



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS**



---

**FACULTAD DE MEDICINA  
SECRETARÍA DE DOCENCIA  
JEFATURA DE POSGRADO**

**Evaluación del efecto antinociceptivo de fosfoserinas  
 $\alpha$ -metiladas en roedores**

**TESIS**

**PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA EN:**

**MEDICINA MOLECULAR**

**QUE PRESENTA:**

**MÉD. CIR. JESSICA RAQUEL RODRÍGUEZ GIL**

**DIRECTORES DE TESIS:**

**DRA. GABRIELA CASTAÑEDA CORRAL**

**DR. JUAN JOSÉ ACEVEDO FERNÁNDEZ**

Cuernavaca, Morelos, México a 25 Marzo del 2021

## **Lugar y fecha de realización**

El presente proyecto se realizó de febrero del 2019 a enero del 2021 en el laboratorio de Farmacología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

## **Miembros del comité tutorial**

<b>Tutores principales:</b>	Dra. Gabriela Castañeda Corral
	Dr. Juan José Acevedo Fernández
<b>Tutor personal:</b>	Dr. Jesús Santa-Olalla Tapia
<b>1er vocal:</b>	Dr. José Luis Viveros Ceballos
<b>2º vocal:</b>	Dra. Vera Lucia Petricevich

## **Miembros del jurado de examen**

<b>Presidente:</b>	Dr. Jesús Santa-Olalla Tapia
<b>Secretario:</b>	Dr. Mario Ordoñez Palacios
<b>1er vocal:</b>	Dr. Iván Omar Romero Estudillo
<b>2º vocal:</b>	Dr. Juan José Acevedo Fernández
<b>3er vocal:</b>	Dra. Gabriela Castañeda Corral

### **Agradecimientos por el financiamiento**

Para la realización del presente proyecto se contó con el apoyo de la **beca de maestría No. 960781** otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT).

Este proyecto fue parcialmente financiado por el proyecto Ciencia de Frontera No. 140607 otorgado por CONACyT.

## DEDICATORIAS

### **A mi familia**

Michelle, mamá y papá, gracias por todo su amor y su apoyo a lo largo de mis proyectos de vida. Ustedes 3 son las personas más importantes para mí en el mundo entero. Sé que en todo momento de mi vida puedo contar con ustedes. Mamá, te agradezco por todas las enseñanzas que me brindas todos y cada uno de los días, gracias por enseñarme a ser fuerte, a ser una persona autosuficiente, a dar lo mejor de mí y a no darme por vencida. Papá, te agradezco por toda la confianza ciega que siempre pones en mí, por ser incondicional ante todo, porque sé que en cualquier momento y en cualquier lugar que te necesite, siempre vas a estar ahí. Gracias por celebrar todos mis logros. Michelle, gracias por ser el apoyo más grande de mi vida. Dios no me pudo dar una mejor hermana que tú. Eres mi mejor amiga y mi razón de seguir adelante y ser mejor cada día. Gracias por hacerme feliz con tus bromas, por compartir conmigo cosas interesantes, bonitas y divertidas. Eres la persona que más quiero en el mundo y espero seguir celebrando tus logros. Estoy confiada en que me seguirás haciendo que me sienta orgullosa de ti.

*“Mi motivación principal es ayudar a mi familia, lo cual no es una mala razón para levantarse por la mañana. Siempre ha sido mi motivación: cuidar a las personas que confían en mí”*

*Tony Parsons*

## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecer a la **Dra. Gaby Castañeda**, por permitirme ser parte de su equipo de trabajo en el laboratorio. Gracias por enseñarme y apoyarme tantísimo en estos largos 2 años. Durante este tiempo, me brindo la confianza suficiente para poder lograr más de lo que alguna vez pensé que sería capaz. Gracias por sus enseñanzas, no solo a nivel profesional, sino también personal. Es una persona a la que admiro muchísimo en todos los aspectos y me alegro de haber podido aportar mi granito de arena al gran trabajo que realiza en el laboratorio.

A mis compañeros de laboratorio con los que tuve el placer de trabajar. **Norma**, mi mejor compañera de laboratorio, mi roomie, mi gran amiga, gracias por todo lo que me ayudaste a superar a lo largo de la maestría. Sabes bien que de no ser por ti, no hubiese llegado hasta este punto. Tú mejor que nadie sabes lo que nos ha costado. Gracias por estar siempre dispuesta a dar una mano cuando se necesita, a ser responsable, luchona como la Chona. Por los viajes, por las bromas, por las risas, por las comidas juntas, por las salidas, por las lecciones para ser fuerte, que bastante me van a ayudar en esta nueva etapa de mi vida. Estoy segura de que a donde sea que vayas, llevarás la marca del laboratorio 9, que nos ha enseñado a dar siempre un extra, y que eso te ayudará a resaltar en cualquier lugar en el que te presentes. ¡Sigue adelante, tienes mucho por ofrecer! A **Juanita**, gracias por todas las enseñanzas en el laboratorio, lo conoces como la palma de tu mano. El objetivo de dolor neuropático no lo hubiese sacado adelante sin tu ayuda. Gracias por las risas, por las pláticas variocolor que me enseñaron más de lo que hubiese imaginado, *if you know what I mean*. Nunca olvidaré las caras graciosas que pones cuando platicamos sobre temas extravagantes. Eres el sello del laboratorio 9. A **Misa**, que desde un principio fuiste un guía para mí, que jamás antes me había adentrado en un laboratorio, me ayudaste a familiarizarme con todas las herramientas de las que disponemos. Gracias por tu paciencia, por hacerme sonreír, por ser un liberador de estrés con tus abrazos. Sé que saldrás adelante ahora en el doctorado. Espero saber de tus próximos triunfos muy pronto. A **Rosy, Antares y Richard**. Pasar el tiempo con ustedes ha sido muy divertido. Durante este tiempo han demostrado tener madera suficiente para formar parte del laboratorio 9. No me queda más que desearles lo mejor en el camino que les queda por recorrer. Sigán adelante, no se den por vencidos, confío en que pueden alcanzar sus metas y demostrarle al mundo de que están hechos. Gracias por mantenerse fieles a sus convicciones. Esa fortaleza los ayudará a superar todas las adversidades. A **Eli** y al **Dr. Acevedo**, por ser como unos padres para todo el laboratorio, por estar siempre al pendiente de nosotros, por hacernos sentir como una familia más grande. Gracias al equipo administrativo de posgrado de la Facultad de Medicina, a la **Srita. Ime**, a la **bióloga Nancy del bioterio** y a los policías que nos acompañaron siempre.

A mis fieles amigos, **Toñita, Fer, Yabal, Eusebio, Mateo, Meri, Gerson, Masiel, Dani, Karen**, gracias por siempre estar al pendiente de mí, de hacerme saber que siempre puedo contar con ustedes, que aún en la distancia y el tiempo, ustedes siempre estarán ahí para dar una mano. Gracias por creer en mí, cuando yo misma no he sido capaz de hacerlo. A mis familiares, **mis abuelitos Chayo, Gil y Raquelito, mi tío Pedro**. Ustedes me ayudaron a iniciar este largo camino, que me ha llenado de aprendizaje y que me ayudará a seguir superándome en mi vida. Muchas gracias.

## RESUMEN

**Antecedentes:** El dolor es un problema de salud pública y la principal causa de sufrimiento a nivel mundial. Es por esto que se ha establecido como un derecho humano el tratamiento del dolor en aquellos que lo padecen. La piedra angular del tratamiento del dolor es la terapia farmacológica que incluye principalmente a los AAINEs y a los analgésicos opioides, así como una gran diversidad de fármacos coadyuvantes. Sin embargo, a pesar de la amplia gama de aproximaciones terapéuticas estas no logran aliviar el dolor por completo, ya sea por falta de eficacia o porque sus efectos adversos limitan su uso. Es por ello que surge la necesidad de buscar nuevas opciones terapéuticas que sean eficaces y seguras, con la finalidad de complementar o reemplazar las terapéuticas actuales. Una de las alternativas es la síntesis química de nuevos fármacos. En este contexto, los  $\alpha$ -aminofosfonatos son moléculas con un gran potencial bioactivo que recientemente han atraído el interés como potenciales agentes antiinflamatorios y analgésicos. En particular las fosfoferinas  $\alpha$ -metiladas, sintetizadas previamente por nuestro grupo de investigación, han mostrado tener efectos antiinflamatorios prometedores por lo que nuestra hipótesis es que también pudieran mostrar efecto analgésico. Con base en lo anterior el **objetivo** del presente trabajo fue evaluar el efecto antinociceptivo de las fosfoferinas  $\alpha$ -metiladas en tres modelos animales de dolor uno de dolor visceral, uno de dolor inflamatorio y uno de dolor neuropático. **Materiales y métodos:** Para evaluar el efecto antinociceptivo de las fosfoferinas  $\alpha$ -metiladas se utilizó el modelo de estiramiento abdominal inducido con ácido acético; el modelo de la formalina y el modelo de dolor neuropático inducido axotomía parcial del nervio ciático en ratones de la cepa CD1. **Resultados:** En el modelo de dolor visceral se encontró que todas las fosfoferinas  $\alpha$ -metiladas evaluadas tienen efecto antinociceptivo moderado con un rango de eficacia máxima entre  $35.7 \pm 7.5\%$  y  $67.8 \pm 3.5\%$ , siendo los compuestos 1E y 2B las más efectivas. En el modelo de la formalina se encontró que las fosfoferinas 1A, 1D, 1E y 1F produjeron un efecto antinociceptivo dependiente de la dosis con un rango de eficacia entre  $33.7 \pm 9.1\%$  y  $59.7 \pm 7.9\%$ , siendo 1F y 1D las más eficaces y más potentes que Diclofenaco. En el modelo de dolor neuropático, se encontró que las fosfoferinas 1D, 1E y 1F, pero no 1A, mostraron un efecto antialodínico con un rango de eficacia máxima entre  $15.4 \pm 2.2\%$  a  $60.1 \pm 5.2\%$ , siendo 1E y 1F más potentes que Gabapentina. **Conclusión:** La mayoría de las fosfoferinas  $\alpha$ -metiladas mostraron efecto antinociceptivo moderado y dependiente de la dosis en tres modelos animales, uno de dolor visceral, uno de dolor inflamatorio y uno de dolor neuropático. Estos resultados en conjunto sugieren que las fosfoferinas  $\alpha$ -metiladas son moléculas prometedoras para seguirse estudiando como potenciales agentes analgésicos.

# ÍNDICE

INDICE DE FIGURAS.....	7
INDICE DE TABLAS.....	9
ABREVIATURAS.....	10
1. INTRODUCCIÓN.....	12
1.1. Dolor.....	12
1.1.1 Nocicepción.....	12
1.1.2. Clasificación del dolor.....	18
1.1.3. El dolor como un problema de salud pública.....	26
1.1.4. Tratamiento farmacológico del dolor.....	27
1.1.5. Modelos animales de dolor.....	38
1.2. Antecedentes específicos.....	44
1.2.1. $\alpha$ -Aminofosfonatos.....	44
1.2.2. La importancia de los ácidos $\alpha$ -aminofosfónicos en el desarrollo de nuevos fármacos.....	45
1.2.3. Potencial biológico de los $\alpha$ -aminofosfonatos.....	46
1.2.4. Actividad anti-inflamatoria y antinociceptiva de los $\alpha$ -aminofosfonatos.....	48
1.2.5. Toxicidad.....	53
2. JUSTIFICACIÓN.....	54
3. HIPÓTESIS.....	55
4. OBJETIVOS.....	55
4.1. Objetivo general.....	55
4.2. Objetivos particulares.....	55
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	56
5.1. Animales.....	56
5.2. Fármacos y sustancias utilizadas.....	56
5.3. Evaluación del efecto antinociceptivo y analgésico de las fosfoferinas $\alpha$ -metiladas.....	57
5.3.1. Modelo de estiramiento abdominal.....	57
5.3.2. Modelo de formalina.....	58
5.3.3. Modelo de dolor neuropático inducido por la axotomía parcial del nervio ciático.....	60
5.3.4. Medición de la alodinia mecánica.....	61
5.4. Análisis estadístico.....	63
6. RESULTADOS.....	64
6.1. Efecto antinociceptivo de las fosfoferinas $\alpha$ -metiladas 1A, 1B, 1C, 1D, 1E, 1F, 2B y 2C en un modelo de dolor visceral.....	64
6.2. Efecto antinociceptivo de las fosfoferinas $\alpha$ -metiladas 1A, 1D, 1E y 1F en un modelo de dolor inflamatorio.....	73
6.3. Efecto antialodínico de las fosfoferinas $\alpha$ -metiladas 1A, 1D, 1E y 1F en un modelo de dolor neuropático.....	80
7. DISCUSIÓN.....	88
7.1. Modelo de dolor visceral.....	88

7.2. Modelo de la formalina.....	90
7.3. Modelo de dolor neuropático.....	91
7.4. Efecto antinociceptivo y antialodínico de las fosfoferinas $\alpha$ -metiladas .....	93
8. CONCLUSIONES.....	96
9. PERSPECTIVAS .....	97
10. REFERENCIAS .....	98

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Anatomía del nociceptor.....	13
Figura 2. Médula espinal.....	15
Figura 3. Nocicepción.....	18
Figura 4. Dolor inflamatorio.....	20
Figura 5. Dolor neuropático.....	23
Figura 6. Mecanismo de acción de los AAINEs.....	31
Figura 7. Clasificación de los opioides por su actividad intrínseca y potencia.....	34
Figura 8. Mecanismo de acción de los opioides.....	36
Figura 9. Estructura química de los $\alpha$ -aminoácidos naturales y los $\alpha$ -aminofosfonatos.....	45
Figura 10. Método de Kabachnik-Fields.....	46
Figura 11. Diseño experimental de la evaluación del efecto antinociceptivo de las diferentes fosfoferinas $\alpha$ -metiladas en el modelo de estiramiento abdominal inducido por ácido acético.....	58
Figura 12. Diseño experimental de la caracterización del modelo de dolor inflamatorio inducido por formalina.....	59
Figura 13. Diseño experimental de la evaluación del efecto antinociceptivo de las diferentes fosfoferinas $\alpha$ -metiladas en el modelo de dolor inflamatorio inducido por formalina.....	60
Figura 14. Diseño experimental de la evaluación del efecto antinociceptivo de las diferentes fosfoferinas $\alpha$ -metiladas en el modelo de dolor neuropático inducido por la axotomía parcial del nervio ciático.....	63
Figura 15. Caracterización de la conducta nociceptiva de estiramientos abdominales producidos por la administración intraperitoneal de ácido acético al 0.6%.....	65
Figura 16. Efecto antinociceptivo de Diclofenaco en el modelo de estiramiento abdominal.....	66
Figura 17. Efecto antinociceptivo de las fosfoferinas $\alpha$ -metiladas 1A, 1B y 1C en el modelo de estiramiento abdominal.....	67
Figura 18. Efecto antinociceptivo de las fosfoferinas $\alpha$ -metiladas 1D, 1E y 1F en el modelo de estiramiento abdominal.....	69
Figura 19. Efecto antinociceptivo de las fosfoferinas $\alpha$ -metiladas 2B y 2C en el modelo de estiramiento abdominal.....	70
Figura 20. Curva dosis respuesta de las fosfoferinas $\alpha$ -metiladas 1E, 2B, 1F y 1C en el modelo de estiramiento abdominal.....	72
Figura 21. Estandarización y validación del modelo de formalina.....	75
Figura 22. Efecto antinociceptivo de las fosfoferinas 1A y 1D en el modelo de dolor inducido por formalina.....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>

Figura 23. Efecto antinociceptivo de las fosfoserinas 1E y 1F en el modelo de dolor inducido por formalina. ....	78
Figura 24. Curva dosis respuesta del efecto antinociceptivo de las fosfoserinas $\alpha$ -metiladas 1A, 1D, 1E y 1F en el modelo de la formalina en ratón. ....	79
Figura 25. Efecto del vehículo en el curso temporal de la alodinia mecánica inducida por axotomía parcial del nervio ciático. ....	81
Figura 26. Efecto antialodínico de Gabapentina en el modelo de dolor neuropático inducido por axotomía parcial del nervio ciático. ....	82
Figura 27. Efecto antialodínico de las fosfoserinas $\alpha$ -metiladas 1A y 1D en el modelo de dolor neuropático inducido por axotomía parcial del nervio ciático. ....	83
Figura 28. Efecto antialodínico de las fosfoserinas $\alpha$ -metiladas 1E y 1F en el modelo de dolor neuropático inducido por axotomía parcial del nervio ciático. ....	85
Figura 29. Curvas dosis respuesta del efecto antialodínico de las fosfoserinas $\alpha$ -metiladas 1A, 1D, 1E y 1F en el modelo de dolor neuropático inducido por axotomía parcial del nervio ciático. ....	86

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de las fibras aferentes primarias..	14
Tabla 2. Clasificación de los AAINEs	29
Tabla 3. Principales efectos adversos de los AAINEs sobre órganos y sistemas.....	32
Tabla 4. Principales efectos adversos de los opioides en órganos y sistemas. ....	38
Tabla 5. Compuesto EAB-318. $\alpha$ -aminofosfonato con efecto neuroprotector en un modelo <i>in vitro</i> .....	47
Tabla 6. Compuestos 4a, 4b y 4c. $\alpha$ -aminofosfonatos con efecto anti-inflamatorio en un modelo <i>in vivo</i> ..	48
Tabla 7. Compuestos 19a, 19b y 19c. $\alpha$ -aminofosfonatos con efecto anti-inflamatorio y analgésico en modelos <i>in vivo</i> ..	49
Tabla 8. Estructura química de las fosfoserinas $\alpha$ -metiladas..	50
Tabla 9. Eficacia máxima, DE <sub>50</sub> y potencia relativa de una serie de diez fosfoserinas $\alpha$ -metiladas. ....	52
Tabla 10. Eficacia y potencia de las fosfoserinas $\alpha$ -metiladas en el modelo de dolor visceral. ....	73
Tabla 11. Eficacia y potencia de las fosfoserinas $\alpha$ -metiladas en el modelo de dolor inflamatorio. ....	80

## ABREVIATURAS

µg	Microgramos
5-HT	Serotonina
AAINEs	Analgésicos anti-inflamatorios no esteroideos
ABC	Área bajo la curva
AMPA	Ácido α-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropinoico
ATP	Adenosín trifosfato
BDNF	Factor neurotrófico derivado del cerebro
BK	Bradicinina
C	Carbono
Ca <sup>2+</sup>	Ion calcio
CGRP	Péptido relacionado con el gen de calcitonina
COX	Ciclooxigenasas
DE <sub>30</sub>	Dosis efectiva 30
G	Gramos
GABA	Ácido gama-aminobutírico
H <sup>+</sup>	Ion hidrógeno
i.p.	Intraperitoneal
IASP	Asociación Internacional para el Estudio del Dolor
IC <sub>50</sub>	Concentración inhibitoria 50
IL-1β	Interleucina 1β
IL-2	Interleucina 2
mg/kg	Miligramos por kilogramo
MOR	Receptor opioide μ
N	Nitrógeno
NA	Noradrenalina
Na <sup>+</sup>	Ion sodio
Na <sub>v</sub>	Canales de sodio dependientes de voltaje
NGF	Factor de crecimiento neural
NK	Neurikinina
NMDA	Ácido N-metil-D-aspartato
NOM	Norma Oficial Mexicana
OMS	Organización Mundial de la Salud
P	Fósforo
P2X	Canales iónicos purinérgicos
SGPA	Sustancia gris periacueductal
PG	Prostaglandinas
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandina E2

PKA	Proteína cinasa A
PKC	Proteína cinasa C
RVM	Médula rostral ventromedial
SIN	Axotomía parcial de nervio ciático
SP	Sustancia P
TNF- $\alpha$	Factor de necrosis tumoral $\alpha$
trkA	Receptores neurotróficos de tirosin cinasa A
TRPA1	Receptor de potencial transitorio de ankirina 1
TRPV1	Receptor de potencial transitorio vaniloide 1
VGCC	Canales de calcio dependientes de voltaje
VGSC	Canales de sodio dependientes de voltaje

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. Dolor

El dolor es definido por la Asociación Internacional para el Estudio del Dolor (IASP, *por sus siglas en inglés*) como una experiencia emocional y sensorial desagradable asociada con, o que se asemeja a una lesión tisular real o potencial, o descrita en términos de dicho daño (1).

En esta definición se distinguen dos componentes importantes. El componente emocional, que hace del dolor una experiencia subjetiva que varía de individuo a individuo y que se ve afectado por las experiencias previas, la cognición, la conducta y los factores socioculturales del individuo que padece dolor (2). Por otro lado, al componente fisiológico del dolor se le conoce como nocicepción.

### 1.1.1 Nocicepción

La nocicepción se refiere al proceso neural que recibe, transmite, integra y responde ante los estímulos potencialmente dañinos (estímulos nocivos) (3). Uno de los componentes anatómicos más importantes de la nocicepción son los nociceptores. Estos son neuronas aferentes primarias con un umbral de activación alto, es decir, que solo responden a estímulos de gran intensidad (4). Los nociceptores son neuronas pseudounipolares cuyo soma se localiza en los ganglios de la raíz dorsal. Del soma surge un axón que bifurca en una terminación periférica que inerva a los tejidos, y una terminación central que se dirige hacia el asta dorsal de la médula espinal (3) (Figura 1).

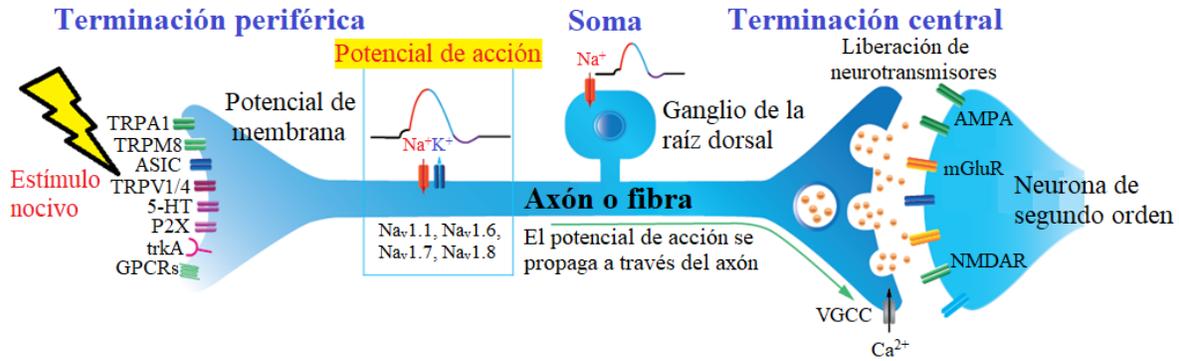


Figura 1. Anatomía del nociceptor. Se observan las diferentes partes del nociceptor (azul). La terminación periférica inerva los diferentes tejidos y expresa una gran variedad de receptores de membrana (p ej. TRPA1, TRPM8, ASICs, TRPV1, 5-HTR, GPCRs) que se activan por mediadores pro-algésicos y pro-inflamatorios que se liberan como consecuencia del estímulo nocivo. El axón o fibra y la terminación central expresan canales iónicos, como por ejemplo los canales de  $\text{Na}^+$  ( $\text{Na}_v$ ) y los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje (VGCC) que ayudan a generar y transmitir el potencial de acción. En el soma, ubicado en el ganglio de la raíz dorsal, se lleva a cabo la síntesis de proteínas necesarias para el funcionamiento del nociceptor. En la terminal central, la información proveniente de la periferia promueven la liberación de neurotransmisores al espacio sináptico. Una vez liberados, los neurotransmisores difunden en el espacio sináptico para finalmente activar a sus receptores localizados en la membrana de la terminal postsináptica de la neurona de segundo orden. TRPA1: Receptor de potencial transitorio de ankirina 1, TRPM8: Receptor de potencial transitorio de melastatina 8, ASIC: Canales iónicos sensibles a ácido, TRPV1: Receptor de potencial transitorio vaniloide 1, 5-HTR: Receptor de serotonina, GPRC: Receptor acoplado a proteína G. Modificada de Raouf, 2010<sup>7</sup>.

El axón es el componente del nociceptor encargado de transmitir la información sensorial desde la periferia hasta el Sistema Nervioso Central (SNC). Algunos axones están recubiertos de mielina gracias a las células de Schwann. La presencia de mielina en el axón incrementa la velocidad de propagación de los potenciales de acción. De acuerdo con el grado de mielinización, las neuronas aferentes primarias pueden clasificarse en tres grupos (Tabla 1). La mayoría de los nociceptores son fibras C que no están mielinizadas y por ende tienen diámetro pequeño. Los nociceptores restantes pertenecen al grupo de las fibras A, principalmente del subtipo  $\text{A}\delta$ . La mayoría de los nociceptores se consideran polimodales ya que son activados por estímulos nocivos de distinta naturaleza (mecánica, térmica o química) (5). Es importante destacar que los nociceptores  $\text{A}\delta$  y C proyectan sus terminaciones centrales hacia las láminas I y II de Rexed en el asta posterior de la médula espinal. Los mecanorreceptores  $\text{A}\beta$  en condiciones normales proyectan sus terminaciones centrales hacia las láminas III y IV, sin embargo en procesos patológicos también pueden proyectarse hacia la lámina II contribuyendo al proceso nociceptivo.

Tabla 1. Clasificación de las fibras aferentes primarias. Modificado de Dubin, 2010<sup>5</sup>.

<b>Grupo</b>	<b>Subgrupo</b>	<b>Cantidad de mielina</b>	<b>Lámina de Rexed a la que se proyecta</b>	<b>Función principal</b>
A	A $\alpha$	Abundante	I, III, IV, V	Propiocepción
	A $\beta$	Abundante	III, IV	Mecanorreceptores
	A $\gamma$	Abundante	I, III, IV, V	Mecanorreceptores
	A $\delta$	Moderado	I, II, III, IV, V	Termorreceptores y mecanorreceptores. Actúan como nociceptores ante estímulos térmicos y mecánicos de alta intensidad.
B		Moderado	I, II, III, IV, V	Inervación visceral y del sistema nervioso autónomo
C		Nulo	I, II	Nociceptores

La médula espinal es una estructura del sistema nervioso central formada por neuronas. En ésta se distinguen dos sitios anatómicos importantes: la sustancia blanca, en donde se localizan los axones, y la sustancia gris, en donde se localizan los somas. En un corte transversal, la sustancia gris se observa en el centro de la médula espinal y tiene forma de H, donde se distinguen dos astas ventrales y dos astas dorsales. El asta dorsal de la médula espinal se divide, con base en la densidad y el tamaño de sus neuronas, en diez porciones conocidas como láminas de Rexed. Las láminas más superficiales (I y II) corresponden al sitio en donde se lleva a cabo la sinapsis entre la terminación central de los nociceptores y las neuronas de segundo orden (6) (Figura 2).

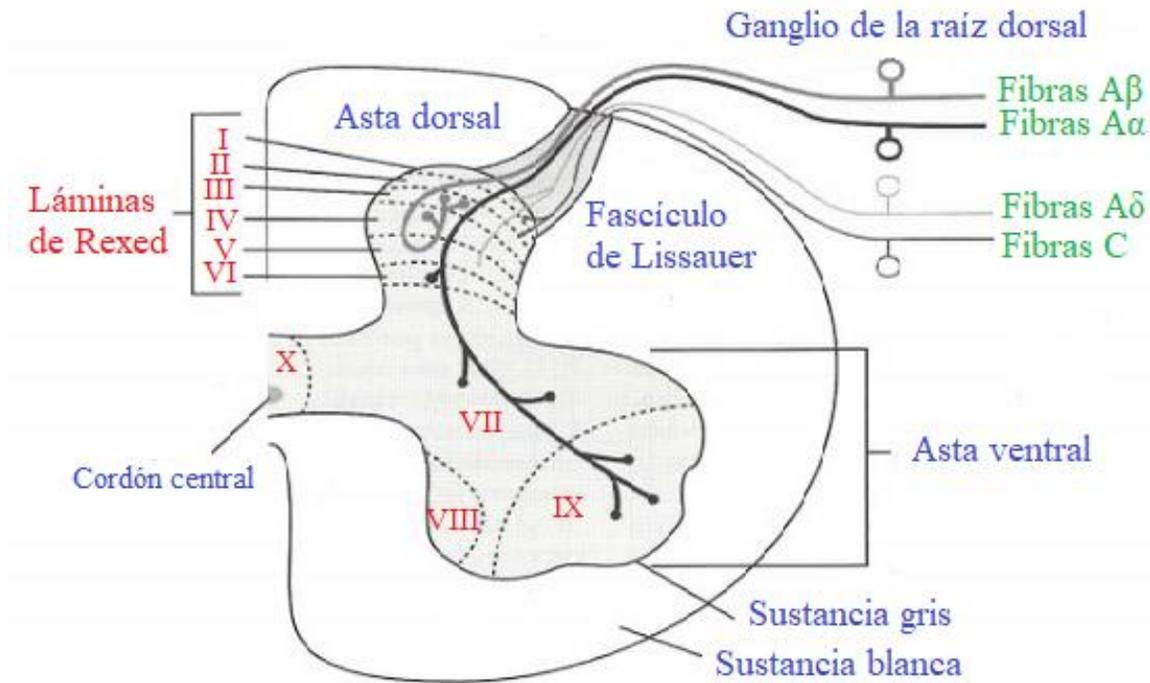


Figura 2. Anatomía de la médula espinal. La médula espinal es la estructura que comunica a la periferia con el encéfalo. La médula se divide en sustancia blanca y sustancia gris. Ésta última presenta un asta ventral, un asta dorsal y un cordón central, y se divide en láminas de Rexed (rojo) de acuerdo a la densidad de sus fibras. Las proyecciones de las fibras aferentes primarias (verde) entran al asta dorsal a través del fascículo de Lissauer y sus terminaciones centrales se proyectan hacia láminas de Rexed específicas. Modificado de Kiernan, 2009<sup>6</sup>.

La nocicepción inicia con el proceso de **transducción**, cuando los estímulos nocivos, independientemente de su naturaleza (mecánica, química, térmica o eléctrica) liberan sustancias proinflamatorias y proalgésicas. Estas sustancias activan a sus receptores de membrana localizados en la terminación periférica de los nociceptores, lo que genera la activación de vías de señalización intrínseca cuya principal finalidad es permitir el influjo de cationes principalmente el  $\text{Na}^+$ , que resulta en la despolarización de la membrana celular, generando así un potencial de acción (7). La **transmisión** es el proceso a través del cual el potencial de acción se propaga a lo largo del axón para llegar hasta la terminación central del nociceptor, en donde activa a los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje (VGCC). La entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  al interior del nociceptor promueve que las vesículas que contienen neurotransmisores se fusionen con la membrana y se liberen los neurotransmisores al espacio

sináptico. Una vez ahí difunden hasta la terminal postsináptica en donde activaran a sus respectivos receptores ubicados en las neuronas de segundo orden localizadas en las láminas I y II del asta dorsal de la médula espinal (8).

Las neuronas de segundo orden proyectan sus axones hacia estructuras superiores del sistema nervioso central a lo que se le conoce como las **vías ascendentes de la nocicepción**. Dichos axones forman el fascículo espinotalámico, que es la principal vía ascendente de transmisión de la información nociceptiva de la médula al tálamo. Además existen, otras vías ascendentes como el fascículo espino-reticular, el espino-bulbar, el espino-hipotalámico, el espino-límbico y el espino-diencéfalo. Las vías ascendentes se proyectan principalmente hacia el tálamo, en donde hacen sinapsis con neuronas de tercer orden: ventrocaudales y mediales. Las neuronas talámicas ventrocaudales proyectan fibras hacia la corteza somatosensorial, mientras que las neuronas mediales proyectan fibras hacia estructuras corticolímbicas encargadas del control cognitivo, emocional y de la memoria. Estas estructuras incluyen a la corteza prefrontal, la amígdala, la corteza cingulada anterior, el hipocampo y el núcleo accumbens, que en conjunto participan en el proceso de **percepción** (Figura 3) (9). Por lo tanto, la percepción es el proceso que resulta de la integración de la información sensorial, cognitiva y emocional, para dar significado y coherencia a la experiencia dolorosa, de tal manera que se generen las respuestas adaptativas adecuadas para combatir el estímulo nocivo. La información somatosensorial permite detectar, localizar, evaluar la intensidad e identificar el estímulo, mientras que la información cognitiva y emocional identifica la experiencia como no placentera, obligando al individuo a alejarse del estímulo nocivo (10). Por otra parte, las vías ascendentes también envían proyecciones hacia el tronco encefálico, específicamente al mesencéfalo. A este nivel hacen sinapsis con grupos neuronales de la sustancia gris periacueductal (SGPA) y de la médula rostral ventromedial (RVM). De estas estructuras surgen las **vías descendentes de la nocicepción** que participan en la **modulación** del dolor (Figura 3). Este proceso involucra mecanismos a través de los cuales se inhibe o se facilita la transmisión de la información nociceptiva (11). La inhibición del dolor es importante para generar un estado de analgesia transitoria, que le permita al individuo evitar o huir de la situación potencialmente dañina (12). La SGPA es el principal sitio de afluencia de proyecciones neuronales y recibe información directamente de las vías ascendentes, del hipotálamo, del núcleo parabraquial, del núcleo del tracto solitario y de estructuras

corticolímbicas. La SGPA proyecta fibras glutamatérgicas, serotoninérgicas y neurotensinógenas hacia los grupos de neuronas serotoninérgicas de la RVM, y a los núcleos noradrenérgicos A5 (locus coeruleus), A6 y A7 localizados en el núcleo subcoeruleus de la médula espinal. La RVM es una región compuesta por un grupo heterogéneo de núcleos neuronales, de donde surgen las vías descendentes que se proyectan hacia el asta dorsal de la médula espinal. Se han descrito dos poblaciones neuronales principales en la RVM: las células OFF y las células ON. Las células OFF son inhibidas justo antes de una respuesta ante un estímulo nocivo. Estas neuronas son activadas por el sistema de opioides endógenos e inhibidas por estímulos nocivos, por lo que se considera que activan procesos de inhibición de la transmisión de la información nociceptiva, también conocida como inhibición descendente. Por otro lado, las células ON se activan justo antes de que se produzca una respuesta ante un estímulo nocivo. Estas son activadas por estímulos nocivos e inhibidas por opioides lo que lleva a la activación de mecanismos que facilitan la transmisión de la información nociceptiva, a lo que se le conoce como facilitación descendente (13). Por otra parte, las neuronas presentes en los núcleos noradrenérgicos se proyectan hacia el asta dorsal de la médula espinal. En la médula liberan noradrenalina que activa a sus receptores adrenérgicos  $\alpha_2$  localizados en la terminal central del nociceptor y las neuronas de segundo orden, lo que resulta en un efecto antinociceptivo (14). Cabe mencionar que las proyecciones que surgen de la SGPA hacia la RVM y los núcleos noradrenérgicos pueden ser inhibidas por neuronas GABAérgicas, impidiendo así el proceso de inhibición descendente. La inhibición GABAérgica puede a su vez inhibirse por opioides y cannabinoides.

