



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Química

**Evaluación del efecto antinociceptivo
del *ácido ferúlico* en modelos de dolor
agudo en ratón**

Tesis

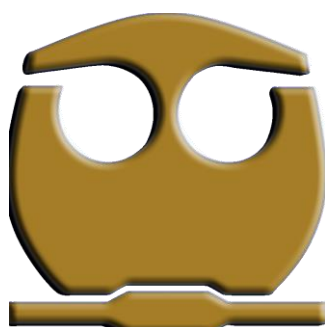
Que para obtener el título de
Químico Farmacéutico Biólogo

Presenta

Mizraim Gonzalo Yair Ramírez Ortiz

Director de tesis

Dr. José Eduardo Roa Coria



Ciudad Universitaria, CD. MX., 2018.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: Ruth Ivonne Téllez Ballesteros

VOCAL: Profesor: Berenice Ovalle Magallanes

SECRETARIO: Profesor: José Eduardo Roa Coria

1° SUPLENTE: Profesor: Ariana Elizabeth Vargas Castillo

2° SUPLENTE: Profesor: Josué Arturo Velázquez Moyado

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER)

ASESOR DEL TEMA:

Dr. José Eduardo Roa Coria

(nombre y firma)

SUSTENTANTE:

Mizraim Gonzalo Yair Ramírez Ortiz

(nombre y firma)

Este trabajo se desarrolló bajo la asesoría del

Dr. José Eduardo Roa Coria,

Investigador en Ciencias Médicas del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias “Ismael Cosío Villegas”.

El presente trabajo fue apoyado por la Secretaría de Investigación y Posgrado del IPN en el proyecto SIP 20171051.

Parte del presente trabajo se presentó en el Congreso Anual de la Sociedad de Ciencias Fisiológicas realizado en Campeche Campeche del 14 al 18 de agosto de 2016.

“¿Miedo al dolor? Es el miedo al dolor el que más duele, pero nada hay más placentero que el placer cuando el dolor se va.”

Epicuro - Eduardo Galeano

Agradecimientos.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por los pagos recibidos por tal nombramiento de ayudante de investigador nivel III del SNI.

A la Facultad de Química y a la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Ya que me otorgaron la beca de titulación.

ÍNDICE

I. Lista de figuras.....	ii
II. Lista de tablas.....	iii
III. Lista de diagramas.....	iv
IV. Abreviaturas.....	iv
1. Resumen.....	1
2. Introducción.....	2
3. Antecedentes.....	3
3. 1. Dolor.....	3
3. 2. Tipos de dolor.....	4
3. 3. Neurofisiología del dolor.....	7
3. 4. Epidemiología del dolor.....	19
3. 5. Farmacoterapia para el tratamiento del dolor.....	20
3. 5. 1. Farmacoterapia principal para el tratamiento del dolor.....	20
3. 5. 2. Adyuvantes.....	23
3. 6. Fitofármacos.....	24
3. 7. <i>Ácido ferúlico</i>	26
3. 7. 1. Características generales y propiedades farmacocinéticas.....	26
3. 7. 2. Biosíntesis del <i>ácido ferúlico</i>	31
3. 7. 3. Efectos farmacológicos del <i>ácido ferúlico</i>	33
3. 7. 3. 1. Inflamación y estrés oxidante.....	35
3. 7. 3. 2. Nocicepción.....	37
3. 7. 3. 3. Cáncer.....	38
3. 7. 3. 4. Convulsiones y depresión.....	39
3. 7. 3. 5 Alzheimer.....	39
3. 7. 3. 6. Cardiovascular.....	40
3. 7. 3. 7. Diabetes.....	40
3. 8. Modelos para el estudio del dolor.....	41
3. 8. 1. Prueba de estiramiento abdominal.....	44
3. 8. 2. Prueba de nocicepción inducida por capsaicina.....	45
3. 8. 3. Prueba de nocicepción inducida por prostaglandina.....	45
3. 8. 4. Prueba de nocicepción inducida por glutamato.....	45
3. 8. 5. Prueba de nocicepción inducida por serotonina.....	46
4. Justificación.....	47
5. Objetivos.....	48
5. 1. Objetivo general.....	48

