

Efecto analgésico de Romero (*Rosmarinus officinalis*) en el modelo de formalina al 5%. Parte II

Elda Araceli García Mayorga,
Maureen Patricia Castro Lugo,
Lourdes Lizbeth Rocha Aguirre,
Rosalinda Gutiérrez Hernández,
Esteban Meza Lamas,
Nora de la Fuente de la Torre,
Ángel Sebastián Reyes Gutiérrez.

Universidad Autónoma de Zacatecas

Unidad Académica de Enfermería,
Unidad Académica de Medicina
Humana.

Correo electrónico:
emayorga3@hotmail.com.



Palabras clave: *Rosmarinus officinalis*, inflamación

Resumen

En artículo previo se evaluó el efecto analgésico de *Rosmarinus officinalis* como alternativa terapéutica para enfermedades, cabe mencionar que el modelo de evaluación de la formalina al 5% es un modelo que se describe como modelo de dolor inflamatorio, sabemos que el uso de plantas medicinales.

Rosmarinus officinalis se le han encontrado efectos antiinflamatorios (Caballero G.L. et al. 2016), el objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto antiinflamatorio, ya que en el artículo anterior se emiten resultados de la evaluación exclusivamente analgésica utilizando el extracto acuoso de romero (*Rosmarinus officinalis*) en esta parte del reporte de nuestros resultados se utilizó la prueba de ELISA para identificar ILs (interleucinas-6 y 9) como indicadores de inflamación. Dentro de la metodología, el extracto acuoso de romero, se administró “*ad libitum*” como agua de uso a diferentes concentraciones al 100, 70, 35, 20 y 10 mg /kg por 2 semanas en grupos de rata macho Wistar de 6 ± 2 animales, se realiza sangrados al inicio y cada semana para la obtención de suero para la identificación de IL-6 y 9. Como resultado se encontró una disminución de las interleucinas IL-9 e IL-6 proporcional con el incremento de la dosis de *Rosmarinus officinalis*.

Romero's analgesic effect (*Rosmarinus officinalis*) in the 5% formalin model. Part II

Summary

In the previous article the analgesic effect of *Rosmarinus officinalis* was evaluated as a therapeutic alternative for diseases, it is worth mentioning that the 5% formalin evaluation model is a model that is described as a model of inflammatory pain, we know that the use of medicinal plants.

Rosmarinus officinalis has been found anti-inflammatory effects (Caballero GL et al. 2016), the objective of the present study was to evaluate the anti-inflammatory effect, since in the previous article results of the exclusively analgesic evaluation are emitted using the rosemary aqueous extract (*Rosmarinus officinalis*) In this part of the report of our results, the ELISA test was used to identify ILs (interleukins-6 and 9) as indicators of inflammation. Within the methodology, the aqueous extract of rosemary, “*ad libitum*” was administered as water of use at different concentrations at 100, 70, 35, 20 and 10 mg / kg for 2 weeks in groups of male Wistar rat of 6 ± 2 animals, bleeding is performed at the beginning and every week to obtain serum for the identification of IL-6 and 9. As a result, a decrease in interleukins IL-9 and IL-6 was found proportional to the increase in the dose of *Rosmarinus officinalis*.

Keywords: *Rosmarinus officinalis*, inflammation.

Introducción

La inflamación es un proceso tisular constituido por una serie de fenómenos moleculares, celulares y vasculares de finalidad defensiva frente a agresiones físicas, químicas o biológicas. Los aspectos básicos que se destacan en el proceso inflamatorio son en primer lugar, la focalización de la respuesta que tiende a circunscribir la zona de lucha contra el agente agresor. La respuesta inflamatoria es inmediata, de urgencia y, por tanto, preponderantemente inespecífica, aunque puede favorecer el desarrollo posterior de una respuesta específica. El foco inflamatorio atrae a las células inmunes de los tejidos cercanos. Las alteraciones vasculares van a permitir, además, la llegada desde la sangre de moléculas inmunes (Gallin, JI. 1989; Roitt, IM et al., 1992).