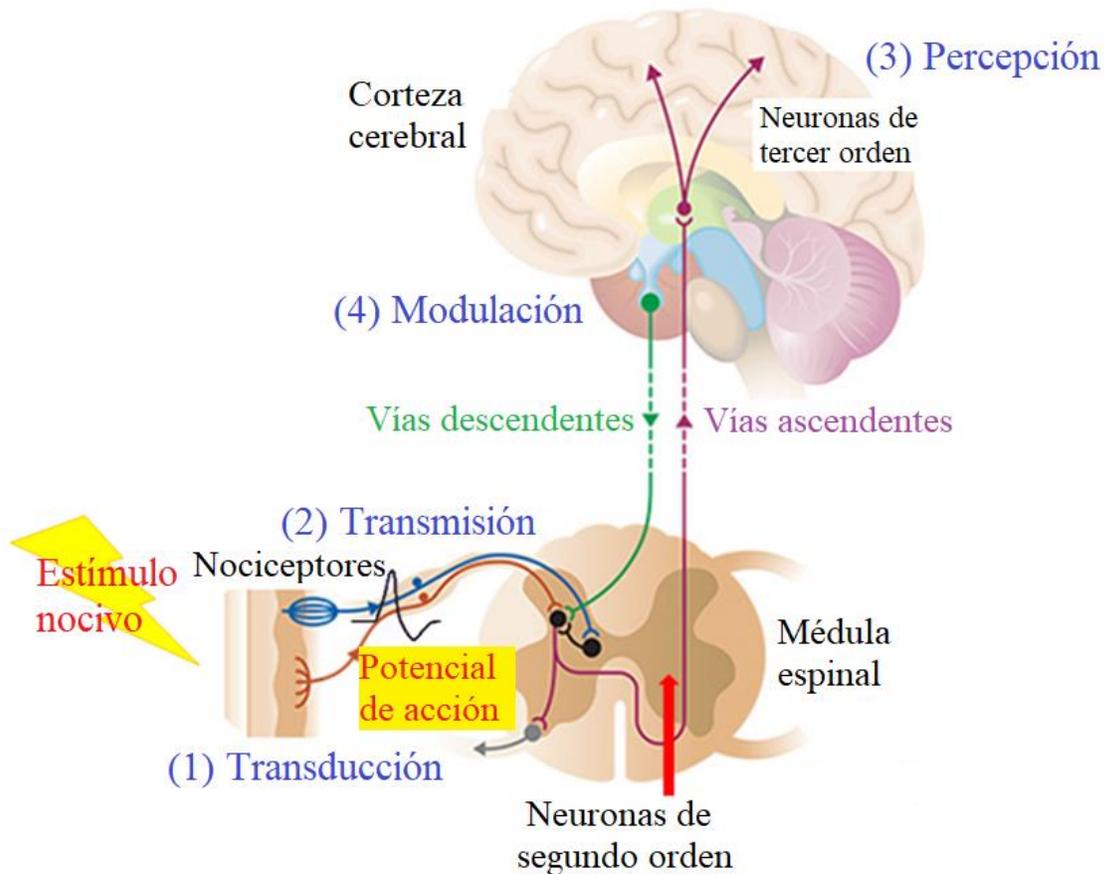


Figura 3. Nocicepción. La nocicepción es el componente fisiológico del dolor a través del cual se detectan los estímulos nocivos. En la nocicepción se distinguen cuatro procesos: 1) transducción, transmisión, modulación y percepción. Para que esto se lleve a cabo los seres humanos cuenta con un sistema nociceptivo, integrado por los nociceptores, las vías ascendentes y descendentes del dolor, así como una serie de estructuras supraespinales, Modificada de Basbaum, 2019<sup>4</sup>.

### 1.1.2. Clasificación del dolor

Actualmente, el dolor tiene varias clasificaciones que ayudan a los profesionales de la salud a diagnosticarlo adecuadamente y a tomar decisiones terapéuticas que ayuden a mitigarlo para disminuir el sufrimiento de los pacientes. De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS), los sistemas de clasificación más usados se basan en la fisiopatología, la localización anatómica y la duración del mismo (15).

### 1.1.2.1. Clasificación del dolor por fisiopatología

Esta clasificación se basa en los mecanismos que subyacen el dolor. Con base en esto podemos distinguir cuatro tipos de dolor, el dolor nociceptivo, el dolor inflamatorio, el dolor neuropático y el dolor disfuncional (16). El dolor **nociceptivo**, también conocido como fisiológico, es aquel dolor producido por la activación de los nociceptores como consecuencia de una lesión en un tejido no neuronal. Este tipo de dolor actúa como un mecanismo de defensa para salvaguardar la integridad del individuo. Esta función protectora es específica y se debe en parte al alto umbral de activación de los nociceptores, que se activan solamente por estímulos nocivos (estímulos de intensidad alta). Otra de las características del dolor nociceptivo es ser adaptativo, es decir, que produce respuestas del sistema endocrino (p. ej. secreción de corticosterona) y del sistema nervioso autónomo (p. ej. respuestas simpáticas) que generan conductas de protección, como mantenerse en estado de alerta, posturas de resguardo y respuestas de retirada y/o huida (12). Los mecanismos fisiológicos del dolor nociceptivo se han descrito previamente en el proceso de nocicepción.

El dolor **inflamatorio** se produce por la activación de los nociceptores por mediadores proinflamatorios liberados como consecuencia de una lesión tisular o un proceso infeccioso. Cuando un estímulo nocivo produce una lesión tisular, las células dañadas liberan moléculas conocidas como patrones moleculares asociados a daño (DAMPs), iones ( $H^+$ ,  $Na^+$  y  $K^+$ ), ATP y prostaglandinas, principalmente  $PGE_2$ , entre otras. Todas estas sustancias se conocen como sopa inflamatoria y actúan en receptores específicos localizados en los nociceptores, células inmunitarias residentes y células relacionadas al sistema inmunológico, como los queratinocitos y las células endoteliales (17). La activación de estos receptores promueve la liberación de citocinas proinflamatorias, quimiocinas y aminas vasoactivas (p. ej. histamina, bradicinina y prostaglandinas) que amplifican la respuesta inmunológica al reclutar células inmunitarias plasmáticas, como células cebadas, macrófagos, neutrófilos y linfocitos. La activación de los nociceptores lleva a la activación de vías de señalización intracelular que conducen a la activación, fosforilación y sobreexpresión de canales iónicos en el nociceptor. Esto permite la entrada de cationes al interior del nociceptor y favorece la despolarización de la membrana, lo que resulta en un potencial de acción (18). Existe una relación estrecha entre el sistema nociceptivo y el sistema inmunológico, pues ambos sistemas actúan de manera coordinada para favorecer la sanación de la lesión y la recuperación de la función de la zona

afectada. Sin embargo, si el dolor inflamatorio no se controla, pierde su función protectora y adaptativa, convirtiéndose en una condición de dolor patológico, como ocurre en enfermedades como la artritis reumatoide, la osteoartritis y el lupus eritematoso sistémico (19) (Figura 4).

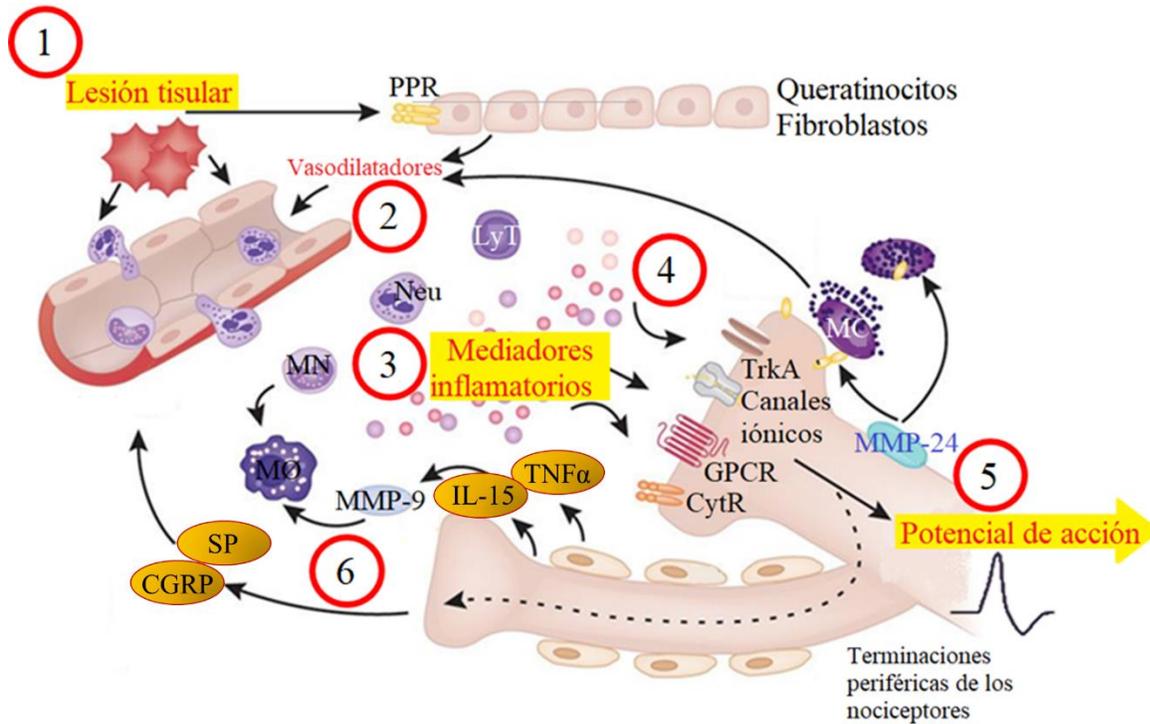


Figura 4. Dolor inflamatorio. Tras la lesión tisular producida por un estímulo nocivo (1), se liberan DAMPs y mediadores proinflamatorios que activan a los receptores ubicados en el nociceptor y las células inmunitarias residentes. Estas células liberan sustancias vasodilatadoras que promueven la migración y extravasación de células inmunitarias (2), que liberan mediadores inflamatorios (3) que activan a sus receptores de membrana localizados en la terminación periférica de los nociceptores (4), activando vías intracelulares que resultan en la generación un potencial de acción (5). A su vez, los nociceptores liberan neuropéptidos como SP y CGRP que favorecen la vasodilatación y la extravasación plasmática de más células inflamatorias que contribuyen amplificando el proceso inflamatorio (inflamación neurogénica) y perpetúan el dolor (6). Modificada de Pinho-Ribeiro, 2017<sup>18</sup>.

El **dolor neuropático**, es otro tipo de dolor patológico, que se produce por una lesión o enfermedad que afecte las estructuras del sistema nervioso somatosensorial, ocasionando alteraciones en el procesamiento de la información nociceptiva (20). Dicha lesión puede ser producida por traumatismos (p. ej. transección nerviosa, hernias discales), enfermedades metabólicas (p. ej. neuropatía diabética, mielopatía por deficiencia de vitamina B12),

procesos infecciosos (p. ej. neuropatía post-herpética, neuropatía por VIH) y enfermedades autoinmunes (p. ej. esclerosis múltiple, síndrome de Guillain-Barré), entre otras (21).

La fisiopatología del dolor neuropático comprende una gran cantidad de mecanismos moleculares tanto a nivel periférico como central dado que la lesión neuronal produce una alteración estructural y funcional persistente. Entre los mecanismos más estudiados resaltan 1) la sensibilización periférica, 2) la degeneración Walleriana, 3) el aumento de la señalización mediada por el receptor NMDA, 4) la activación de la microglía y 5) la desinhibición que en conjunto contribuyen a la sensibilización del SNC (Figura 5). Por una parte, los remanentes proximales de las fibras lesionadas sobreexpresan diversos tipos de canales catiónicos como por ejemplo canales de  $\text{Na}^+$  activados por voltaje (VGSC), en particular los subtipos Nav1.7, Nav1.8 y Nav1.9 y los canales  $\text{Ca}^{2+}$ , mientras que la función de canales de  $\text{K}^+$  dependientes de voltaje, en especial Kv2.1 disminuye, lo que resulta en una disminución del umbral de activación y genera potenciales de acción ectópicos (22). Por otro lado, la lesión neuronal provoca un aumento de la infiltración de células inmunitarias al sitio de la lesión que liberan mediadores proinflamatorios que contribuyen a la sensibilización periférica de las fibras intactas adyacentes al sitio de la lesión. La sensibilización periférica se define como una disminución del umbral de activación de los nociceptores, un aumento de la magnitud de la respuesta ante estímulos nocivos y actividad espontánea. Las fibras C y A $\delta$  intactas sobreexpresan canales catiónicos selectivos como los receptores de potencial transitorio vaniloide 1 (TRPV1). Los TRPV1 se activan por protones, es decir cuando el pH del medio es ácido ( $\sim$ pH 6.0 o menor) y por el aumento de la temperatura corporal ( $>43^\circ\text{C}$ ) (23). Además, los mediadores proinflamatorios liberados favorecen la sensibilización de estos. De igual forma, las células de Schwann adyacentes a las fibras lesionadas secretan neurotrofinas como el factor de crecimiento neuronal (NGF) y el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), y metaloproteasas de la matriz (MMPs) que contribuyen a la remodelación, la supervivencia y la diferenciación celular para reparar el tejido neuronal lesionado, sin embargo, esto también produce patrones de comunicación neuronal aberrantes y alteran el fenotipo de las fibras A $\beta$  haciendo que proyecten sus terminales centrales hacia la lámina II en lugar de proyectarse hacia láminas no nociceptivas de la médula espinal (p. ej. las láminas III/IV) (22). Por otra parte, incrementan las aferencias del sistema nervioso

simpático hacia el ganglio de la raíz dorsal, dando como resultado un aumento en la actividad espontánea y evocada de los nociceptores y mecanorreceptores (12).

Adicional a la sensibilización periférica, a nivel central también se produce un proceso de sensibilización. Algunos de los mecanismos que contribuyen a este proceso son 1) las alteraciones en la permeabilidad del  $\text{Ca}^{2+}$ , como consecuencia de la sobreexpresión de VGCC, y 2) la fosforilación de los receptores glutamatergicos AMPA y NMDA, a nivel de la terminación central de los nociceptores y de las neuronas de segundo orden, que incrementa la frecuencia de los potenciales de acción post-sinápticos. En este escenario, también contribuye la microglía. Estas células son los macrófagos del sistema nervioso central y al ocurrir una lesión tisular pasan de su estado quiescente a su estado activado. En el estado activado la microglía a través de distintas vías de señalización intracelular como la vía de la proteína kinasa activada por mitogéno p38 fosforilado (p-p38 MAPK) liberan mediadores proinflamatorios (p. ej.  $\text{TNF-}\alpha$ ,  $\text{IL-1}\beta$  y BDNF) que a su vez activan a sus receptores en la membrana de los nociceptores y generan potenciales de acción (22).

Otro mecanismo importante que contribuye a la fisiopatología del dolor neuropático es la alteración de la actividad de las vías descendentes inhibitorias. La pérdida de la inhibición descendente se debe en parte a muerte de las interneuronas GABAérgicas y la alteración de la expresión de los canales de  $\text{Cl}^-$ . Además, se presentan alteraciones de las vías descendentes noradrenérgicas, mientras que las vías descendentes serotoninérgicas que facilitan la transmisión nociceptiva incrementan su actividad. También se producen cambios adaptativos en estructuras corticolímbicas y somatosensoriales (p. ej. el tálamo, la corteza somatosensorial y la amígdala) que alteran la percepción del dolor (12). Los mecanismos fisiopatológicos se encuentran representados en la Figura 5.

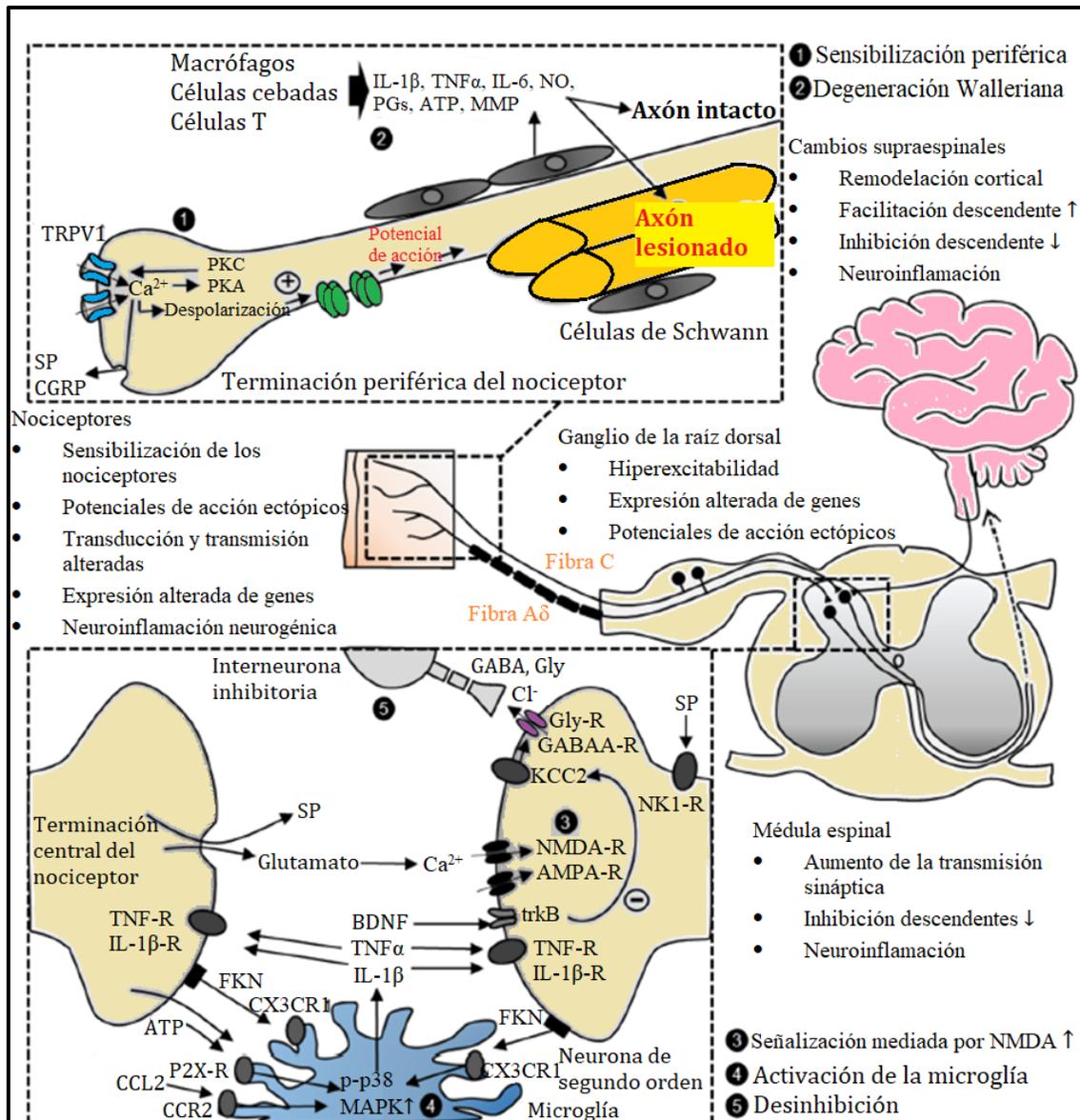


Figura 5. Dolor neuropático. La fisiopatología del dolor neuropático se compone de varios mecanismos: 1) Sensibilización periférica, caracterizada por un incremento de la excitabilidad de los nociceptores y una disminución de su umbral de activación; 2) Degeneración Walleriana que se produce secundaria a la lesión y produce una desestructuración del axón y su vaina de mielina; 3) Aumento en la señalización mediada por NMDA, que incrementa el influjo de Ca<sup>2+</sup> a las neuronas de segundo orden favoreciendo su excitabilidad; 4) Activación de la microglía que en estas condiciones libera mediadores proinflamatorios y neuroquinas que activan a sus receptores de membrana; y 5) Desinhibición, cuando la función de los receptores de GABA y glicina se altera, ocasionando la salida de Cl<sup>-</sup> que resulta en la despolarización de las neuronas de segundo orden. ATP: Adenosín trifosfato, BDNF: Factor neurotrófico derivado del cerebro, CCL2: Quimiocina 2, CCR2/CX3CR1: Receptores de quimiocinas, CGRP: Péptido relacionada con el gen de calcitonina, GABA: Ácido gama-aminobutírico, Gly: Glicina, FKN: Fractalkina, IL-1 $\beta$ : Interleucina 1 $\beta$ , IL-6: Interleucina 6, KCC2: Simportador de cloruro de potasio, MMP: Metaloproteínasa de matriz, NK1-R: Receptor de neurokinina 1, NO: Óxido nítrico, p-p38 MAPK: Proteín kinasa activada por mitógeno p38 fosforilado, PG: Prostaglandina, SP: Sustancia P, TNF $\alpha$ : Factor de necrosis tumoral  $\alpha$ , TNF-R: Receptor de TNF, trkB: Tirosin kinasa B, TRPV1: Receptor de potencial transitorio vaniloide 1. Modificado de Rosenberger, 2020<sup>22</sup>.

Por último, dentro del dolor patológico crónico también se incluye el dolor **disfuncional**, el cual se presenta cuando no existe ningún estímulo nocivo, proceso inflamatorio o daño al sistema somatosensorial identificable, por lo tanto, los mecanismos fisiopatológicos que subyacen el dolor disfuncional no se conocen con detalle en la actualidad. Algunas condiciones patológicas que se incluyen en este tipo de dolor son la fibromialgia, el síndrome de intestino irritable y el dolor vesical (19).

### **1.1.2.2. Clasificación anatómica del dolor**

El sistema de clasificación anatómica describe la región o área específica del cuerpo en donde el dolor se percibe, con base en lo anterior el dolor puede ser somático o visceral (15). El dolor **somático** es el dolor localizado en la piel y estructuras que componen el sistema musculoesquelético como el hueso, el músculo, las articulaciones, los tendones y los ligamentos. Se caracteriza por ser bien localizado, debido en parte a la abundante cantidad de fibras sensoriales presentes en la piel. Cabe mencionar que gran parte del conocimiento que existe actualmente acerca de los mecanismos moleculares que subyacen el dolor derivan de estudios experimentales enfocados a la evaluación del dolor somático (24). Por otra parte, el dolor **visceral** se localiza en las vísceras huecas como aquellas que componen los sistemas cardiovascular, respiratorio, gastrointestinal y genitourinario (25). El dolor visceral es resultado de la activación mecánica o química de los nociceptores debido a la compresión, distensión u obstrucción de las vísceras huecas (26). Debido a que las estructuras somáticas y viscerales están inervadas por fibras aferentes comunes que convergen en el asta dorsal de la médula espinal, es común que el dolor producido en una víscera se refleje en una región cutánea. Tal es el caso del dolor presente en la apendicitis aguda, secundario a la distensión del apéndice cecal que es referido como dolor cutáneo en el cuadrante inferior derecho del abdomen, fenómeno conocido como dolor referido (27).

### **1.1.2.3. Clasificación del dolor por temporalidad**

De acuerdo a su temporalidad, el dolor puede dividirse en agudo y crónico. Esta clasificación se usa con frecuencia en el ámbito clínico ya que es útil para la selección del tratamiento. El dolor **agudo** o dolor nociceptivo se ha descrito con anterioridad. Sin embargo, cabe resaltar que este tipo de dolor desaparece una vez que el estímulo nocivo que lo inició también

desaparece o bien cuando se ha reparado el tejido lesionado. Debido a esto se dice que el dolor agudo es reversible y de corta duración. Desde el punto de vista clínico en la mayoría de los casos esto se da en un periodo de tiempo menor o igual a tres meses.

Sin embargo, el dolor agudo cuando es de alta intensidad se asocia al sufrimiento y limita las actividades físicas de forma temporal. Con la finalidad de mejorar los criterios clínicos del diagnóstico y por ende su tratamiento, se ha propuesto una clasificación del dolor agudo basada en el mecanismo causal.

Por una parte, tenemos el dolor quirúrgico, en donde el dolor predomina durante el tiempo que dure la intervención quirúrgica por lo que frecuentemente estos procedimientos se realizan bajo anestesia. Sin embargo, en el periodo postquirúrgico se anticipa la presencia de dolor de diferente intensidad, que depende del tipo de procedimiento quirúrgico realizado. En éste caso, el tratamiento del dolor puede ser preventivo, sin embargo, a pesar del avance en el manejo del dolor peri y postoperatorio, más del 50% de los pacientes presenta dolor severo después de la cirugía (28). Dentro de esta categoría se incluyen todos los tipos de intervenciones quirúrgicas (p. ej. cirugía general, cirugía dental).

Por otra parte está el dolor no quirúrgico. Dentro de esta categoría se encuentran condiciones patológicas con distintos tipos de mecanismos causantes del dolor, como el dolor ocasionado por traumatismos, por isquemia, el visceral, y el musculoesquelético (29). Sin embargo, cuando el dolor persiste más allá del periodo normal de reparación tisular, se convierte en dolor crónico.

Al dolor **crónico** también se le conoce como dolor patológico. Éste carece de la función protectora y adaptativa del dolor agudo. Genera un estado de alerta persistente que conduce a conductas de tipo depresión, como desesperanza, anhedonia e impotencia, pues el individuo se encuentra en una situación dolorosa de la que no puede escapar (30). Desde un punto de vista clínico, el dolor se considera crónico cuando perdura más de tres meses. No se sabe con certeza los mecanismos que participan en la evolución del dolor agudo a dolor crónico, sin embargo, se ha establecido la participación de mecanismos neuronales como la sensibilización periférica y central. La sensibilización del sistema nervioso genera manifestaciones clínicas características del dolor crónico que incluyen el dolor espontáneo (no provocado por un estímulo nocivo extrínseco), la hiperalgesia (incremento de la

intensidad del dolor provocado por un estímulo nocivo) y la alodinia (dolor provocado por un estímulo inocuo) (12).

Actualmente existe un debate en el ámbito médico referente a si el dolor crónico es un síntoma o una enfermedad en sí mismo. Esta discrepancia en algunas circunstancias dificulta el diagnóstico y por ende el tratamiento. Debido a lo anterior, la IASP en el 2019 creo un grupo de trabajo con la finalidad de establecer una clasificación de los diferentes síndromes de dolor crónico que sea útil también en la práctica clínica. Derivado de este trabajo, se llegó al consenso de que el dolor crónico puede ser un síntoma acompañante de una entidad patológica crónica, o bien ser una enfermedad *per se*. Con base en lo anterior se clasificó al dolor crónico en dos principales grupos de síndromes:

- Síndromes de dolor crónico primario: En estos síndromes se considera que el dolor es la enfermedad *per se*, y por lo tanto se debe tratar como tal. Se caracterizan por la presencia de dolor, en una o más regiones anatómicas, que persiste por más de tres meses, de forma constante o episódica. Otra característica importante es que su etiología no está relacionada por la presencia de otra condición patológica. En esta categoría encontramos los síndromes de dolor crónico generalizado, el síndrome regional complejo, el dolor orofacial o craneal primario, el dolor visceral primario y el dolor musculoesquelético primario (31).
- Síndromes de dolor crónico secundarios: En estas condiciones, el dolor es el síntoma cardinal principal y debilitante que resulta como consecuencia de la presencia de otra patología crónica. El diagnóstico se establece a partir de cuándo el dolor se vuelve un problema por sí mismo, el cual puede continuar aun cuando la enfermedad de base tenga un adecuado tratamiento. Ejemplos de síndromes de dolor crónico secundario son el dolor oncológico, el dolor posquirúrgico, el postraumático, el neuropático, el orofacial y craneal secundario, el visceral secundario y el musculoesquelético secundario (32).

### **1.1.3. El dolor como un problema de salud pública**

El dolor tanto en su condición fisiológica como un sistema protector, como en su condición patológica donde evoluciona hasta convertirse en una enfermedad por sí mismo, es una causa

importante de discapacidad y sufrimiento, pues impacta negativamente en la calidad de vida de los individuos que lo padecen (33).

De acuerdo al Estudio Global de Carga de Enfermedades, Lesiones y Factores de riesgo (*GBD, por sus siglas en inglés*) que recopila los datos de prevalencia, incidencia y años vividos con discapacidad (*YLD, por sus siglas en inglés*) de las principales enfermedades no fatales que disminuyen la calidad de vida de la población mundial, se encontró que entre 2007 a 2017 las tres principales causas de discapacidad en el mundo son los síndromes dolorosos lumbalgia y síndromes de dolor craneal con una prevalencia de 17.5% y 15.4%, respectivamente) y los desórdenes depresivos, que funcionan como factores de riesgo que empeoran y perpetúan el proceso doloroso (con una prevalencia de 14.3% e) (34).

A nivel nacional, existen algunos datos de la prevalencia de los síndromes de dolor. De 1990 a 2010, dentro de las diez primeras causas de morbilidad en México se encontraron síndromes de dolor crónico (p. ej. lumbalgia, dolor de cuello, migraña, osteoartritis) y enfermedades que empeoran y perpetúan las condiciones dolorosas (p. ej. depresión mayor, diabetes mellitus, trastornos de ansiedad) (35). En el caso del dolor agudo, se estima que un 80% de las personas que se someten a cirugía en México presentan dolor postoperatorio de intensidad moderada relacionado a un esquema analgésico insuficiente (36). Por otra parte, se ha documentado que de los ingresos en los servicios de urgencias en nuestro país, el 90% corresponde a síndromes de dolor agudo asociado a traumatismos. Sin embargo, hasta el 86% de los egresos continuarán presentando dolor, lo que los hace propensos a desarrollar síndromes de dolor crónico (37).

#### **1.1.4. Tratamiento farmacológico del dolor**

Debido a que el dolor es una de las causas principales de discapacidad y sufrimiento, su tratamiento se ha convertido en una prioridad del sistema de salud a nivel mundial. En este contexto, la Asamblea Mundial de la Salud estableció que “*es un deber ético de los profesionales de la salud aliviar el dolor y el sufrimiento*”. Las pautas del tratamiento del dolor recomiendan un abordaje multidisciplinario que incluye estrategias farmacológicas, de rehabilitación física, terapias cognitivo-conductuales, intervención quirúrgica y tratamientos alternativos sugiriendo que debe ser implementado y facilitado a la sociedad por los servicios nacionales de salud pública. En este mismo contexto, es deber de los sistemas de salud, así

como de sus líneas de investigación, el proveer de opciones terapéuticas más eficaces y seguras (38). A continuación, se describen las estrategias farmacológicas empleadas para mitigar el dolor.

Una de las primeras guías para el tratamiento farmacológico del dolor fue la escalera analgésica de la OMS. Esta herramienta se diseñó con la finalidad de ayudar a seleccionar el tratamiento analgésico más adecuado para pacientes con dolor oncológico. Sin embargo, hoy en día se utiliza para el manejo terapéutico de la mayoría de las condiciones dolorosas. La elección del tratamiento depende de la intensidad del dolor que manifieste el paciente (leve, moderado y severo). La base del tratamiento en la escalera analgésica son los analgésicos convencionales, es decir, los opioides y analgésicos anti-inflamatorios no esteroideos (AINEs), ya sea solos o en combinación. Adicionalmente, también contempla el uso de coadyuvantes. Estos son fármacos cuya principal indicación terapéutica es otra diferente del dolor, pero ejercen un efecto analgésico en síndromes dolorosos. Algunos ejemplos son los anticonvulsivantes en el tratamiento del dolor neuropático y los glucocorticoides en el tratamiento del dolor inflamatorio (39).

Desde su primera versión publicada en 1986, la escalera analgésica de la OMS ha sufrido modificaciones con la finalidad de resolver sus limitaciones y controversias. En la actualidad, consta de cuatro escalones de tratamiento de acuerdo al nivel de dolor. El primer escalón corresponde al tratamiento del dolor de intensidad leve que se basa en el uso de AINEs, solos o combinados con coadyuvantes. El segundo escalón corresponde al tratamiento de dolor moderado en donde se recomienda el uso de opioides débiles, solos o combinados con los fármacos del primer escalón. En el tercer escalón se indica el tratamiento para el dolor de intensidad severa que corresponde al uso de opioides fuertes, solos o asociados con fármacos del primer escalón. Por último, el cuarto escalón corresponde al tratamiento de los pacientes que no se han beneficiado del tratamiento con opioides o presentan efectos adversos intolerables y por lo tanto, el dolor severo persiste. En este escalón se incluyen técnicas intervencionistas, como la neuromodulación, las intervenciones quirúrgicas y las combinaciones farmacológicas (40). A continuación se describen los fármacos convencionales para el tratamiento del dolor.

### 1.1.4.1. Analgésicos anti-inflamatorios no esteroideos

Los analgésicos anti-inflamatorios no esteroideos (AINEs) son una familia extensa de fármacos de estructura química diversa y que se caracterizan por sus efectos analgésicos, anti-inflamatorios y antipiréticos. Debido a lo anterior son la familia de fármacos más prescrita alrededor del mundo (41). Sin embargo, también pueden ser adquiridos sin receta médica.

#### A. Clasificación

Tradicionalmente los AINEs se clasifican de acuerdo con su estructura química. La estructura química de los AINEs típicos consiste en un radical ácido unido a un grupo funcional aromático plano. De acuerdo a su radical ácido se clasifican en derivados del ácido salicílico, del ácido acético, del ácido enólico, del ácido antranílico y del ácido propiónico. Actualmente, con el avance del conocimiento de su mecanismo de acción, se ha propuesto una nueva clasificación de los AINEs basada en la selectividad de la inhibición de las isoformas de la enzima ciclooxigenasa (COX). La COX también se conoce también como prostaglandina-endoperoxido sintasa (PGHS) y es la enzima encargada de sintetizar prostanoïdes. Estos son mediadores proinflamatorios importantes en la inflamación y el dolor (42). Con base en lo anterior, los AINEs se clasifican en preferentemente selectivos por COX-1, no selectivos y preferentemente selectivos por COX-2 (Tabla 2) (41).

Tabla 2. Clasificación de los AINEs. Modificada de Brune, 2015<sup>41</sup>.

<b>Preferentemente selectivos por COX-1</b>	<b>No selectivos</b>	<b>Preferentemente selectivos por COX-2</b>
<ul style="list-style-type: none"><li>• Ácido acetilsalicílico</li><li>• Ketoprofeno</li><li>• Naproxeno</li><li>• Ibuprofeno</li><li>• Ketorolaco</li><li>• Ácido salicílico</li><li>• Acetaminofén</li><li>• Flurbiprofeno</li><li>• Nabumetona</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Indometacina</li><li>• Piroxicam</li><li>• Lornoxicam</li><li>• Etodolaco</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Meloxicam</li><li>• Diclofenaco</li><li>• Nimesulida</li><li>• Celecoxib</li><li>• Valdecoxib</li><li>• Etodolaco</li><li>• Rofecoxib</li><li>• Etoricoxib</li><li>• Lumiracoxib</li></ul>

#### B. Mecanismo de acción

Su mecanismo de acción se basa en la inhibición reversible (o irreversible en el caso de los salicilatos) de las isoformas 1 y/o 2 de las COX a nivel periférico y/o central. Los AINEs

bloquean el sitio activo de ciclooxigenasa de las enzimas lo que impide que el ácido araquidónico entre y actúe como sustrato para la síntesis de prostanoideos (p. ej. prostaglandinas y tromboxanos), principalmente de la PGE<sub>2</sub>, que es el principal prostanoide involucrado en el proceso nociceptivo en ambos niveles. A continuación se describen las funciones de la PGE<sub>2</sub> en el proceso nociceptivo y como la inhibición de su síntesis genera analgesia.

- Inhibición de la síntesis de PGE<sub>2</sub> a nivel periférico

A nivel periférico, después de un estímulo nocivo aumenta la expresión de COX-2 que resulta en un aumento de la síntesis de PGE<sub>2</sub>, la cual activa a sus receptores acoplados a proteínas G<sub>as</sub> y G<sub>aq</sub> (receptores EP1-4) localizados en la membrana de los nociceptores (43). Estos receptores activan las vías de señalización intracelular de la proteína kinasa C (PKC) y la proteína kinasa A (PKA). PKA y PKC fosforilan canales catiónicos como los receptores de potencial transitorio vaniloide 1 (TRPV1), los canales de sodio resistentes a tetrodotoxina (TTX-R Na<sup>+</sup>), los canales purinérgicos P2X3 y los canales de Ca<sup>2+</sup> tipo T, lo que resulta en una ganancia de función, una mayor entrada iones que despolarizan al nociceptor y por ende la generación de potenciales de acción. Por otra parte, la PGE<sub>2</sub> también incrementa la sensibilidad de los nociceptores a otras sustancias pronociceptivas, como la bradicinina o la capsaicina (44). Por lo tanto la inhibición en la síntesis de PGE<sub>2</sub> a nivel periférico, inhibe la generación y la propagación del potencial de acción en los nociceptores (Figura 6 A).

- Inhibición de la síntesis de PGE<sub>2</sub> a nivel central

A nivel de la terminación central del nociceptor, la PGE<sub>2</sub> incrementa el influjo de Ca<sup>2+</sup>, lo que resulta en un aumento de la liberación de neurotransmisores excitatorios como el glutamato, la sustancia P y el péptido relacionado con el gen de calcitonina (CGRP). Mientras que a nivel post-sináptico, la activación de los receptores EP2 fosforila a los receptores AMPA, NMDA, NK1 y el receptor de CGRP, lo que resulta en el influjo de cationes el interior de la neurona de segundo orden. Por otra parte, la PGE<sub>2</sub> también puede interferir con la función las vías descendentes inhibitorias al bloquear al receptor del neurotransmisor inhibitorio glicina (44). De esta manera, al inhibir la síntesis de PGE<sub>2</sub> a nivel central se bloquea la transmisión de la información nociceptiva entre los nociceptores y las neuronas de segundo orden, y favorece la inhibición descendente (Figura 6 B).