5. 2. Objetivos particulares.....	48
6. Hipótesis.....	49
7. Metodología.....	59
7. 1. Animales.....	50
7. 2. Reactivos.....	50
7. 3. Pruebas.....	50
7. 4. Estadística.....	55
8. Resultados.....	57
8. 1. Evaluación del <i>ácido ferúlico</i> mediante la prueba de estiramiento abdominal.....	57
8. 2. Evaluación del mecanismo de acción del <i>ácido ferúlico</i> en la prueba de estiramiento abdominal.....	57
8. 3. Evaluación del efecto antinociceptivo del <i>ácido ferúlico</i> en la nocicepción inducida por capsaicina.....	58
8. 4. Evaluación del efecto antinociceptivo del <i>ácido ferúlico</i> en la nocicepción inducida por glutamato.....	58
8. 5. Evaluación del efecto antinociceptivo del <i>ácido ferúlico</i> en la nocicepción inducida por prostaglandina.....	60
8. 6. Evaluación del efecto antinociceptivo del <i>ácido ferúlico</i> en la nocicepción inducida por serotonina.....	60
9. Discusión.....	62
10. Conclusión.....	71
11. Perspectivas.....	72
12. Referencias.....	73

I. Lista de Figuras.

Figura 1. Esquema de los diferentes factores que intervienen en la experiencia dolorosa	4
Figura 2. Vía del proceso doloroso.....	7
Figura 3. Características de los nervios periféricos y orden de reacción según el tipo.....	9
Figura 4. Dolor nociceptivo.....	9
Figura 5. Dolor inflamatorio.....	10
Figura 6. Ejemplos de agonistas naturales y sintéticos del receptor TRPV1.....	15
Figura 7. Canales, receptores y mecanismos de transmisión de las terminaciones	

aferentes nociceptivas.....	19
Figura 8. Escala analgésica de la OMS	22
Figura 9. Estructuras de algunos compuestos que fueron obtenidos a partir de productos naturales.....	25
Figura 10. Porcentaje de cada tipo de nuevas moléculas aprobadas como fármacos durante 1981-2006.....	26
Figura 11. Estructura química del <i>ácido ferúlico</i>	27
Figura 12. Estructura del ácido shikímico.	32
Figura 13. Ruta biosintética de los flavonoides y compuestos derivados como los ácidos cinámicos.	32
Figura 14. Síntesis del <i>ácido ferúlico</i> y compuestos relacionados.	33
Figura 15. Resonancias posibles que permiten que el <i>ácido ferúlico</i> presente su efecto antioxidante.....	36
Figura 16. Estructura de la curcumina.....	37
Figura 17. Ambientación y conducta de los ratones en la prueba de estiramiento abdominal.....	51
Figura 18. Ambientación y conducta de los ratones en las pruebas donde se administró el agente algésico en la pata trasera derecha.....	55
Figura 19. Efecto antinociceptivo del <i>ácido ferúlico</i> en la prueba de estiramiento abdominal en ratón	57
Figura 20. Efecto antinociceptivo del <i>ácido ferúlico</i> en la prueba de estiramiento abdominal en ratón ante la presencia de L-NAME (10 mg/kg), metiotepina (MET, 0,1 mg/kg) o naloxona (NLX, 1mg/kg).	58
Figura 21. Efecto antinociceptivo del <i>ácido ferúlico</i> en la prueba de capsaicina en ratón.	59
Figura 22. Efecto antinociceptivo del <i>ácido ferúlico</i> en la prueba de glutamato en ratón	59
Figura 23. Efecto antinociceptivo del <i>ácido ferúlico</i> en la prueba de prostaglandina E ₂ en ratón	60
Figura 24. Efecto antinociceptivo del <i>ácido ferúlico</i> en la prueba de serotonina en ratón.....	61

II. Lista de tablas

Tabla 1. Factores fisiopatológicos que pueden llevar a que el dolor agudo se vuelva crónico	5
Tabla 2. Lista de fármacos opioides y fármacos relacionados junto con su mecanismo de acción.....	22
Tabla 3. Alimentos que contienen <i>ácido ferúlico</i> y los mg que contienen por cada 100 g de dicho alimento.....	27
Tabla 4. Parámetros farmacocinéticos del <i>ácido ferúlico</i>	30
Tabla 5. Valores de DE ₅₀ y % de efcto máximo obtenidos en cada uno de los modelos realizados en este trabajo.....	61

