reprod. 2013; 10(4): 677-683.
34. Maeda K, Ohkura S, Tsukamura H. Physiology of reproduction. In: The rat laboratory. Krinke GJ, editor. USA: Academic Press. 2000. p. 145.
35. Ratnasooriya WD, Dharmasiri MG, Rajapakse RAS, De Silva MS, Jayawardena SPM, Fernando PUD, De Silva WN, Nawela AJ, Warusawithana RP, Jayakody JR, Digana PM. Tender Leaf Extract of *Terminalia catappa* Antinociceptive Activity in Rats. Pharm Biol. 2002; 40(1): 60-66.
36. Kiasalari Z, Khalili M, Ashrafi M. Antinociceptive effect of alcoholic extract of henbane seed on the different phases of estrous cycle of female Rats. J Gorgan Univ Med Sci. 2010; 11 (4): 1-7.