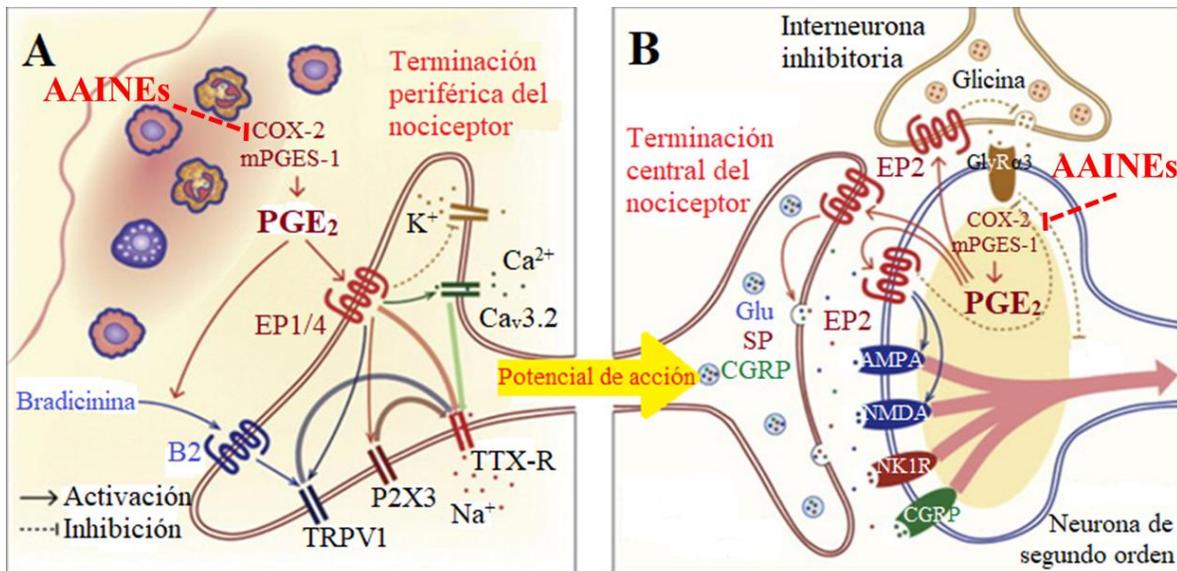


Figura 6. Mecanismo de acción de los AINEs. Los AINEs ejercen sus efectos farmacológicos a través de la inhibición de la síntesis de prostaglandinas, principalmente de la PGE<sub>2</sub>, a nivel periférico (Panel A) y central (Panel B). A nivel periférico, la inhibición de la COX-2 impide que la PGE<sub>2</sub> actúe sobre sus receptores EP1-4 y active canales catiónicos que despolaricen la membrana y resulten en un potencial de acción. También impide que aumente la sensibilización de los nociceptores por otras sustancias como la bradicinina. A nivel central, la inhibición de la COX-2 previene que la PGE<sub>2</sub> actúe sobre sus receptores EP2 lo que favorece un aumento de la liberación de neurotransmisores, la activación de canales catiónicos y la inhibición de la liberación de neurotransmisores inhibitorios como glicina. Todo lo anterior contribuye al efecto analgésico y antiinflamatorio característico de este grupo de fármacos. Modificado de Chen, 2013<sup>44</sup>.

### C. Usos clínicos

Los AINEs se utilizan principalmente en el tratamiento de pacientes que padecen de condiciones dolorosas que cursan con inflamación, como la artritis reumatoide, la osteoartritis, el dolor posquirúrgico y la dismenorrea (42). Por su efecto antipirético son la primera elección farmacológica en el tratamiento de la fiebre.

Además de sus efectos farmacológicos principales, algunos miembros de la familia de los AINEs poseen otros efectos terapéuticos que amplían su gama de usos clínicos. Tal es el caso de la Indometacina y el Ibuprofeno que forman parte del tratamiento para la corrección del conducto arterioso persistente (45), o el Ácido acetilsalicílico que es un pilar importante en la prevención primaria de pacientes con riesgo cardiovascular elevado por su efecto como antiagregante plaquetario (46).

#### D. Efectos adversos

Los AAINEs tienen una amplia gama de usos clínicos en condiciones de dolor agudo, para los cuáles su uso a corto plazo es relativamente seguro, sin embargo, cuando se utiliza por periodos prolongados como es el caso de síndromes dolorosos crónicos, presentan efectos adversos que dificultan la adherencia al tratamiento. Por otra parte, al ser fármacos de venta libre, es frecuente que la población general los consuma sin consultar previamente a un médico, lo que frecuentemente conlleva a incrementar la frecuencia de estos efectos adversos. En el caso de los inhibidores preferentemente selectivos por COX-1, sus principales efectos adversos se presentan a nivel gastrointestinal y renal; mientras que con los preferentemente selectivos por COX-2, sus principales efectos adversos son a nivel cardiovascular (47). En la Tabla 3 se recopilan algunos de los principales efectos adversos de los AAINEs.

Tabla 3. Principales efectos adversos de los AAINEs sobre órganos y sistemas. Modificada de Cazacu, 2015<sup>47</sup>.

Órgano o sistema	Efectos adversos
Sistema nervioso	Cefalea, tinnitus, mareo, meningitis aséptica
Cardiovascular	Retención de fluidos, hipertensión, edema, taquiarritmia atrial o ventricular, infarto agudo al miocardio, insuficiencia cardíaca congestiva
Gastrointestinal	Dolor abdominal, dispepsia, náuseas, vómito, gastritis erosiva, úlcera duodenal, úlcera gástrica, hemorragia
Hematológico	Trombocitopenia, neutropenia, anemia aplásica
Hígado	Alteración de la función hepática, insuficiencia hepática
Pulmonar	Hiperreactividad bronquial
Piel	Urticaria, prurito, reacciones de hipersensibilidad, síndrome de Reye
Renal	Insuficiencia renal, hiperkalemia, proteinuria
Osteomuscular	Retardo en la reparación tendón-hueso

#### 1.1.4.2. Opioides

Los opioides son la familia de fármacos analgésicos más potentes que existen actualmente. Inicialmente estos fármacos se obtuvieron del extracto del opio (*Papaver somniferum*) y

posteriormente se sintetizaron nuevas moléculas con características farmacológicas similares a estos.

#### A. Clasificación

De acuerdo a su origen, los opioides se clasifican en opioides naturales (p. ej. Morfina y Tebaína), semisintéticos (p. ej. Heroína, Hidromorfina, Dehidromorfina) y sintéticos (p. ej. Nalbufina, Metadona, Fentanilo) (48). Otra clasificación de los opioides se basa en su potencia analgésica. Los que presentan mayor potencia analgésica se denominan opioides fuertes (p. ej. Morfina, Fentanilo) y a menor potencia se consideran opioides débiles (p. ej. Tramadol, Codeína). Esta clasificación resulta importante pues existe una correlación positiva entre el riesgo de producir adicción y tolerancia, y la potencia analgésica. Cabe destacar que tanto el riesgo de producir adicción tanto como el desarrollo de tolerancia son los principales efectos adversos que limitan su uso crónico. Los opioides también pueden clasificarse de acuerdo a su actividad intrínseca, es decir, el efecto que producen tras unirse a sus receptores opioides en agonistas puros, agonistas parciales, agonistas/antagonistas y antagonistas. Mientras que los agonistas puros producen una eficacia máxima al unirse a su receptor, los agonistas parciales producen una eficacia parcial tras unirse a su receptor. Por otra parte los antagonistas se unen a su receptor opioide sin producir efecto, y previenen la unión de otros agonistas opioides (49) (Figura 7).

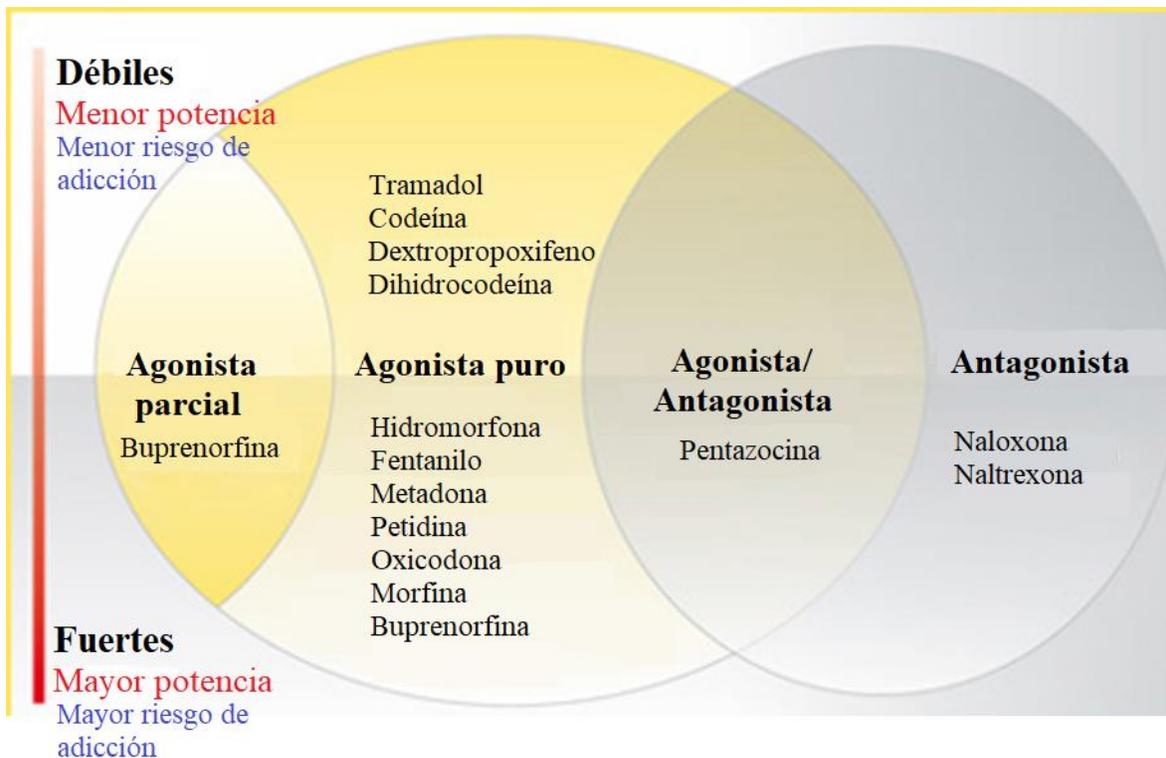


Figura 7. Clasificación de los opioides por su actividad intrínseca y potencia. De acuerdo a su actividad intrínseca, los opioides pueden actuar como agonistas parciales, agonistas puros, agonistas/antagonistas y antagonistas. A su vez de acuerdo a su potencia, estos mismos pueden clasificarse en débiles y fuertes respectivamente. Modificado de Williams, 2008<sup>49</sup>.

## B. Mecanismo de acción

Los opioides ya sea naturales o sintéticos actúan sobre los receptores del sistema de opioides endógenos o receptores opioides denominados MOR, KOR, DOR y ORL. Los receptores opioides, principalmente el receptor MOR, se expresan ampliamente en el sistema nervioso periférico y central, (p. ej. en los nociceptores, en el ganglio de la raíz dorsal, en la lámina II del asta dorsal de la médula espinal, la SGPA, la RVM, el locus coeruleus, etc.) (48) así como en otros sistemas como el sistema nervioso entérico, el músculo liso del tracto gastrointestinal (50) y el músculo cardíaco (51). La amplia distribución de los receptores en el organismo, explica la diversidad de efectos farmacológicos, el gran potencial terapéutico de estos fármacos y a su vez, la amplia gama de efectos adversos que presentan y que frecuentemente limitan su uso.

Los receptores opioides son receptores acoplados a proteínas G inhibitorias ( $G_{ai/o}$ ). A nivel presináptico la activación de los receptores opioides en los nociceptores produce una disminución de los niveles intracelulares de  $Ca^{2+}$  a través de dos mecanismos. Por un lado, la subunidad  $G_{ai}$  inhibe la actividad de la adenilato ciclasa, lo que resulta en una disminución de la síntesis de AMPc, mientras que por otra parte la subunidad  $G_{\beta\gamma}$  inhibe la apertura de los VGCC de tipo N, P/Q y L. En conjunto, esto ocasiona la disminución de la liberación de neurotransmisores y se interrumpe la transmisión de la información nociceptiva. A nivel post-sináptico, por un mecanismo mediado por su subunidad  $G_{\beta\gamma}$ , los opioides activan a los canales rectificadores de potasio (GIRK) lo que resulta en hiperpolarización de las neuronas de segundo orden, impidiendo así la generación de potenciales de acción (52).

El efecto analgésico que ejercen los opioides no solo depende de su capacidad para inhibir directamente a las neuronas, sino que además son capaces de actuar indirectamente a través de la activación de las vías descendentes inhibitorias. La activación de los receptores MOR de las neuronas GABAérgicas que se localizan en la región mesencefálica de la SGPA, bloquea la liberación del neurotransmisor inhibitorio GABA, permitiendo que las neuronas de la SGPA que se proyectan hacia el asta dorsal de la médula espinal activen la liberación de noradrenalina y serotonina, lo que atenúa la activación de las neuronas de segundo orden. (53, 54) (Figura 8).

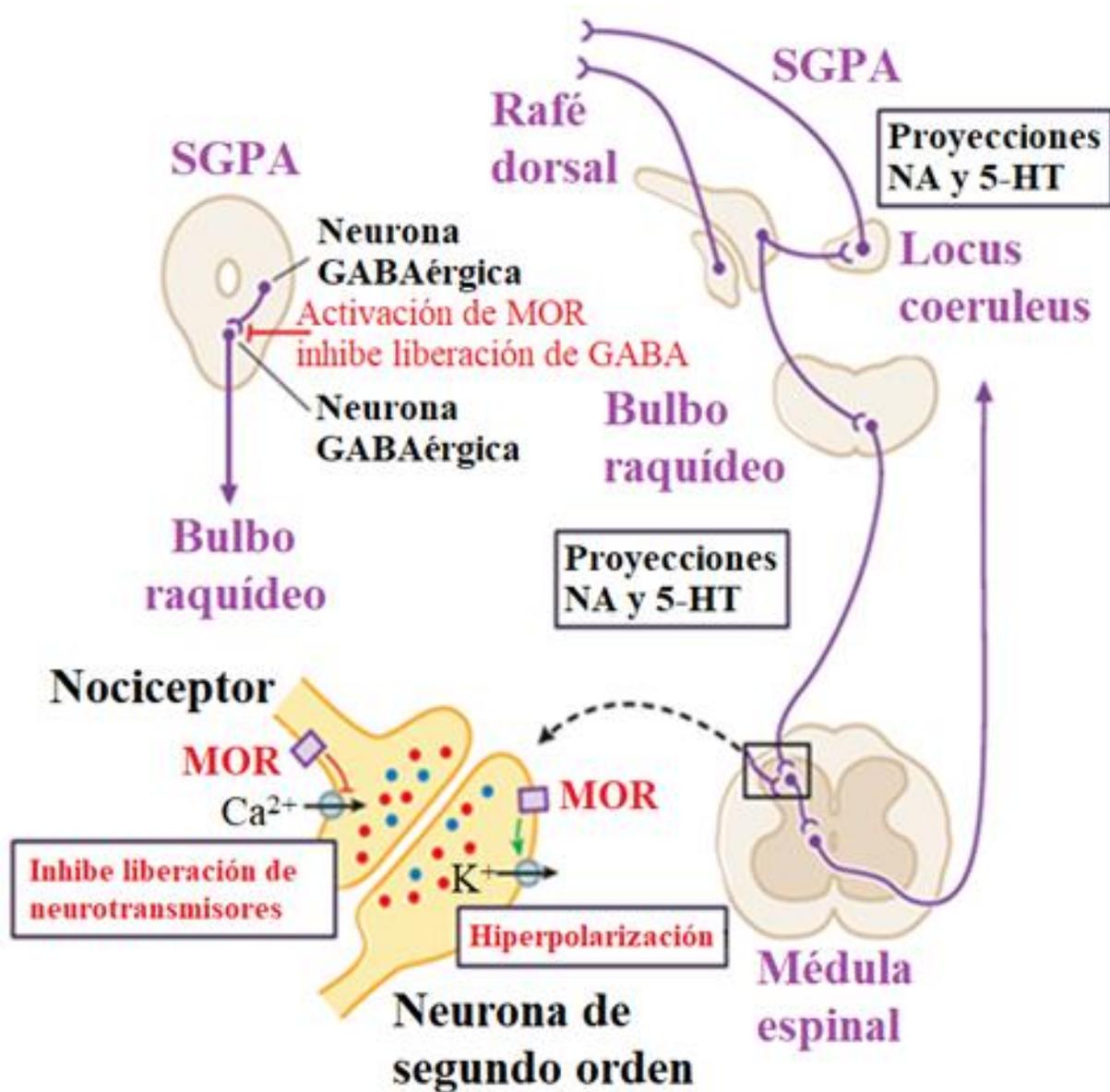


Figura 8. Mecanismo de acción de los opioides. Los opioides ejercen su efecto analgésico a través de la activación de sus receptores, principalmente el receptor MOR, distribuido en el sistema somatosensorial a nivel periférico y central. A nivel presináptico, la activación de MOR inhibe canales de  $Ca^{2+}$  impidiendo la liberación de neurotransmisores, mientras que a nivel post-sináptico activa canales rectificadores de  $K^+$  provocando la hiperpolarización de la membrana. A nivel central, en las neuronas GABAérgicas de la SGPA, la activación de MOR impide la liberación de GABA, permitiendo la activación de las proyecciones de NA y 5-HT de las vías descendentes inhibitorias. Modificado de Brunton, 2007<sup>54</sup>.

Además del efecto que tienen los opioides sobre la transmisión y la modulación del dolor, también se ha demostrado que son capaces de alterar la percepción de la experiencia dolorosa. Estudios clínicos han demostrado que los pacientes que reciben tratamiento con Morfina refieren que si bien, la sensación dolorosa aún está presente, la aversión afectiva al dolor disminuye (55). Esto se debe en parte a la acción que los opioides ejercen en sitios

importantes para el procesamiento afectivo como la región cortical, subcortical, límbica y rostral (52).

### C. Usos clínicos

El principal uso clínico de estos fármacos es la analgesia, siendo actualmente la base del tratamiento del dolor oncológico (56), aunque también pueden ser utilizados en el tratamiento del dolor agudo de intensidad moderada a severa (37). Además, los opioides débiles se consideran la segunda línea de tratamiento en pacientes con síndromes de dolor crónico, como el dolor neuropático (57). Por otra parte, su efecto sobre la motilidad intestinal se ha aprovechado para el tratamiento del síndrome del intestino irritable, tanto en su variedad con predominio de diarrea como con predominio de constipación, en donde las principales opciones terapéuticas son la Loperamida y la Eluxadolina, respectivamente (58).

A nivel del sistema cardiopulmonar, la Morfina ha demostrado tener un efecto farmacológico dual en el tratamiento del infarto agudo al miocardio, donde además de aliviar el dolor de intensidad severa provocado por la angina de pecho, mejora la función miocárdica y reduce la respuesta inflamatoria provocada por la isquemia (51). Además, su uso a dosis apropiadas ayuda a revertir la disnea y a mejorar la frecuencia respiratoria (59).

### D. Efectos adversos

La amplia distribución de receptores opioides también contribuye a la gran diversidad de efectos adversos que presentan, lo cual limita su uso crónico (48). Entre sus efectos adversos destaca el riesgo de producir adicción, tolerancia y dependencia después de su administración crónica. Este hecho ocasiono la “crisis de los opioides” en Estados Unidos lo que limito el acceso a estos fármacos (48). Actualmente, se han desarrollado nuevos esquemas de tratamiento utilizando opioides, de tal manera que se mantenga su eficacia analgésica con un menor riesgo de desarrollar adicción (60). En la tabla 4 se ejemplifican algunos de los principales efectos adversos de los opioides.

Tabla 4. Principales efectos adversos de los opioides en órganos y sistemas. Modificado de Pasternak, 2013<sup>48</sup>.

Órgano o sistema	Efectos adversos
Sistema nervioso	Delirio, sedación, mioclonus, convulsiones, hiperfagia, hiperalgesia, miosis, incoordinación motora, tolerancia, dependencia, adicción, síndrome de abstinencia, depresión respiratoria, alteraciones del sueño, déficit de memoria
Endocrinológico	Hipogonadismo, aumento en la secreción de la hormona del crecimiento, aumento de peso, anorexia, hiperprolactinemia
Gastrointestinal	Náuseas, vómito, constipación, reflujo esofágico, estasis biliar, disminución de la absorción intestinal
Genitourinario	Retención urinaria, disfunción sexual
Piel	Urticaria, prurito, enrojecimiento
Hematológico	Inmunosupresión

En la actualidad las aproximaciones farmacológicas con analgésicos convencionales han sido un pilar importante en el tratamiento del dolor, sin embargo, no han logrado resolver el problema por completo. Esto se debe en parte a que su eficacia analgésica es limitada y a que su uso se ve limitado por sus efectos adversos que pueden culminar en complicaciones que deterioren aún más la calidad de vida de los pacientes. Es por ello que es primordial buscar nuevas opciones farmacológicas más eficaces y seguras que complementen o reemplacen los tratamientos actuales.

#### 1.1.5. Modelos animales de dolor

Los modelos animales de dolor tienen el objetivo de intentar reproducir situaciones clínicas o fisiopatológicas que permitan estudiar alternativas terapéuticas que puedan ser empleadas en la clínica o ampliar el conocimiento de los mecanismos fisiopatológicos de las condiciones dolorosas (61). Para ello, los modelos deben cumplir con las siguientes características:

- Debe tener utilidad clínica: Debe reproducir condiciones dolorosas presentes en la práctica clínica o aspectos concretos de dichas condiciones, haciendo que los resultados obtenidos experimentalmente puedan extrapolarse a la clínica.
- Debe ser reproducible: Para asegurar la veracidad de sus resultados, permitiendo la comparación de distintos tratamientos.

- Debe ser cuantificable: La mayoría de los modelos de dolor en animales evalúan el proceso nociceptivo midiendo respuestas conductuales. En algunos modelos se evalúa midiendo la latencia de una respuesta de retirada, que se producen como consecuencia de la aplicación de un estímulo nocivo de naturaleza térmica, química o eléctrica. La respuesta de retirada se produce como consecuencia de la activación de un arco reflejo generado a nivel medular. Ejemplos de modelos en donde se evalúa el dolor mediante latencias de respuesta son el *tail-flick* y el de la placa caliente. En ambos modelos la respuesta se induce aplicando un estímulo térmico nocivo (48 – 55°C) (62). En otros modelos la intensidad del dolor se mide cuantificando una conducta específica (conducta nociceptiva) que se produce por la aplicación de un estímulo nocivo. En la mayoría de los casos se trata de una sustancia química irritante que activa los nociceptores en el sitio de la inyección. Ejemplos de estos son los modelos de dolor inflamatorio como el modelo de estiramiento abdominal inducido por ácido acético y el modelo de la formalina. Así también, existen modelos de dolor inducidos por la lesión de nervios. En estos la intensidad del dolor se evalúa induciendo una respuesta de retirada a través de la aplicación de estímulos mecánicos como por ejemplo los filamentos de von Frey. La aplicación de estímulos mecánicos de fuerza conocidos permite evidenciar estados de hipersensibilidad al dolor, fenómenos mejor conocidos como alodinia e hiperalgesia.
- Debe ser validado: Para ello, se debe poner a prueba un tratamiento con eficacia analgésica reconocida experimentalmente o en la clínica, que logre revertir las conductas nociceptivas generadas por el modelo (61).

A continuación se describen algunos de los modelos de dolor en animales que han sido aprobados por el Plan de Estudios Básico para la Educación Profesional en Dolor, publicado por la IASP (63).

#### **1.1.5.1. Modelo de estiramiento abdominal**

El modelo de estiramiento abdominal es bien aceptado como un modelo de dolor visceral, así como de dolor inflamatorio, por lo que es ampliamente utilizado como evaluación preliminar de la actividad antinociceptiva de fármacos con potencial efecto analgésico y/o anti-inflamatorio (64). En este modelo el dolor se induce mediante la inyección

intraperitoneal de soluciones diluidas de sustancias químicas que irritan las membranas serosas del peritoneo. Algunas de las sustancias más utilizadas son ácido acético y 2-fenil-1,4-benzoquinona (65, 66). Cualquiera de estas sustancias produce inmediatamente después de la inyección una conducta nociceptiva característica conocida como estiramiento abdominal o “*writhing*”. El estiramiento abdominal se describe como el arqueamiento de la espalda, acompañado de hiperextensión de las extremidades pélvicas y de contracción de la musculatura abdominal (65). Durante la evaluación conductual, se cuantifica el número de estiramientos abdominales por un período de 30 minutos. En este periodo se produce un número de estiramientos significativos en comparación con animales inyectados con solución salina. Cada estiramiento se considera una respuesta positiva. Con base en lo anterior, la una disminución del número de estiramientos abdominales en respuesta al tratamiento con un compuesto de prueba se interpreta como efecto analgésico (66).

En este modelo se ha descrito que los estiramientos abdominales se producen debido a que la administración de ácido acético induce un proceso inflamatorio agudo, tanto en la cavidad abdominal, secundario a la activación de las enzimas COX que sintetizan prostanoïdes (p. ej. PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2α</sub> y lipoxigenasas) que activan a sus receptores de membrana en las terminaciones periféricas de los nociceptores (66); como a nivel medular, donde el incremento en la liberación de quimiocinas activa las vías intrínsecas de MAPK y PI3K que resultan en la activación de las células de la microglía (67). Otro mecanismo que subyace el dolor visceral en el modelo de estiramiento abdominal es la participación del sistema nervioso simpático a través de la activación de los receptores adrenérgicos, pues la administración intraperitoneal de sus agonistas (p. ej. dopamina y tiramina) induce estiramientos abdominales que se revierten con antagonistas de adrenérgicos (p. ej. β-bloqueadores) (68, 69). Adicionalmente, también se ha observado la participación de los receptores P2X3 pues la administración de antagonistas de estos receptores disminuye significativamente la cantidad de estiramientos abdominales (70).

Los estiramientos abdominales también se inhiben con fármacos analgésicos y coadyuvantes como AAINES, opioides, antagonistas de receptores dopaminérgicos, antihistamínicos, relajantes musculares, inhibidores de la monoaminoxidasa y neurolépticos.

Las ventajas del modelo de estiramiento abdominal recaen en que es un modelo sencillo, rápido, replicable, que no requiere de equipamiento especial y que produce conductas nociceptivas fáciles de reconocer. Es un modelo con gran sensibilidad para detectar fármacos potencialmente analgésicos. Sin embargo, carece de especificidad debido a la gran cantidad de mecanismos que lo producen. Por lo tanto, sus resultados se deben asociar a modelos cuyos mecanismos moleculares sean más específicos (64).

#### **1.1.5.2. Modelo de formalina**

El modelo de la formalina es uno de los modelos de dolor inflamatorio más empleados en la búsqueda de nuevos analgésicos. En este modelo el dolor se induce por la inyección subcutánea de una solución diluida de formalina (0.5 – 10%) en el dorso de la pata posterior de la rata o el ratón (64). Está bien caracterizado que la inyección de formalina en roedores produce diversas conductas nociceptivas características que incluyen lamida, mordida y sacudida de la pata inyectada. Una característica del modelo es que el curso temporal de las conductas nociceptivas presenta un patrón bifásico (71). La primera fase o fase I ocurre desde el momento de la inyección y dura aproximadamente 5 minutos. Desde un punto de vista molecular existe evidencia que sugiere que las conductas en esta fase se producen por la generación de potenciales de acción en los nociceptores a través de la activación directa de los canales TRPV1 y TRPA1 (72). A nivel central, la sensibilización es resultado de la liberación de la sustancia P y bradicinina (73). Esta primera fase puede ser inhibida con anestésicos locales, opioides y AAINes como el ácido acetilsalicílico y el paracetamol (71). Después de la fase I, se produce una interfase en donde se observa la inhibición de las conductas nociceptivas. La interfase, ocurre entre los 5 y 10 minutos post-inyección de formalina. No está claro cuáles son los mecanismos responsables de esta inhibición. Sin embargo, algunos reportes sugieren que se debe a la activación de las vías inhibitorias mediadas por la activación del sistema de opioides endógenos (74), la activación de receptores GABAA (75) y al bloqueo de canales de sodio dependientes de voltaje (76). Por último, la fase II inicia 15 minutos después de la inyección de la formalina y perdura por al menos 40 min en ratón y una hora en rata. En esta fase las conductas nociceptivas se producen debido al proceso inflamatorio inducido por formalina y que genera sensibilización periférica y central. La sensibilización periférica se produce como consecuencia de la liberación de

mediadores proinflamatorios del tejido dañado, de las células inmunitarias residentes, de las células inflamatorias que son reclutadas al sitio de la lesión y de los nociceptores (77). La segunda fase puede ser inhibida de manera dosis-dependiente por opioides, AAINES, corticoesteroides y gabapentinoides (71).

El modelo de la formalina posee ciertas ventajas. La inyección de formalina genera conductas nociceptivas robustas y continuas, que generan un patrón bifásico característico, con mecanismos moleculares distintivos de cada fase lo que ayuda a identificar el mecanismo de acción de los tratamientos evaluados (64). Sin embargo, una de sus desventajas es que solo permite la evaluación de la piel lampiña del dorso de la pata posterior, ya que se ha comprobado que la inyección de formalina en un sitio anatómico diferente, altera la intensidad y el patrón de respuesta (78).

### **1.1.5.3. Modelos de dolor neuropático**

Los modelos de dolor neuropático se producen por lesión directa del sistema nervioso somatosensorial ya sea en rata o ratón. La lesión de los nervios periféricos o de estructuras del sistema nervioso central resulta en síntomas similares a los que se presentan en los síndromes de dolor crónico en humano y que incluyen dolor espontáneo, alodinia e hiperalgesia (79). La lesión puede ser producida por diferentes métodos, como por ejemplo la axotomía o la compresión parcial o total de estructuras del sistema nervioso central o de nervios periféricos, por condiciones metabólicas (diabetes) o infecciosas (neurotoxinas) o por la administración de fármacos empleados en la quimioterapia (80).

En particular los modelos que se producen por lesión de los nervios periféricos utilizan como sitio de lesión el nervio ciático. Este nervio es de fácil acceso porque se localiza en las extremidades posteriores. En la mayoría de los casos la lesión se realiza de forma unilateral, por lo que la pata contralateral puede ser utilizada como control. Además cabe resaltar que la lesión del nervio ciático puede llevarse a cabo a través de la sección o la constricción del nervio ciático o de una o varias de sus ramas, lo que da lugar a varios modelos (79). Entre estos, el modelo de axotomía parcial del nervio ciático o SNI (*por sus siglas en inglés, Spared nerve injury*) que es uno de los más empleados.

#### 1.1.5.4. Modelo de axotomía parcial del nervio ciático

Este modelo se produce por la lesión parcial del nervio ciático que consiste en la ligadura y axotomía de 2 de las 3 ramas terminales del nervio ciático, los nervios tibial y peroneal común, dejando intacto el nervio sural (81), lo que produce alodinia mecánica crónica, hipersensibilidad al frío y dolor espontáneo (82), así como conductas tipo ansiedad y depresión (83).

La alodinia mecánica se detecta desde etapas tempranas después de la axotomía y perdura por períodos largos de tiempo (al menos seis meses en rata y 30 días en ratón) (84, 85). La alodinia mecánica se produce por diversos mecanismos moleculares como la activación de fibras C y mecanorreceptores A $\beta$  que conducen a sensibilización central. Los nociceptores lesionados transmiten información nociceptiva hacia interneuronas de amplio rango (WDR, *por sus siglas en inglés*) que se sensibilizan y activan en dirección ortodrómica y antidrómica a los mecanorreceptores y a otros nociceptores (86, 87). La sensibilización central producida en el modelo de la axotomía parcial del nervio ciático se presenta en parte por la activación de los receptores AMPA (88).

Por otro lado, estudios recientes muestran que las células inmunitarias también participan en la producción de alodinia mecánica. Esto mediante la activación de la microglía que una vez activada libera BDNF quien a su vez, activa a su receptor trkB (89). Esto resulta en un aumento de las concentraciones intracelulares de Ca<sup>2+</sup> en las neuronas de segundo orden. Además se ha observado que la axotomía del nervio ciático favorece el incremento en la producción de quimiocinas como CCL2, CCL3 y CX3CL1, quienes promueven la migración de células *Natural killer* al sitio de la lesión (90).

Es importante mencionar que al ser un modelo de dolor neuropático la alodinia mecánica puede disminuirse por fármacos utilizados en la terapéutica del dolor neuropático como los antiepilépticos Gabapentina y Carbamacepina, el antidepresivo tricíclico Amitriptilina, el inhibidor de la recaptura de serotonina y norepinefrina Duloxetina, el opioide débil Tramadol, entre otros. Sin embargo, los AAINes muestran poca o nula eficacia (91, 92).

El modelo de la axotomía parcial del nervio ciático posee la ventaja de reproducir conductas nociceptivas como la alodinia mecánica presentes en pacientes con síndromes de dolor neuropático, que se mantienen por periodos prolongados de tiempo. El procedimiento es

relativamente más fácil que otros modelos de lesión nerviosa, es altamente reproducible y no limita la actividad diaria de los animales, como la ingesta de alimentos y el movimiento de los animales, lo que nos permite evaluar a los animales libremente reduciendo el estrés. Aunado a ello, también permite evaluar los cambios neurofisiológicos que ocurren en las terminales periféricas del nervio sural intacto adyacente al sitio de la lesión. Además, no genera autotomía como se observa en otros modelos, como el modelo de transección del nervio ciático (83).

Por otra parte, algunas de las desventajas que produce el modelo de SNI es que la lesión nerviosa producida por la axotomía es tan severa, que ocasiona degeneración de los axones intactos adyacentes al sitio de la lesión después de un período prolongado de tiempo, lo que limita el número de terminaciones periféricas intactas, que resulta en dificultad para la evaluación (79).

El modelo de dolor en animales ideal sería aquel que reprodujera todos los mecanismos fisiopatológicos que subyacen el dolor. Sin embargo, los diferentes tipos de dolor difieren en sus mecanismos y por ende también en su sensibilidad a diferentes tratamientos farmacológicos, por lo tanto es necesario que la evaluación de fármacos con potencial efecto analgésico se realice en distintos modelos de dolor en animales que ayuden a reproducir diferentes condiciones dolorosas para discernir en cuales modelos tiene efecto y en cuáles no. Dichos resultados pueden ayudar a inferir cuál es el probable mecanismo de acción de dichos fármacos y como su efecto analgésico pudiese extrapolarse a la práctica clínica.

## **1.2. Antecedentes específicos**

### **1.2.1. $\alpha$ -Aminofosfonatos**

Los ácidos  $\alpha$ -aminofosfónicos y sus ésteres, los  $\alpha$ -aminofosfonatos, son compuestos orgánicos que fueron descubiertos en los seres vivos alrededor de los años 40's (93). Los ácidos  $\alpha$ -aminofosfónicos son considerados los análogos isostéricos más importantes de los  $\alpha$ -aminoácidos, donde el grupo carboxílico plano [CO<sub>2</sub>H] es sustituido por el grupo fosfónico tetrahédrico [P(O)(OH)<sub>2</sub>] de mayor demanda estérica. Recientemente se han convertido en compuestos de gran interés en la investigación de la química orgánica y en el desarrollo de nuevos fármacos (94) (Figura 9).

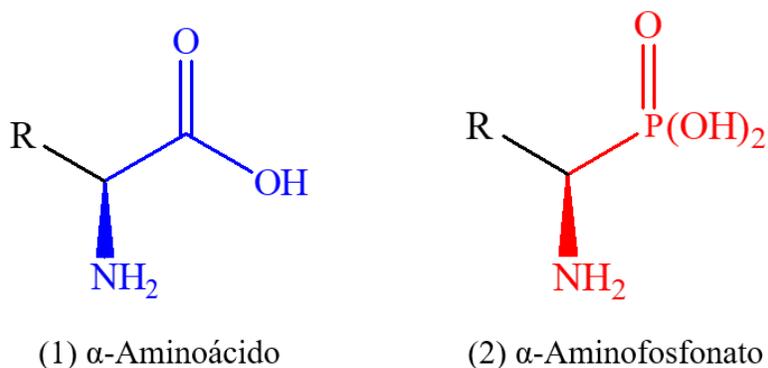


Figura 9. Estructura química de los  $\alpha$ -aminoácidos naturales y los  $\alpha$ -aminofosfonatos. Los  $\alpha$ -aminofosfonatos se obtienen de la sustitución isostérica del grupo carboxilo (azul) del  $\alpha$ -aminoácido (1) por el grupo fosfónico (rojo) dando como resultado un  $\alpha$ -aminofosfonato (2). Modificado de Ordoñez, 2015<sup>94</sup>.

El grupo fosfónico es altamente nucleofílico, más ácido, tetraédrico y con un mayor volumen estérico en comparación con su análogo el ácido carboxilo, además presenta un eje de simetría C3 y el enlace  $\pi$  entre el fósforo (P) y el oxígeno (O) es más débil que el enlace entre carbono (C) y oxígeno (O) aumentando la probabilidad de la formación del enlace P-O en el grupo fosfónico en comparación a la del enlace C-O en el grupo carboxílico. Por otro lado, el grupo fosfonato a diferencia del grupo fosfato es resistente a la hidrólisis por enzimas fosfatasas involucradas en la escisión de grupos fosfato, lo que favorece su estabilidad en el organismo.

