

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTINOCICEPTIVA DE LOS EXTRACTOS HEXÁNICO, ACETATO DE ETILO Y METANÓLICO DE LA HOJA DE MONTANOA TOMENTOSA EN RATAS WISTAR

Evaluation of the antinociceptive activity of the hexane, ethyl acetate and methanolic extracts of the Montanoa tomentosa leaf in Wistar rats

AUTORES: Guillermo Villar-Juárez¹, Isela Esther Juárez-Rojo², Juan Daniel Cruz-Castillo², Samuel Suarez-Mendez^{2*}

¹ Escuela de Ciencias de la Salud. Universidad Anáhuac Querétaro, Querétaro, México. ²

División Académica de Ciencias Básicas, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, Cunduacán, Tabasco, México.

RESUMEN

MONTANOA TOMENTOSA

Es una planta nativa de México que se usa en la medicina tradicional como remedio para las deficiencias reproductivas y particularmente para inducir el parto. En estudios anteriores, se ha demostrado que esta planta contiene metabolitos secundarios caracterizados por producir efectos analgésicos. Hasta la fecha, no existen informes sobre el efecto antinociceptivo de los extractos de la hoja de *Montanoa tomentosa*. Por lo tanto, el objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto antinociceptivo de los extractos hexánico, acetato de etilo y metanólico de la hoja de *Montanoa tomentosa* en ratas. El comportamiento nociceptivo se midió utilizando la prueba de formalina. Para evaluar el efecto antinociceptivo de los extractos hexánico, acetato de etilo y metanólico de la hoja de *Montanoa tomentosa*, se administró localmente el vehículo, las dosis de los extractos (50, 100, 200, 400 µg/pata) o los controles positivos (ketorolaco, meloxicam; 400 µg/pata). La administración periférica local de los extractos hexánico, acetato de etilo y metanólico de la hoja de *Montanoa tomentosa* disminuyó la nocicepción en la fase II de la prueba de formalina de manera dosis dependiente. Además, la eficacia de los tres extractos fue similar a la de los AINEs, siendo el extracto hexánico el más efectivo. La administración periférica local de los extractos hexánico, acetato de etilo y metanólico de la hoja de *Montanoa tomentosa* tienen efecto antinociceptivo en ratas y podrían ser una alternativa farmacológica para el tratamiento del dolor inflamatorio.

PALABRAS CLAVES:

Montanoa tomentosa, dolor, antinocicepción, extracto hexánico, extracto acetato de etilo, extracto metanólico

ABSTRACT

Montanoa tomentosa is a native plant from Mexico used in traditional medicine as a remedy for reproductive impairments and particularly to inducing childbirth. In previous studies, it has been shown that this plant contains secondary metabolites characterized by produce analgesic effects. To date, it does not exist reports of the antinociceptive effect of extracts of the Montanoa tomentosa leaf. Thus, aim of the present study was to evaluate the antinociceptive effect of the hexanic, ethyl acetate and

methanolic extracts of the Montanoa tomentosa leaf in rats. Nociceptive behavior was measured using the formalin test. To evaluate the antinociceptive effect of the hexanic, ethyl acetate and methanolic extracts of the Montanoa tomentosa leaf, was administrated locally the vehicle, the doses of the extracts (50, 100, 200, 400 µg/paw) or positive controls (ketorolac, meloxicam; 400 µg/paw). Local peripheral administration of the hexanic, ethyl acetate and methanolic extracts of the Montanoa tomentosa leaf decreased nociception in phase II of formalin test in a dose-dependent manner. Moreover, the efficacy of the three extracts was similar to AINEs, being hexanic extract the more effective. In conclusion, the local peripheral administration of the hexanic, ethyl acetate and methanolic extracts of the Montanoa tomentosa leaf have antinociceptive effect in rats and could be a pharmacological alternative for the treatment of inflammatory pain.

KEY WORDS:

Montanoa tomentosa, pain, antinociceptive, hexanic extract, ethyl acetate extract, methanolic extract.

1. INTRODUCCIÓN

El dolor es una experiencia sensorial y emocional desagradable asociada a un daño tisular real o potencial que se relaciona de manera directa con la intensidad de dicho daño¹. Debido a la inflamación del tejido lesionado, un aporte tónico de las fibras nociceptivas produce un estado hiperexcitable entre las vías nociceptivas centrales que resulta en hiperalgesia, alodinia y dolor espontáneo². Existe una disponibilidad de opciones terapéuticas para tratar el dolor inflamatorio, sin embargo, el potencial de efectos secundarios y la eficacia moderada pueden limitar seriamente su uso clínico³.