Los aspectos básicos que se destacan en el proceso inflamatorio son la focalización de la respuesta, que tiende a circunscribir la zona de lucha contra el agente agresor, la respuesta inflamatoria es inmediata, de urgencia y por tanto, preponderantemente inespecífica, aunque puede favorecer el desarrollo posterior de una respuesta específica. El foco inflamatorio, por lo que lo anterior y las alteraciones vasculares permitirán la llegada desde la sangre de moléculas inmunes, y mediadores de la inflamación. La inflamación se ha considerado integrada por los cuatro signos: **calor, rubor, tumor y dolor**, la inflamación es producida por la actuación de determinados mediadores incluyendo IL-6. IL-9 (interleucina 6 y 9), además otras ILs, que actúan sobre las terminaciones nerviosas del dolor interleucina- 6 (IL-6) sus acciones promueven diferenciación de monocitos, aumenta número de plaquetas circulantes y proteínas reactivas de fase aguda. La IL-6 es la principal estimuladora de la producción de la

mayoría de las proteínas de fase aguda, proteína C-reactiva, amiloide sérico A, ceruloplasmina, haptoglobina, hemopexina, ferritina, algunas proteínas del sistema del complemento, diferentes proteínas de la cascada de la coagulación y del sistema fibrinolítico, etc. (11). La IL-6 es, junto con IL-1, TNF- α e interferón gamma, un regulador importante de la termogénesis corporal y su papel como pirógeno endógeno está ampliamente demostrado (Saavedra Ramírez et.al., 2011) IL-9 una linfocina polipeptídica glucosilada, con un peso molecular de 30.000 a 40.000. Secretada por células T activadas por IL-2, y tiene efectos in vitro promotores de crecimiento sobre las células cebadas. La comunicación entre células inmunes e inflamatorias es mediada en gran parte por proteínas llamadas interleucinas, que promueven crecimiento, diferenciación y activación celular (Oppenheim, J.J. et al., 2002).

II. *Rosmarinus officinalis*

El *Rosmarinus officinalis*, es una planta muy aromática que pertenece a la división: Embriophyta, clase: Dicotyledoneae, orden: Tubifloreae, familia: Labiatae (Koschier EH y Sedy, KA, 2003), género: *Rosmarinus* y especie: *officinalis* (Brouk, 1975). En nuestro país la conocemos comúnmente como Romero.

El romero es un arbusto perenne con hojas de unos 3.5 cm de longitud y 2-4 mm de anchura, rígidas, opuestas, sésiles, con los bordes doblados de color verde oscuro por el haz y plateado por el envés y de aspecto lanoso. El romero es nativo del Mediterráneo, pero puede crecer en cualquier lugar, especialmente en regiones con poca cantidad de agua, soleadas y con terrenos bien drenados. Se han sido aislados numerosos compuestos de la planta, tales como carnosol, rosma-

nol, isorosmanol, epirosmanol, rosmariquina, ácido carnósico, ácido ursólico y miltirona; aceite volátil esencial compuesto por monoterpenos tales como el 1,8-cineol (eucaliptol), borneol, pineno, canfeno, alcanfor, limoneno inalol, isobutilacetato, 3-octanona, terpineol, verbenol, etc. El contenido en aceites esenciales varía entre 1 a 2.5%. (Boutekedjiret, 2003).

Los efectos atribuidos al romero son múltiples, pudiéndose citar entre ellos los siguientes: antiasténico, antimigrañoso, antitusígeno, particularmente en tos rebelde, antiespasmódica, diurética, colerético, colagogo, emingago, antigonadotrópico, estimulante, hepatoprotector y hepatocurativo y estimulante de la memoria (Guerin et al., 1988). Es conocida la actividad antioxidante y antiinflamatoria de otras especies empleadas masivamente en la cocina, como la canela, pimienta, clavos de olor, orégano, romero, llantén; sin embargo, el efecto es dosis dependiente, donde la tolerancia es un factor de importancia en la adherencia al tratamiento. El reto está en incorporar el conocimiento generado, en el diseño de intervenciones dietarias, que permitan el logro de los objetivos asociados a la antiinflamación. (Caballero G.L. et al. 2016).

En este trabajo se plantea un modelo de daño experimental en rata inducido por formaldehído al 5% como estímulo de dolor-inflamatorio. Después, establecer la respuesta terapéutica utilizando una emulsión a diferentes concentraciones de un extracto acuoso de extracto total o a diferentes concentraciones de *Rosmarinus officinalis* y evaluar si la emulsión modula el proceso doloroso e inflamatorio con la identificación de las IL-s 6 y 9 mediante la técnica de ELISA analizando los sueros de los grupos con *Rosmarinus officinalis* a diferentes concentraciones y comparándolos con el grupo control e identificar una mejoría en el proceso inflamatorio poste-

rior a la administración del romero.