### 1.2.2. La importancia de los ácidos $\alpha$ -aminofosfónicos en el desarrollo de nuevos fármacos

Actualmente existen diversos ácidos  $\alpha$ -aminofosfónicos y ésteres fosfónicos que han mostrado poseer una gran variedad de actividades biológicas prometedoras, lo que ha aumentado el interés en distintas áreas comerciales, que van desde la agroquímica hasta la medicina. En este contexto, el potencial biológico de los ácidos  $\alpha$ -aminofosfónicos y sus ésteres han despertado gran interés para el desarrollo de nuevos fármacos.

En consecuencia, en los últimos años se incrementó la investigación en el estudio de nuevas metodologías para la síntesis racémica y enantioselectiva de este tipo de compuestos. Desde el punto de vista químico, este andamiaje ofrece diversas posibilidades de modificación estructural que han resultado en un gran número de  $\alpha$ -aminofosfonatos de relevancia química y que difieren entre sí en su estructura química: 1) heterociclos o 2) anillos aromáticos como

furano, antraceno, tiofeno, pirazol, imidazol y piridina, dando como resultado en una amplia gama de  $\alpha$ -aminofosfonatos, por lo que utilizando como criterio de clasificación su estructura química, estos compuestos se agrupan en los siguientes subgrupos: ácidos  $\alpha$ -aminofosfónicos, ácidos fosfínicos, péptidos fosfónicos, fosfonatos y los bifosfonatos (94).

Uno de los métodos de síntesis de  $\alpha$ -aminofosfonatos más empleados es el método de Kabachnik-Fields. Esta es una reacción tricomponente que involucra: (1) un compuesto con un grupo carbonilo, ya sea un aldehído o una cetona, que se une a un complejo formado por (2) un amino y (3) un diacilfosfonato, que da como producto un  $\alpha$ -aminofosfonato (4) (95). Dicho proceso se ejemplifica en la Figura 10.

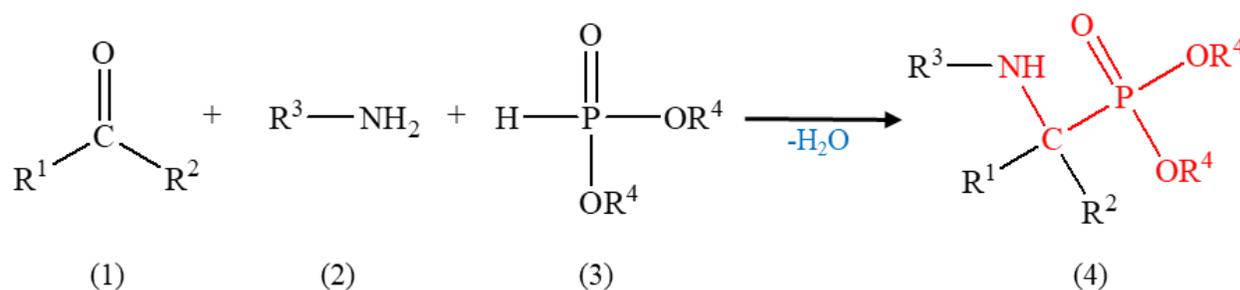


Figura 10. Método de Kabachnik-Fields. Modificado de Naydenova, 2010<sup>95</sup>.

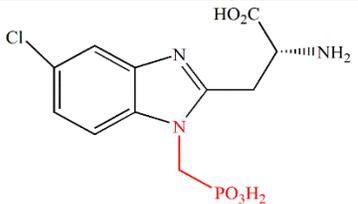
### 1.2.3. Potencial biológico de los $\alpha$ -aminofosfonatos

Los  $\alpha$ -aminofosfonatos son moléculas con un gran potencial bioactivo debido a su similitud con los  $\alpha$ -aminoácidos naturales. En concordancia múltiples estudios *in vivo* e *in vitro* sugieren que algunos tipos de  $\alpha$ -aminofosfonatos actúan como agentes citotóxicos, antibacterianos, antioxidantes, antivirales y antifúngicos.

Por otro lado, a nivel del sistema nervioso, se determinó el efecto neuroprotector *in vitro* de un  $\alpha$ -aminofosfonato, denominado EAB-318, a través de la evaluación de su actividad como antagonista de los receptores NMDA. El ensayo de unión con radioligandos demostró que EAB-318 es capaz de inhibir la unión de glutamato al receptor NMDA con una  $IC_{50}$  de 7.9 nM. A través de estudios de electrofisiología en cultivos de neuronas del hipocampo de rata, se demostró que el compuesto EAB-318 inhibe la despolarización neuronal con valores de  $IC_{50}$  de 69 nM. Al incrementar las concentraciones de radioligando, la curva dosis-respuesta del compuesto se desplaza hacia la derecha, demostrando así que su mecanismo de acción es

a través del antagonismo competitivo. Su actividad neuroprotectora se corroboró en un ensayo de neurotoxicidad inducida con NMDA en retina de pollo. El compuesto demostró su efecto neuroprotector en concentraciones entre 100- (96) (Tabla 5).

Tabla 5. Compuesto EAB-318.  $\alpha$ -aminofosfonato con efecto neuroprotector en un modelo *in vitro*. Modificado de Sun, 2004<sup>96</sup>.

Estructura química	Nombre químico	IC <sub>50</sub> efecto neuroprotector (nM)
	<p>(<i>R</i>-<math>\alpha</math>-amino-5-cloro-1-(fosfonometil)-1<i>H</i>-benzimidazol-2-propanoico ácido hidrocloclorhídrico)</p>	<p>100 – 300</p>

En la misma línea cabe destacar que la actividad biológica más prometedora de los  $\alpha$ -aminofosfonatos en medicina es la disminución de la actividad de diversas enzimas. En este contexto existen numerosos reportes que indican que los  $\alpha$ -aminofosfonatos tienen la capacidad de actuar como potentes inhibidores enzimáticos. Esto se debe en parte a las características estructurales y electrónicas del andamiaje N-C-P y a su tamaño. Estas dos características les permite actuar como inhibidores enzimáticos mediante diferentes mecanismos: 1) actuando como sustitutos de sus análogos en la formación de péptidos, 2) actuando como falsos sustratos o 3) bloqueando el sitio activo de la enzima. La combinación de estas características junto con la adición de sustituyentes que están dirigidos a mejorar la afinidad por el sitio activo provee la posibilidad de crear inhibidores enzimáticos de todas las clases; estructuralmente diversas, efectivos y selectivos. Ejemplos de aminofosfonatos con efecto terapéutico es el antihipertensivo fosinopril que inhibe metaloproteasas como la Enzima Convertidora de Angiotensina I (ECA). LA ECA desempeña un papel importante en la fisiopatología de la hipertensión arterial, razón por la cual el fosinopril actualmente se encuentra entre el arsenal de medicamentos disponibles para el tratamiento de la hipertensión (97). Asimismo, también se han sintetizado  $\alpha$ -aminofosfonatos que pueden inhibir potentemente enzimas como la glutamina sintetasa, importante en la infección por tuberculosis (98); la ureasa, esencial en el metabolismo de bacterias y protozoarios (99); o la proteasa VIH-1 del virus del VIH (100). En conjunto, la evidencia anterior muestra que estos

compuestos representan una nueva terapéutica potencial para el tratamiento de diversas enfermedades.

#### 1.2.4. Actividad anti-inflamatoria y antinociceptiva de los $\alpha$ -aminofosfonatos

Dentro de la amplia gama de actividades biológicas de los  $\alpha$ -aminofosfonatos, existe evidencia que sugiere que estos compuestos también poseen actividad sobre el sistema inmunológico y el sistema nervioso, lo que sugiere que pudieran tener el potencial de modular el proceso inflamatorio y la nocicepción. En relación a esto, existen estudios que muestran que algunos tipos de  $\alpha$ -aminofosfonatos poseen actividad anti-inflamatoria. Por ejemplo en el 2011, se evaluó *in vivo* el efecto anti-inflamatorio de los  $\alpha$ -aminofosfonatos 4a, 4b y 4c sintetizados por el grupo de Abdou (101). El efecto de estos compuestos fue evaluado a una dosis de 50 mg/kg, en el modelo de edema plantar inducido con carragenina en rata (Tabla 6). Se encontró que los compuestos 4a y 4b inhibieron el edema plantar inducido por carragenina en un 80 y 84.1%, respectivamente.

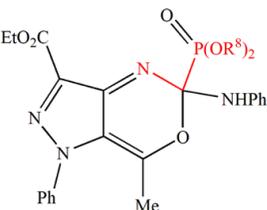
Tabla 6. Compuestos 4a, 4b y 4c.  $\alpha$ -aminofosfonatos con efecto anti-inflamatorio en un modelo *in vivo*. Modificado de Abdou, 2011<sup>101</sup>.

Estructura química	Sustituyentes	Nombre químico	% de efecto anti-inflamatorio
	4a R = Me	Dimetil [3-(benzofuran-2-il)-1-fenil-1H-pirazol-4-il]-(3-ciano-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[b]tiofen-2-il-amino) metilfosfonato	84.1%
	4b R = Et	Dietil [3-(benzofuran-2-il)-1-fenil-1H-pirazol-4-il]-(3-ciano-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[b]tiofen-2-il-amino) metilfosfonato	80%
	4c R = i-Pr	Diisopropil [3-(benzofuran-2-il)-1-fenil-1H-pirazol-4-il]-(3-ciano-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[b]tiofen-2-il-amino)metilfosfonato	15.7%

En otro estudio, se sintetizaron otros 3 nuevos  $\alpha$ -aminofosfonatos denominados 19a-c, a los que también se les evaluó su efecto anti-inflamatorio en el modelo de edema plantar inducido con carragenina en rata. Los compuestos se inyectaron por vía subcutánea a una dosis de 100

mg/kg. Se encontró que los compuestos 19a, 19b y 19c mostraron efecto anti-inflamatorio significativo de 88.5%, 89.5% y 49.9%, respectivamente. Adicionalmente a estos compuestos se les evaluó el efecto antinociceptivo. Para esto se utilizó un modelo de dolor visceral, el modelo de estiramiento abdominal inducido con *p*-benzoquinona. Los tres compuestos fueron administrados por vía intraperitoneal a una dosis de 100 mg/kg. Los resultados mostraron que los tres compuestos disminuyeron el número de estiramientos abdominales lo que indica que poseen un efecto antinociceptivo. De manera puntual los compuestos 19a, 19b y 19c disminuyeron el número de estiramientos abdominales en un 74.8%, 73.5% y 51.4%, respectivamente (102) (Tabla 7).

Tabla 7. Compuestos 19a, 19b y 19c.  $\alpha$ -aminofosfonatos con efecto anti-inflamatorio y analgésico en modelos *in vivo*. Modificado de Abdou, 2013<sup>102</sup>.

Estructura química	Sustituyentes	Nombre químico	% de efecto anti-inflamatorio	% de efecto analgésico
	19a R8 = Me	Etil 5-(dimetoxifosforil)-7-metil-1-fenil-5-(fenilamino)-1,5-dihidropirazolo[4,3-d][1,3]oxazina-3-carboxilato	88.5%	74.8%
	19b R8 = Et	Etil 5-(dietoxifosforil)-7-metil-1-fenil-5-(fenilamino)-1,5-dihidropirazolo[4,3-d][1,3]oxazina-3-carboxilato	89.5%	73.5%
	19c R8 = <i>i</i> -Pr	Etil 5-(diisopropoxifosforil)-7-metil-1-fenil-5-(fenilamino)-1,5-dihidropirazolo-[4,3-d][1,3]oxazina-3-carboxilato	49.9%	51.4%

En este mismo sentido en el 2018 el grupo de investigación del Dr. Ordoñez del Centro de Investigaciones Químicas de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos, realizó la síntesis de una nueva serie de  $\alpha$ -aminofosfonatos. Estos compuestos son análogos fosfónicos del aminoácido serina o fosfoserinas  $\alpha$ -metiladas que se sintetizaron a través del método de Kabachnik-Fields (103). Esta reacción permitió obtener una serie de 10 compuestos cuya estructura, nombre químico y clave se muestra en la Tabla 8.

Tabla 8. Estructura química de las fosfoferinas  $\alpha$ -metiladas. Modificado de Romero-Estudillo, 2018<sup>103</sup>.

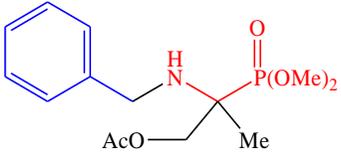
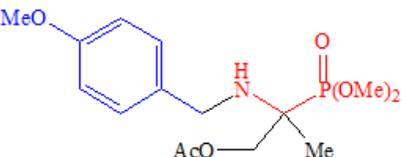
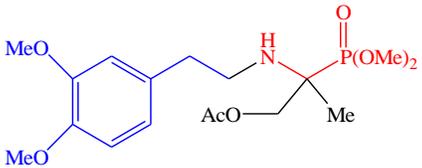
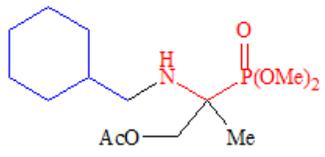
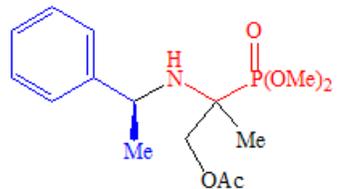
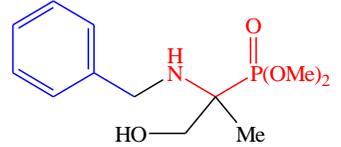
Fosfoferinas $\alpha$ -metiladas	Estructuras químicas
2-Benzilamino-2-dimetoxifosforil propil acetato <b>(1A)</b>	
2-Dimetoxifosforil-2-4-metoxibenzil amino propil acetato <b>(1B)</b>	
3,4-Dimetoxifenetil amino-2-dimetoxifosforil propil acetato <b>(1C)</b>	
2-Cicloheximetil amino-2-dimetoxifosforil propil acetato <b>(1D)</b>	
2-Alilamino-2-dimetoxifosforil propil acetato <b>(1E)</b>	
2-Dimetoxifosforil-2-S-1-feniletil amino propil acetato <b>(1F)</b>	

Tabla 8. Continuación

Fosfoserinas $\alpha$ -metiladas	Estructuras químicas
Dimetil 2-benzilamino-1-hidroxiopropano-2-1-fosfonato ( <b>2A</b> )	
Dimetil 2-3,4-dimetoxifenetil amino-1-hidroxiopropano-2-1-fosfonato ( <b>2B</b> )	
Dimetil 1-hidroxi-2-S-1-feniletil amino propano-2-il-fosfonato ( <b>2C</b> )	
2-Dimetoxifosforil-2-hidroxiopropil acetato / $\alpha$ -hidroximetilfosfonato ( <b>3</b> )	

A todas estas fosfoserinas  $\alpha$ -metiladas se les evaluó su efecto anti-inflamatorio, por vía tópica en un modelo murino de inflamación auricular inducida con tetradecanoilforbol 13-acetato (TPA), en un rango de dosis de 0.1 a 10 mg/oreja. Se encontró que los 10 compuestos mostraron efecto anti-inflamatorio significativo. Cabe destacar que los compuestos 1A>1C>1F>2C>2B>1D presentaron una eficacia anti-inflamatoria máxima mayor al 90% y que no es estadísticamente diferente del control positivo Indometacina. Es importante resaltar que si bien todos poseen eficacia, la potencia con la que producen dicho efecto es menor a la observada con Indometacina, como lo evidencian los valores de dosis efectiva 50 (DE<sub>50</sub>) (Tabla 9) (103).

Tabla 9. Eficacia máxima, DE<sub>50</sub> y potencia relativa de una serie de fosfoferinas  $\alpha$ -metiladas. Modificado de Romero-Estudillo, 2018<sup>103</sup>.

<b>Fosfoferina <math>\alpha</math>-metilada</b>	<b>Eficacia máxima (%)</b>	<b>DE<sub>50</sub> (mg/oreja)</b>	<b>Potencia relativa</b>
Indometacina	99.3 $\pm$ 2.0	0.49	1.0
1F	96.1 $\pm$ 2.3 <sup>ns</sup>	0.73	0.67
1D	93.0 $\pm$ 1.6 <sup>ns</sup>	0.95	0.50
2B	94.6 $\pm$ 2.0 <sup>ns</sup>	1.00	0.48
2C	95.6 $\pm$ 3.1 <sup>ns</sup>	1.05	0.46
1C	97.0 $\pm$ 3.2 <sup>ns</sup>	1.29	0.37
1A	97.6 $\pm$ 1.4 <sup>ns</sup>	1.46	0.33
1E	74.3 $\pm$ 3.5*	1.68	0.28
1B	66.1 $\pm$ 9.4*	1.73	0.29
2A	81.6 $\pm$ 6.5*	3.63	0.13
3	47.2 $\pm$ 7.5*	10.14	0.04

Con base en el importante efecto anti-inflamatorio observado con estos compuestos, se decidió estudiar cómo podrían estar ejerciendo este efecto. Para ello se evaluó el efecto de los cuatro compuestos más efectivos (1A, 1C, 1D y 1F) en el número de monocitos y neutrófilos presentes en sangre periférica durante el proceso inflamatorio inducido por TPA. Se observó que los cuatro compuestos disminuyeron de manera significativa el número de neutrófilos en un porcentaje de  $63 \pm 1.6$ ,  $62.6 \pm 3.7$ ,  $62.9 \pm 3.3$  y  $46.7 \pm 5.9$ , respectivamente, con respecto al grupo tratado con vehículo, mientras que la Indometacina disminuyó el número de monocitos en un  $57.7 \pm 2.1\%$ . En el caso de los monocitos, los cuatro compuestos disminuyeron el número de monocitos en un rango entre  $18.9 \pm 3.9$  a  $34.1 \pm 8.2\%$ . Estos resultados sugieren que los compuestos 1A, 1C, 1D y 1F poseen un efecto inmunomodulador (103).

Dado que esta serie de fosfoferinas  $\alpha$ -metiladas poseen un importante efecto anti-inflamatorio e inmunomodulador, en conjunto con el hecho de que algunos tipos de  $\alpha$ -aminofosfonatos afectan la neurotransmisión glutamatérgica sugiere que estos compuestos

podieran tener también efectos en el procesamiento del dolor en condiciones que cursan con inflamación.

### **1.2.5. Toxicidad**

Los nuevos compuestos son análogos de moléculas encontradas de manera natural en organismos vivos, no obstante, es importante investigar sus posibles efectos tóxicos, pues como hemos mencionado previamente, estos compuestos poseen actividad citotóxica. En este sentido, se han realizado estudios para evaluar la inducción de aberraciones cromosomales por 11  $\alpha$ -aminofosfonatos. Se encontró que 9 de estos compuestos presentan efectos genotóxicos moderados, que derivan en la ruptura o fragmentación del cromosoma, o en la fusión de sus centrómeros y telómeros. Sin embargo, también se comprobó que los  $\alpha$ -aminofosfonatos presentan cierta selectividad celular, pues tienden a acumularse en mayor medida en células de estirpe tumoral que en células normales (95).

Por otro lado, es importante mencionar que se realizó también un estudio preliminar de toxicidad aguda de las fosfoserinas  $\alpha$ -metiladas y se observó que los compuestos 1A, 1B, 1C, 1D, 1E y 1F administrados por vía oral presentan dosis letales 50 ( $DL_{50}$ ) a una dosis única mayor de 2000 mg/kg. Con base a los criterios de la Organización Europea para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OECD, *por sus siglas en inglés*), los compuestos de la generación 1 se consideran inofensivos cuando se administran en una dosis única por vía oral. Sin embargo, eso no los exenta de presentar efectos secundarios como piloerección, aislamiento social, respuesta exagerada de alerta y parálisis flácida (103).

## 2. JUSTIFICACIÓN

El dolor, tanto en su condición fisiológica como patológica, representa un problema importante de salud a nivel global, pues es la primera causa de morbilidad y sufrimiento en el mundo. Es por ello que la evaluación y la actualización de las estrategias terapéuticas para mitigar el dolor es una prioridad para los servicios de salud. A pesar de la amplia gama de aproximaciones terapéuticas actuales, de las que destaca la terapia farmacológica, ninguna de estas logra una resolución completa del dolor. Este problema se puede adjudicar a la baja eficacia de los analgésicos convencionales y a que los efectos adversos que producen pueden empeorar la calidad de vida de los pacientes, limitando su uso a largo plazo. Por todo lo anterior es de suma importancia encontrar nuevas opciones terapéuticas eficaces y seguras, con la finalidad de complementar o reemplazar las terapéuticas actuales empleadas en el manejo del dolor. En este contexto, una de las moléculas que han atraído el interés como potenciales fármacos por su alto potencial bioactivo son los  $\alpha$ -aminofosfonatos, que son análogos isostéricos de los  $\alpha$ -aminoácidos naturales. En 2018, el grupo de trabajo del Dr. Ordoñez del Centro de Investigaciones Químicas sintetizó una serie de  $\alpha$ -aminofosfonatos, que son análogos fosfónicos del aminoácido serina, también llamados fosfoserinas  $\alpha$ -metiladas. Estos compuestos demostraron tener un efecto anti-inflamatorio prometedor similares a los obtenidos con el fármaco control, Indometacina, que pertenece a la familia de los AAINes por lo que podría esperarse que estos compuestos también posean efecto analgésico. Además, en un estudio preliminar de toxicidad aguda, dichos compuestos demostraron ser inofensivos a una dosis única mayor de 2000 mg/kg, p.o., de acuerdo a los criterios de la OECD. Es por ello, que el objetivo del presente proyecto fue evaluar el efecto antinociceptivo de las fosfoserinas  $\alpha$ -metiladas en tres modelos animales de dolor: un modelo de dolor visceral, uno de dolor inflamatorio y uno de dolor neuropático.

### **3. HIPÓTESIS**

Las fosfoserinas  $\alpha$ -metiladas 1A, 1B, 1C, 1D, 1E, 1F, 2B y 2C disminuirán las conductas nociceptivas en un modelo de dolor visceral, en un modelo de dolor inflamatorio y en un modelo de dolor neuropático.

### **4. OBJETIVOS**

#### **4.1. Objetivo general**

Determinar el efecto antinociceptivo de las fosfoserinas  $\alpha$ -metiladas en tres modelos animales de dolor.

#### **4.2. Objetivos particulares**

1. Determinar el efecto antinociceptivo de las fosfoserinas  $\alpha$ -metiladas 1A, 1B, 1C, 1D, 1E, 1F, 2B y 2C en un modelo de dolor visceral.
2. Determinar el efecto antinociceptivo de las fosfoserinas  $\alpha$ -metiladas 1A, 1D, 1E y 1F en un modelo de dolor inflamatorio.
3. Determinar el efecto antialodínico de las fosfoserinas  $\alpha$ -metiladas 1A, 1D, 1E y 1F en un modelo de dolor neuropático.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1. Animales

Se utilizaron ratones machos de la cepa CD-1 con un peso corporal de 25-35 g. para los modelos de estiramiento abdominal, de la formalina, y ratones hembras de la misma cepa y peso corporal para el modelo de dolor neuropático. Los ratones se mantuvieron con libre acceso a agua y alimento, en un ciclo de luz/oscuridad de 12 por 12 horas. Todos los experimentos se realizaron bajo los lineamientos de la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 (Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio) (104). El protocolo fue aprobado por el comité para el cuidado y uso de animales de la Facultad de Medicina de la UAEM (CCUAL-FM-UAEM). Al finalizar los experimentos, los ratones fueron sacrificados por asfixia con CO<sub>2</sub> bajo los lineamientos de la NOM-033-ZOO-2014 (Métodos para dar muerte a los animales domésticos y silvestres) (105).

### 5.2. Fármacos y sustancias utilizadas

Para el modelo de estiramiento abdominal se utilizó ácido acético glacial al 0.6% (Mallinckrodt Chemicals No. Lote G41D57), mientras que para el modelo de formalina se utilizó formaldehído al 1, 2.5 y 5% (J.T. Baker No. Lote V22C13). Por otro lado, como control positivo se utilizó Diclofenaco sódico (Arrioli Organics No. Lote 05/1502/0086B) para el modelo de estiramiento abdominal y para el modelo de formalina; y Gabapentina (Sigma-Aldrich No. Lote LRAA5714) para el modelo de dolor neuropático. Las fosfoserinas  $\alpha$ -metiladas evaluadas fueron proporcionadas por el Dr. Iván Omar Romero, del Centro de Investigaciones Químicas, su nombre químico y clave empleada es: 2-Benzilamino-2-dimetoxifosforil propil acetato (1A), 2-Dimetoxifosforil-2-4-metoxibenzil amino propil acetato (1B), 3,4-Dimetoxifenetil amino-2-dimetoxifosforil propil acetato (1C), 2-Ciclohexilmetil amino-2-dimetoxifosforil propil acetato (1D), 2-Alilamino-2-dimetoxifosforil propil acetato (1E), 2-Dimetoxifosforil-2-S-1-feniletal amino propil acetato (1F), Dimetil 2-3,4-dimetoxifenetil amino-1-hidroxiopropano-2-il-fosfonato (2B) y Dimetil 1-hidroxi-2-S-1-feniletal amino propano-2-il-fosfonato (2C). Las disoluciones de

formaldehído, el ácido acético y todos los fármacos fueron disueltos en solución salina 0.9% y fueron preparados el día del experimento.

### **5.3. Evaluación del efecto antinociceptivo y analgésico de las fosfoferinas $\alpha$ -metiladas**

Con la finalidad de determinar el efecto antinociceptivo de las fosfoferinas  $\alpha$ -metiladas se emplearon tres modelos animales de dolor. Un modelo de dolor visceral, un modelo de dolor inflamatorio y un modelo de dolor neuropático. A continuación se describe la estrategia experimental empleada en cada modelo.

#### **5.3.1. Modelo de estiramiento abdominal**

Para estudiar el efecto antinociceptivo de las fosfoferinas  $\alpha$ -metiladas en un modelo de dolor visceral, se utilizó el modelo de estiramiento abdominal. Para cumplir con este objetivo, cada ratón se colocó en una caja de acrílico transparente cubierta con una rejilla y se les permitió un período de adaptación de 15 minutos. Posteriormente se retiró al ratón de la caja para realizar la administración por vía intraperitoneal, como pretratamiento, de los diferentes tratamientos: vehículo o control negativo (solución salina 0.9%; 0.1 mL/10 g de peso corporal); control positivo (Diclofenaco sódico a las dosis de 0.3, 1, 3, 10 y 30 mg/kg); y las fosfoferinas  $\alpha$ -metiladas 1A, 1B, 1C, 1D, 1E, 1F, 2B y 2C en un rango de dosis que abarca de 0.1 a 30 mg/kg e inmediatamente el ratón se regresó a la caja de acrílico. Quince minutos después de la administración del correspondiente pretratamiento, se retiró nuevamente al ratón de la caja para realizar la inyección intraperitoneal de ácido acético al 0.6% (0.1 mL/10 g de peso) (106, 107). Inmediatamente se regresó al ratón a la caja de acrílico y se inició la evaluación conductual. La evaluación consistió en la cuantificación del número de estiramientos abdominales en intervalos de 5 minutos por un período de 30 minutos (Figura 11). Se consideró como un estiramiento abdominal al arqueamiento de la espalda con hiperextensión de las extremidades pélvicas y la contracción de la musculatura abdominal, de acuerdo a la definición de Siegmund (65). En este modelo, una disminución significativa del número de estiramientos abdominales como consecuencia de la administración del tratamiento se interpretó como efecto antinociceptivo. Posteriormente a partir del número

total de estiramientos se calculó el porcentaje de efecto antinociceptivo con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Efecto antinociceptivo} = 100 - \frac{\text{Número total de estiramientos abdominales}}{\bar{X} \text{ del número total de estiramientos abdominales del control negativo}}$$

El porcentaje de efecto antinociceptivo se utilizó para construir las curvas dosis-respuesta del porcentaje de efecto analgésico de los compuestos con la finalidad de obtener la dosis efectiva 30 y la eficacia máxima.

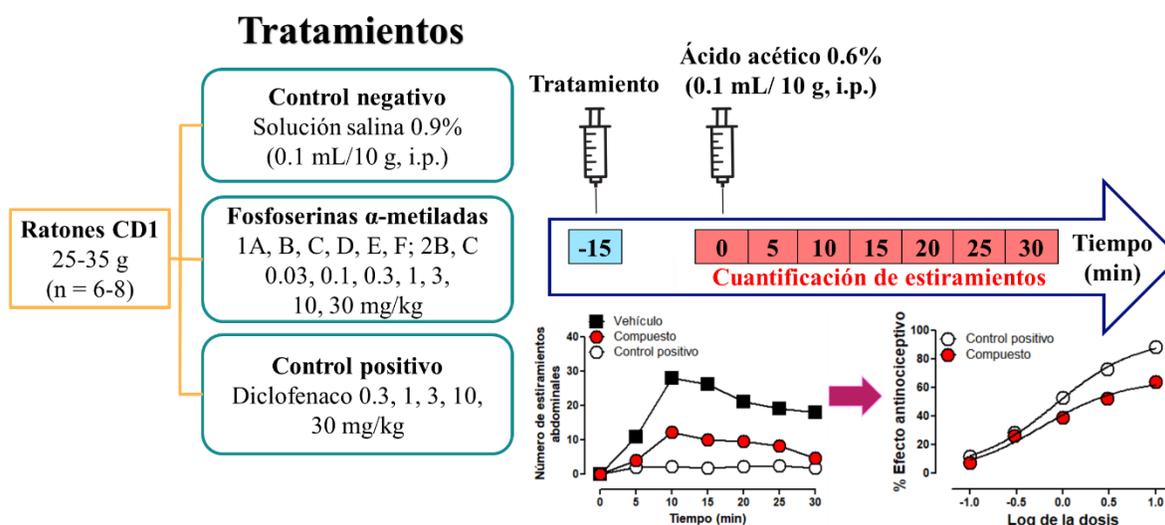


Figura 11. Diseño experimental de la evaluación del efecto antinociceptivo de las diferentes fosfoferinas α-metiladas en el modelo de estiramiento abdominal inducido por ácido acético.

### 5.3.2. Modelo de formalina

Para determinar el efecto antinociceptivo de las fosfoferinas α-metiladas en un modelo de dolor inflamatorio se utilizó el modelo de formalina. Tomando en cuenta que el modelo no estaba implementado en el laboratorio, en primera instancia se implementó y estandarizó el modelo en nuestras condiciones experimentales. Para esto inicialmente se determinó cuál concentración de formalina produce conductas nociceptivas de manera más robusta y en la

magnitud suficiente para evaluar el efecto antinociceptivo de las fosfoferinas  $\alpha$ -metiladas. Para esto, cada ratón fue colocado en un cilindro de acrílico transparente de 30 cm de diámetro y 30 cm de altura, el cual era rodeado de espejos de 30 x 30 cm con la finalidad de poder observar al ratón en todo momento. Una vez en el cilindro a los ratones se les permitió un período de adaptación de 20 minutos para disminuir el estrés. Posteriormente, el ratón fue retirado del cilindro para realizar bajo condiciones de anestesia ligera (Isoflurano inhalado) la administración subcutánea en el dorso de la pata posterior derecha de las diferentes concentraciones de formalina (1%, 2.5% y 5%) en un volumen de 20  $\mu$ L/pata (108). Inmediatamente después el ratón fue puesto nuevamente en el cilindro y se inició la cuantificación de la conducta nociceptiva de lamida y mordida de la pata inyectada. Esto consiste en medir el tiempo (en segundos) que el ratón pasa lamiendo o mordiendo la pata inyectada, en intervalos de 5 minutos durante un período de 40 minutos (Figura 12). En este modelo la disminución del tiempo que el animal pasa lamiendo la extremidad inyectada tras la administración del tratamiento se interpretó como efecto antinociceptivo.

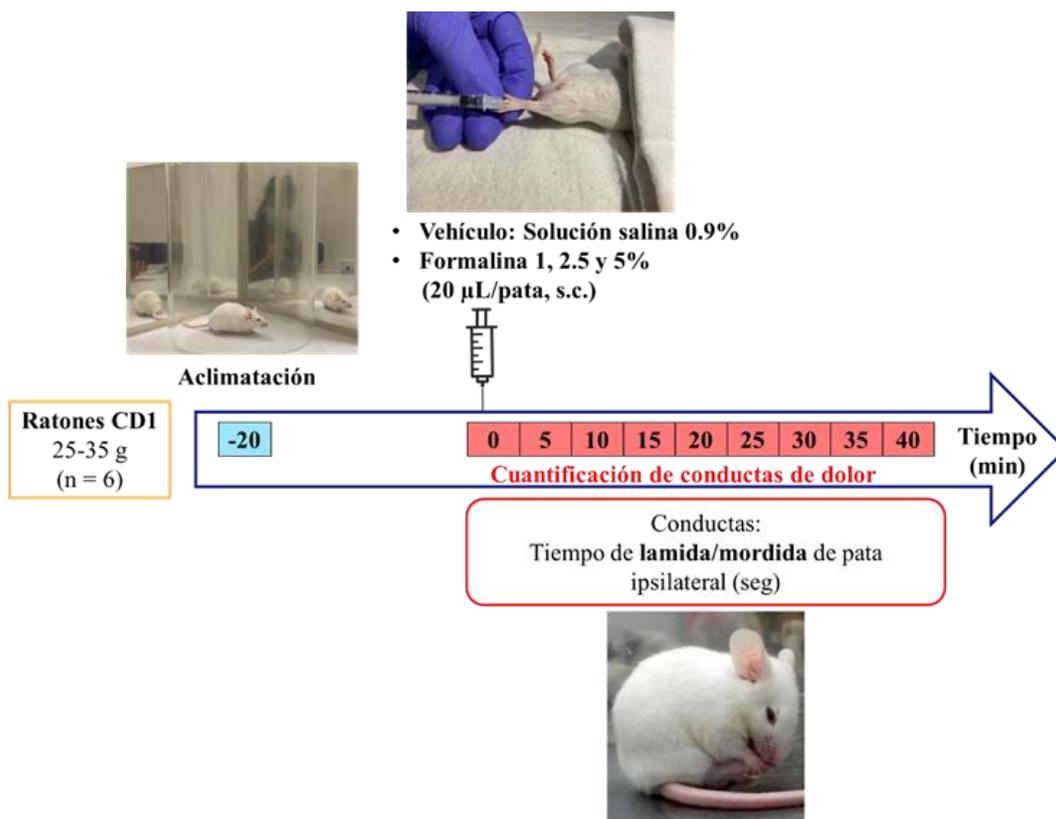


Figura 12. Diseño experimental de la caracterización del modelo de dolor inflamatorio inducido por formalina.

Una vez que se seleccionó la concentración de formalina adecuada, con esta concentración se indujo dolor en los animales en donde se evaluó el potencial efecto antinociceptivo de las fosfoferinas  $\alpha$ -metiladas. Para cumplir con este objetivo en primer lugar se realizó la administración como pretratamiento, de dosis crecientes (3, 10, 30, 100, 300 y 1000  $\mu\text{g/pata}$ ) de cada una de las fosfoferinas  $\alpha$ -metiladas por vía subcutánea 20 minutos antes del inicio de la evaluación conductual. Adicionalmente se evaluó como control negativo solución salina 0.9% (20  $\mu\text{L/pata}$ , veh) y, como control positivo Diclofenaco (10, 30 y 100  $\mu\text{g/pata}$ ) (Figura 13).