MONTANOA TOMENTOSA CERV. (ASTERACEAE)

Es un arbusto perenne nativo de México conocido como zoapatle o cihuapatli, se utiliza en la medicina tradicional en México (té a partir de las hojas) como remedio para inducir el parto, regulación de la fertilidad y ciclo menstrual^{4,5}. Asimismo, estudios previos en roedores demuestran que *Montanoa tomentosa* ejerce efecto antitumoral, vasoconstrictor, diurético, ansiolítico y afrodisiaco⁶⁻⁸. Algunos autores atribuyen estas propiedades farmacológicas de *Montanoa tomentosa* a dos ácidos

diterpénicos: grandiflorenico (GA) [kaura-9 (11), ácido 16-dien-18-oico] y kaurenoico (KA) [ácido kaur-16-en-18-oico]. El ácido kaurenoico obtenida de un árbol del género *Copaifera*, demostró poseer actividad antiinflamatoria en animales⁹. Además, estudios fitoquímicos proponen otros metabolitos secundarios presentes en *Montanoa tomentosa* como son flavonoides, resinas, ácido oxálico, sales minerales y alcaloides. Asimismo, aceites esenciales constituidos por monoterpenos, borneol, camfeno, limoneno, linalol, mirceno, mirtenol, ocimeno, α -pineno, β -pineno, terpinen-4-ol, α -terpineol, β -tuyeno, β -caiofileno, α -copaeno, β -cubefeno, β -endesmaneno, β -sistosterol, estigmasterol^{10,11}. Está descrito que muchos de estos compuestos se caracterizan por presentar efectos antioxidantes, antiinflamatorios y analgésicos a través de la inhibición y reducción de la expresión de las ciclooxigenasas, sintasa de óxido nítrico, prostaglandinas E2 y óxido nítrico^{12,13}. A la fecha, no se ha reportado el efecto antinociceptivo de la hoja de *Montanoa tomentosa*. Por lo tanto, el objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto antinociceptivo de los extractos hexánico, acetato de etilo y metanólico de la hoja de *Montanoa tomentosa* en un modelo en ratas.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. EXTRACTOS HEXÁNICO, ACETATO DE ETILO Y METANÓLICO DE LA HOJA DE *MONTANOA TOMENTOSA*

Con la finalidad de evaluar la actividad antinociceptiva de la hoja de *Montanoa tomentosa*, se obtuvieron tres extractos considerando las diferentes polaridades: el hexano para extraer compuestos de muy baja polaridad; el acetato de etilo para extraer compuestos de mediana polaridad; y metanol para extraer compuestos de alta polaridad. Los extractos hexánico, acetato de etilo y metanólico de la hoja de *Montanoa tomentosa* fueron proporcionados por la División académica de Ciencias Básicas de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. Los extractos se disolvieron en dimetilsulfóxido al 20% para la evaluación farmacológica en el modelo de formalina 1%.

2.2. ANIMALES

Se utilizaron ratas Wistar macho con un peso de 180-200 g, los animales permanecieron en condiciones ambientales estándares de laboratorio con temperatura entre 22-24 °C, con ciclo de 12 horas luz/oscuridad, con acceso libre a comida y agua. Las ratas se utilizaron una sola vez y al término del experimento se sacrificaron en una cámara saturada de CO₂. Los experimentos se realizaron de acuerdo a los lineamientos para el cuidado de los animales de laboratorio y las guías éticas para la investigación del dolor experimental en animales conscientes¹⁴.

2.3. FÁRMACOS

El ketorolaco (inhibidor preferente de COX-1) y meloxicam (inhibidor preferente de COX-2) se adquirieron en Sigma® (St. Louis, MO, USA) y fueron solubles en solución salina. Estos AINEs son los más frecuentemente prescritos en la clínica. Además, su presentación farmacéutica en solución inyectable los convierte en una buena opción para la administración periférica local (vía subcutánea).

2.4. DISEÑO EXPERIMENTAL

En este estudio se evaluó la conducta nociceptiva mediante la prueba de formalina 1 % en ratas Wistar macho. Para medir el efecto antinociceptivo de los extractos de la hoja de *Montanoa tomentosa* se realizó la administración periférica local (vía subcutánea) del vehículo (50 μ L), las dosis de los extractos hexánico, acetato de etilo y metanólico (50, 100, 200, 400 μ g/pata)¹⁵. Además, se utilizó un inhibidor preferencial de COX-1 (ketorolaco, 400 μ g/pata) y un inhibidor preferencial de COX-2 (meloxicam, 400 μ g/pata) como controles positivos¹⁶. La administración de los extractos de *Montanoa tomentosa* o los controles positivos se realizaron 12 minutos antes de la inyección de formalina al 1%, ambas administraciones se efectuaron en la misma pata.