III. Objetivos

General: Evaluar la eficacia de *Rosmarinus officinalis* como analgésico-antiinflamatorio en rata en el modelo de la formalina al 5%.

Específicos:

1. Obtener el extracto acuoso total de romero y preparar las emulsiones a diferentes concentraciones 100, 70, 35, 20, 10 y mg/kg.
2. Evaluar el efecto de la emulsión del extracto acuoso de romero como analgésico-antiinflamatorio en suero identificándolo por la presencia de IL-6 e IL-9 en los diferentes grupos de ratas evaluadas.

IV. Material y métodos

Preparación del extracto acuoso de *Rosmarinus officinalis*

Inicialmente se realizará la obtención de extracto acuoso del romero y se dispondrá a hacer las emulsiones a diferentes concentraciones. El romero fue adquirido en un mercado local de la ciudad de México, D.F. identificado y clasificado como *Rosmarinus officinalis*. Las hojas se secaron en estufa convencional a temperatura de $37 \pm 0,2^\circ\text{C}$ durante 48 h. Al obtener las hojas se secarán a la sombra, a temperatura ambiente, y el extracto acuoso de hojas de romero se obtuvo sometiendo material vegetal seco a un proceso de extracción con etanol al 95% durante 48 h. Posteriormente fue concentrado en un rotavapor (Büchi R-124) y por último se liofilizó y almacenó a $4 \pm 0,2^\circ\text{C}$. El aceite esencial de romero se extrajo de las hojas deshidratadas, por destilación de arrastre con vapor de agua. El aceite obtenido se almacenó en

refrigeración a una temperatura de $4 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ hasta el momento de su uso. Para preparar los extractos acuosos, se tomaron 50 g de hojas verdes de las diferentes plantas adultas, se cortaron en trozos de 0,5 cm y se depositaron en un vaso de precipitado, luego se mezclaron con 200 ml de agua destilada y se dejaron remojar por 24 h. Al transcurrir el lapso, se trituraron en una licuadora durante 30 seg. La solución se filtró dos veces a través de papel de filtro N° 1. La solución obtenida fue considerada como estándar (100%); partiendo de esta solución y agregando agua destilada en cantidades adecuadas, se prepararon las siguientes concentraciones de 10, 20, 35, 70 y 100 mg. Adicionalmente se incluyó un testigo con agua destilada solamente. El extracto puro obtenido fue envasado en un frasco ámbar y colocado en un refrigerador (4°C) para su posterior uso (Vallejos Campos, 2017).

La metodología se estableció sobre la base del estudio del efecto antiinflamatorio, del extracto acuoso de romero, en un modelo de la formalina inducida con formaldehído al 5%, en donde se evaluará el patrón analgésico en la pata de la rata y la fase rápida aguda de dolor y la fase de dolor inflamatoria, para comprender el comportamiento de una planta con propiedades analgésicas y antiinflamatorias.

Se realizó el estudio, de manera comparativa con emulsiones de diferente concentración para evaluar la mejor concentración de extracto a utilizar.

Al investigar esto comparativamente, el resultado nos permitió elegir, en su caso, el tratamiento con mayor ventaja analgésica antiinflamatoria.

Administración de la emulsión del extracto acuoso de *Rosmarinus officinalis* por vía Oral por dos semanas a diferentes contracciones

A grupos de rata macho Wistar de 6 semanas de edad con un peso aproximado de 400 g, en grupos de 6 ± 2 animales, manteniendo cada grupo en una caja independiente, en el Bioterio del Área de Ciencias de la Salud de la UAZ, a temperatura ambiente, con ciclos de luz oscuridad de 12 h por 12 h.