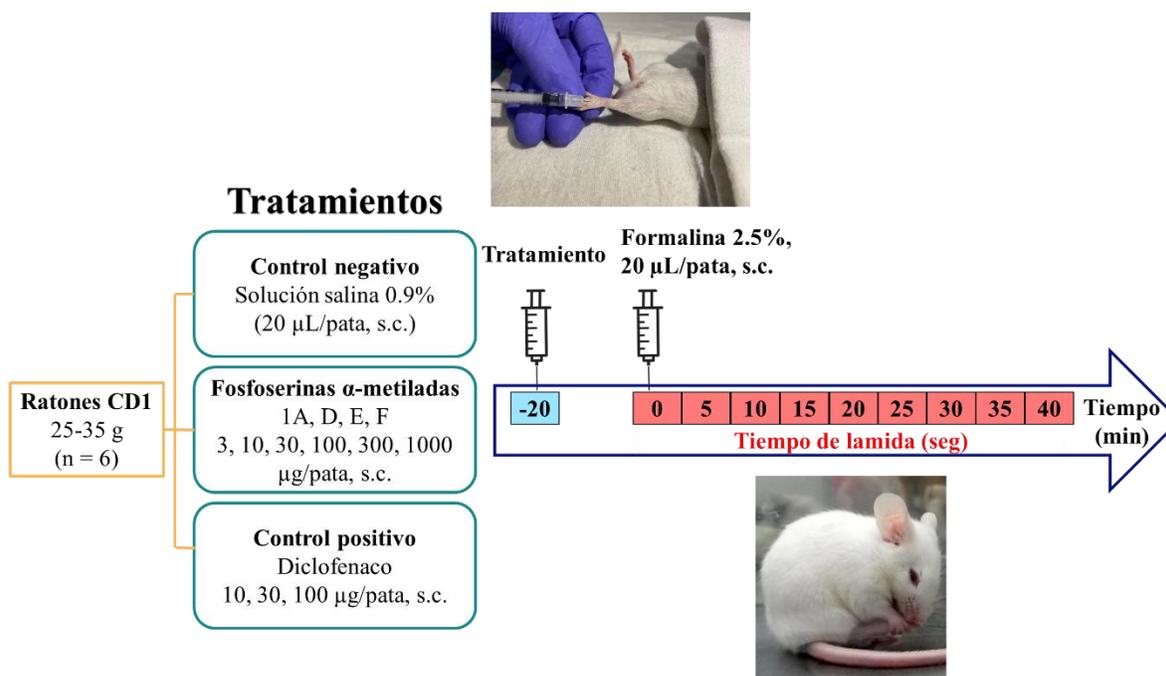


Figura 13. Diseño experimental de la evaluación del efecto antinociceptivo de las diferentes fosfoferinas  $\alpha$ -metiladas en el modelo de dolor inflamatorio inducido por formalina.

### 5.3.3. Modelo de dolor neuropático inducido por la axotomía parcial del nervio ciático

Para evaluar el efecto antialodínico de las fosfoferinas  $\alpha$ -metiladas en un modelo de dolor neuropático, se utilizó el modelo de axotomía parcial del nervio ciático (SNI, *por sus siglas en inglés*). Este se realizó según el protocolo descrito por Shields (109). De forma breve, los ratones fueron anestesiados con una mezcla de Ketamina/Xilacina (100/10 mg/kg, i.p.). Una vez anestesiados, se realizó tricotomía de la extremidad posterior izquierda y se aplicó asepsia en la región. Después usando como referencia la cabeza femoral se realizó una incisión de aproximadamente 1 cm de longitud, en dirección caudal a la extremidad para

exponer el bíceps femoral y el vasto lateral. Inmediatamente se realizó sobre el músculo un corte transversal a la incisión en piel y se separaron los músculos para exponer las ramas terminales del nervio ciático: sural, peroneal y tibial. Se ligaron las ramas peroneal y tibial con seda 6-0 para realizar el corte de las ramas por debajo de la ligadura y cuidando de no dañar la rama sural. Después se suturó el plano muscular con catgut 5-0 y se verificó la hemostasia, para proceder a suturar la piel. Por último, se realizó asepsia de la herida quirúrgica con merthiolate y los animales se regresaron a su caja habitación para su recuperación de la anestesia.

#### **5.3.4. Medición de la alodinia mecánica**

Está bien establecido que la axotomía parcial del nervio ciático produce alodinia mecánica desde etapas tempranas después de la cirugía y que perdura por semanas e incluso meses después de la axotomía. En este proyecto para cuantificar la alodinia mecánica producida por la axotomía parcial del nervio ciático se utilizó el método de up-down descrito por Chaplan, utilizando para esto filamentos de von Frey, los cuales están calibrados en un rango de fuerza de 0.007 a 3.24 g.

Para la evaluación del efecto antialodínico de las fosfoserinas  $\alpha$ -metiladas, 14 días después de la cirugía, los ratones se colocaron en cajas de acrílico transparente sobre una malla metálica que permite tener acceso a las extremidades posteriores del ratón. A cada animal se le permitió un periodo de aclimatación de 20 minutos para adaptarse al ambiente. Transcurrido este tiempo se inicia la aplicación de los filamentos de von Frey siguiendo el método up-down. El método consiste en aplicar un filamento a la vez durante 3 segundos en la superficie plantar de la extremidad ipsilateral, empezando con el filamento de 0.06 g. La estimulación con este filamento puede resultar en una respuesta de retirada de la pata (respuesta positiva) o ninguna respuesta (respuesta negativa). Si la respuesta fue negativa, se aplica el siguiente estímulo con el siguiente filamento de mayor fuerza, sin embargo, si la respuesta fue positiva el siguiente estímulo se produce aplicando el siguiente filamento de menor fuerza. Se continua así hasta identificar la primera respuesta positiva, y posterior a esta se realizaron otras cuatro mediciones consecutivas, hasta obtener un patrón de cinco respuestas. Finalmente, el patrón de respuestas obtenido se utiliza para calcular el 50% de umbral de retiro mediante la siguiente fórmula:

$$50\% \text{ umbral de retiro} = \lceil 10^{((Xf + \kappa\delta))} / 10,000$$

Donde:

- Xf: Valor del último filamento utilizado (en valor logarítmico).
- $\kappa$ : Valor asignado para el patrón de respuestas positivo/negativo de acuerdo a la tabla de Chaplan.
- $\delta$ : La diferencia entre la fuerza de los estímulos (mayor y menor) (en valor logarítmico).

Cabe destacar que los valores menores o iguales a 0.4 g. en el 50% de umbral de retiro indican la presencia de alodinia mecánica, es decir, una respuesta exagerada ante un estímulo que normalmente no es nocivo. En esta prueba el incremento de los valores de 50% de umbral de retiro por arriba de 0.4 g se interpretan como efecto antialodínico (110).

En este modelo, el efecto analgésico de las fosfoserinas  $\alpha$ -metiladas se determinó el día 14 post-axotomía debido a que estudios previos indican que para este día, la alodinia ya está bien establecida (109). El día del experimento inicialmente se midió el valor basal del 50% de umbral de retiro para confirmar que todos los ratones presentarían alodinia. Posteriormente a grupos de 6-8 animales se les administró por vía intraperitoneal (0.1 mL/10 g) los diferentes tratamientos: vehículo (solución salina 0.9%), como control positivo Gabapentina (30-300 mg/kg) y las diferentes fosfoserinas  $\alpha$ -metiladas 1A, 1D, 1E y 1F en un rango de dosis de 10 a 600 mg/kg. Inmediatamente después de la administración de los tratamientos, se realizó la evaluación del 50% de umbral de retiro a las 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 4, 5 y 6 horas. Con los valores de umbral de retiro se construyeron los cursos temporales del efecto antialodínico y se calculó el área bajo la curva (ABC) por el método de los trapecoides (111). Con los datos de ABC se calculó el % de efecto y posteriormente se construyeron las curvas dosis respuesta del efecto antialodínico, para determinar parámetros como dosis efectiva 50, eficacia máxima y potencia relativa (Figura 14).

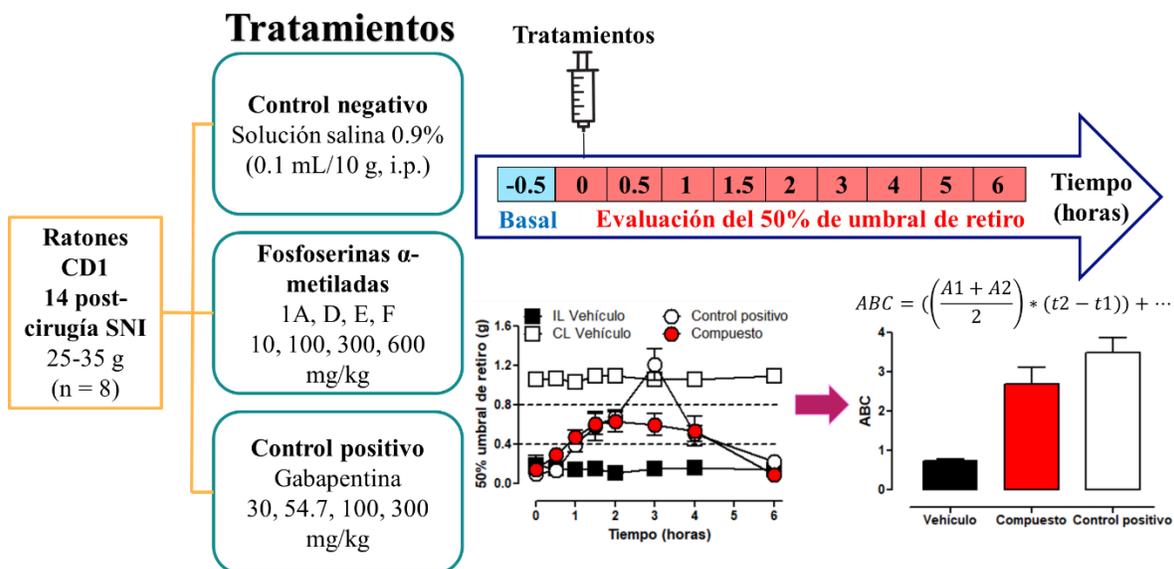


Figura 14. Diseño experimental de la evaluación del efecto antinociceptivo de las diferentes fosfoferinas α-metiladas en el modelo de dolor neuropático inducido por la axotomía parcial del nervio ciático.

#### 5.4. Análisis estadístico

Los resultados se expresan como el promedio de 6-8 animales  $\pm$  el error estándar de la media (e.e.m.). El cálculo del área bajo la curva (ABC) se realizó mediante el método de los trapecoides a partir de los cursos temporales del efecto antialodínico vs tiempo del modelo de dolor neuropático (111). Para determinar si existían diferencias estadísticas se realizó análisis de varianza de (ANOVA) de una vía seguido de la prueba de Dunnett para comparar más de dos grupos experimentales de un mismo tratamiento, y ANOVA de dos vías seguido de la prueba de Bonferroni o de Tuckey cuando se compararon grupos con dos factores (dosis, tiempo). Se consideró que existe una diferencia estadísticamente significativa cuando el valor de  $p$  fue menor a 0.05.

## 6. RESULTADOS

### 6.1. Efecto antinociceptivo de las fosfoserinas $\alpha$ -metiladas 1A, 1B, 1C, 1D, 1E, 1F, 2B y 2C en un modelo de dolor visceral

Para determinar si las fosfoserinas  $\alpha$ -metiladas 1A, 1B, 1C, 1D, 1E, 1F, 2B y 2C poseen efecto antinociceptivo en un modelo de dolor visceral, se utilizó el modelo de estiramiento abdominal inducido por la inyección intraperitoneal (i.p.) de ácido acético al 0.6%. Para esto inicialmente se caracterizó el curso temporal del número de estiramientos abdominales que se producen después de la inyección de ácido acético al 0.6% o de solución salina fisiológica (SSF). Se observó que la inyección intraperitoneal de ácido acético al 0.6% produjo estiramientos abdominales que se presentaron inmediatamente después de la inyección. Estos aumentaron de forma gradual hasta alcanzar su pico máximo entre los 10 y 15 minutos post-inyección. A partir de este punto el número de estiramientos empezó a disminuir gradualmente, sin embargo, no llegaron al valor basal. Cabe mencionar que estos se mantuvieron presentes durante los 30 minutos que duró la evaluación. En contraste, la inyección i.p. de SSF produjo un promedio de 3 estiramientos abdominales durante los primeros 10 min y posteriormente siguieron disminuyendo hasta desaparecer totalmente a los 20 min post-inyección (Figura 15 A). De forma global la inyección i.p. de ácido acético produjo en promedio  $120.74 \pm 4.7$  estiramientos abdominales en un periodo de 30 min, mientras que la SSF produjo en promedio  $8.6 \pm 1.3$  estiramientos abdominales (Figura 15 B). Estos resultados indican que los estiramientos abdominales se producen principalmente por acción del ácido acético y no por la inyección *per se*, o la SSF.

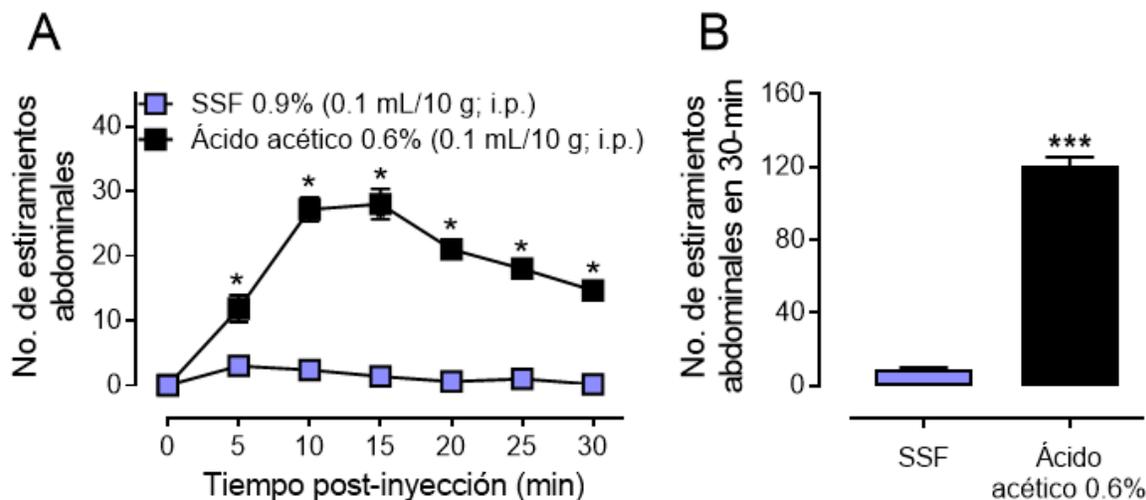


Figura 15. Caracterización de la conducta nociceptiva de estiramientos abdominales producidos por la administración intraperitoneal de ácido acético al 0.6%. En A se muestra el curso temporal del número de estiramientos abdominales y en B el número total de estiramientos abdominales en un periodo de 30 minutos. Cada punto o barra representa  $\bar{X} \pm \text{SEM}$  ( $n = 6$ ). \* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.001$  por ANOVA de dos vías seguida por una post hoc de Bonferroni (curso temporal) o prueba t de student (gráfica de barras).

Por otra parte, con la finalidad de validar el modelo se empleó como control positivo Diclofenaco. Este fármaco pertenece al grupo de los AAINES y se utiliza ampliamente en la terapéutica del dolor agudo y crónico (41). Se observó que el pre-tratamiento (-15 min) intraperitoneal con Diclofenaco sódico (0.3, 1, 3, 10 y 30 mg/kg) disminuyó el número de estiramientos abdominales de manera dependiente de la dosis en todos los intervalos de tiempo evaluados (Figura 16 A). En la gráfica de barras se observa que la disminución del número de estiramientos abdominales inducida por Diclofenaco fue estadísticamente significativa a partir de la dosis de 1 mg/kg y hasta la dosis de 30 mg/kg. El efecto antinociceptivo máximo o eficacia máxima de Diclofenaco se produjo con la dosis de 30 mg/kg y fue de  $87.5 \pm 2.7\%$  (Figura 16 B). Estos resultados muestran que los estiramientos abdominales inducidos por ácido acético disminuyen por el tratamiento con AAINES. Debido a que en este modelo el Diclofenaco produce su mayor efecto antinociceptivo a la dosis de 30 mg/kg, se utilizará esta dosis para comparar con el efecto producido por las fosfoserinas  $\alpha$ -metiladas.

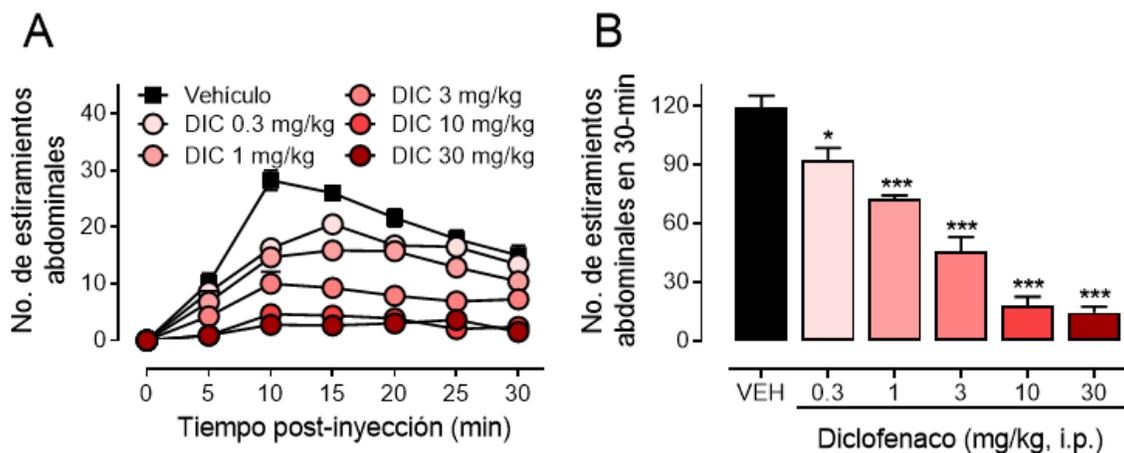


Figura 16. Efecto antinociceptivo de Diclofenaco en el modelo de estiramiento abdominal. En A se muestra el efecto del Diclofenaco en el curso temporal de los estiramientos abdominales inducidos por ácido acético. En B se muestra el efecto de éste fármaco en el número total de estiramientos abdominales. Cada punto o barra representa  $\bar{X} \pm \text{SEM}$  ( $n = 8$ ). \* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.001$  estadísticamente significativo con respecto al vehículo, por ANOVA de una vía seguido de una post-hoc de Dunnet. VEH: Vehículo, DIC: Diclofenaco, i.p.: intraperitoneal.

Una vez estandarizado el modelo, se realizó la evaluación de las fosfoferinas  $\alpha$ -metiladas 1A, 1B, 1C, 1D, 1E, 1F, 2B y 2C para determinar si producen efecto antinociceptivo en el modelo de estiramiento abdominal. Para esto, los compuestos fueron administrados en dosis crecientes (0.1 – 10 mg/kg, i.p.) como pre-tratamiento, es decir 15 minutos antes de la inyección de ácido acético. En la gráficas de la figura 17 se observa que las fosfoferinas  $\alpha$ -metiladas 1A (0.1, 0.3, 1, 3 y 10 mg/kg), 1B (0.3, 1, 3 y 10 mg/kg) y 1C (0.03, 0.1, 0.3, 1 y 10 mg/kg) disminuyeron el número de estiramientos abdominales en todos los intervalos de tiempo evaluados (Figura 17 A, C, E). Cuando los datos se presentan como el número total de estiramientos se puede observar que el efecto antinociceptivo de los compuestos 1A y 1C fue dependiente de la dosis y estadísticamente significativo para 1A a partir de la dosis de 0.3 mg/kg y para 1C a partir de la dosis de 0.1 mg/kg. Es importante notar que las fosfoferinas  $\alpha$ -metiladas 1A y 1C alcanzaron su mayor efecto a las dosis de 10 y 30 mg/kg, respectivamente (Figura 17 B y F). En contraste el efecto antinociceptivo del compuesto 1B no fue dependiente de la dosis, dado que las dosis de 1, 10 y 30 mg/kg produjeron un efecto antinociceptivo similar (aproximadamente 35%) (Figura 17 C y D).

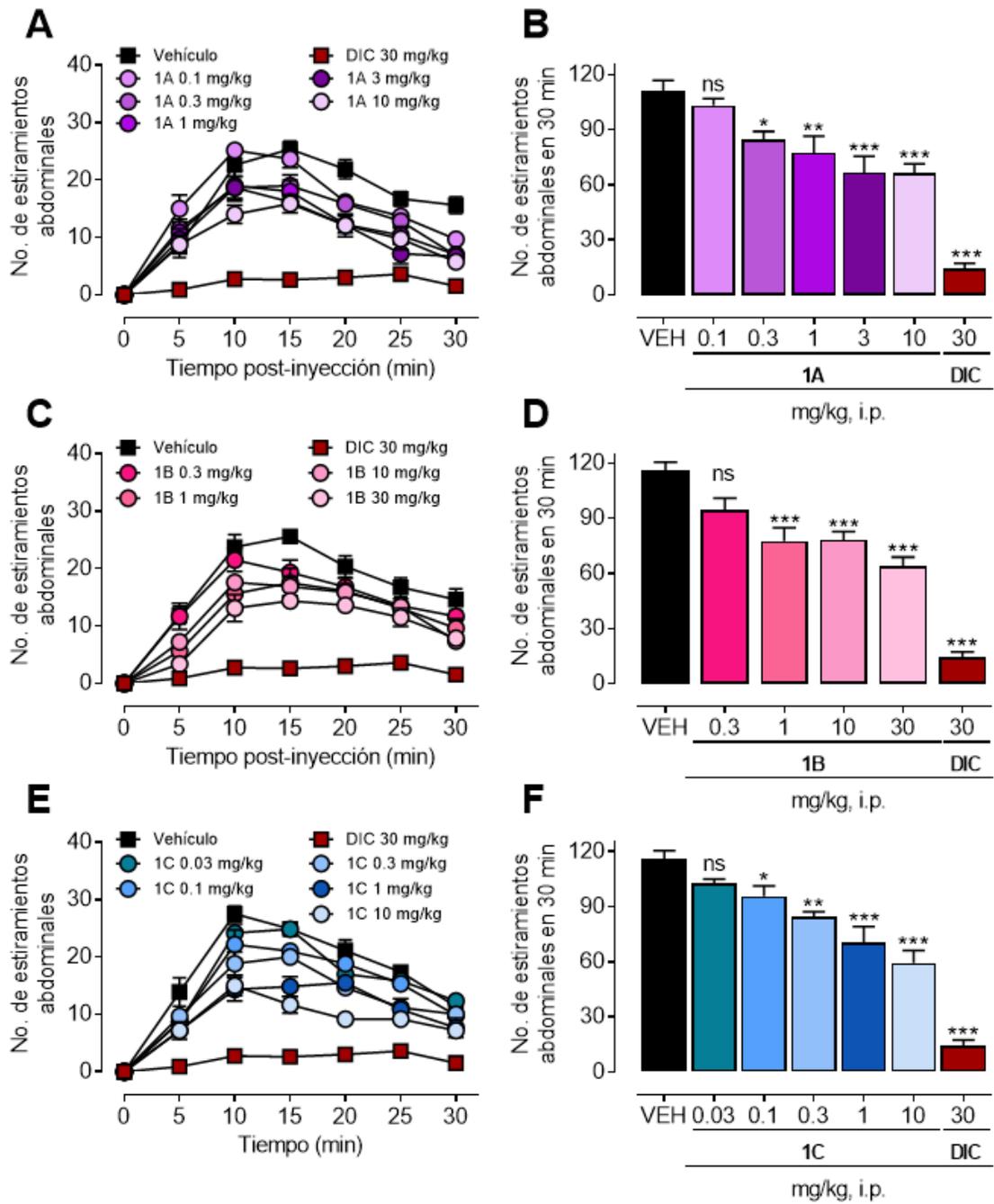


Figura 17. Efecto antinociceptivo de las fosfoserinas  $\alpha$ -metiladas 1A, 1B y 1C en el modelo de estiramiento abdominal. En los paneles A, C, y E se muestran los cursos temporales de los estiramientos abdominales. En B, D, y F los datos se muestran como el número total de estiramientos observados en un periodo de 30 minutos. Cada punto o barra representa  $\bar{X} \pm \text{SEM}$  ( $n = 6-8/\text{dosis}$ ). \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  significativo comparado con el vehículo, por ANOVA de una vía, seguido de un post-hoc de Dunnett. VEH: Vehículo, DIC: Diclofenaco, i.p.: intraperitoneal, ns: no significativo.

De forma similar el pre-tratamiento con las fosfoserinas  $\alpha$ -metiladas 1D (0.3, 1, 3, 10 y 30 mg/kg), 1E (0.03, 0.1, 1, 3 y 10 mg/kg) y 1F (0.03, 0.1, 0.3, 1, 3 y 10 mg/kg) disminuyó el número de estiramientos abdominales en todos los intervalos de tiempo evaluados (Figura 18 A, C, E). En las gráficas de barras se observa que esta disminución fue estadísticamente significativa para 1D a partir de la dosis de 1 mg/kg, para 1E a partir de 0.03 mg/kg y para 1F a partir de 0.3 mg/kg. El efecto máximo observado se produjo con la dosis de 30 mg/kg de 1D y 1E, mientras que el de 1F se observó a la dosis de 10 mg/kg (Figura 18 B, D, F).

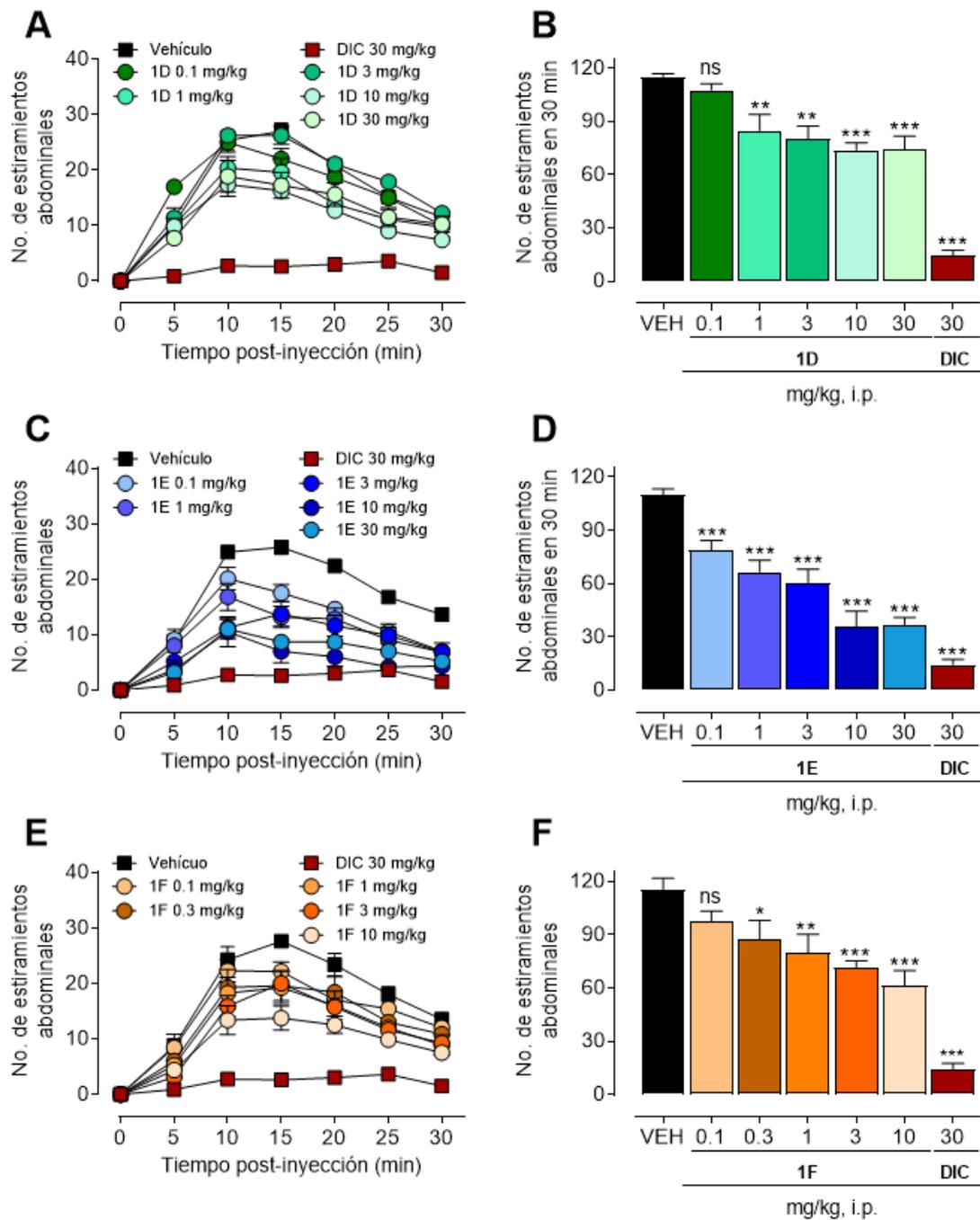


Figura 18. Efecto antinociceptivo de las fosfoserinas  $\alpha$ -metiladas 1D, 1E y 1F en el modelo de estiramiento abdominal. En los paneles A, C, y E se muestran los cursos temporales de los estiramientos abdominales. En B, D, y F los datos se muestran como el número total de estiramientos observados en un periodo de 30 minutos. Cada punto o barra representa  $\bar{X} \pm \text{SEM}$  ( $n = 6-8/\text{dosis}$ ). \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  significativo comparado con el vehículo, por ANOVA de una vía, seguido de un post-hoc de Dunnett. VEH: Vehículo, DIC: Diclofenaco, i.p.: intraperitoneal, ns: no significativo.

Finalmente, las fosfoferinas  $\alpha$ -metiladas 2B (0.03, 0.1, 1, 3 y 10 mg/kg) y 2C (0.1, 0.3, 1, 3 y 10 mg/kg) disminuyeron de manera dosis dependiente el número de estiramientos abdominales en todos los intervalos de tiempo evaluados (Figura 19 A y C). En la gráfica de barras se observa que esta disminución fue estadísticamente significativa para 2B a partir de la dosis de 0.03 mg/kg y para 2C a partir de 0.1 mg/kg. Tanto 2B como 2C alcanzaron su efecto antinociceptivo máximo a la dosis de 10 mg/kg (Figura 19 B y D). Nuestros resultados muestran que todas las fosfoferinas  $\alpha$ -metiladas evaluadas presentaron un efecto antinociceptivo en un rango de dosis que va de 0.03 a 30 mg/kg en el modelo de estiramiento abdominal.

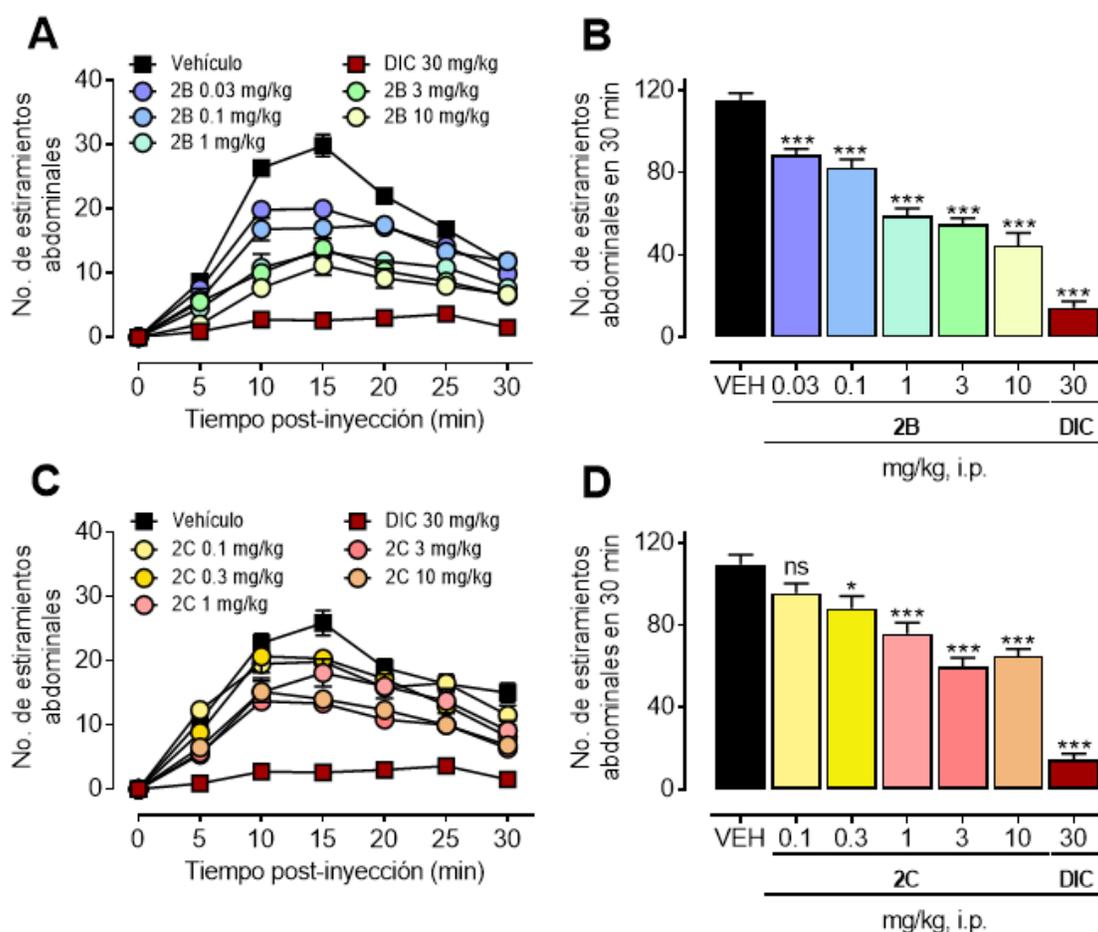


Figura 19. Efecto antinociceptivo de las fosfoferinas  $\alpha$ -metiladas 2B y 2C en el modelo de estiramiento abdominal. En los paneles A y C se muestran los cursos temporales de los estiramientos abdominales. En B y D los datos se muestran como el número total de estiramientos observados en un periodo de 30 minutos. Cada punto o barra representa  $\bar{X} \pm SEM$  ( $n = 6-8$ /dosis). \* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.001$  significativo comparado con el vehículo, por ANOVA de una vía, seguido de un post-hoc de Dunnett. VEH: Vehículo, DIC: Diclofenaco, i.p.: intraperitoneal, ns: no significativo.

Adicionalmente, a partir del número total de estiramientos abdominales se calculó el % de efecto antinociceptivo con la finalidad de construir la curva dosis-respuesta (CDR) de las diferentes fosfoferinas  $\alpha$ -metiladas. A partir de la CDR, se calcularon los parámetros de eficacia o efecto máximo ( $E_{m\acute{a}x}$ ) y potencia ( $DE_{30}$ ) (Tabla 10). Encontramos que si bien todas las fosfoferinas  $\alpha$ -metiladas poseen efecto antinociceptivo, ninguna posee un efecto máximo mayor al que produjo el Diclofenaco. Cabe mencionar que los efectos presentados por los compuestos 1B y 1D no fueron dependientes de la dosis por lo cual no se pudo obtener la  $DE_{30}$ , en comparación con el resto de las fosfoferinas  $\alpha$ -metiladas evaluadas. En la figura 20 se muestra la CDR de los cuatro compuestos que presentaron la mayor eficacia máxima y que se encuentra en rango que va de 46.5% a 67.8%. Estos resultados nos indican que las fosfoferinas  $\alpha$ -metiladas se comportan como agonistas parciales en el modelo de estiramiento abdominal.