2.5. EVALUACIÓN DE LA CONDUCTA NOCICEPTIVA INDUCIDA POR FORMALINA

El modelo de formalina permite evaluar la respuesta del animal ante un dolor agudo que es generado por un daño tisular; siendo un modelo que se aproxima más al dolor clínico¹⁷. El dolor inducido por la administración de formalina es consecuencia del proceso inflamatorio producido por esta sustancia química. Este modelo consistió en colocar las ratas en una cámara de observación de plexiglás abierta durante 30 minutos para aclimatarse a su entorno; luego fueron retiradas para la administración de formalina. Cincuenta microlitros de formalina diluida al 1% se inyectaron por vía subcutánea en la superficie dorsal de la pata trasera derecha con una aguja No. 30½. Los animales fueron devueltos a las cámaras y se observó la conducta nociceptiva inmediatamente después de la inyección de formalina. Se colocaron espejos en cada cámara para permitir la observación sin obstáculos. La conducta nociceptiva se cuantificó como el número de sacudidas de la pata inyectada durante períodos de 1 minuto cada 5 minutos, hasta 60 minutos después de la inyección. La sacudida de la pata se caracterizó como una retirada rápida y breve o como una flexión de la pata inyectada^{17,18}. La actividad antinociceptiva se considera como una disminución en el número de sacudidas. Los animales se usaron solo una vez y al final del experimento se sacrificaron en una cámara de CO₂.

AUTOR DE CORRESPONDENCIA:

Samuel Suarez Mendez,

samuelsuarezmendez@hotmail.com,

Tel.: +52-993-358-1500 ext. 6318; Fax: +52-993-351-1132.

2.6. ANÁLISIS DE DATOS

Los datos son presentados como el promedio \pm error estándar de 6 animales por grupo. Los cursos temporales de la respuesta antinociceptiva de los extractos individuales se construyeron trazando la media del número de sacudidas en función del tiempo. El área bajo la curva (ABC) del número de sacudidas contra el tiempo, se calculó mediante el método del trapezoide. Los datos de la dosis-respuesta se presentan como el porcentaje de antinocicepción (% Antinocicepción), calculado a partir del ABC de la Fase II de la prueba de formalina; de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Antinocicepción} = [(ABC \text{ vehículo} - ABC \text{ fármaco}) / (ABC \text{ vehículo})] * 100$$

Las diferencias significativas se determinaron mediante un análisis de varianza unidireccional (ANOVA) seguido de una prueba post hoc prueba de Tukey's, $p < 0.05$ se consideró estadísticamente significativo.

3. RESULTADOS

3.1. EVALUACIÓN DE LA CONDUCTA NOCICEPTIVA INDUCIDA POR FORMALINA EN RATAS

Al grupo que se le administró DMS 20% (vehículo) y formalina al 1% mostró una fase aguda inicial (0-10 min; fase I) fue seguida de un período de reposo corto, y después se presentó una respuesta tónica prolongada (10-60 min; fase II). Este patrón se denomina bifásico. La primera fase comenzó inmediatamente después de la administración de formalina y luego disminuyó gradualmente en aproximadamente 10 minutos (Figura 1A). La segunda fase inició a los 15 minutos y duró hasta 60 minutos (Figura 1A).

3.1. ACTIVIDAD ANTINOCICEPTIVA DEL EXTRACTO HEXÁNICO DE LA HOJA DE *M. TOMENTOSA* EN RATAS

La inyección periférica local (vía subcutánea) del extracto hexánico de la hoja de *M. tomentosa* disminuyó el número de sacudidas/minuto del modelo de formalina al 1% en ratas (Figura 1A). El efecto antinociceptivo del extracto hexánico de la hoja de *Montanoa tomentosa* fue estadísticamente significativo ($p < 0.05$) y dependiente de la dosis (50, 100, 200 y 400 $\mu\text{g/pata}$; Figura 1B). Además, el efecto antinociceptivo de este extracto fue similar al efecto observado con meloxicam (400 $\mu\text{g/pata}$; Figura 1B).

TABLA 1.

Porcentaje de antinocicepción calculadas a partir de las ABC del efecto antinociceptivo de la dosis de 400 $\mu\text{g/pata}$ de los extractos de la hoja de *Montanoa tomentosa* en ratas.

Los valores están expresados en promedio \pm error estándar. $\$p < 0.05$ contra el E. acetato de etilo y E. metanólico; $\psi p < 0.05$ contra el ketorolaco; $*p < 0.05$ contra el E. metanólico; $\#p < 0.05$ contra el grupo meloxicam, determinado por la prueba t de Student's.