III. Lista de diagramas

Diagrama 1. Clasificación del dolor según la neurofisiología.....	6
Diagrama 2. Cronograma de las actividades para realizar la prueba de estiramiento abdominal.....	51
Diagrama 3. Cronograma de las actividades que se realizaron para la evaluación del <i>ácido ferúlico</i> en la prueba de estiramiento abdominal ante la presencia de los antagonistas (MET, NLX o L-NAME).....	52
Diagrama 4. Cronograma de las actividades para realizar la prueba con capsaicina.....	53
Diagrama 5. Cronograma de las actividades para realizar la prueba con glutamato.....	53
Diagrama 6. Cronograma de las actividades para realizar la prueba con PGE ₂	54
Diagrama 7. Cronograma de las actividades para realizar la prueba con 5-HT.....	55

IV. Abreviaturas.

5-HT5-hidroxitriptamina o serotonina
AASácido acetilsalicílico
ADNácido desoxirribonucleico
AFácido ferúlico
AINEanalgésico antiinflamatorio no esteroideo
ALADdeshidratasa del ácido 5-aminolevulínico (por sus siglas en inglés)

ALT	alanina aminotransferasa
AMPA	ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico
AMPc	adenosín monofosfato cíclico
ANADEVA	análisis de varianza
ASIC	canales iónicos sensibles a ácido (por sus siglas en inglés)
ATP	trifosfato de adenosina
Ca ²⁺	ion calcio
CAT	catalasa
CGRP	péptido relacionado con el gen de la calcitonina (por sus siglas en inglés)
Cl ⁻	ion cloruro
COX	ciclooxigenasa
DE ₅₀	dosis efectiva 50
ECA	enzima convertidora de angiotensina
E.E.M.	error estándar medio
eNOS	sintasa de óxido nítrico endotelial (por sus siglas en inglés)
EPSP	5-enopiruvilshikimato-3-fosfato
FLC	fosfolipasa C
GABA	ácido γ -aminobutírico
GMPc	guanosín monofosfato cíclico
GOT	glutamato-oxalacetato transaminasa
GPCR	receptor acoplado a proteína G
GPT	glutamato piruvato transaminasa
GSH	glutación
H ⁺	ion hidrógeno (protón)
HO	hemo-oxigenasa
Hsp	proteína del choque térmico (por sus siglas en inglés)
IASP	Organización Internacional para el Estudio del Dolor (por sus siglas en inglés)
i.d.	intradérmica
IL	interleucina
iNOS	sintasa de óxido nítrico inducible (por sus siglas en inglés)
IP3	inositol-1,4,5-trifosfato
i.p.	intraperitoneal
i.pl	intraplantar
K ⁺	ion potasio
kg	kilogramo
L-NAME	NG-nitro-L-arginina metilester

mL	mililitro
Na ⁺	ion sodio
NGF	factor de crecimiento neuronal
NMDA	N-metil-D-aspartato (receptor)
NK	neuroquinina
nNOS	sintasa de óxido nítrico neuronal (por sus siglas en inglés)
NO	óxido nítrico (por sus siglas en inglés)
OMS	Organización Mundial de la Salud
Pb	plomo
PGE ₂	prostaglandina E ₂
PIP2	fosfatidilinositol-4,5-difosfato
PK	proteína cinasa
RNS	especies reactivas de nitrógeno (por sus siglas en inglés)
ROS	especies reactivas de oxígeno (por sus siglas en inglés)
s.c.	subcutáneo
SN	sistema nervioso
SNC	sistema nervioso central
SNP	sistema nervioso periférico
SOD	superóxido dismutasa
SP	sustancia P
SSI	solución salina isotónica
TGF	Factor de crecimiento transformante (por sus siglas en inglés)
TNF	Factor de necrosis tumoral (por sus siglas en inglés)
TRP	receptores de potencial transitorio (por sus siglas en inglés)
UGT	uridina difosfato glucuroniltransferasa
Veh	vehículo
v.o.	vía oral