Grupo	Rosmarinus	Tiempo de tratamiento	Evaluación	Resultados
1	Salina 0.9 %	Por 2 semanas	Evaluación con formalina 5 %	Resultados control
2	Rosmarinus 10 mg/kg	Por 2 semanas	Evaluación con formalina 5 %	Medición de IL-S
3	Rosmarinus 20 mg/kg	Por 2 semanas	Evaluación con formalina 5 %	Medición de IL-S
4	Rosmarinus 35 mg/kg	Por 2 semanas	Evaluación con formalina 5 %	Medición de IL-S
5	Rosmarinus 70 mg/kg	Por 2 semanas	Evaluación con formalina 5 %	Medición de IL-S
6	Rosmarinus 100 mg/kg	Por 2 semanas	Evaluación con formalina 5 %	Medición de IL-S

Modelo de la formalina

Posterior a la administración por 2 semanas de *Rosmarinus officinalis*, se evaluó con el modelo de la formalina es un modelo de dolor inflamatorio. La rata se coloca en una cámara de observación transparente de acrílico (Plexiglas) de 20 cm de diámetro y 30 cm de altura, durante 30 min para permitirle adaptarse al nuevo ambiente. Una vez transcurrido este tiempo se administran 50 μL de formaldehído al 5% vía subcutánea en la región dorsal de la pata posterior derecha, utilizándose una jeringa de 1 mL., con aguja calibre 30G. Posteriormente la rata se coloca nuevamente en el interior de la cámara de observación. En la parte trasera del cilindro se colocaron dos espejos de 30 X 30 cm formando un ángulo de 90° entre ellos para facilitar la observación de la pata inyectada. Inmediatamente,

después de la inyección del formaldehído, la rata mostrará una conducta nociceptiva manifestada como sacudidas de la pata. El número de sacudidas se registra por periodos de 5 minutos durante una hora. La formalina induce una respuesta bifásica, una **Fase I** aguda (del min 0 al min 10) o neurogénica seguida de un periodo corto de quiescencia (del min 10 al min 15), el cual es seguido de una respuesta inflamatoria tónica prolongada (del min 15 al min 60) o **Fase II**. La nocicepción se evalúa como el número de sacudidas y como el área bajo la curva (ABC) del curso temporal en cada fase. En este modelo la disminución en el número de sacudidas y en el valor de ABC se interpreta como efecto analgésico (Tjolsen et al., 1992). La aplicación de las diferentes concentraciones de romero en grupos independientes.

Valorar la actividad antiinflamatoria identificando IL-6 y 9 por el método de ELISA, Identificación de IL-s por método de ELISA

Los niveles de IL-6 e IL-9 se determinaron por un ensayo tipo ELISA mediante el siguiente proceso:

- 1.- Preparar todos los reactivos, la dilución estándar.
- 2.- Retire con tiras desecantes absorbibles de las micro-placas excesos de la placa y volver a precintar.
- 3.- Añadir 50µL. del diluyente de ensayo RD1-54 a cada pocillo.
- 4.- Añadir 50 µL. de estándar, control o muestra por pocillo. Mezclar golpeando suavemente el marco de la placa durante 1 minuto. Cubrir con la tira adhesiva suministrada. Incubar durante 2 horas a temperatura ambiente.
- 5.- Aspirar cada pocillo y lavar, repitiendo el proceso cuatro veces para un total de cinco lavados. Lave llenando cada pocillo con buffer de lavado (400 µl.) utilizando

una jeringa, dispensador de colector o autolavador. La eliminación completa del líquido en cada paso es esencial para un buen rendimiento. Después del último lavado, eliminar cualquier resto de buffer de lavado por aspiración o decantación. Invierta la placa y borrar contra papel de secado.

6.- Añadir 100 µl. de conjugado de rata IL-9 e IL-6 a cada pocillo. Cubrir con una nueva tira adhesiva. Incubar durante 2 horas a temperatura ambiente.

7.- Repetir la aspiración / lavado como en el paso 5.

8.- Añadir 100 µl. solución de sustrato de a cada pocillo. Incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente. Proteger de la luz.

9.- Añadir 100 µl. de solución de parada a cada pocillo. Golpee suavemente la placa para que se mezcle bien.

10.- Determinar la densidad óptica de cada pocillo en 30 minutos. Usando un lector de microplacas ajustado a 450 nm. Si la corrección de longitud de onda está disponible. Ajustado a 540 nm o 570 nm. Si la corrección de longitud de onda no está disponible. Restar la lectura a 540 nm. o 570 nm. de las lecturas a 450 nm. Esta resta corregirá la imperfección óptica en la placa. Lectura hecha directamente a 450 nm., sin corrección puede ser más alta y menos precisa (Quantikine ELISA Rat IL-9 immunoassay R&D Systems). La absorbancia a 450 nm se determinó por espectrofotometría con lector de placas (Sensident Scan, Merck, Alemania). El límite de detección del ensayo fue de 25 pg/mL, por lo que los valores inferiores a esta concentración se consideraron indetectables.