3.2. ACTIVIDAD ANTINOCICEPTIVA DEL EXTRACTO DE ACETATO DE ETILO DE LA HOJA DE *M. TOMENTOSA* EN RATAS

La administración periférica local (vía subcutánea) del extracto de acetato de etilo de la hoja de *M. tomentosa* redujo el número de sacudidas/minuto inducido por formalina al 1% en ratas (Figura 2A). Las dosis del extracto de acetato de etilo de la hoja de *Montanoa tomentosa* mostraron una eficacia estadísticamente significativa ($p < 0.05$), observándose una relación directa entre la cantidad de la dosis y el efecto registrado (100, 200 y 400 $\mu\text{g/pata}$; Figura 2B). La antinocicepción de la dosis mayor de este extracto fue similar al efecto observado con ketorolaco (400 $\mu\text{g/pata}$; Figura 2B).

3.3. ACTIVIDAD ANTINOCICEPTIVA DEL EXTRACTO METANÓLICO DE LA HOJA DE *M. TOMENTOSA* EN RATAS

La administración periférica local (vía subcutánea) del extracto metanólico de la hoja de *Montanoa tomentosa* revirtió el incremento del número de sacudidas/minuto inducido por formalina al 1% en ratas (Figura 3A). El extracto metanólico de la hoja de *Montanoa tomentosa* tuvo un efecto antinociceptivo dependiente de la dosis (100, 200 y 400 $\mu\text{g/pata}$), estos datos mostraron diferencia significativa con respecto al vehículo (Figura 3B). La actividad antinociceptiva de este extracto fue similar al observado con ketorolaco (400 $\mu\text{g/pata}$; Figura 3B). Los tres extractos de la hoja de *Montanoa tomentosa* utilizados en el presente estudio mostraron eficacia en la fase II, pero no en la fase I del modelo de formalina al 1% (datos no mostrados).

3.4. EFICACIA DE LA ACTIVIDAD ANTINOCICEPTIVA DE LOS EXTRACTOS DE LA HOJA DE *MONTANOA TOMENTOSA*.

A partir de las curvas dosis respuesta se calculó la eficacia de la actividad antinociceptiva de los extractos hexánico, acetato de etilo y metanólico de la hoja de *Montanoa tomentosa*. En el presente estudio se observó que: extracto hexánico ($66.3 \pm 3.0\%$), extracto de acetato de etilo ($52.5 \pm 4.7\%$) y extracto metanólico ($46.9 \pm 3.4\%$). Además, la eficacia mostrada por los tres extractos fue similar a la eficacia de ketorolaco y meloxicam (Tabla 1).

| % ANTINOCICEPCIÓN (400 MG/PATA) | | | | |
|---------------------------------|----------------------|---------------------|----------------|----------------|
| E. HEXÁNICO | E. ACETATO DE ETILO | E. METANÓLICO | KETOROLACO | MELOXICAM |
| 66.3 \pm 3.0 ψ | 52.5 \pm 4.7* $\#$ | 46.9 \pm 3.4 $\#$ | 49.1 \pm 2.9 | 64.3 \pm 4.5 |