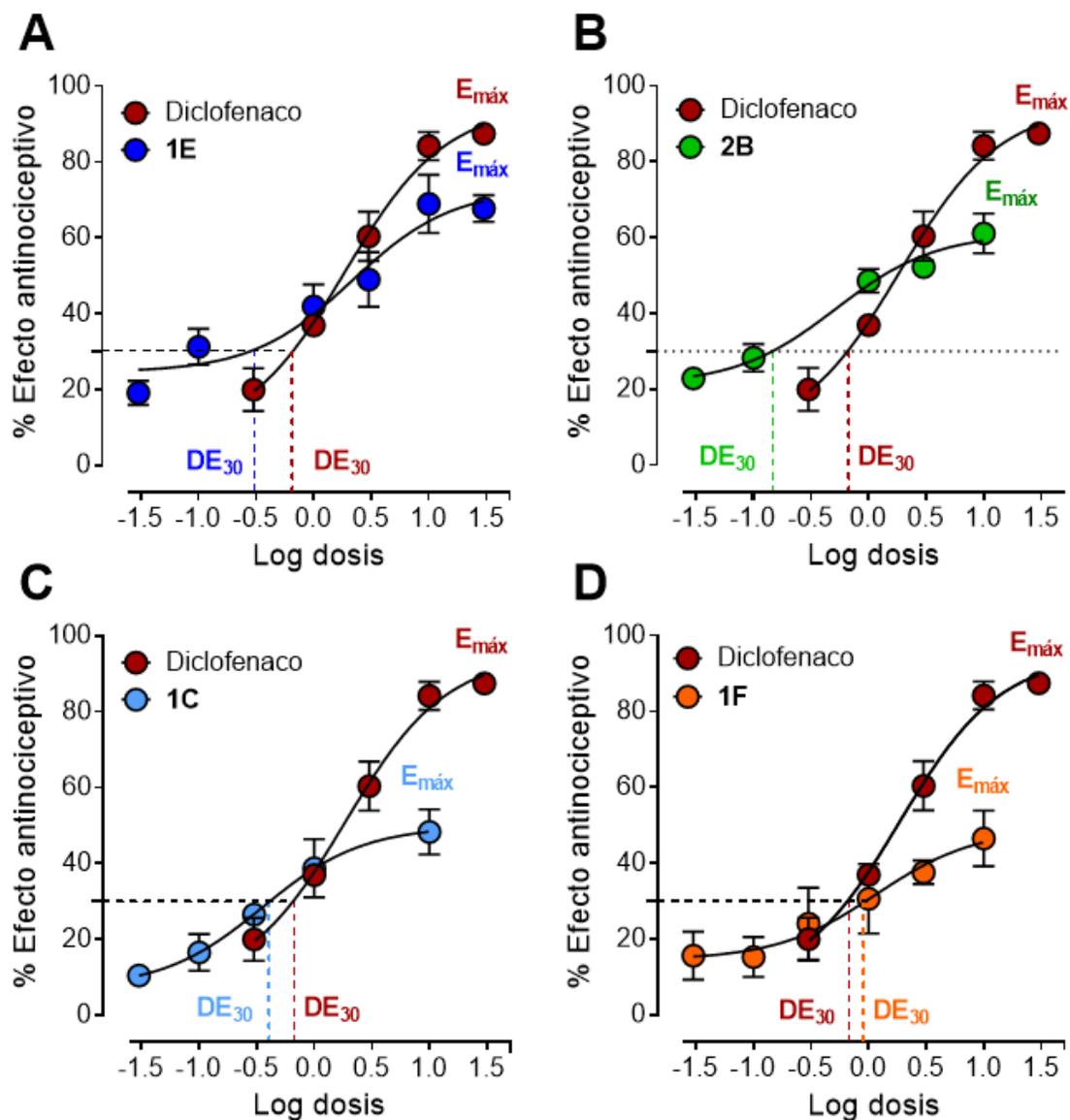


Figura 20. Curva dosis respuesta de las fosfoferinas  $\alpha$ -metiladas 1E, 2B, 1F y 1C en el modelo de estiramiento abdominal. Cada punto representa  $\bar{X} \pm SEM$  ( $n = 6-8/\text{dosis}$ ).  $E_{m\acute{a}x}$ : Eficacia máxima,  $DE_{30}$ : Dosis efectiva 30.

En la tabla 10 se muestra un resumen de los parámetros calculados a partir de la CDR de cada una de las fosfoferinas  $\alpha$ -metiladas: eficacia máxima y  $DE_{30}$ . Se observa que las fosfoferinas  $\alpha$ -metiladas que muestran la mayor eficacia máxima fueron 1E y 2B con un efecto máximo de  $67.8 \pm 3.5\%$  y  $61.1 \pm 5.3\%$ , respectivamente. El análisis estadístico por prueba de t de student de los grupos tratados con las dosis que producen estos efectos no mostró diferencias estadísticamente significativas, indicando que ambas fosfoferinas  $\alpha$ -metiladas son

equiefectivas. De forma global el orden de eficacia de las fosfoferinas  $\alpha$ -metiladas, en orden decreciente fue Diclofenaco>1E=2B>1C=1F=1B=2C=1A>1D.

En cuanto a la potencia ( $DE_{30}$ ) se observó que las fosfoferinas  $\alpha$ -metiladas más potentes fueron 1E y 2B y la menos potente fue 1D. Cabe destacar que las fosfoferinas  $\alpha$ -metiladas 1E y 2B fueron más potentes que el Diclofenaco. El orden de potencia en orden decreciente fue 2B>1E>1C>Diclofenaco>2C>1F>1A.

Tabla 10. Eficacia y potencia de las fosfoferinas  $\alpha$ -metiladas en el modelo de dolor visceral.

Fosfoferinas $\alpha$ -metiladas	$E_{m\acute{a}x}$ (% efecto)	$DE_{30}$ (mg/kg)	Intervalo de confianza (mg/kg)
Diclofenaco	87.5 $\pm$ 2.7	0.57	0.29 – 1.12
1E	67.8 $\pm$ 3.5	0.13	0.05 – 0.33
2B	61.1 $\pm$ 5.3	0.10	0.06 – 0.15
1C	48.3 $\pm$ 6	0.51	0.32 – 0.83
1F	46.5 $\pm$ 7.3	0.72	0.38 – 1.38
1B	44.4 $\pm$ 4.4	ND	-
2C	43.5 $\pm$ 3.2	0.62	0.25 – 1.52
1A	42.3 $\pm$ 4.5	0.90	0.41 – 1.96
1D	35.7 $\pm$ 7.5	ND	-

En conjunto, todos estos resultados demuestran que las fosfoferinas  $\alpha$ -metiladas evaluadas poseen un efecto antinociceptivo moderado en un modelo de dolor visceral, y que las fosfoferinas  $\alpha$ -metiladas más prometedoras para continuar siendo evaluados son 1E, 2B, 1C y 1F.

## 6.2. Efecto antinociceptivo de las fosfoferinas $\alpha$ -metiladas 1A, 1D, 1E y 1F en un modelo de dolor inflamatorio

Para determinar si las fosfoferinas  $\alpha$ -metiladas poseen efecto antinociceptivo en un modelo de dolor inflamatorio, se utilizó el modelo de la formalina. Por disponibilidad de los compuestos, solamente se evaluaron los compuestos 1A, 1D, 1E y 1F. Para cumplir con este objetivo inicialmente se caracterizó el curso temporal de la conducta nociceptiva de “licking”

o lamida de la pata inyectada con concentraciones crecientes de formalina (1, 2.5 y 5%). Lo anterior se realizó con la finalidad de determinar que concentración de formalina produce la conducta de *licking* con una magnitud suficiente que nos permita evaluar el efecto antinociceptivo de las fosfoserinas  $\alpha$ -metiladas de interés. Se observó que la administración subcutánea de formalina en el dorso de la pata posterior derecha a las concentraciones de 1%, 2.5% y 5% produjo la conducta nociceptiva de lamida de pata. Esta conducta se observó inmediatamente después de la inyección de formalina y persistió por al menos 40 minutos. La conducta de lamida de la pata inyectada presentó un patrón bifásico. La fase I se observó de los 0 a los 10 minutos en donde se observó un pico máximo a los 5 minutos post-inyección. Cabe mencionar que entre los 10 y 15 minutos post-inyección se observó una disminución significativa del tiempo de lamida, a este periodo se le conoce como interfase. Posteriormente la conducta de lamida incremento gradualmente alcanzando un pico máximo entre los 25 y 30 minutos post-inyección, y persistió hasta los 40 min post-inyección, a lo que se le denomina fase II (Figura 21 A). Cuando los datos se presentan como el tiempo total de lamida de pata de la fase I y de la fase II, se observó que la fase I presentó un tiempo de lamida mucho menor en comparación con la fase II. Además cabe mencionar que en la fase I se observa un efecto dependiente de la concentración, mientras que en la fase II el efecto dependiente de la concentración solo se observó cuando se inyectó formalina al 1 y al 2.5%, mientras que la concentración de 5% produjo un efecto similar a las concentraciones anteriores pero con mayor variabilidad (Figura 21 B). Con base en estos resultados se decidió utilizar la concentración de formalina de 2.5% para evaluar el posible efecto antinociceptivo de las fosfoserinas  $\alpha$ -metiladas.

Para validar el modelo, se empleó como control positivo Diclofenaco. Éste fármaco pertenece al grupo de los AAINes y esta reportado que posee efecto analgésico en el modelo de dolor inflamatorio (66). Se observó que el pre-tratamiento (-20 min) subcutáneo con Diclofenaco sódico a la dosis de 10, 30 o 100  $\mu$ g/pata no modifica el tiempo de lamida de pata durante la fase I. En contraste, en la fase II se observó que el Diclofenaco disminuyó de forma dependiente de la dosis el tiempo de lamida, siendo el efecto antinociceptivo estadísticamente significativo a las dosis de 30 y 100  $\mu$ g/pata (Figura 21 C y D). Debido a que el mayor efecto antinociceptivo de Diclofenaco, en este modelo, se observó con la dosis de 100  $\mu$ g/pata, se utilizó esta dosis para comparar con el efecto de las fosfoserinas  $\alpha$ -metiladas evaluadas.

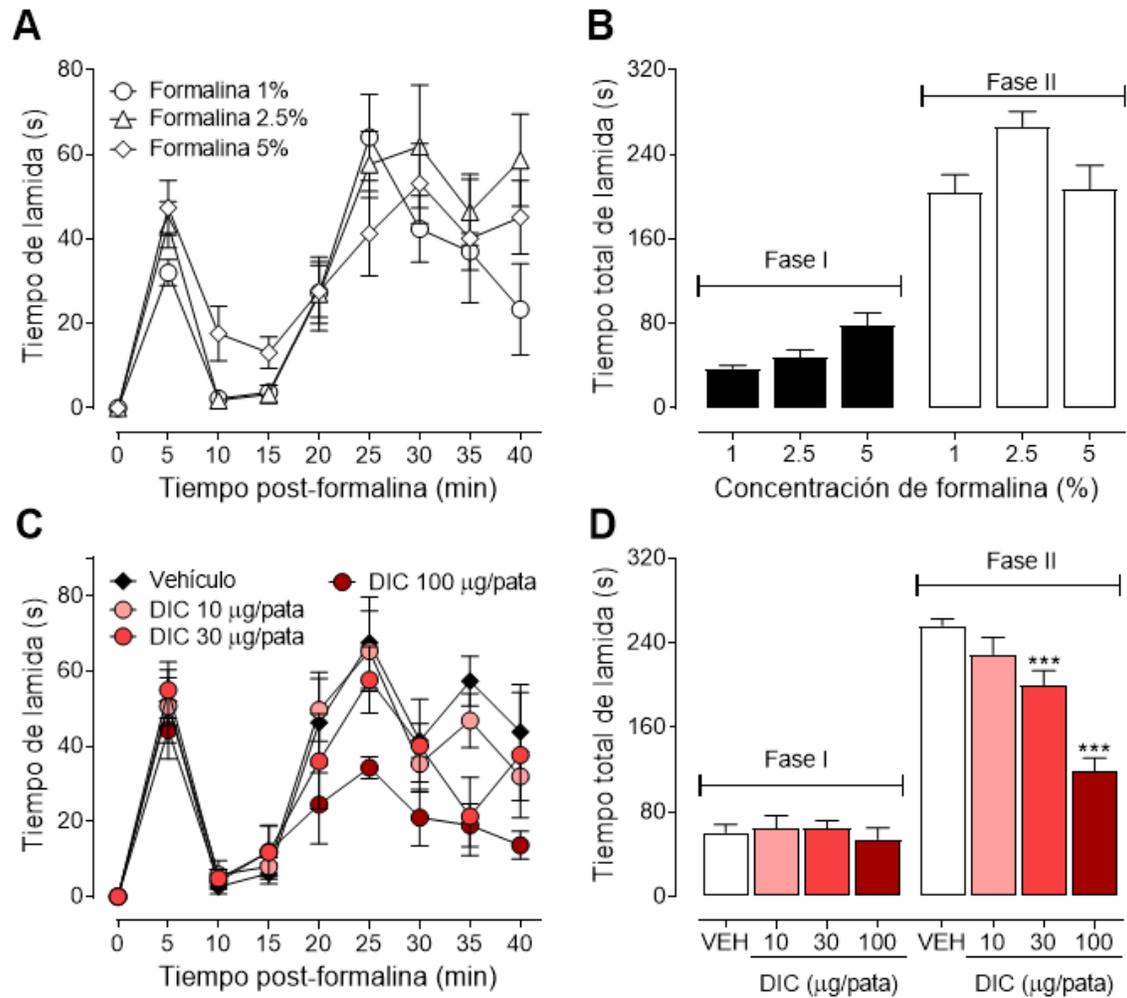


Figura 21. Estandarización y validación del modelo de formalina. En el panel A se muestra el curso temporal de la conducta nociceptiva de lamida de la pata inyectada inducida por la inyección de concentraciones crecientes de formalina (1, 2.5 y 5%). En el panel C se muestra el efecto de Diclofenaco (s.c.) en el tiempo de lamida. En los paneles B y D los datos se muestran como el tiempo total de lamida durante la fase I (0 – 10 min) y durante la fase II (15 – 40 min). Cada punto o barra representa  $\bar{X} \pm \text{SEM}$  ( $n = 8/\text{dosis}$ ). \*\*\* $p < 0.001$  comparado con el vehículo, por ANOVA de una vía, seguido de una post-hoc de Dunnett. VEH: Vehículo, DIC: Diclofenaco.

Para determinar si las fosfoserinas  $\alpha$ -metiladas 1A, 1D, 1E y 1F poseen efecto antinociceptivo en el modelo de formalina, se evaluaron dosis crecientes de cada una de las fosfoserinas  $\alpha$ -metiladas (0.003 – 1 mg/pata) las cuales fueron administradas como pre-tratamiento por vía subcutánea (-20 min) antes de la inyección de formalina al 2.5%.

Se observó que el pre-tratamiento subcutáneo, a las dosis evaluadas de las fosfoserinas  $\alpha$ -metiladas 1A, 1D, 1E y 1F no modificó de manera significativa el tiempo de lamida durante

la fase I de la prueba de la formalina (Figuras 22 y 23). En contraste en la fase II se observó que la fosfoferina 1A disminuyó el tiempo de lamida, siendo estadísticamente significativo a las dosis de 0.1, 0.3 y 1 mg/pata. Sin embargo, es importante destacar que el efecto antinociceptivo observado no fue dependiente de la dosis ya que en las tres dosis previamente mencionadas el efecto fue de aproximadamente el 35% (Figura 22 A y B). De la misma manera, se observó que el pre-tratamiento con dosis crecientes de las fosfoferinas 1D, 1E y 1F disminuyó el tiempo de lamida durante la fase II de la prueba de la formalina alcanzando un efecto máximo aproximadamente a los 25 minutos después de la inyección de formalina (Figuras 22 y 23). Cuando los datos se presentan como el tiempo total de lamida durante la fase II, se observó que el efecto de estas tres fosfoferinas fue dependiente de la dosis. El efecto antinociceptivo de la fosfoferina 1D fue estadísticamente significativo a las dosis de 0.1 y 1 mg/pata, mientras que su efecto antinociceptivo máximo se observó con la dosis de 1 mg/pata (Figura 22 C y D). En el caso de la fosfoferina 1E, su efecto antinociceptivo fue estadísticamente significativo a las dosis de 0.1, 0.3 y 1 mg/pata, y su efecto antinociceptivo máximo se presentó a las dosis de 0.3 mg/pata (Figura 23 A y B). Por otro lado, la fosfoferina 1F presento un efecto antinociceptivo estadísticamente significativo a partir de la dosis de 0.01 mg/pata, y su efecto antinociceptivo máximo se observó a la dosis de 0.1 mg/pata (Figura 23 C y D).

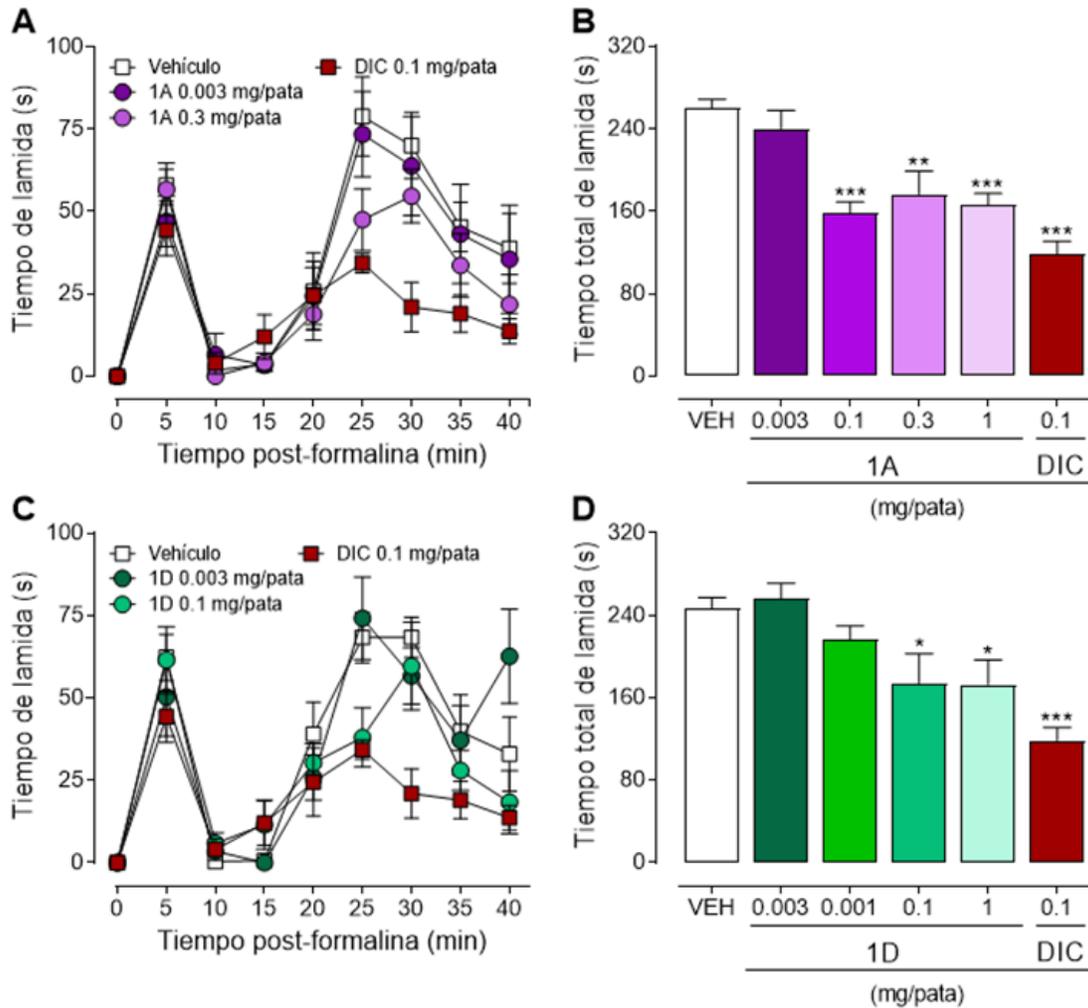


Figura 22. Efecto antinociceptivo de las fosfoserinas 1A y 1D en el modelo de dolor inducido por formalina. En los paneles A y C se muestran el efecto de las fosfoserinas en el curso temporal del tiempo de lamida. En los paneles B y D los datos se muestran como el tiempo total de lamida de la fase II. Cada punto o barra representa  $\bar{X} \pm \text{SEM}$  ( $n = 6/\text{dosis}$ ). \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  significativo comparado con el vehículo, por ANOVA de una vía, seguido de una post hoc de Dunnett. VEH: Vehículo, DIC: Diclofenaco.

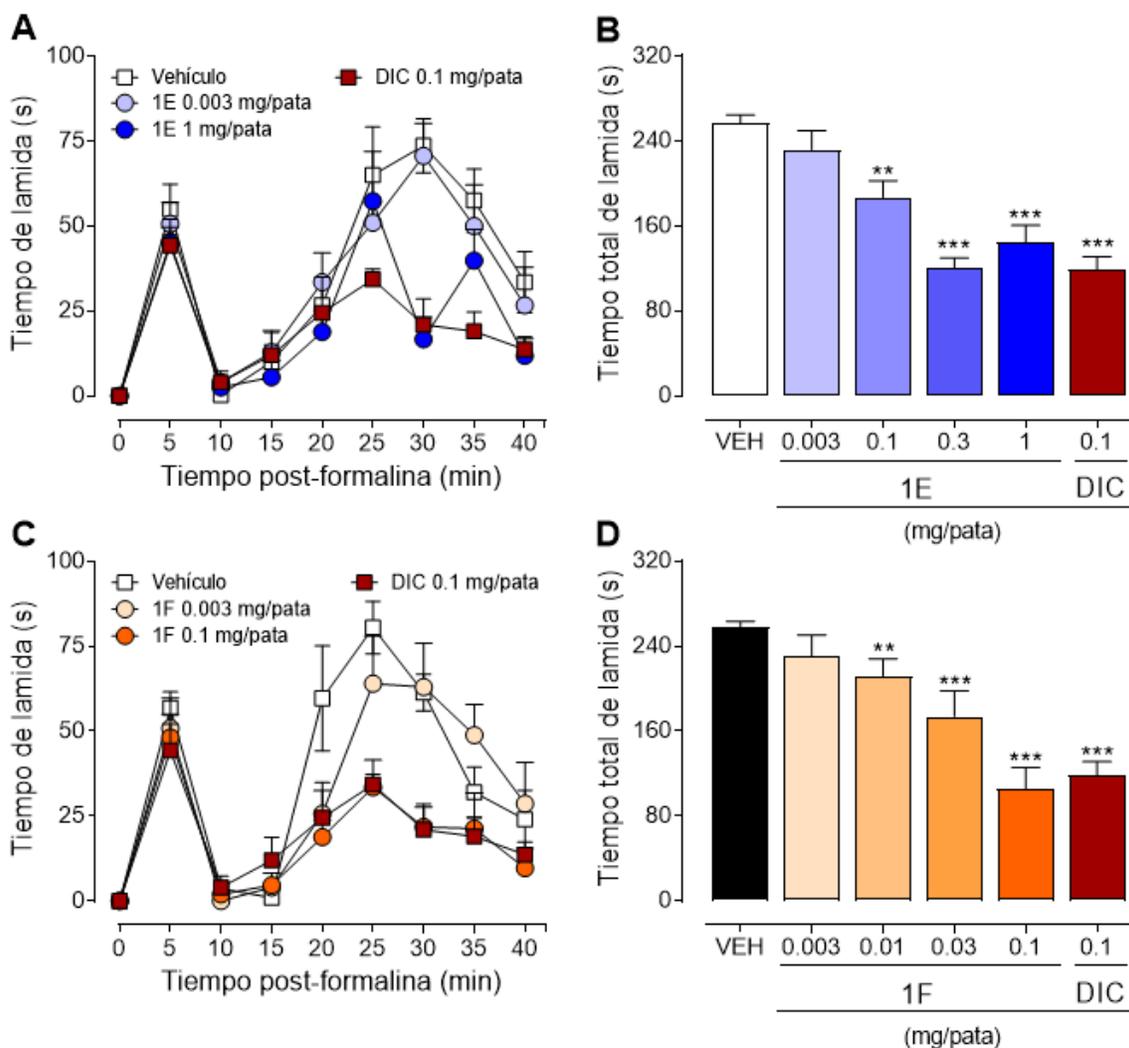


Figura 23. Efecto antinociceptivo de las fosfoserinas 1E y 1F en el modelo de dolor inducido por formalina. En los paneles A y C se muestran el efecto de las fosfoserinas en el curso temporal del tiempo de lamida. En los paneles B y D los datos se muestran como el tiempo total de lamida de la fase II. Cada punto o barra representa  $\bar{X} \pm \text{SEM}$  ( $n = 6/\text{dosis}$ ). \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  significativo comparado con el vehículo, por ANOVA de una vía, seguido de una post hoc de Dunnett. VEH: Vehículo, DIC: Diclofenaco.

Por último, el tiempo de lamida se utilizó para calcular el % de efecto antinociceptivo y para construir la CDR del % de efecto antinociceptivo de las fosfoserinas  $\alpha$ -metiladas 1A, 1D, 1E y 1F. Este análisis mostró que las cuatro fosfoserinas  $\alpha$ -metiladas evaluadas poseen efecto antinociceptivo, siendo las fosfoserinas 1E y 1F las que mostraron un efecto antinociceptivo máximo evaluado similar al de Diclofenaco (Figura 24 C y D). Las demás fosfoserinas presentaron un efecto máximo por debajo del que se consigue con Diclofenaco (Figura 24 A y B). Esto demuestra que las fosfoserinas  $\alpha$ -metiladas 1A, 1D, 1E y 1F tienen efectividad en

el tratamiento del dolor inflamatorio inducido por la inyección subcutánea de formalina al 2.5%, en especial las fosfoserinas 1F y 1E.

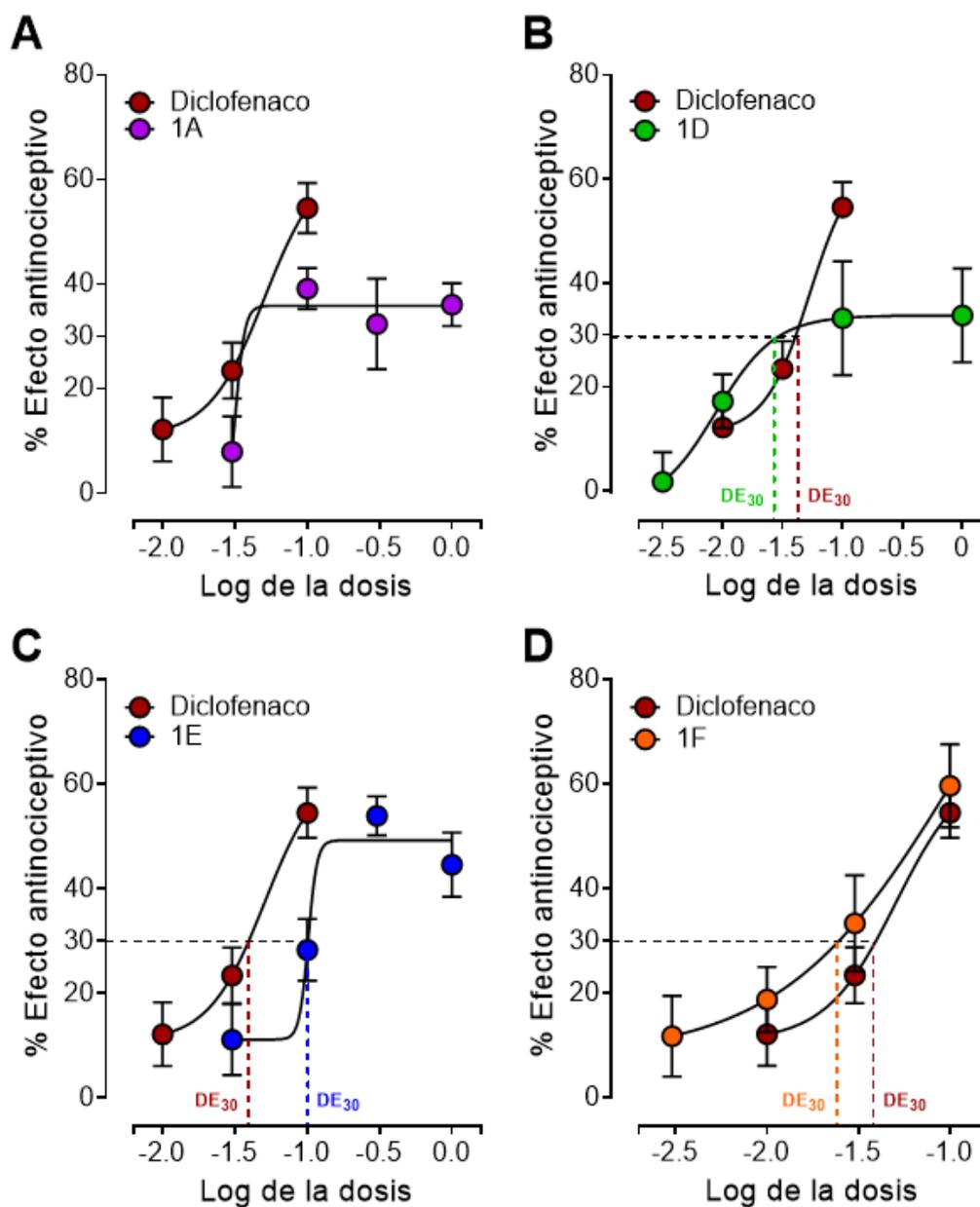


Figura 24. Curva dosis respuesta del efecto antinociceptivo de las fosfoserinas  $\alpha$ -metiladas 1A, 1D, 1E y 1F en el modelo de la formalina en ratón. Cada punto representa  $\bar{X} \pm \text{SEM}$  ( $n = 6/\text{dosis}$ ). DE<sub>30</sub>: Dosis efectiva 30.

En la tabla 11 se muestra un resumen de los parámetros de eficacia máxima y DE<sub>30</sub> de Diclofenaco y de las fosfoferinas  $\alpha$ -metiladas evaluadas. Estos resultados muestran que las fosfoferinas  $\alpha$ -metiladas más eficaces fueron 1F ( $59.7 \pm 7.9\%$ ) y 1E ( $53.9 \pm 3.7\%$ ), siendo igual de eficaces que el control positivo ( $54.5 \pm 4.8\%$ ). El menos eficaz es el 1D ( $33.7 \pm 9.1\%$ ). En cuanto a la potencia (DE<sub>30</sub>) se observó que la fosfoferina más potente fue 1F, nuevamente siendo más potente que Diclofenaco, y el menos potente fue 1A. El orden de potencia en orden decreciente fue 1F>1D>Diclofenaco>1E.

Tabla 11. Eficacia y potencia de las fosfoferinas  $\alpha$ -metiladas en el modelo de dolor inflamatorio.

$\alpha$ -aminofosfonato	E <sub>máx</sub> (% efecto)	DE <sub>30</sub> (mg/pata)	Intervalo de confianza (mg/pata)
1F	$59.7 \pm 7.9$	0.02	0.01 – 0.03
Diclofenaco	$54.5 \pm 4.8$	0.03	0.02 – 0.06
1E	$53.9 \pm 3.7$	0.11	0.02 – 0.65
1A	$36.1 \pm 4.1$	No aplica	-
1D	$33.7 \pm 9.1$	0.2	0.01 – 3.26

### 6.3. Efecto antialodínico de las fosfoferinas $\alpha$ -metiladas 1A, 1D, 1E y 1F en un modelo de dolor neuropático

Para determinar si las fosfoferinas  $\alpha$ -metiladas 1A, 1D, 1E y 1F poseen efecto antialodínico en un modelo de dolor neuropático, se utilizó el modelo de dolor neuropático inducido por axotomía parcial del nervio ciático. Para esto se utilizaron ratones con 14 días post-axotomía. Se seleccionó este tiempo debido a que en nuestras condiciones experimentales se ha establecido que los ratones muestran alodinia marcada (112). Inicialmente, se determinó si el vehículo (solución salina 0.9%) afectaba los valores del 50% de umbral de retiro de las patas posteriores de los ratones medido cada hora durante un periodo de 6 horas. Se observó que la pata posterior ipsilateral presentó valores de 50% de umbral de retiro menores a 0.4 g (alodinia), mientras que la pata contralateral mostró valores de 50% de umbral de retiro superiores a 0.8 g (considerado normal), durante todo el periodo de evaluación (Figura 25 A). En la gráfica de barras se muestran los resultados expresados como el Área Bajo la Curva (ABC), en donde se observa que el ABC de la pata ipsilateral fue significativamente menor

( $0.73 \pm 0.06$ ) en comparación con el ABC de la pata contralateral ( $6.84 \pm 0.26$ ) (Figura 25 B). Estos resultados muestran que la alodinia inducida por axotomía parcial del nervio ciático no se modifica con la administración del vehículo o la medición durante un intervalo de 6 horas.

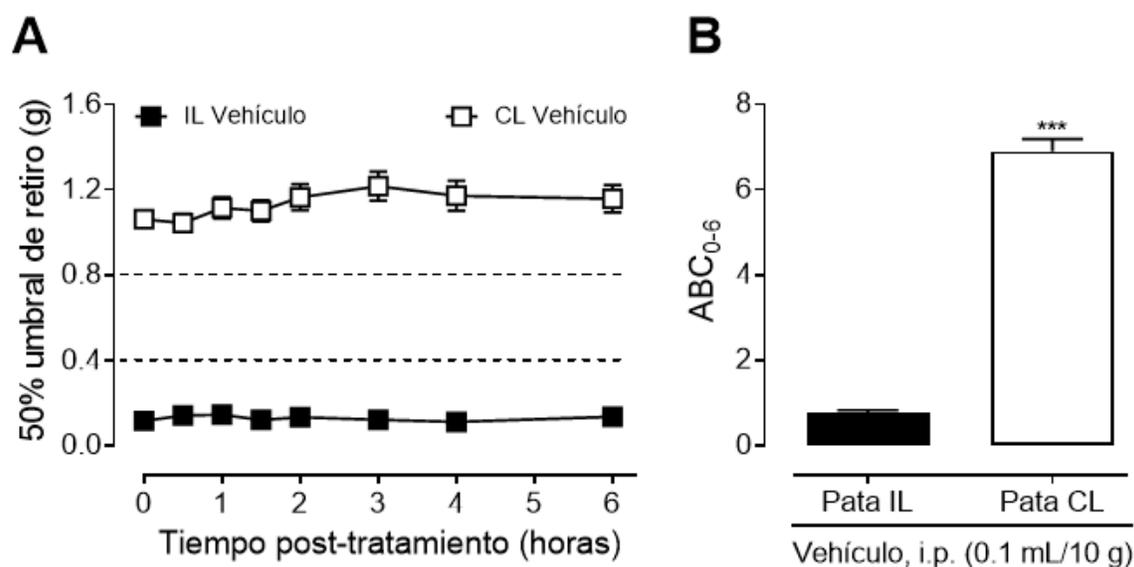


Figura 25. Efecto del vehículo en el curso temporal de la alodinia mecánica inducida por axotomía parcial del nervio ciático. En el panel A se muestra el curso temporal del 50% de umbral de retiro después de la administración del vehículo. En el panel B los datos se expresan como el área bajo la curva (ABC) calculada a partir del curso temporal. Cada punto o barra representa  $\bar{X} \pm \text{SEM}$  ( $n = 8$ ). IL: Ipsilateral, CL: Contralateral, i.p.: intraperitoneal.

Para validar nuestro modelo, se utilizó como control positivo la Gabapentina, fármaco que se encuentra en la primera línea en el tratamiento del dolor neuropático en el ámbito clínico. Se observó que el tratamiento intraperitoneal con Gabapentina (54.7, 100 y 300 mg/kg) en el día 14 post-axotomía, incrementó de manera dosis-dependiente el 50% de umbral de retiro de la pata ipsilateral, a partir de la hora 1 post-tratamiento. El efecto antialodínico máximo se presentó a la hora 3 post-tratamiento. A partir de este punto, el 50% de umbral de retiro disminuyó hasta alcanzar valores basales a la hora 6, excepto con la dosis de 600 mg/kg (Figura 26 A). En contraste, el 50% de umbral de retiro de la pata contralateral no se modificó con el tratamiento con Gabapentina en ninguno de los tiempos evaluados. Cuando los resultados se muestran como ABC se observó que el efecto antialodínico de Gabapentina fue dependiente de la dosis y estadísticamente significativo a partir de la dosis de 54.7 mg/kg y

hasta la dosis de 300 mg/kg. El efecto antialodínico máximo se produjo con la dosis de 300 mg/kg (Figura 26 B). Estos resultados demuestran que la alodinia mecánica inducida por axotomía parcial del nervio ciático disminuye con el tratamiento con Gabapentina, fármaco de primera línea en el tratamiento del dolor neuropático en humanos.

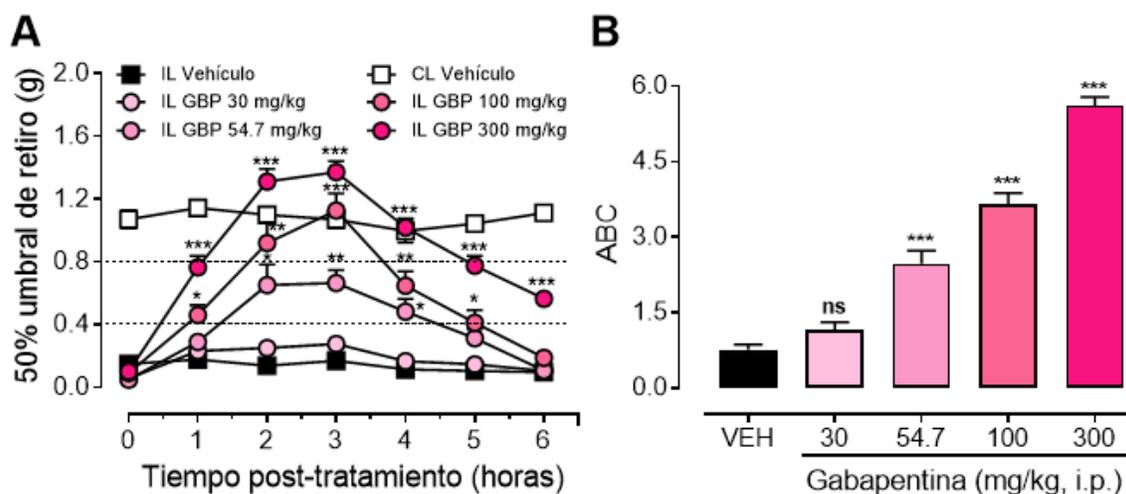


Figura 26. Efecto antialodínico de Gabapentina en el modelo de dolor neuropático inducido por axotomía parcial del nervio ciático. En el panel A se muestra el efecto de Gabapentina en el curso temporal de la alodinia mecánica. En el panel B los datos se expresan como el área bajo la curva (ABC) calculada a partir de los cursos temporales. Cada punto o barra representa  $\bar{X} \pm \text{SEM}$  ( $n = 8/\text{dosis}$ ). \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  significativo comparado con el vehículo, por ANOVA de dos vías, seguido de una post hoc de Tuckey (curso temporal) o por ANOVA de una vía, seguido de una post hoc de Dunnett (gráficas de barras). IL: Ipsilateral, CL: Contralateral, GBP: Gabapentina, i.p.: intraperitoneal, ns: no significativo.