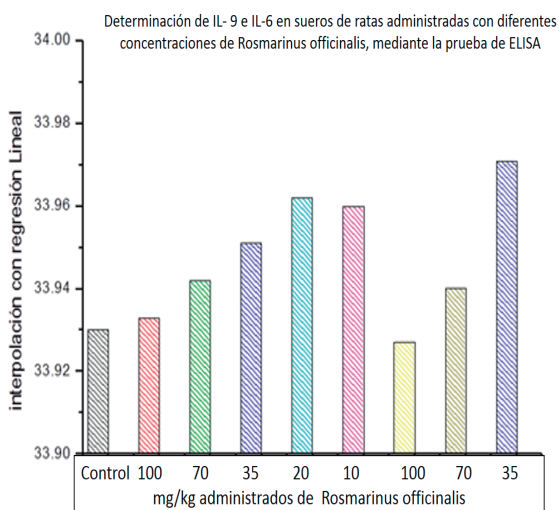
Análisis estadístico

Los resultados serán evaluados estadísticamente, en donde todos los datos se expresarán como media ± ESM. Se realiza la regresión lineal con las lecturas de la

densidad óptica de los sueros analizados y se realiza el cálculo para la concentración de IL-6 e IL-9 obtenidas en los sueros de los grupos tratados con *Rosmarinus officinalis* y hacer la correlación clínica con el proceso inflamatorio.

V. Resultados

La evaluación de la inflamación se realizó con la técnica arriba descrita de ELISA. En la Grafica 1, se muestran los datos de interpolación de lectura de la técnica para identificación de IL-9, el numero 1 corresponde al grupo control, de 2 al 9 corresponde a las concentraciones administradas de romero dosis desde 10 hasta 100 mg/kg con incrementos de (10, 20, 35, 70 y 100 mg/kg).



Grafica 1. Datos de interpolación de lectura de la técnica de ELISA para identificación de IL-9, el numero 1 corresponde al grupo control, de 2 al 6 corresponde a las concentraciones administradas de romero dosis desde 100 hasta 10 mg/kg con incrementos de (100, 70, 35, 20 y 10 mg/kg). Las columnas 7, 8 y 9 corresponden a los valores de IL-6, muestras de suero de los grupos de ratas con romero a concentración de 100, 70 y 35 mg, analizados por la técnica de ELISA, donde se observa un incremento de la lectura de D.O. y sometida a regresión lineal.

En los resultados de la prueba de ELISA, Para IL-6 se encontraron diferencias, entre las muestras del grupo control con respecto a los sueros de los grupos de ratas que se les administró romero a dosis desde 35 hasta 100 mg/kg con dosis específicas de (100, 70, 35 mg/kg) barras 7, 8 y 9 de la gráfica 1. Para IL-9, en la gráfica 1 barras de 1 a 6, los niveles de IL-9 se fueron incrementando conforme disminuyó la concentración administrada de *Rosmarinus officinalis*, lo que habla de un incremento de la IL-9 inversamente proporcional a la concentración de *Rosmarinus officinalis*, interpretada como un efecto antiinflamatorio de la planta en relación a su concentración y la participación de la IL-9 en el proceso inflamatorio.

VI. Discusión

Emami F. y cols., describen que el extracto hidroalcohólico de *Rosmarinus officinalis* y su constituyente carnosol inhiben el dolor inducido por formalina y la inflamación en los ratones. Describen propiedades anti-inflamatorias y antinociceptivos de ambos en ratones machos NMRI, se han evaluado en su presente estudio, resultados similares a los datos mostrados en este trabajo, Emami F. y cols.

Takaki I. y cols., describen los efectos antiinflamatorios y antinociceptivos (analgésicos) del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* en modelos animales experimentales, las hojas de romero se utilizan para la condimentación de alimentos y se han utilizado en la medicina popular para muchas condiciones; tienen antiespasmódico, analgésico, antirreumático, carminativo, colagogo, diurético, expectorante, y los efectos antiepilépticos. El objetivo de este estudio fue evaluar los efectos del