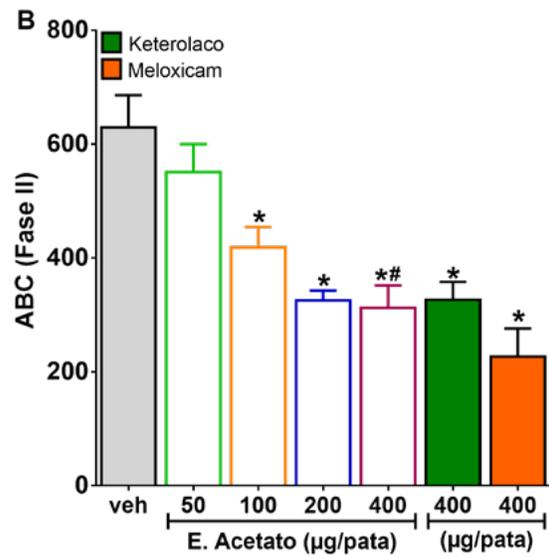
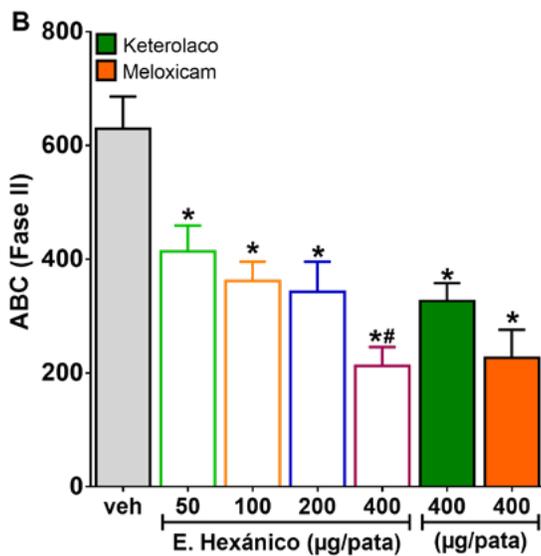
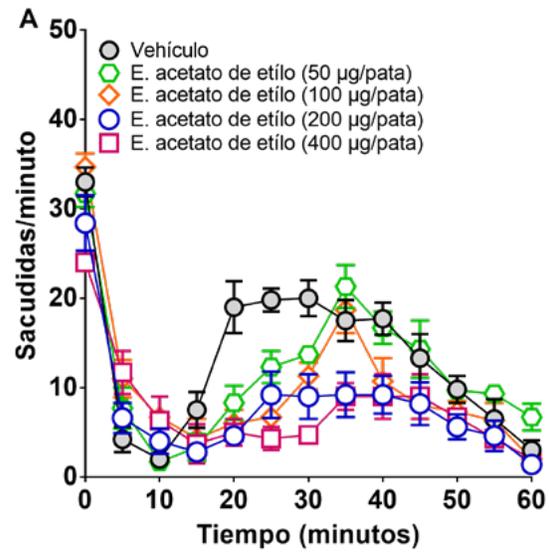
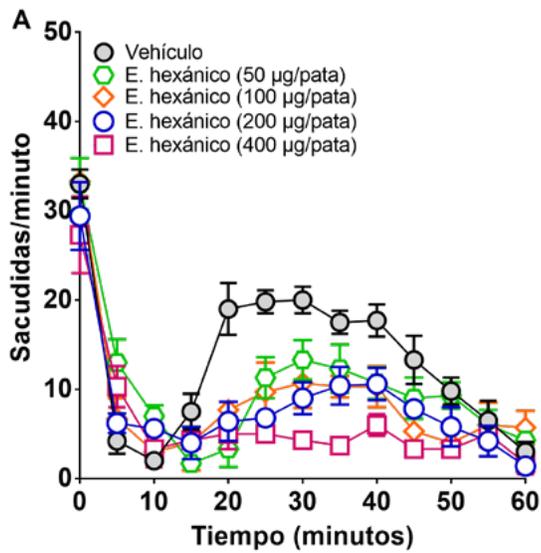
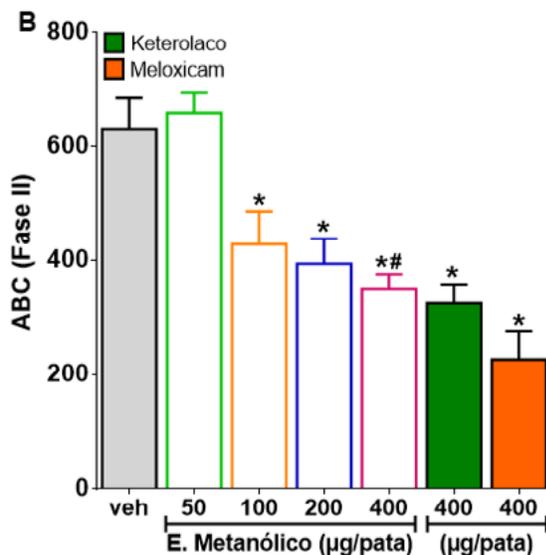
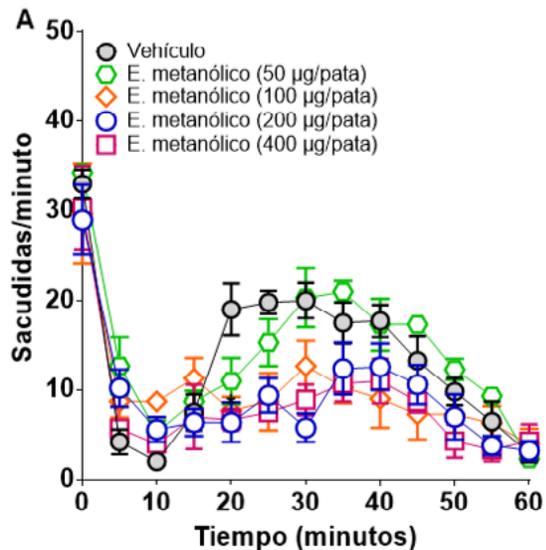


FIGURA 1.