Para determinar si las fosfoferinas  $\alpha$ -metiladas 1A, 1D, 1E y 1F poseen efecto antialodínico en el modelo de dolor neuropático inducido por axotomía parcial del nervio ciático, se administraron estos compuestos en un rango de dosis que va de 1 a 600 mg/kg, el día 14 post-axotomía y se evaluó su efecto en los valores de 50% de umbral de retiro. Los resultados mostraron que la fosfoferina 1A posee un efecto antialodínico muy bajo en comparación con la Gabapentina, a una dosis alta (300 mg/kg) en donde se observó una eficacia de tan solo el  $15.4 \pm 2.2\%$  (Figura 27 A y B), por lo que puede considerarse que esta fosfoferina no tiene potencial para el tratamiento del dolor neuropático. En contraste la fosfoferina 1D mostró un efecto antialodínico dependiente de la dosis. El efecto antialodínico inició 30 min post-administración y alcanzó un pico máximo una hora post-tratamiento. Sin embargo el efecto solo se mantiene por aproximadamente 3 horas con la dosis de 600 mg/kg (Figura 27 C). El análisis de ABC evidencia mejor el efecto dependiente de la dosis y se observa que el efecto

fue estadísticamente significativo a partir de la dosis de 300 y hasta la dosis de 600 mg/kg, dosis a la que se observó su efecto máximo ( $60.1 \pm 5.2\%$ ) (Figura 27 D). Sin embargo, es importante mencionar que el compuesto 1D a dicha dosis presentó efectos adversos importantes durante los primeros 20 minutos post-administración. Los efectos adversos observados fueron pérdida de la coordinación motora, erguimiento de la cola, convulsiones tónico-clónicas y sedación.

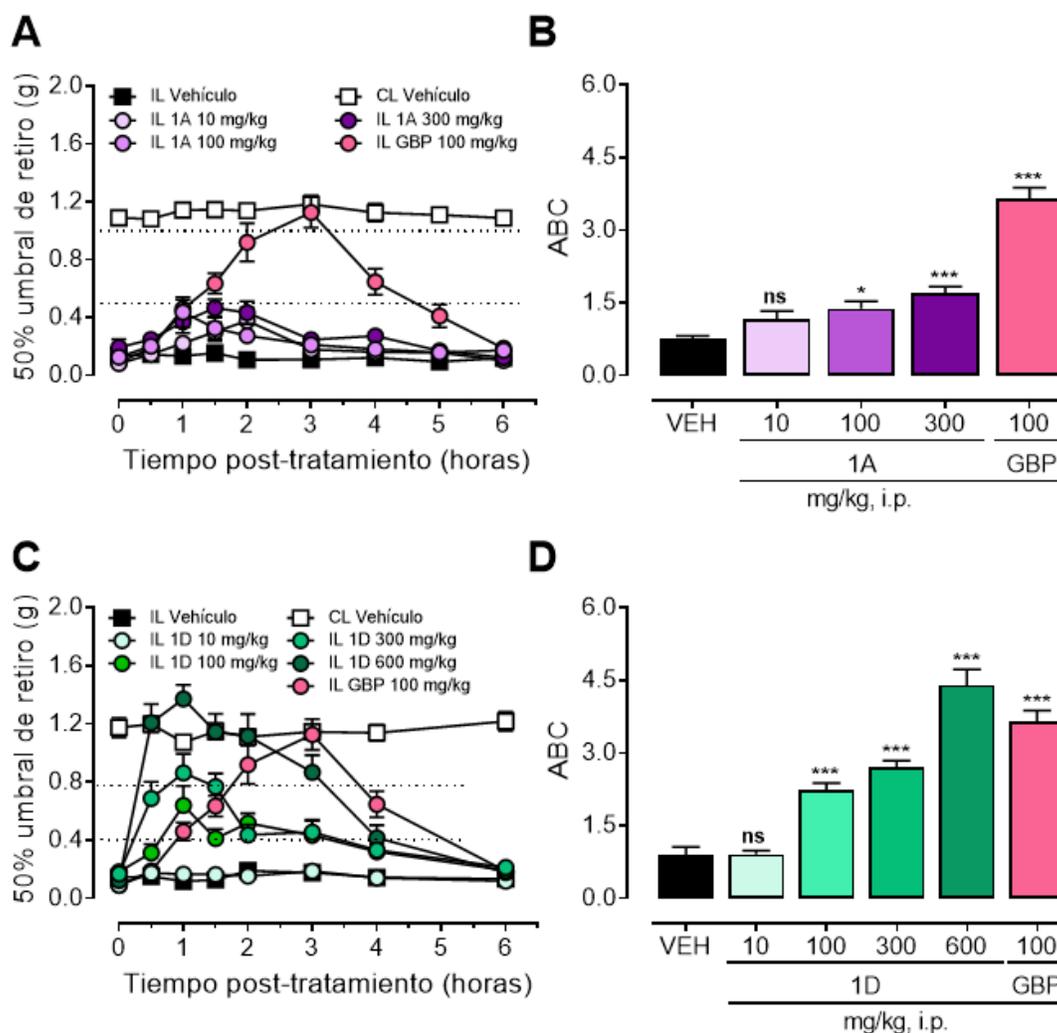


Figura 27. Efecto antialodínico de las fosfoserinas  $\alpha$ -metiladas 1A y 1D en el modelo de dolor neuropático inducido por axotomía parcial del nervio ciático. En los paneles A y C se muestran los cursos temporales de la alodinia mecánica. En los paneles B y D los datos se muestran como el área bajo la curva (ABC) calculada a partir de los cursos temporales. Cada punto o barra representa  $\bar{X} \pm \text{SEM}$  ( $n = 8/\text{dosis}$ ). \* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.001$  significativo comparado con el vehículo, por ANOVA de dos vías, seguido de una post hoc d Tuckey (curso

temporal) o por ANOVA de una vía, seguido de una post hoc de Dunnett (gráficas de barras). IL: Ipsilateral, CL: Contralateral, GBP: Gabapentina, i.p.: intraperitoneal, ns: no significativo.

En cuanto al compuesto 1E también se observó un efecto antialodínico. Esto se evidenció a través del incremento significativo del 50% de umbral de retiro de la pata ipsilateral de manera estadísticamente significativa como resultado de la administración de las diferentes dosis de 1E. El efecto antialodínico se observó a partir de la 0.5 horas post-administración, mientras que el efecto máximo se observó entre las 1 – 1.5 horas post-tratamiento. Al igual que con 1D, el efecto antialodínico fue de corta duración (aproximadamente 3 horas) (Figura 28 A). En el análisis de ABC se observó que el efecto antialodínico es dependiente de la dosis y que es estadísticamente significativo a todas las dosis evaluadas (Figura 28 B). Finalmente, la fosfoserina 1F también mostró un efecto antialodínico moderado, con un curso temporal similar al que produjo la fosfoserina 1E. Sin embargo, el análisis de ABC mostró que 1F mostró un efecto antialodínico dependiente de la dosis y estadísticamente significativo desde la dosis de 1 mg/kg y hasta la dosis de 300 mg/kg. Cabe destacar que el efecto antialodínico producido por las dosis de 300 y 600 mg/kg fue igual, lo cual indica que se alcanzó la eficacia máxima (Figura 28 C y D). Cabe resaltar que la fosfoserina 1F a las dosis de 300 y 600 mg/kg, presentó efectos adversos en los primeros 15 minutos después de su administración, como pérdida de la coordinación motora, erguimiento de la cola y sedación.

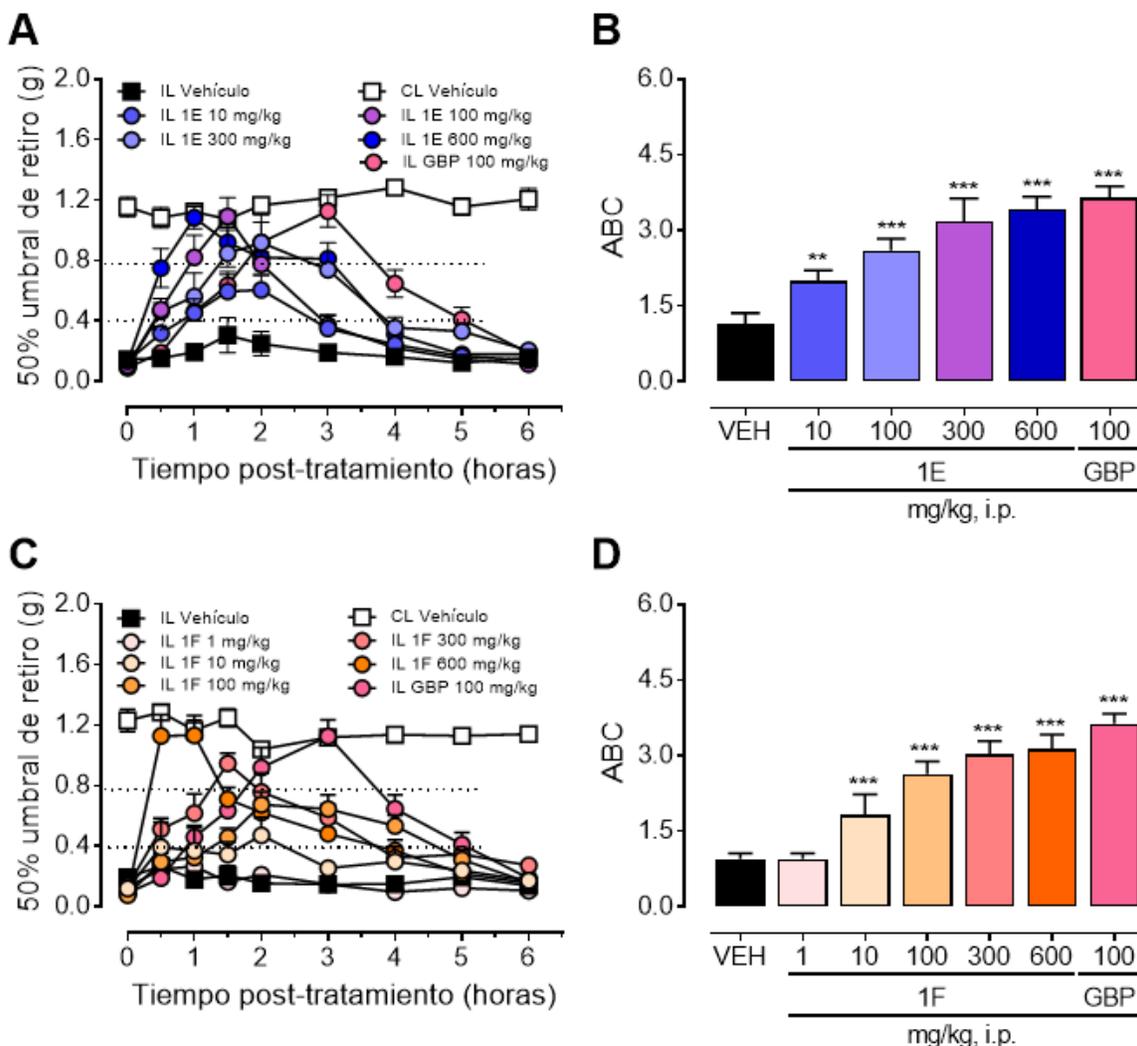


Figura 28. Efecto antialodínico de las fosfoserinas  $\alpha$ -metiladas 1E y 1F en el modelo de dolor neuropático inducido por axotomía parcial del nervio ciático. En los paneles A y C se muestran los cursos temporales de la alodinia mecánica. En los paneles B y D los datos se muestran como el área bajo la curva (ABC) calculada a partir de los cursos temporales. Cada punto o barra representa  $\bar{X} \pm \text{SEM}$  ( $n = 8/\text{dosis}$ ). \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  significativo comparado con el vehículo, por ANOVA de dos vías, seguido de una post hoc de Tukey (curso temporal) o por ANOVA de una vía, seguido de una post hoc de Dunnett (gráficas de barras). IL: Ipsilateral, CL: Contralateral, GBP: Gabapentina, i.p.: intraperitoneal, ns: no significativo.

Finalmente, con los datos de ABC se realizó el cálculo del % de efecto antialodínico para construir la CDR de Gabapentina y de las fosfoserinas  $\alpha$ -metiladas 1A, 1D, 1E y 1F. Las CDR muestran claramente que la eficacia del compuesto 1A es menor al 20%, lo que lo descarta como una fosfoserina con un efecto antialodínico prometedor. La eficacia máxima alcanzada por las fosfoserinas 1D, 1E y 1F fue de  $60.1 \pm 5.2\%$ ,  $44.0 \pm 4.5\%$  y  $39.2 \pm 4.5\%$ , respectivamente. En cuanto a la potencia, para 1A no es posible calcularse, mientras que la

DE<sub>30</sub> de 1D, 1E y 1F fue de 116.1 mg/kg, 58.8 mg/kg y 28.13 mg/kg, respectivamente (Figura 29).

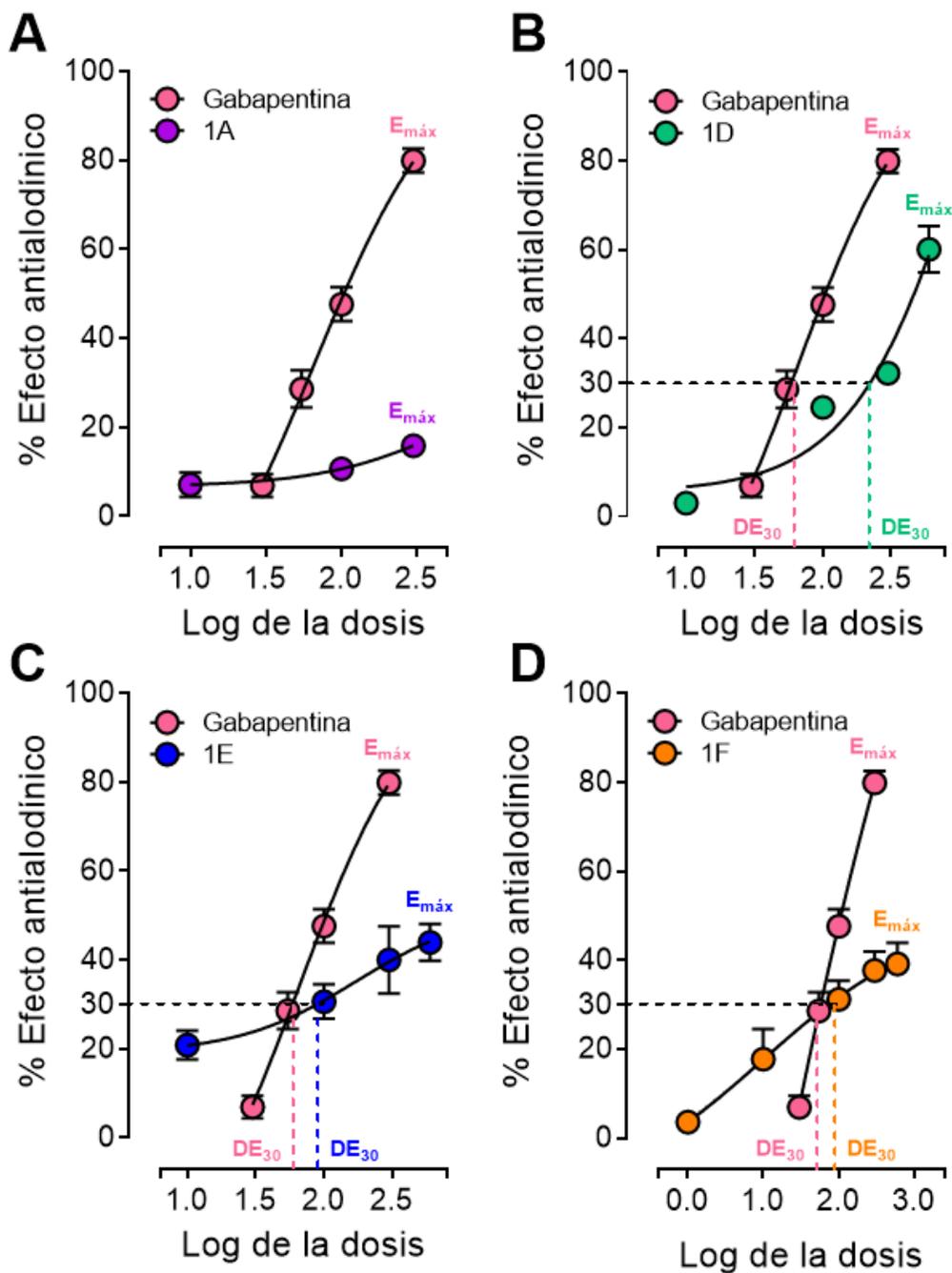


Figura 29. Curvas dosis respuesta del efecto antialodínico de las fosfoserinas  $\alpha$ -metiladas 1<sup>a</sup>, 1D, 1E y 1F en el modelo de dolor neuropático inducido por axotomía parcial del nervio ciático. Cada punto representa  $\bar{X} \pm SEM$  (n = 8/dosis).

En cuanto a la potencia ( $DE_{30}$ ) se observó que la fosfoferina  $\alpha$ -metilada más potente fue 1E, y la menos potente fue 1D. En el caso de las fosfoferinas 1F y 1A, no fue posible calcular la  $DE_{30}$  ya que su eficacia máxima no era mayor a 30% o porque no se formaba una CDR. El orden de potencia en orden decreciente fue 1E>Gabapentina>1D.

En conjunto estos resultados sugieren que el compuesto 1D es un candidato para seguir estudiándose como potencial candidato para el tratamiento del dolor neuropático.

## 7. DISCUSIÓN

En el presente estudio se evaluó el efecto antinociceptivo de las fosfoferinas  $\alpha$ -metiladas en tres modelos de dolor en ratones, con el objetivo de determinar cuáles de estas fosfoferinas mostraban tener un efecto antinociceptivo prometedor para continuar con su estudio como potenciales fármacos analgésicos que puedan complementar o reemplazar las terapéuticas actuales para el tratamiento del dolor.

### 7.1. Modelo de dolor visceral

El dolor visceral es aquel que se localiza en las vísceras huecas como resultado de la activación mecánica o química de los nociceptores, resultado de la compresión, distensión y obstrucción de las vísceras (25). Existen síndromes de dolor visceral de temporalidad aguda (p. ej. el dolor por apendicitis aguda o colecistitis aguda) y de temporalidad crónica (p. ej. el síndrome de intestino irritable), por lo que puede manifestarse tanto como una urgencia médica como una condición crónica incapacitante (29, 32). En el presente estudio se implementó y validó un modelo de dolor visceral conocido como modelo de estiramiento abdominal, en donde el dolor se localiza principalmente en las vísceras que se encuentran en la cavidad peritoneal (p. ej. membranas serosas del peritoneo, el mesenterio, el intestino delgado y el intestino grueso) (64). El dolor en este modelo es inducido por la inyección intraperitoneal de ácido acético al 0.6%, que produce de manera inmediata una respuesta nociceptiva característica conocida como estiramiento abdominal, que perdura por al menos 30 minutos (65). Éste modelo es fácil de replicar, ya que el procedimiento es fácil de realizar, no requiere de equipamiento especializado y es rápido, a diferencia de otros modelos de dolor visceral como el de distensión rectal, que requiere del uso de electromiografía para evaluar las respuestas visceromotoras (113).

El dolor visceral inducido por la inyección de ácido acético se manifiesta a través de estiramientos abdominales. Por ello la cuantificación del número de estiramientos abdominales se utiliza para evaluar los mecanismos fisiopatológicos que subyacen el dolor visceral y el potencial antinociceptivo de nuevos fármacos (66). Con base en lo anterior en el presente utilizó para determinar el efecto de las fosfoferinas  $\alpha$ -metiladas en el dolor visceral. En nuestras condiciones experimentales, la inyección intraperitoneal de ácido

acético al 0.6%, pero no la de solución salina, produjo un incremento estadísticamente significativo de estiramientos abdominales en un período de 30 minutos. Dichos resultados concuerdan con lo reportado en la literatura, en donde se ha que el ácido acético produce un promedio de entre 32.5 y 44.83 estiramientos abdominales en un rango de tiempo entre 10 y 20 minutos (107, 114). Por otro lado, se ha observado que los estiramientos abdominales pueden disminuirse con fármacos que se encuentran entre las alternativas terapéuticas del manejo del dolor en la práctica clínica como como los AAINES y los opioides (115, 116). Sin embargo, también se inhiben con coadyuvantes como los antagonistas adrenérgicos (69), los antagonistas de receptores dopaminérgicos, los antihistamínicos, los relajantes musculares, los inhibidores de la monoaminooxidasa y los neurolépticos (116).

De acuerdo con lo anterior, para validar el modelo en nuestras condiciones experimentales se evaluó el efecto antinociceptivo del Diclofenaco sódico, un fármaco perteneciente a la familia de los AAINES que ha demostrado tener eficacia antinociceptiva en este modelo. Éste fármaco ejerce su efecto antinociceptivo a través de la inhibición de las enzimas ciclooxigenasas (44). Se observó que el pre-tratamiento (-15 min) con Diclofenaco (30 mg/kg, i.p.) disminuyó el número de estiramientos abdominales con una eficacia de  $87.5 \pm 2.7\%$ , resultado congruente con estudios previos que muestran que el Diclofenaco posee efecto antinociceptivo con una eficacia máxima en un rango entre 52 a 92% en el modelo de estiramiento abdominal (117, 118). Estos resultados muestran que en nuestras condiciones experimentales los estiramientos inducidos por ácido acético se inhiben por AINES.

Por otro lado es importante mencionar que existe evidencia que sugiere que el dolor visceral inducido por ácido acético es a través de sensibilización periférica y central. A la sensibilización periférica contribuyen también la activación y la migración de las células inmunitarias (p. ej. macrófagos y células cebadas) y la liberación de mediadores proinflamatorios (p. ej. TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ ) en la cavidad peritoneal (119). Otros mecanismos relacionados con la generación de estiramientos abdominales son el incremento de la concentración de aminas simpaticomiméticas y noradrenalina (69) y la activación de receptores P2X3 (70). A nivel central, la activación de las vías de señalización p-p38 MAPK en las células de la microglía genera conductas nociceptivas en este modelo (67). Por ende, si un fármaco genera un efecto antinociceptivo en el modelo de estiramiento abdominal, es

posible sugerir que su mecanismo de acción podría interferir con alguno de estos mecanismos moleculares.

## **7.2. Modelo de la formalina**

El dolor inflamatorio se produce por la activación de los nociceptores por mediadores proinflamatorios, liberados de manera aguda después de una lesión tisular o de manera crónica en patologías con un componente autoinmune, como la osteoartritis y la artritis reumatoide (18), patologías que presentan una gran prevalencia en nuestro país (35). En el presente estudio se implementó y validó un modelo de dolor inflamatorio conocido como el modelo de la formalina, en donde el dolor se induce a través de la inyección subcutánea de una solución diluida de formalina en el dorso de la pata posterior del roedor (64). En este modelo la formalina genera conductas nociceptivas como la lamida, mordida y sacudida de la pata inyectada, que presentan un curso temporal bifásico (120). Sin embargo, en ratón la conducta más robusta es la conducta de lamida de la pata inyectada. Esta conducta nociceptiva presentó un patrón bifásico La fase I que representa el dolor nociceptivo y la fase II que representa el dolor inflamatorio. Ambas fases presentan mecanismos fisiopatológicos característicos (71).

Estudios electrofisiológicos y farmacológicos han demostrado que la primera fase del modelo de formalina se produce por la activación directa de los canales TRPA1 y TRPV1 (119), presentes en las fibras C y A $\delta$  (121), sin embargo existen estudios que confirman que el dolor inflamatorio ocasionado por la inyección de formalina persiste aún sin las fibras C (122), por lo que se propone que la fase I pudiese estar regulada por otros mecanismos, tales como la activación de la liberación por la sustancia P y bradicinina (73). Mientras que la segunda fase se genera y se mantiene por el proceso inflamatorio producido por la activación de células inmunitarias que liberan mediadores proinflamatorios (p. ej. histamina, serotonina, prostaglandinas y bradicinina) (77).

El patrón bifásico de las conductas nociceptivas del modelo de la formalina traduce que el ratón presenta dolor nociceptivo y dolor inflamatorio, por lo tanto, la cuantificación del tiempo de las conductas, en este caso, del tiempo de lamida de pata, es útil para el estudio de los mecanismos fisiopatológicos de ambos tipos de dolor como para la evaluación de fármacos con efecto antinociceptivo y anti-inflamatorio. Con base en lo anterior, en el

presente estudio se caracterizó y validó el curso temporal del modelo de la formalina. Inicialmente se evaluaron distintas concentraciones de formalina (1, 2.5 y 5%), para determinar cuál de ellas producía conductas nociceptivas de manera más robusta y con la magnitud suficiente para evaluar el efecto antinociceptivo de las fosfoferinas  $\alpha$ -metiladas. De acuerdo a nuestros resultados, el efecto nociceptivo de la formalina fue dependiente de la concentración en la fase I, sin embargo en la fase II el efecto solo fue dependiente de la concentración con las dosis de 1 y 2.5%, ya que la concentración de 5% presento mayor variabilidad. Dichos resultados concuerdan con los estudios de Sufka y colaboradores, y Murray y colaboradores, ambos en 1988, en donde se observa que la concentración de formalina de 5% presenta mayor variabilidad del tiempo de lamida de pata en comparación a otras concentraciones (120, 123).

En estudios preclínicos previos se ha demostrado que la fase I del modelo de la formalina puede ser inhibida con barbitúricos (p. ej. Pentobarbital (124), opioides (p. ej. Morfina (125)) y AAINES (p. ej. Ácido acetilsalicílico (126)), mientras que la fase II es inhibida por opioides (p. ej. Morfina (125)), AAINES (p. ej. Ácido acetilsalicílico (126) e Indometacina (73)), corticoides (p. ej. Dexametasona (127)) y gabapentinoides (p. ej. Gabapentina (128)). Es por ello que se decidió validar el efecto del Diclofenaco en el modelo de formalina con nuestras condiciones experimentales. Los resultados muestran que el pre-tratamiento con Diclofenaco administrado por vía subcutánea no presenta efecto antinociceptivo en la fase I, pero sí en la fase II, en donde presenta una eficacia máxima de  $54.5 \pm 4.8\%$ . Dichos resultados concuerdan con lo reportado en estudios anteriores donde se demuestra que fármacos pertenecientes a la familia de los AAINES, como la Indometacina y el Ácido acetilsalicílico, disminuyen de manera significativa el tiempo de lamida de pata en la fase II del modelo (73). Estos resultados, confirman que el dolor inducido por formalina puede ser revertido con AAINES.

### **7.3. Modelo de dolor neuropático**

El dolor neuropático se genera por una lesión o disfunción de alguna de las estructuras del sistema nervioso central o periférico (129). Representa una condición de dolor patológico de etiología muy variada (21), que se manifiesta con mayor prevalencia como una patología clasificada como dolor crónico secundario que conlleva a la discapacidad (32), debido en parte a su difícil manejo (39). En el presente estudio se utilizó el modelo de dolor neuropático

inducido por la axotomía parcial del nervio ciático, previamente implementado y caracterizado en nuestro laboratorio (112) (81). En este modelo la axotomía produce conductas nociceptivas que asemejan a los síntomas que presentan los pacientes con dolor neuropático, como alodinia mecánica, hipersensibilidad al frío, dolor espontáneo (82), así como conductas de tipo ansiedad y depresión (83), por ende es un modelo ampliamente validado para la evaluación de fármacos con potencial efecto antialodínico. De acuerdo a los resultados de nuestro laboratorio, la axotomía parcial del nervio ciático produjo una disminución del 50% de umbral de retiro en valores menores a 0.4 g, lo que se traduce como alodinia. La alodinia fue unilateral y se observó desde el día 7 y hasta el día 14 post-axotomía. Estos resultados coinciden con lo reportado previamente en la caracterización de dicho modelo en nuestro laboratorio, en donde la alodinia se estableció desde el día 4 post-axotomía y se mantuvo hasta por 42 días (112). Para validar este modelo en nuestras condiciones experimentales se evaluó el efecto antialodínico de la Gabapentina, un anticonvulsivante perteneciente usado como tratamiento de primera línea para el manejo del dolor neuropático, cuyo mecanismo de acción es bloquear los canales de  $Ca^{2+}$  a través de su unión con la subunidad  $\alpha 2\delta$ , (92). En nuestras condiciones experimentales, la Gabapentina presentó un efecto antialodínico dependiente de la dosis, alcanzando una eficacia máxima a la dosis de 300 mg/kg. Estos resultados concuerdan con lo reportado previamente en otros modelos animales de dolor neuropático como el realizado por Erichsen y colaboradores en el 2002, en donde Gabapentina demostró tener efecto antialodínico en el modelo SNI evaluado en ratas (85). Además confirma la eficacia de la Gabapentina en el tratamiento del dolor neuropático en humanos (91, 92). Por lo anterior, podemos considerar que el modelo de la axotomía parcial del nervio ciático bajo nuestras condiciones experimentales, genera conductas nociceptivas parecidas a las que se presentan en pacientes con dolor neuropático, las cuáles pueden ser revertidas por fármacos de primera línea para el tratamiento de esta patología.

En este modelo de dolor neuropático el dolor crónico se produce a través de múltiples mecanismos fisiopatológicos, que afectan tanto al sistema nervioso periférico como central, como lo son la activación ortodrómica y antidrómica de fibras C y  $A\beta$  (86), la activación de receptores AMPA en las neuronas de segundo orden (88), la activación de la microglía en la

médula espinal (89) y la activación y migración de células *Natural killer* hacia el sitio de la lesión (90).

#### **7.4. Efecto antinociceptivo y antialodínico de las fosfoserinas $\alpha$ -metiladas**

El dolor representa la primera causa de sufrimiento y discapacidad, lo que lo convierte en un problema importante de salud pública (34), por lo que se han diseñado distintas estrategias terapéuticas, como el tratamiento farmacológico, que intentan mitigar el dolor (38), sin embargo, hasta el momento la terapia farmacológica actual no alivia completamente el dolor, debido a la baja eficacia que presentan o a los efectos adversos que interfieren con el adecuado apego al tratamiento (130). Por ello es necesario buscar nuevas opciones farmacológicas que sustituyan o complementen la terapia farmacológica actual, tal es el caso de los  $\alpha$ -aminofosfonatos, análogos isostéricos de los  $\alpha$ -aminoácidos naturales que han presentado una amplia gama de biodiversidades, entre las que destacan para nuestro estudio su efecto como inhibidores enzimáticos (95), neuroprotectores (96), anti-inflamatorios (101, 102) y analgésicos (102). Debido a lo anterior, se decidió evaluar el efecto antinociceptivo de la serie de compuestos  $\alpha$ -aminofosfonatos derivados de serina o fosfoserinas  $\alpha$ -metiladas (103) en los modelos de dolor visceral, dolor inflamatorio y dolor neuropático descritos previamente.

Los resultados de dichas evaluaciones mostraron que las fosfoserinas  $\alpha$ -metiladas presentan efecto antinociceptivo moderado en los tres modelos de dolor. En el modelo de dolor visceral las fosfoserinas con mayor eficacia antinociceptiva fueron 1E y 2B, con una eficacia máxima mayor a 50%, sin embargo no fueron más eficaces que Diclofenaco. En términos de potencia, las fosfoserinas 1E, 2B y 1C fueron más potentes que el control positivo. Por otro lado, en el modelo de dolor inflamatorio, la fosfoserina 1F demostró ser más eficaz y potente que Diclofenaco, con una eficacia máxima casi del 60% en la fase II del modelo, mientras que la fosfoserina 1E presentó una eficacia máxima mayor al 50% en la fase II. En ambos modelos, las fosfoserinas no produjeron efectos adversos visibles. Este estudio no es el primero en donde se observa el efecto anti-inflamatorio y antinociceptivo de compuestos tipo  $\alpha$ -aminofosfonato. Previamente Abdou y colaboradores en el 2013, sintetizaron y evaluaron tres compuestos de la familia de los aminofosfonatos que también poseen efecto antiinflamatorio y antinociceptivo (102), y con los resultados de Assenov y colaboradores,

donde demostraron el efecto antinociceptivo de un  $\alpha$ -aminofosfonato derivado de valina en el modelo de formalina (131).

Teniendo en cuenta que tanto el modelo de estiramiento abdominal como el de la formalina existe un componente inflamatorio es posible que las fosfoserinas  $\alpha$ -metiladas ya mencionadas pudiesen estar llevando a cabo su efecto antinociceptivo a través de la intervención con el proceso inflamatorio. Esto se refuerza por el hecho de que el Diclofenaco, un AINE, posee efecto antinociceptivo en ambos modelos, además de poseer efecto antiinflamatorio, y cuyo mecanismo incluye disminuir la inflamación a través de inhibir la síntesis de prostaglandinas (41). Adicionalmente, en un estudio previo observamos que estos compuestos poseen efecto antiinflamatorio en un modelo de dolor edema auricular en ratón, en donde se observó que estos compuesto producen sus efectos a través de modificar el influjo de células inflamatorias como neutrófilos y monocitos al sitio de la inflamación (103, 132). Esto resultados en conjunto sugieren que los compuestos evaluados podrían poseer un mecanismo de acción similar al de los AINEs. Sin embargo, se requieren de experimentos adicionales para corroborar esta hipótesis y tampoco se pueden descartar otros posibles mecanismos de acción como la bloqueo de la actividad de canales iónicos o la inhibición de la liberación de neurotransmisores.

Por otra parte, en el modelo de dolor neuropático, la fosfoserina 1D (600 mg/kg) tuvo una eficacia máxima mayor a la de Gabapentina a la dosis de 100 mg/kg, sin embargo, produjo una serie de efectos adversos como incoordinación motora, sedación y convulsiones tónico-clónicas. Cabe resaltar que durante el curso temporal, las fosfoserinas presentaron un pico máximo del efecto antialodínico más temprano que la Gabapentina. Dicho patrón coincide con el efecto antialodínico que presentan los antagonistas adrenérgicos en el modelo de dolor neuropático en humanos, en donde el alivio del dolor se produce en cuestión de minutos (12). Por otro lado, es importante resaltar la actividad de los  $\alpha$ -aminofosfonatos como neuroprotectores, por ejemplo el compuesto EAB-318, que inhibe la unión de glutamato con su receptor NMDA (96), un receptor estrechamente involucrado con el desarrollo y el mantenimiento del dolor neuropático (22). Aunado a ello, no podemos descartar que el efecto antialodínico de las fosfoserinas se produzca por algún otro mecanismo involucrado en el dolor neuropático, a través del bloqueo de la activación de la microglía (89), la inhibición de la facilitación descendente (11) o la liberación de opioides endógenos (133).

Por último, cabe destacar que fue en este modelo donde se observaron efectos adversos que nos podrían sugerir cuáles son los posibles tejidos diana de las fosfoferinas  $\alpha$ -metiladas. Dentro de los primeros 15 minutos después de la administración intraperitoneal de las fosfoferinas  $\alpha$ -metiladas, principalmente la fosfoferina 1D, los animales presentaron incoordinación motora, lo cual sugiere que las fosfoferinas pudiesen ejercer su acción sobre estructuras encargadas de la actividad motriz y el equilibrio, como el cerebelo, el ganglio basal y la corteza motora (134). Al mismo tiempo, los animales también presentaron erguimiento de la cola, efecto secundario característico del uso de opioides (135), por lo que cabe la posibilidad de que pudiesen estar activando al sistema de receptores opioides, principalmente el receptor MOR, en el sistema nervioso central. Aproximadamente a partir de los 20 minutos después de la administración de las fosfoferinas, los animales presentaron convulsiones tónico-clónicas, convulsiones tónico-clónicas y sedación, con lo que se puede inferir que las fosfoferinas estén ejerciendo sus efectos en estructuras del sistema nervioso cuya función se encuentra alterada en estados epilépticos, como el hipocampo, el tálamo, la amígdala y la corteza entorrinal (136). La presencia de efectos adversos en este modelo podría estar relacionado con el hecho de que el efecto antialodínico de 1D se observó a dosis mucho mayores que las empleadas en los otros dos modelos, pero también sugiere que a dosis altas estos compuestos actúan a nivel del sistema nervioso central. Con base en lo anterior es de gran relevancia estudiar a detalle el perfil de efectos adversos de estos compuestos

## 8. CONCLUSIONES

En conclusión, las fosfoferinas  $\alpha$ -metiladas 1A, 1B, 1C, 1D, 1E, 1F, 2B y 2C mostraron tener efecto antinociceptivo moderado en el modelo de estiramiento abdominal inducido por la inyección intraperitoneal de ácido acético al 0.6%. En este modelo las fosfoferinas 1E, 2B, 1C y 1F son las más prometedoras para seguirse evaluando.