aceite esencial de romero en modelos experimentales de la nocicepción y la inflamación en animales. El efecto antiinflamatorio de romero se evaluó por volumen de exudado inflamatorio y la migración de leucocitos en la pleuresía inducida en el modelo de prueba de edema inducido por carragenina en ratas. La antinocicepción se evaluó utilizando la contorsión inducida por ácido acético y las pruebas de la placa caliente en ratones. *Rosmarinus officinalis* (500 mg/kg) redujo significativamente el volumen de exudado pleural y disminuyó ligeramente el número de células que habían migrado en comparación con los animales de control. A dosis de 250, 500 y 750 mg/kg, *Rosmarinus officinalis* inhibe significativamente el edema inducido por carragenina 1 a 4 horas después de la inyección del agente phlogístico. En la prueba de la placa caliente, la administración de romero (125, 250, y 500 mg/kg) mostró efectos anodinos sobre la latencia de respuesta, mientras que la inyección de control de la meperidina indujo efectos antinociceptivos significativos, la dosis de 70, 125 y 250 mg/kg tuvo un efecto antinociceptivo significativo en el ensayo de retorcimiento abdominal inducida por ácido acético en comparación con los animales de control. Estos datos sugieren que *Rosmarinus officinalis* posee actividad antinociceptiva antiinflamatoria y periférica.

Se conoce ampliamente según se refiere en el artículo de Vilá y cols., la IL-6 como marcador de inflamación sistémica en algunas patologías, refiere a los en pacientes con enfisema por deficiencia de alfa-1-antitripsina, Vilá y cols., mencionan la importancia de la cuantificación de la interleucina 6 en suero como mediador de inflamación sistémica en pacientes con deficiencia de alfa-1-antitripsina. Comparando los resultados en nuestro trabajo al realizar la prueba de ELISA para la determinación de IL-6

como marcador de inflamación no se encontró identificación diferente a los valores normales de IL-6, por lo que IL-6 no se identifica como un mediador importante de inflamación sistémica (Gráficas no mostradas) por lo que se concluye que *Rosmarinus officinalis*, no tiene al menos en este protocolo de administración un efecto antiinflamatorio, solo analgésico en base a los resultados, No así con la IL-9 que se muestra un incremento dependiente de la dosis que nos habla de la participación de la IL.9 en el proceso inflamatorio generado por el modelo de la formalina al 5% .

Mercado-Mercado y cols., mencionan que las especias tienen actividad antiinflamatoria, tanto en estudios in vitro e in vivo han demostrado que tanto extractos de especias picantes como los compuestos puros (curcumina, eugenol y capsaisina) presentan actividad antiinflamatoria. Diferentes estudios han demostrado que la administración de una dosis única de estos compuestos reduce hasta en un 52% la inflamación inducida por carragenanos en ratas. Actualmente estos compuestos son utilizados de manera comercial en la formulación de cremas y pastillas para el tratamiento de artritis, dolores musculares y como analgésicos odontológicos.

VII. Conclusiones

Se concluye que, sí existe participación de las interleucinas IL-6 e IL-9, en el proceso analgésico-antiinflamatorio y que existe una remisión de las interleucinas arriba mencionadas en animales tratados con *Rosmarinus officinalis*, por lo que se corrobora lo que otros autores mencionan en relación a el efecto analgésico antiinflamatorio de la planta en el modelo utilizados en este trabajo.