(A) Curso temporal del efecto antinociceptivo del extracto hexánico de la hoja *Montanoa tomentosa* en ratas. (B) Las barras muestran el ABC del efecto antinociceptivo del extracto hexánico de la hoja de *Montanoa tomentosa* en la fase II del modelo de formalina. Los datos se expresan como medias \pm S.E.M. de 6 animales. * $P \leq 0.05$ versus vehículo y # $P \leq 0.05$ versus ketorolaco, determinado por un análisis de varianza de una vía seguida de la prueba de Tukey's. Abreviaturas: ABC, área bajo la curva; veh, vehículo.

FIGURA 2.

(A) Curso temporal del efecto antinociceptivo del extracto de acetato de etilo de la hoja *Montanoa tomentosa* en ratas. (B) Las barras muestran el ABC del efecto antinociceptivo del extracto de acetato de etilo de la hoja de *Montanoa tomentosa* en la fase II del modelo de formalina. Los datos se expresan como medias \pm S.E.M. de 6 animales. * $P \leq 0.05$ versus vehículo y # $P \leq 0.05$ versus meloxicam, determinado por un análisis de varianza de una vía seguida de la prueba de Tukey's. Abreviaturas: ABC, área bajo la curva; veh, vehículo.

**FIGURA 3.**

(A) Curso temporal del efecto antinociceptivo del extracto metanólico de la hoja *Montanoa tomentosa* en ratas. (B) Las barras muestran el ABC del efecto antinociceptivo del extracto metanólico de la hoja *Montanoa tomentosa* en la fase II del modelo de formalina. Los datos se expresan como medias \pm S.E.M. de 6 animales. * $P \leq 0.05$ versus vehículo y # $P \leq 0.05$ versus meloxicam, determinado por un análisis de varianza de una vía seguida de la prueba de Tukey's. Abreviaturas: ABC, área bajo la curva; veh, vehículo.

4.DISCUSIÓN

En el presente estudio demostramos que la administración periférica local (vía subcutánea) de los extractos hexánico, acetato de etilo y metanólico de la hoja de *Montanoa tomentosa* redujeron la conducta nociceptiva inducida por formalina al 1% en ratas. Además, el porcentaje de antinocicepción de los extractos hexánico, acetato de etilo y metanólico de la hoja de *Montanoa tomentosa* fue similar al de los inhibidores de ciclooxigenasas, ketorolaco y meloxicam. De acuerdo a nuestro conocimiento, este es el primer reporte acerca del efecto antinociceptivo de los extractos hexánico, acetato de etilo y metanólico de la hoja de *Montanoa tomentosa*. Previos estudios fitoquímicos sugieren que *Montanoa tomentosa* contiene flavonoides, ácido kaurenico, β -sistosterol y estigmasterol, compuestos químicos descritos por presentar efectos analgésicos y antiinflamatorios a través de la inhibición de las ciclooxigenasas y reducción en la producción de óxido nítrico¹⁹. Esto, podría ser congruente con el efecto antinociceptivo observado en la fase II del modelo de formalina, ya que esta fase es caracterizada por el rol de IL-1 β , IL-6, TNF- α , COX-2, prostaglandina E2 y óxido nítrico²⁰.

Otras especies del género *Montanoa*, como el extracto hexánico de *Montanoa grandiflora* redujo la inflamación en un modelo de edema de la pata trasera inducido por carragenina²¹. Asimismo, en los extractos metanólico y etanólico de *Montanoa hibiscifolia* se encontraron lactonas sesquiterpénicas, sustancias que inhibieron la unión de NF- κ B al ADN, en una línea celular de leucemia (células T Jurkat)²². NF- κ B es un factor de transcripción que regula la transcripción de citocinas pro-inflamatorias (IL-1 β , IL-6, TNF- α), COX-2 y a la sintasa de óxido nítrico inducible (iNOS).

Por otra parte, se reportó que los efectos ansiolíticos y ansiogénicos del extracto acuoso de *Montanoa tomentosa*, dependen de la presencia de receptores GABA^A, debido a que la administración de picrotoxina un antagonista del receptor GABA^A, revierte el efecto ansiolítico inducido por *Montanoa tomentosa*^{23,24}. Los receptores GABA^A son receptores ionotrópicos activados por el ácido gamma-aminobutírico (GABA), permitiendo la entrada de iones cloruro produciendo una hiperpolarización de la neurona y por lo tanto antinocicepción²⁵. Estos datos sugieren que la actividad antinociceptiva mostrada por los extractos de la hoja de *Montanoa tomentosa* es posible que sea mediado por la inhibición de ciclooxigenasas, disminución de la producción de óxido nítrico, activación de receptores GABA^A o una combinación de estos.