Por otro lado, las fosfoferinas 1A, 1D, 1E y 1F también un efecto antinociceptivo moderado en la fase II del modelo de dolor inflamatorio inducido formalina, siendo la fosfoferinas 1F más eficaz que el control positivo, tras su administración por vía subcutánea.

Por último, las fosfoferinas 1D, 1E y 1F mostraron un efecto antialodínico en el modelo de dolor neuropático inducido por la axotomía parcial de nervio ciático. Siendo la 1D la más efectiva.

En conjunto, estos resultados demuestran que las fosfoferinas  $\alpha$ -metiladas son compuestos prometedor para seguirse evaluando como potenciales agentes analgésicos.

## 9. PERSPECTIVAS

- Evaluar el efecto antinociceptivo de las fosfoserinas  $\alpha$ -metiladas 1B, 1C, 2B y 2C en el modelo de la formalina.
- Evaluar el efecto antialodínico de las fosfoserinas  $\alpha$ -metiladas 1B, 1C, 2B y 2C en el modelo de dolor neuropático inducido por la axotomía parcial del nervio ciático.
- Evaluar el efecto del tratamiento crónico con las fosfoserinas  $\alpha$ -metiladas más efectivas en modelos de dolor crónico para corroborar su utilidad en tratamientos a largo plazo.
- Determinar el mecanismo de acción a través del cual las fosfoserinas  $\alpha$ -metiladas ejercen su efecto antinociceptivo y antialodínico.
- Evaluar la toxicidad aguda y crónica de las fosfoserinas  $\alpha$ -metiladas más activas con la finalidad de determinar su DL50, así como caracterizar su perfil de efectos adversos no letales.

## 10. REFERENCIAS

1. IASP. Pain terms: A current list with definitions and notes on usage. IASP Pain Terminology. 1994.
2. Turner JA. Pain and disability. Clinical, behavioral, and public policy perspectives (Institute of Medicine Committee on pain, disability, and chronic illness behavior). LWW; 1988.
3. Lamont LA, Tranquilli WJ, Grimm KA. Physiology of pain. *Veterinary Clinics: Small Animal Practice*. 2000;30(4):703-28.
4. Basbaum AI, Bautista DM, Scherrer G, Julius D. Cellular and molecular mechanisms of pain. *Cell*. 2009;139(2):267-84.
5. Dubin AE, Patapoutian A. Nociceptors: the sensors of the pain pathway. *The Journal of clinical investigation*. 2010;120(11):3760-72.
6. Kiernan JA, Barr ML. *Barr's the human nervous system: an anatomical viewpoint*: Lippincott Williams & Wilkins; 2009.
7. Raouf R, Quick K, Wood JN. Pain as a channelopathy. *The Journal of clinical investigation*. 2010;120(11):3745-52.
8. Hammond C. *Cellular and molecular neurophysiology*: Academic Press; 2014.
9. Lima D. *Ascending pathways: Anatomy and physiology*. *Science of Pain*, eds Basbaum AI, Bushnell C. Academic Press, San Diego; 2009.
10. Osterweis M, Kleinman A, Mechanic D. *The Anatomy and Physiology of Pain. Pain and Disability: Clinical, Behavioral, and Public Policy Perspectives*: National Academies Press (US); 1987.
11. Millan MJ. Descending control of pain. *Progress in neurobiology*. 2002;66(6):355-474.
12. Millan MJ. The induction of pain: an integrative review. *Progress in neurobiology*. 1999;57(1):1-164.
13. Fields H, Malick A, Burstein R. Dorsal horn projection targets of ON and OFF cells in the rostral ventromedial medulla. *Journal of neurophysiology*. 1995;74(4):1742-59.
14. Ossipov MH, Dussor GO, Porreca F. Central modulation of pain. *The Journal of clinical investigation*. 2010;120(11):3779-87.
15. Orr PM, Shank BC, Black AC. The role of pain classification systems in pain management. *Critical Care Nursing Clinics*. 2017;29(4):407-18.
16. Woolf CJ. What is this thing called pain? *The Journal of clinical investigation*. 2010;120(11):3742-4.
17. Roh JS, Sohn DH. Damage-associated molecular patterns in inflammatory diseases. *Immune network*. 2018;18(4).
18. Pinho-Ribeiro FA, Verri Jr WA, Chiu IM. Nociceptor sensory neuron-immune interactions in pain and inflammation. *Trends in immunology*. 2017;38(1):5-19.

19. Manion J, Waller MA, Clark T, Massingham JN, Neely GG. Developing modern pain therapies. *Frontiers in neuroscience*. 2019;13:1370.
20. Costigan M, Scholz J, Woolf CJ. Neuropathic Pain: A Maladaptive Response of the Nervous System to Damage. *Annual review of neuroscience*. 2009;32:1-32.
21. Gilron I, Baron R, Jensen T, editors. *Neuropathic pain: principles of diagnosis and treatment*. Mayo Clinic Proceedings; 2015: Elsevier.
22. Rosenberger DC, Blechschmidt V, Timmerman H, Wolff A, Treede R-D. Challenges of neuropathic pain: focus on diabetic neuropathy. *Journal of Neural Transmission*. 2020:1-36.
23. Mickle A, Shepherd A, Mohapatra D. Nociceptive TRP Channels: Sensory Detectors and Transducers in Multiple Pain Pathologies. *Pharmaceuticals*. 2016;9(4):72.
24. Cervero F. Visceral versus somatic pain: similarities and differences. *Digestive diseases*. 2009;27(Suppl. 1):3-10.
25. Kufe D, Pollock R, Weichselbaum R, Bast R, Gansler T, Holland J, Frei EL, editors. *Cancer Medicine Canada*, Hamilton: BC Decker Inc. 2003.
26. Mayer EA, Gebhart GF. Basic and clinical aspects of visceral hyperalgesia. *Gastroenterology*. 1994;107(1):271-93.
27. Murray GM. Guest editorial: referred pain. *Journal of Applied Oral Science*. 2009;17(6):0-.
28. Pain IAftSo. Unrelieved pain is a major global healthcare problem. 2012.
29. Kent ML, Tighe PJ, Belfer I, Brennan TJ, Bruehl S, Brummett CM, et al. The ACTION–APS–AAPM Pain Taxonomy (AAAPT) multidimensional approach to classifying acute pain conditions. *Pain Medicine*. 2017;18(5):947-58.
30. Hadjistavropoulos T, Craig KD. *Pain: psychological perspectives*: Psychology Press; 2004.
31. Nicholas M, Vlaeyen JW, Rief W, Barke A, Aziz Q, Benoliel R, et al. The IASP classification of chronic pain for ICD-11: chronic primary pain. *Pain*. 2019;160(1):28-37.
32. Treede R-D, Rief W, Barke A, Aziz Q, Bennett MI, Benoliel R, et al. Chronic pain as a symptom or a disease: the IASP Classification of Chronic Pain for the: International Classification of Diseases:(: ICD-11:). *Pain*. 2019;160(1):19-27.
33. Katz N, Mazer NA. The impact of opioids on the endocrine system. *The Clinical journal of pain*. 2009;25(2):170-5.
34. James SL, Abate D, Abate KH, Abay SM, Abbafati C, Abbasi N, et al. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 354 diseases and injuries for 195 countries and territories, 1990–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *The Lancet*. 2018;392(10159):1789-858.
35. Lozano R, Gómez-Dantés H, Garrido-Latorre F, Jiménez-Corona A, Campuzano-Rincón JC, Franco-Marina F, et al. La carga de enfermedad, lesiones, factores de riesgo y desafíos para el sistema de salud en México. *Salud pública de México*. 2013;55(6):580-94.

36. Covarrubias-Gómez A, González-García JL, Betancourt-Sandoval JA, Mendoza-Reyes JJ. El dolor agudo perioperatorio y el paracetamol: una visión basada en la evidencia. *Revista mexicana de anestesiología*. 2013;36(1):47-55.
37. Covarrubias-Gómez A, Garduño-López AL, Monroy-Álvarez CJ, Alvarado-Pérez J. Curso de apoyo avanzado en dolor agudo perioperatorio (AADAP). *Revista Mexicana de Anestesiología*. 2016;39(S1):240-2.
38. Brennan F, Lohman D, Gwyther L. Access to pain management as a human right. *American journal of public health*. 2019;109(1):61-5.
39. Organization WH. *Cancer Pain Relief World Health organization*. Geneva. 1986;3:42.
40. Yang J, Bauer BA, Wahner-Roedler DL, Chon TY, Xiao L. The Modified WHO Analgesic Ladder: Is It Appropriate for Chronic Non-Cancer Pain? *Journal of Pain Research*. 2020;13:411.
41. Brune K, Patrignani P. New insights into the use of currently available non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Journal of pain research*. 2015;8:105.
42. Bindu S, Mazumder S, Bandyopadhyay U. Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and organ damage: A current perspective. *Biochemical pharmacology*. 2020:114147.
43. Ricciotti E, FitzGerald GA. Prostaglandins and inflammation. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2011;31(5):986-1000.
44. Chen L, Yang G, Grosser T. Prostanoids and inflammatory pain. *Prostaglandins & other lipid mediators*. 2013;104:58-66.
45. Mitra S, Florez ID, Tamayo ME, Mbuagbaw L, Vanniyasingam T, Veroniki AA, et al. Association of placebo, indomethacin, ibuprofen, and acetaminophen with closure of hemodynamically significant patent ductus arteriosus in preterm infants: a systematic review and meta-analysis. *Jama*. 2018;319(12):1221-38.
46. Arnett DK, Blumenthal RS, Albert MA, Buroker AB, Goldberger ZD, Hahn EJ, et al. 2019 ACC/AHA guideline on the primary prevention of cardiovascular disease: executive summary: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines. *Journal of the American College of Cardiology*. 2019;74(10):1376-414.
47. Cazacu I, Mogosan C, Loghin F. Safety issues of current analgesics: an update. *Clujul Medical*. 2015;88(2):128.
48. Pasternak GW, Pan Y-X. Mu opioids and their receptors: evolution of a concept. *Pharmacological reviews*. 2013;65(4):1257-317.
49. Williams J. Basic opioid pharmacology. *Reviews in pain*. 2008;1(2):2-5.
50. Sobczak M, Sałaga M, Storr MA, Fichna J. Physiology, signaling, and pharmacology of opioid receptors and their ligands in the gastrointestinal tract: current concepts and future perspectives. *Journal of gastroenterology*. 2014;49(1):24-45.

51. Headrick JP, See Hoe LE, Du Toit EF, Peart JN. Opioid receptors and cardioprotection–‘opioidergic conditioning’ of the heart. *British journal of pharmacology*. 2015;172(8):2026-50.
52. Corder G, Castro DC, Bruchas MR, Scherrer G. Endogenous and exogenous opioids in pain. *Annual review of neuroscience*. 2018.
53. Katzung BG. *Basic and clinical pharmacology* 14th edition: McGraw Hill Professional; 2017.
54. Brunton LL, Lazo JS, Parker KL. *Goodman & Gilman. Las bases farmacológicas de la terapéutica*. 2007;12.
55. Price D, Von der Gruen A, Miller J, Rafii A, Price C. A psychophysical analysis of morphine analgesia. *Pain*. 1985;22(3):261-9.
56. OMS. *Alivio del dolor en el cáncer con una guía sobre la disponibilidad de opioides*. 2a ed 1996.
57. Ballantyne JC, Mao J. Opioid therapy for chronic pain. *New England Journal of Medicine*. 2003;349(20):1943-53.
58. Pannemans J, Corsetti M. Opioid receptors in the GI tract: targets for treatment of both diarrhea and constipation in functional bowel disorders? *Current opinion in pharmacology*. 2018;43:53-8.
59. Gallagher R. The use of opioids for dyspnea in advanced disease. *CMAJ*. 2011;183(10):1170-.
60. Malta M, Varatharajan T, Russell C, Pang M, Bonato S, Fischer B. Opioid-related treatment, interventions, and outcomes among incarcerated persons: a systematic review. *PLoS medicine*. 2019;16(12):e1003002.
61. González-Darder J. Modelos animales de dolor y aspectos éticos de la experimentación animal. *Rev Soc Esp Dolor*. 2000;7:313-8.
62. Barrot M. Tests and models of nociception and pain in rodents. *Neuroscience*. 2012;211:39-50.
63. Fields HL. *Core curriculum for professional education in pain*, Rev: IASP press; 1991.
64. Yam MF, Loh YC, Oo CW, Basir R. Overview of Neurological Mechanism of Pain Profile Used for Animal “Pain-Like” Behavioral Study with Proposed Analgesic Pathways. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020;21(12):4355.
65. Siegmund E. CR, Lu G. A method for evaluating both non-narcotic and narcotic analgesics. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 1957;4:729-31.
66. Muhammad N. In-vivo models for management of pain. *Pharmacology & Pharmacy*. 2014;2014.
67. Pavao-de-Souza GF, Zarpelon AC, Tedeschi GC, Mizokami SS, Sanson JS, Cunha TM, et al. Acetic acid-and phenyl-p-benzoquinone-induced overt pain-like behavior depends on spinal activation of MAP kinases, PI3K and microglia in mice. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 2012;101(3):320-8.

68. Nakamura M, Ferreira S. A peripheral sympathetic component in inflammatory hyperalgesia. *European journal of pharmacology*. 1987;135(2):145-53.
69. Duarte I, Nakamura M, Ferreira S. Participation of the sympathetic system in acetic acid-induced writhing in mice. *Brazilian journal of medical and biological research= Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas*. 1988;21(2):341-3.
70. Honore P, Mikusa J, Bianchi B, McDonald H, Cartmell J, Faltynek C, et al. TNP-ATP, a potent P2X3 receptor antagonist, blocks acetic acid-induced abdominal constriction in mice: comparison with reference analgesics. *Pain*. 2002;96(1-2):99-105.
71. Hunskaar S, Hole K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. *Pain*. 1987;30(1):103-14.
72. McNamara CR, Mandel-Brehm J, Bautista DM, Siemens J, Deranian KL, Zhao M, et al. TRPA1 mediates formalin-induced pain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2007;104(33):13525-30.
73. Shibata M, Ohkubo T, Takahashi H, Inoki R. Modified formalin test: characteristic biphasic pain response. *pain*. 1989;38(3):347-52.
74. Gaumond I, Spooner M-F, Marchand S. Sex differences in opioid-mediated pain inhibitory mechanisms during the interphase in the formalin test. *Neuroscience*. 2007;146(1):366-74.
75. Franklin K, Abbott F. Pentobarbital, diazepam, and ethanol abolish the interphase diminution of pain in the formalin test: evidence for pain modulation by GABAA receptors. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 1993;46(3):661-6.
76. Fischer M, Carli G, Raboisson P, Reeh P. The interphase of the formalin test. *PAIN®*. 2014;155(3):511-21.
77. Tjølsen A, Berge O-G, Hunskaar S, Rosland JH, Hole K. The formalin test: an evaluation of the method. *Pain*. 1992;51(1):5-17.
78. Erami E, Azhdari-Zarmehri H, Imoto K, Furue H. Characterization of nociceptive behaviors induced by formalin in the glabrous and hairy skin of rats. *Basic and clinical neuroscience*. 2017;8(1):37.
79. Challa SR. Surgical animal models of neuropathic pain: Pros and Cons. *International Journal of Neuroscience*. 2015;125(3):170-4.
80. Jaggi AS, Jain V, Singh N. Animal models of neuropathic pain. *Fundamental & clinical pharmacology*. 2011;25(1):1-28.
81. Decosterd I, Woolf CJ. Spared nerve injury: an animal model of persistent peripheral neuropathic pain. *Pain*. 2000;87(2):149-58.
82. Bennett GJ, Xie Y-K. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain*. 1988;33(1):87-107.
83. Guida F, De Gregorio D, Palazzo E, Ricciardi F, Boccella S, Belardo C, et al. Behavioral, Biochemical and Electrophysiological Changes in Spared Nerve Injury Model of Neuropathic Pain. *International journal of molecular sciences*. 2020;21(9):3396.

84. Bourquin A-F, Süveges M, Pertin M, Gilliard N, Sardy S, Davison AC, et al. Assessment and analysis of mechanical allodynia-like behavior induced by spared nerve injury (SNI) in the mouse. *Pain*. 2006;122(1-2):14. e1-. e.
85. Erichsen HK, Blackburn-Munro G. Pharmacological characterisation of the spared nerve injury model of neuropathic pain. *Pain*. 2002;98(1-2):151-61.
86. Chen Y, Balasubramanyan S, Lai AY, Todd KG, Smith PA. Effects of sciatic nerve axotomy on excitatory synaptic transmission in rat substantia gelatinosa. *Journal of neurophysiology*. 2009;102(6):3203-15.
87. Cervero F, Laird JM. Mechanisms of touch-evoked pain (allodynia): a new model. *Pain*. 1996;68(1):13-23.
88. Xu X-J, Hao J, Seiger A, Wiesenfeld-Hallin Z. Systemic excitatory amino acid receptor antagonists of the alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) receptor and of the N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor relieve mechanical hypersensitivity after transient spinal cord ischemia in rats. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 1993;267(1):140-4.
89. Reichardt LF. Neurotrophin-regulated signalling pathways. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 2006;361(1473):1545-64.
90. Davies AJ, Kim HW, Gonzalez-Cano R, Choi J, Back SK, Roh SE, et al. Natural Killer Cells Degenerate Intact Sensory Afferents following Nerve Injury. *Cell*. 2019;176(4):716-28. e18.
91. Moulin D, Clark A, Gilron I, Ware M, Watson C, Sessle B, et al. Pharmacological management of chronic neuropathic pain—consensus statement and guidelines from the Canadian Pain Society. *Pain Research and Management*. 2007;12(1):13-21.
92. Kremer M, Salvat E, Muller A, Yalcin I, Barrot M. Antidepressants and gabapentinoids in neuropathic pain: mechanistic insights. *Neuroscience*. 2016;338:183-206.
93. Fuentes NRG. Síntesis y estudios de ácidos-Aminofosfónicos 1989.
94. Ordonez M, Viveros-Ceballos JL, Cativiela C, Sayago FJ. An update on the stereoselective synthesis of  $\alpha$ -aminophosphonic acids and derivatives. 2015.
95. Naydenova ED, Todorov PT, Troev KD. Recent synthesis of aminophosphonic acids as potential biological importance. *Amino acids*. 2010;38(1):23-30.
96. Lucy Sun ea. Characterization of two novel N-Methyl-D-aspartate antagonists: EAA-090 (2-[8,9-Dioxo-2,6-diazabicyclo [5.2.0]non-1(7)-en-2-yl]ethylphosphonic acid) and EAB-318 (R- $\alpha$ -amino-5-chloro-1-(phosphonomethyl)-1H-benzimidazole-2-propanoic acidhydrochloride). *The Journal of Pharmacology and experimental therapeutics*. 2004;310(2):563-70.
97. Allen MC, Fuhrer W, Tuck B, Wade R, Wood JM. Renin inhibitors. Synthesis of transition-state analog inhibitors containing phosphorus acid derivatives at the scissile bond. *Journal of medicinal chemistry*. 1989;32(7):1652-61.
98. Thomas K, Adhikari AV, Telkar S, Chowdhury IH, Mahmood R, Pal NK, et al. Design, synthesis and docking studies of new quinoline-3-carbohydrazide derivatives as antitubercular agents. *European journal of medicinal chemistry*. 2011;46(11):5283-92.

99. Mucha A, Kafarski P, Berlicki Ł. Remarkable potential of the  $\alpha$ -aminophosphonate/phosphinate structural motif in medicinal chemistry. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2011;54(17):5955-80.
100. Chen M-H, Chen Z, Song B-A, Bhadury PS, Yang S, Cai X-J, et al. Synthesis and antiviral activities of chiral thiourea derivatives containing an  $\alpha$ -aminophosphonate moiety. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2009;57(4):1383-8.
101. Abdou WM, Barghash RF, Bekheit MS. Multicomponent reactions in a one-pot synthesis of  $\alpha$ -aminophosphonates and  $\alpha$ -aminophosphonic diamides with anti-inflammatory properties. *Monatshefte für Chemie-Chemical Monthly*. 2011;142(6):649.
102. Abdou WM, Barghash RF, Bekheit MS. Carbodiimides—key mediators in the synthesis of novel cytotoxic and analgesic/antiinflammatory motifs based on  $\alpha$ -amino-, enamino-phosphonates, and azaphosphones. *RSC Advances*. 2013;3(5):1528-40.
103. Iván Romero-Estudillo JLV-C, Obed Cazares-Carreño, Berenice Flores de Jesús, Misael López-Castillo, Gabriela Castañeda-Corral, Mario Ordóñez. Synthesis of new  $\alpha$ -aminophosphonates: evaluation as antiinflammatory agents and QSAR studies. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2018.
104. Mexicana NO. Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999: Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. *Diario Oficial de la Federación México*; 1999.
105. Mexicana NO. Norma Oficial Mexicana NOM-033-ZOO-2014. Métodos para dar muerte a los animales domésticos y silvestres. *Diario Oficial de la Federación México*; 2014.
106. Gupta AK, Parasar D, Sagar A, Choudhary V, Chopra BS, Garg R, et al. Analgesic and anti-inflammatory properties of gelsolin in acetic acid induced writhing, tail immersion and carrageenan induced paw edema in mice. *PloS one*. 2015;10(8):e0135558.
107. M Padmaja ABS, D Aruna. Study of synergistic effect of venlafaxine and aspirin in experimentally induced pain models in rats and mice. *International Journal of scientific research*. 2018;7(7):69-72.
108. Rosland JH, Tjølsen A, Mæhle B, Hole K. The formalin test in mice: effect of formalin concentration. *Pain*. 1990;42(2):235-42.
109. Shields SD, Eckert III WA, Basbaum AI. Spared nerve injury model of neuropathic pain in the mouse: a behavioral and anatomic analysis. *The Journal of Pain*. 2003;4(8):465-70.
110. Deuis JR, Dvorakova LS, Vetter I. Methods used to evaluate pain behaviors in rodents. *Frontiers in molecular neuroscience*. 2017;10:284.
111. Yeh S-T. Using trapezoidal rule for the area under a curve calculation. *Proceedings of the 27th Annual SAS® User Group International (SUGI'02)*. 2002.
112. Serrano JNT. Caracterización farmacológica del déficit en la distribución de peso en un modelo de dolor neuropático en ratón 2019.
113. Johnson AC, Farmer AD, Ness TJ, Greenwood-Van Meerveld B. Critical evaluation of animal models of visceral pain for therapeutics development: A focus on irritable bowel syndrome. *Neurogastroenterology & Motility*. 2020;32(4):e13776.

114. Sakin Y, Dogrul A, Ilkaya F, Seyrek M, Ulas U, Gulsen M, et al. The effect of FAAH, MAGL, and Dual FAAH/MAGL inhibition on inflammatory and colorectal distension-induced visceral pain models in Rodents. *Neurogastroenterology & Motility*. 2015;27(7):936-44.
115. Chernov H, Wilson D, Fowler W, Plummer A. Non-specificity of the mouse writhing test. *Archives internationales de pharmacodynamie et de thérapie*. 1967;167(1):171.
116. Loux J, Smith S, Salem H. Comparative analgetic testing of various compounds in mice using writhing techniques. *Arzneimittel-Forschung*. 1978;28(9):1644-7.
117. Afify EA, Alkreathy HM, Ali AS, Alfaifi HA, Khan LM. Characterization of the antinociceptive mechanisms of khat extract (*Catha edulis*) in mice. *Frontiers in neurology*. 2017;8:69.
118. Yin Z-Y, Li L, Chu S-S, Sun Q, Ma Z-L, Gu X-P. Antinociceptive effects of dehydrocorydaline in mouse models of inflammatory pain involve the opioid receptor and inflammatory cytokines. *Scientific reports*. 2016;6:27129.
119. Ribeiro RA, Vale ML, Thomazzi SM, Paschoalato AB, Poole S, Ferreira SH, et al. Involvement of resident macrophages and mast cells in the writhing nociceptive response induced by zymosan and acetic acid in mice. *European journal of pharmacology*. 2000;387(1):111-8.
120. Sufka KJ, Watson GS, Nothdurft RE, Mogil JS. Scoring the mouse formalin test: validation study. *European Journal of Pain*. 1998;2(4):351-8.
121. Puig S, Sorkin L. Formalin-evoked activity in identified primary afferent fibers: systemic lidocaine suppresses phase-2 activity. *Pain*. 1996;64(2):345-55.
122. Shields SD, Cavanaugh DJ, Lee H, Anderson DJ, Basbaum AI. Pain behavior in the formalin test persists after ablation of the great majority of C-fiber nociceptors. *PAIN®*. 2010;151(2):422-9.
123. Murray CW, Porreca F, Cowan A. Methodological refinements to the mouse paw formalin test: an animal model of tonic pain. *Journal of pharmacological methods*. 1988;20(2):175-86.
124. Saddi G-M, Abbott FV. The formalin test in the mouse: a parametric analysis of scoring properties. *Pain*. 2000;89(1):53-63.
125. Yuill MB, Hale DE, Guindon J, Morgan DJ. Anti-nociceptive interactions between opioids and a cannabinoid receptor 2 agonist in inflammatory pain. *Molecular pain*. 2017;13:1744806917728227.
126. Bhutia YD, Vijayaraghavan R, Pathak U. Analgesic and anti-inflammatory activity of amifostine, DRDE-07, and their analogs, in mice. *Indian journal of pharmacology*. 2010;42(1):17.
127. Min S-H, Soh J-S, Park J-Y, Choi S-U, Lee H-W, Lee J-J, et al. Epidural dexamethasone decreased inflammatory hyperalgesia and spinal cPLA2 expression in a rat formalin test. *Yonsei medical journal*. 2014;55(6):1631.
128. Lopes DM, Cater HL, Thakur M, Wells S, McMahan SB. A refinement to the formalin test in mice. *F1000Research*. 2019;8.

129. Woolf CJ, Mannion RJ. Neuropathic pain: aetiology, symptoms, mechanisms, and management. *The lancet*. 1999;353(9168):1959-64.
130. Borsook D, Kalso E. Transforming pain medicine: adapting to science and society. *European journal of pain*. 2013;17(8):1109-25.
131. Assenov B, Pechlivanova D, Dzhambazova E, Peneva P, Todorov P. Antinociceptive Effects of VV-Hemorphin-5 Peptide Analogues Containing Aminophosphonate Moiety in Mouse Formalin Model of Pain. *Protein and Peptide Letters*. 2020.
132. Castillo ML. Evaluación del efecto anti-inflamatorio y toxicidad aguda de nuevos  $\alpha$ -aminofosfonatos: Universidad Autónoma del Estado de Morelos; 2019.
133. Thompson SJ, Pitcher MH, Stone LS, Tarum F, Niu G, Chen X, et al. Chronic neuropathic pain reduces opioid receptor availability with associated anhedonia in rat. *Pain*. 2018;159(9):1856.
134. Caligiore D, Pezzulo G, Baldassarre G, Bostan AC, Strick PL, Doya K, et al. Consensus paper: towards a systems-level view of cerebellar function: the interplay between cerebellum, basal ganglia, and cortex. *The Cerebellum*. 2017;16(1):203-29.
135. Nath C, Gupta MB, Patnaik GK, Dhawan KN. Morphine-induced straub tail response: mediated by central  $\mu$ 2-opioid receptor. *European journal of pharmacology*. 1994;263(1-2):203-5.
136. Zhang Z, Li J-J, Lu Q-C, Gong H-Q, Liang P-J, Zhang P-M. Interaction between thalamus and hippocampus in termination of amygdala-kindled seizures in mice. *Computational and mathematical methods in medicine*. 2016;2016.

Cuernavaca, Mor., 12 de Marzo de 2021.

**Dra. Vera Lucia Petricevich**

Directora

Facultad de Medicina

P r e s e n t e:

Estimada Dra. Petricevich, por este conducto me permito informarle que he revisado el trabajo de Tesis “**Evaluación del efecto antinociceptivo de fosfoserinas  $\alpha$ -metiladas en roedores**”, que para obtener el grado de Maestra en Medicina Molecular me proporcionó la alumna Jessica Raquel Rodríguez Gil. Le comunico que su contenido es adecuado y suficiente, por lo que de acuerdo al artículo 75 del Reglamento General de Estudios de Posgrado de la UAEM le otorgo el siguiente dictamen:

**I. Se aprueba el trabajo de tesis otorgando el voto correspondiente.**

Así mismo, le agradezco la invitación a participar en este programa educativo, reiterando además mi disposición para seguir colaborando en este tipo de actividades. Sin otro particular por el momento, reciba un cordial saludo.

**A t e n t a m e n t e**

**Dra. Gabriela Castañeda Corral**



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

### Sello electrónico

**GABRIELA CASTAÑEDA CORRAL | Fecha:2021-03-16 15:18:23 | Firmante**

BsclpJJyfKtbi+aOEmUvJz8kDUq85+n5alw9RwP7a5zDRKUcTisz6BwjOodelvdbWGe1wo2CekIxG2ppmY7T51EafSQe68Kx8h31BibBle3hnijAEtTY3nq6HPtqybNSofJHViDUCz+XTmJARdA/N4HrLgBZHA9JUbnM86FSIQvyOuSO7vqnN2tA7f/MW/qKRrgzlnE3UgG886zvtvC0JWolwkv0YnfWD1U4huBANraT0ffP2QSY9o4tpLGYHIFzaA4wqhfAKTqUsPLRv4/ytAIWmVFJq3edbwWvWfMjx2GWWeFdx1PfkNvTOfZWrlYVISSiJgSVrcz8degUPmM/g==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[L6JmZy](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/J4l2km9KTBKR4W1r5EV8jMyGC7ua6Hp>





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS



FACULTAD DE MEDICINA

Secretaría de Investigación

Coordinación General de Posgrado

Cuernavaca, Mor., 12 de marzo de 2021.

**Dra. Vera Lucia Petricevich**

Directora

Facultad de Medicina

Presente:

Estimada Dra. Petricevich, por este conducto me permito informarle que he revisado el trabajo de Tesis “**Evaluación del efecto antinociceptivo de fosfoserinas  $\alpha$ -metiladas en roedores**”, que para obtener el grado de Maestra en Medicina Molecular me proporcionó la alumna Jessica Raquel Rodríguez Gil. Le comunico que su contenido es adecuado y suficiente, por lo que de acuerdo al artículo 75 del Reglamento General de Estudios de Posgrado de la UAEM le otorgo el siguiente dictamen:

**I. Se aprueba el trabajo de tesis otorgando el voto correspondiente.**

Así mismo, le agradezco la invitación a participar en este programa educativo, reiterando además mi disposición para seguir colaborando en este tipo de actividades. Sin otro particular por el momento, reciba un cordial saludo.

**A t e n t a m e n t e**

**Dr. Juan José Acevedo Fernández**



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

### Sello electrónico

**JUAN JOSE ACEVEDO FERNANDEZ** | Fecha:2021-03-16 07:54:49 | Firmante

qU8AOe0gy7aowlis7rMg/Mvvyca7q8Cfv0FRJeAfkx2L2lkbwr7kXDdu9WV7NgZlIBPV1xEDvJ+OCgBCN5MOY/w8dsP1tgQWnnIVjpNQDJG+kC5xQ7cuaqJ50yUKN0W6ZfJNSLjM9qdKnIRYZyiOetR9ds5iUqyMthUum8QW7nVjyv0YCRvTFhlaXtvDpO93vHCmMDpPwoXgmy0ToBV2OSag2BWG8Je4NdPRPjWWykcX4KBqXgEar+IT0VH+nePI7AB5KwTPD6fnh9WraPNdEGNxP0h2fbbRtw6rB/hz3n/oRKPuH6UT/zSnlGew7WwAAKJF2NO675MI+q33V33Hg==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[onSDuE](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/XEyWhZ7WOiuHKXn8ZG4e1Jpn1qMQGOES>





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS



FACULTAD DE MEDICINA

Secretaría de Investigación

Coordinación General de Posgrado

Cuernavaca, Mor., 12 de marzo de 2021.

**Dra. Vera Lucia Petricevich**

Directora

Facultad de Medicina

Presente:

Estimada Dra. Petricevich, por este conducto me permito informarle que he revisado el trabajo de Tesis “**Evaluación del efecto antinociceptivo de fosfoserinas  $\alpha$ -metiladas en roedores**”, que para obtener el grado de Maestra en Medicina Molecular me proporcionó la alumna Jessica Raquel Rodríguez Gil. Le comunico que su contenido es adecuado y suficiente, por lo que de acuerdo al artículo 75 del Reglamento General de Estudios de Posgrado de la UAEM le otorgo el siguiente dictamen:

**I. Se aprueba el trabajo de tesis otorgando el voto correspondiente.**

Así mismo, le agradezco la invitación a participar en este programa educativo, reiterando además mi disposición para seguir colaborando en este tipo de actividades. Sin otro particular por el momento, reciba un cordial saludo.

**Atentamente**

**Dr. José Mario Ordóñez Palacios**



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

### Sello electrónico

**JOSE MARIO ORDOÑEZ PALACIOS | Fecha:2021-03-17 08:50:03 | Firmante**

AsMbcEnnyg3+7vm/rZrg/TcSaBn88uCMypAUR5xfB31Cq+winhTVOE2Jcx4JpurkyzcXxM80Ug+bKv1SCM4423YWzAPTzrDgpbCP14Etc1TTUT3Djn1dokOgpZ19f5AbfiFhbVcWa2K3lOc2s3JUApE5VQDymQtwae+aUZ+lxPsYHhXu8Op2uKO046CDeB88aZ3lnH/pRiDdBRXpnh1Fh3alruWG+tCt94doC8VfzXMeUN3irnp078+RITOL+BQGP0wdDNeGenyNmBBrwidxgCjWJCiGGjTEbfyr8g7smFpScwj5TJ1gFYb/aA95Fs7UTnb2VH78TMmGjcwPaqg==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[vcbmSr](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/WDTG1iF1c99K0J9sRdmsAx6Fsu5psAPW>





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS



FACULTAD DE MEDICINA

Secretaría de Investigación

Coordinación General de Posgrado

Cuernavaca, Mor., 12 de marzo de 2021.

**Dra. Vera Lucia Petricevich**

Directora

Facultad de Medicina

Presente:

Estimada Dra. Petricevich, por este conducto me permito informarle que he revisado el trabajo de Tesis “**Evaluación del efecto antinociceptivo de fosfoserinas  $\alpha$ -metiladas en roedores**”, que para obtener el grado de Maestra en Medicina Molecular me proporcionó la alumna Jessica Raquel Rodríguez Gil. Le comunico que su contenido es adecuado y suficiente, por lo que de acuerdo al artículo 75 del Reglamento General de Estudios de Posgrado de la UAEM le otorgo el siguiente dictamen:

**I. Se aprueba el trabajo de tesis otorgando el voto correspondiente.**

Así mismo, le agradezco la invitación a participar en este programa educativo, reiterando además mi disposición para seguir colaborando en este tipo de actividades. Sin otro particular por el momento, reciba un cordial saludo.

**A t e n t a m e n t e**

**Dr. Iván Omar Romero Estudillo**



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

### Sello electrónico

**IVAN OMAR ROMERO ESTUDILLO | Fecha:2021-03-15 23:23:19 | Firmante**

b13d4Kig2ECGtbY7IDhko7l2lSaYalh4XkAnQ2wUvZNe3ybeXzwpCqlexoBe+pSPDw07ArTEx+wVbDqMGMwsywfAmWo84h5/rAZhGnAOdVGbFA2/GCeNA2ijRmPYKirDEpy1jhf9SfDUQXK0aZvXvtu+ICYBbYviUwtfAOjHqExPGY7ij6lBhpQ8Od9dwCQduNRkwZ1PaJzoEd/bAuhPQt+CVhxOEVtWiuC93jKQC0tE64KqGudd/Q2UmDoEcZgqauvqvazxguV96ljEqsEfw2tNfOluT059FgWcq1BBTHUcDZW+9Xunvwq9TnGwdBTsHmsqXOtD7+YB++2wL2Q/A==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



tkKrYL

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/yqkrkUMVskq9a3ZUK9YRgjoibpE6P8An>