Referencias bibliográficas

1. Boutekedjiret C., Bentahar F., Belabbes R. and Bessiere J. M., Extraction of rosemary essential oil by steam distillation and hydrodistillation (2003), Article first published online: 1 oct. 2003, DOI: 10.1002/ffj.1226. Copyright © 2003 John Wiley & Sons, Ltd.
2. Brouk A.C. 1975. Plants consumed by man. London: Academia Press.
3. Caballero-Gutiérrez Lidia, Gonzáles Gustavo F., Alimentos con efecto anti-inflamatorio Acta Med Peru. 2016;33(1):50-64.
4. Dray A., Dickenson A.H., Besson J.M. (1997). Peripheral mediators of pain. In: The pharmacology of pain. Berlin: Springer-Verlag. p.p. 21-41.
5. Emami F1, Ali-Beig H1, Farahbakhsh S1, Mojabi N2, Rastegar-Moghadam B1, Arbaian S1, Kazemi M2, Tekieh E2, Golmanesh L2, Ranjbaran M2, Jalili C3, Noroozadeh A4, Sahraei H., Hydroalcoholic extract of Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) and its constituent carnosol inhibit formalin-induced pain and inflammation in mice., Pak J Biol Sci. 2013 Apr 1;16(7):309-16.
6. Gallin, JI. Inflammation. En: Paul, WE. (Ed.) Fundamental Immunology. Raven Press, New York, 1989: 721-733.
7. González-Trujano ME, Peña EI, Martínez AL, Moreno J, Guevara-Fefer P, Déciga-Campos M, López-Muñoz FJ. Evaluation of the antinociceptive effect of *Rosmarinus officinalis* L. using three different experimental models in rodents. J Ethnopharmacol. 2007 May 22; 111(3):476-82. Epub 2006 Dec
8. Guyton A.C. (1977), Sensaciones somáticas: II. Dolor, dolor visceral, cefalea y temperatura. En tratado de fisiología médica, 5ª. edición, México, D.F. Ed. Interamericana, 662-677.
9. Koschier, EH; Sedy, KA (2003). Aceites esenciales labiate que afectan la selección anfitriona y la aceptación de los trips, tabaci Lindeman . Crop Prot. 22, 929-934.
10. Lucarini R, Bernardes WA, Ferreira DS, Tozatti MG, Furtado R, Bastos JK, Pauletti PM, Januário AH, Silva ML, Cunha WR. In vivo analgesic and anti-inflammatory activities of *Rosmarinus officinalis* aqueous extracts, rosmarinic acid and its acetyl ester derivative. Pharm Biol. 2013 Sep;51(9):1087-90. doi: 10.3109/13880209.2013.776613. Epub 2013 Jun 5.

11. Male, DK; Champion, B; Cooke, A; Owen, M. Cell troffic and inflammation. En: Advance Immunology. 2ª ed. Ed Gower London-New York 1991.
12. Martínez Beltrán, M. Valoración de la lesión medular traumática mediante espectroscopia de RMN de protones (ERMNH1) Estudio experimental. Tesis Doctoral. Universidad de Granada. Junio, 1992.
13. Mercado-Mercado Gilberto, Laura de la Rosa Carrillo, Abraham Wall-Medrano, José Alberto López Díaz y Emilio Álvarez-Parrilla, Compuestos polifenólicos y capacidad antioxidante de especias típicas consumidas en México Rev Nutr Hosp. 2013;28 (1):36-46, ISSN 0212-1611, CODEN NUH0EQ, S.V.R. 318.
14. Millan M. J. (1999). The induction of pain: an integrative review. Prog Neurobiol 57, 1-164 [Review providing a global account of of mechanisms involved in the induction of pain with particular attention focused on cellular aspects and on consequences of peripheral nerve injury].
15. Quantikine ELISA Rat IL-9 immunoassay R&D Systems.
16. Roitt, IM; Brostoff, J; Male, DK: Inmunología. 2ª ed. Barcelona: Salvat, 1992.
17. Saavedra Ramírez Giovanni, Vásquez Duque Gloria María, González Naranjo Luis Alonso, (2011). Interleucina-6: ¿amiga o enemiga? Bases para comprender su utilidad como objetivo terapéutico, ATREIA Vol 24(2) junio 2011, pp157.
18. Takaki I, Bersani-Amado LE, Vendruscolo A, Sartoretto SM, Diniz SP, Bersani-Amado CA, Cuman RK. Anti-inflammatory and antinociceptive effects of Rosmarinus officinalis L. essential oil in experimental animal models. J. Med Food. 2008 Dec;11(4):741-6. doi: 10.1089/jmf.2007.0524.
19. Tjolsen A., Berge O.G., Hunskaar S., Rosland J.H. and Hole K. (1992). The formalin test: an evaluation of the method, Pain, 51(1):5-17.
20. Vallejos Campos Elmer (2017). EFECTO ANTIFÚNGICO in vitro DEL EXTRACTO ACUOSO DE Rosmarinus officinalis "ROMERO" CONTRA Candida albicans, Tesis para obtener el título de Cirujano Dentista. 2017, pp 37.
21. Vilà S., M. Miravittles, F. Camposa, C. de la Roza, R. Seguraa, F. Morell y R. Vidal, Importancia de la medición de la interleucina 6 en suero como mediador de inflamación sistémica en pacientes con deficiencia de alfa-1-antitripsina. Arch Bronconeumol 2002;38(6):263-6.
22. Weissmann G. (1992). Inflammation En: Basic Principles and Clinical correlates. Gallin J. I., Goldstein I.M. and Snyderman R. (Ed.). Raven Press, Usa. Second edition, 5-9.