Sin embargo, debido a la complejidad de los mecanismos fisiopatológicos del dolor inflamatorio y la función de la hoja de *Montanoa tomentosa*, se requieren estudios farmacológicos, fotoquímicos y bioquímicos para determinar los metabolitos implicados en el efecto antinociceptivo de los extractos hexánico, acetato de etilo y metanólico de la hoja de *Montanoa tomentosa* y sus posibles mecanismos de acción. Además, es preciso determinar los posibles efectos adversos de estos extractos, aunque las reacciones adversas de una administración periférica local (vía subcutánea) son relacionadas con mayor frecuencia al área de la inyección.

5. CONCLUSIÓN

En este estudio nuestros datos indican que los extractos hexánico, acetato de etilo y metanólico de la hoja de *Montanoa tomentosa* revierten la conducta nociceptiva inducida por formalina 1%. Además, podrían ser una alternativa terapéutica en el tratamiento del dolor inflamatorio.

6. DECLARACIÓN DE CONFLICTOS DE INTERÉS

Los autores declaran que no tienen intereses en competencia.

7. FINANCIAMIENTO

Los autores no recibieron fondos para este trabajo.

REFERENCIAS

- Merskey, H. Prepared by the IASP Subcommittee on Taxonomy. Classification of chronic pain: descriptions of chronic pain syndromes and definitions of pain terms. Pain [Internet]. 1986; 3: S1-S226. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3461421>
- Yam, M.F., Loh, Y.C., Tan, C.S., Khadijah-Adam, S., Abdul-Manan, N., Basir, R. General Pathways of Pain Sensation and the Major Neurotransmitters Involved in Pain Regulation. Int J Mol Sci [Internet]. 2018; 19(8). Disponible en: doi: 10.3390/ijms19082164.
- Cooper, C., Chapurlat, R., Al-Daghri, N., Herrero-Beaumont, G., Bruyère, O., Rannou, F., Roth, R., Uebelhart, D., Reginster, J.Y. Safety of Oral Non-Selective Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs in Osteoarthritis: What Does the Literature Say? Drugs Aging [Internet]. 2019; 36(1): 15-24. Disponible en: doi: 10.1007/s40266-019-00660-1.
- Levine, S. D., Hahn, D. W., Cotter, M. L., Greenslade, F. C., Kanojia, R. M., Pasquale, S. A., McGuire, J. L. The Mexican plant zoapatle (*Montanoa tomentosa*) in reproductive medicine. Past, present and future. J Reprod Med [Internet]. 1981; 26(10): 524-528. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7031239>
- Rodríguez-Landa, J.F., Cueto-Escobedo, J., Flores-Aguilar, L.Á., Rosas-Sánchez, G.U., Rovirosa-Hernández, M.J., García-Orduña, F., Carro-Juárez, M. The Aqueous Crude Extracts of *Montanoa frutescens* and *Montanoa grandiflora* Reduce Immobility Faster Than Fluoxetine Through GABA(A) Receptors in Rats Forced to Swim. J Evid Based Integr Med [Internet]. 2018; Disponible en: doi: 10.1177/2515690X18762953.
- Carro-Juárez, M., Cervantes, E., Cervantes-Méndez, M., & Rodríguez-Manzo, G. Aphrodisiac properties of *Montanoa tomentosa* aqueous crude extract in male rats. Pharmacology Biochemistry and Behavior [Internet]. 2004; 78(1): 129-134. Disponible en: doi:10.1016/j.pbb.2004.03.001.
- Carro-Juárez, M., Lobatón, I., Benítez, O. & Espíritu, A. Pro-ejaculatory effect of the aqueous crude extract of cihuapatli (*Montanoa tomentosa*) in spinal male rats. Journal of Ethnopharmacology [Internet]. 2006; 106(1): 111-116. Disponible en: doi:10.1016/j.jep.2005.12.011.
- Gallegos, A. J. The zoapatle. VI. Revisited. Contraception [Internet]. 1985; 31(5): 487-497. Disponible en: doi:10.1016/0010-7824(85)90084-8
- Kotian, S., Bhat, K., Pai, S., Nayak, J., Souza, A., Gourisheti, K., Padma, D. The Role of Natural Medicines on Wound Healing: A Biomechanical, Histological, Biochemical and Molecular Study. Ethiop J Health Sci [Internet]. 2018; 28(6):759-770. Disponible en: doi:10.4314/ejhs.v28i6.11.
- Marcelle, G. B., Bunyapraphatsara, N., Cordell, G. A., Fong, H. H., Nicolaou, K. C., y Zipkin, R. E. Studies of zoapatle I. The extraction of zoapatle (*Montanoa tomentosa*) and the identification of 21-normontanol as the initial decomposition product of zoapatanol. Journal of natural products [Internet]. 1985; 48(5): 739-745. Disponible en: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/np50041a004>
- Villa-Ruano, N., Betancourt-Jimenez, M. G., y Lozoya-Gloria, E. Biosynthesis of uterotonic diterpenes from *Montanoa tomentosa* (zoapatle). J Plant Physiol [Internet]. 2009; 166(18): 1961-1967. Disponible en: doi:10.1016/j.jplph.2009.06.004
- Chen, Y., Yang, L., y Lee, T. J. Oroxilin A inhibition of lipopolysaccharide-induced iNOS and COX-2 gene expression via suppression of nuclear factor-kappaB activation. Biochem Pharmacol [Internet]. 2000; 59(11): 1445-1457. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10751555>
- Ravindra, P. V., y Narayan, M. S. Antioxidant activity of the anthocyanin from carrot (*Daucus carota*) callus culture. Int J Food Sci Nutr [Internet]. 2003; 54(5): 349-355. Disponible en: doi:10.1080/09637480120092134
- Zimmermann, M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. Pain [Internet]. 1983; 16(2): 109-110. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6877845>
- Morales, P.E. Aparicio, M.A., Ramón-Frias, T., Pérez, A., y Juárez-Rojop, I.E. Actividad inflamatoria de la pomada de *Montanoa tomentosa* (zoapatle) en ratas Wistar. [Tesis de maestría en Ciencias Básicas Biomédicas] Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, Tabasco, México; 2018
- Bermúdez-Ocaña, D. Y., Aguilar-Mariscal, H., Frias, T. R., Ble-Castillo, J. L., Flores-Murrieta, F. J., Et Al. Proglumide enhances the antinociceptive effect of cyclooxygenase inhibitors in diabetic rats in the formalin test. Eur J Pharmacol [Internet]. 2011; 664(1-3): 8-13. Disponible en: doi:10.1016/j.ejphar.2011.04.044
- Dubuisson, D., y Dennis, S. G. The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats. Pain [Internet]. 1977; 4(2): 161-174. Disponible en: doi:10.1016/0304-3959(77)90130-0
- Wheeler-Aceto, H., y Cowan, A. Standardization of the rat paw formalin test for the evaluation of analgesics. Psychopharmacology (Berl) [Internet]. 1991; 104(1): 35-44. Disponible en: doi:10.1007/bf02244551
- Villa-Ruano, N., & Lozoya-Gloria, E. Anti-fertility and other biological activities of zoapatle (*Montanoa* spp.) with biotechnological application. Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas [Internet]. 2014; 13(5): 415-436. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/281668521_Anti-fertility_and_other_biological_activities_of_zoapatle_Montanoa_spp_with_biotechnological_application
- Chichorro, J. G., Lorenzetti, B. B., y Zampronio, A. R. Involvement of bradykinin, cytokines, sympathetic amines and prostaglandins in formalin-induced orofacial nociception in rats. Br J Pharmacol [Internet]. 2004; 141(7): 1175-1184. Disponible en: doi:10.1038/sj.bjp.0705724
- Villa-De La Torre, F., Puebla-Pérez, A. M., Arana-Argaez, V. E., Ortiz-Andrade, R., Carballo-Uicab, G., Méndez-González, M., Cáceres-Farfan, M., y Borges-Argáez, R. Anti-inflammatory activity of *critonia* aromatisans and *montanoa grandiflora* leaves extracts, plants used in mayan traditional medicine to treat inflammation. Polibotánica [Internet]. 2017; (43): 285-319. Disponible en: doi: 10.18387/polibotanica.43.13
- Müller, S., Murillo, R., Castro, V., Brecht, V. y Merfort, I. Sesquiterpene lactones from *Montanoa hibiscifolia* that inhibit the transcription factor NF-kappa B. J Nat Prod [Internet]. 2004; 67(4): 622-30. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15104492>
- Estrada-Camarena, E., Sollozo-Dupont, I., Islas-Preciado, D., González-Trujano, M. E., Carro-Juárez, M., & López-Rubalcava, C. Anxiolytic-and anxiogenic-like effects of *Montanoa tomentosa* (Asteraceae): Dependence on the endocrine condition. Journal of ethnopharmacology [Internet]. 2019; Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31153863>
- Sollozo-Dupont, I., Estrada-Camarena, E., Carro-Juárez, M., & López-Rubalcava, C. GABAA/benzodiazepine receptor complex mediates the anxiolytic-like effect of *Montanoa tomentosa*. Journal of Ethnopharmacology [Internet]. 2015; 162: 278-286. Disponible en: doi:10.1016/j.jep.2014.12.070
- Knoflach, F., Hernandez, M.C., & Bertrand, D. GABAA receptor-mediated neurotransmission: Not so simple after all. Biochemical Pharmacology [Internet]. 2016; 115: 10-17. Disponible en: doi:10.1016/j.bcp.2016.03.014