1. Resumen

El dolor es el motivo principal de atención médica en el mundo debido a su impacto en la calidad de vida de las personas. En este contexto, la investigación de nuevas opciones terapéuticas ha cobrado importancia y el *ácido ferúlico* (ácido 4-hidroxi-3-metoxicinámico), el cual es un compuesto que se encuentra en frutas, verduras y plantas, ha sido reportado como agente con propiedades terapéuticas. El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto antinociceptivo de la administración oral del *ácido ferúlico* en el ratón. Para ello, se utilizaron cinco modelos conductuales de inducción de la nocicepción por medio de agentes algésicos. La nocicepción se indujo mediante la prueba de estiramiento abdominal (ácido acético 0,6%, i.p.) y mediante la inyección de capsaicina (3 µg/pata), prostaglandina E₂ (3 nmol/pata), glutamato (15 µmol/pata) o serotonina (20 ng/pata) en la pata posterior derecha. Además, se utilizaron pretratamientos con xenobióticos {N[G]-Nitro-L-arginina metil éster (L-NAME), naloxona y metiotepina} en la prueba de estiramiento abdominal, con el propósito de elucidar el posible mecanismo de acción que presenta el *ácido ferúlico* en esta prueba. Una reducción de la conducta nociceptiva (estiramientos o lamida de la pata) en los diversos modelos, se consideró como un efecto antinociceptivo. La administración oral del *ácido ferúlico* en los modelos utilizados produjo un efecto antinociceptivo dependiente de la dosis. Las ventanas de actividad biológica, así como los parámetros de DE₅₀ y efecto máximo encontrados en cada modelo fueron diferentes: estiramiento abdominal (DE₅₀: 55,6 ± 6,9 mg/kg; E_{max}: 68,69 ± 26,41%); capsaicina (DE₅₀: 120,7 ± 17,3 mg/kg; E_{max}: 64,34 ± 15,16%); prostaglandina E₂ (DE₅₀: 0,44 ± 0,17 mg/kg; E_{max}: 76,15 ± 8,28%); glutamato (no se encontró efecto alguno del AF en el modelo) y serotonina (DE₅₀: 5,16 mg/kg ± 1,89 mg/kg; E_{max}: 79,52 ± 23,67 %). Los datos sugieren que el ácido ferúlico administrado de forma oral presenta un efecto antinociceptivo en varios modelos de nocicepción, este efecto es mediado posiblemente por la vía opioidérgica, la vía serotoninérgica, el antagonismo del receptor TRPV₁ e intervención en la vía de los receptores a prostaglandinas; además de intervenir en receptores y vías relacionadas en estos modelos. Se propone al *ácido ferúlico* como un posible fármaco y/o adyuvante en la terapia analgésica.

2. Introducción

El dolor es la razón principal por la que los pacientes asisten al médico, lo que lo hace un problema de gran importancia. Esto se debe a que los diferentes tipos de dolor afectan la calidad de vida de los pacientes de manera física, psicológica, emocional y económica. En este contexto, el dolor es un síntoma y/o enfermedad de vital importancia en los pacientes. Además, es este el síntoma principal por el que los pacientes asisten a atención médica.

Para el tratamiento del dolor se utilizan diversos medicamentos que, en general, provocan reacciones adversas. Entre los grupos de fármacos más utilizados se encuentran los antiinflamatorios no esteroideos y los opioides. Se pueden utilizar otros fármacos concomitantes para mejorar los resultados como los adyuvantes, entre los que se encuentran los inhibidores de la recaptura de serotonina, los esteroides y vitaminas.

Dado que ya se ha reportado que los productos naturales son una fuente de fármacos que se utilizan en el tratamiento de diversas patologías neurológicas, se ha reconocido que sustancias obtenidas a partir de dichas fuentes podrían presentar efectos analgésicos como se propone en este trabajo con el *ácido ferúlico (AF)*. El *AF* es un compuesto que se clasifica como un derivado del ácido cinámico o un ácido fenólico. Esta molécula se encuentra ampliamente distribuida en los alimentos que el hombre consume diariamente, entre los que se encuentran las frutas y los cereales. El *AF* presenta efectos farmacológicos de interés en modelos preclínicos de Alzheimer, diabetes, dolor crónico, inflamación, hipertensión y cáncer. Asimismo, el *AF* presenta actividad antioxidante que podría explicar parte de sus propiedades farmacológicas.

En este trabajo se evaluó el efecto antinociceptivo del *AF* utilizando modelos de nocicepción aguda en ratón, en los cuales se aplicaron diferentes agentes algésicos. Entre los modelos utilizados se encuentran: el modelo de estiramiento abdominal, el modelo de inducción de nocicepción con capsaicina, modelo de inducción de nocicepción con prostaglandina, modelo de inducción de nocicepción con glutamato y el modelo de nocicepción ocasionado con serotonina (5-HT).

3. Antecedentes

3. 1. Dolor

La palabra dolor se usa comúnmente para referirse a un sentimiento desagradable y lastimero. A nivel fisiológico, el dolor es un sistema de advertencia para evitar el daño al organismo (Scholz & Woolf, 2002). La IASP define el dolor como “una experiencia sensitiva y emocional desagradable, asociada a una lesión tisular real o potencial” (Puebla Días, 2005). El dolor consta de un sistema neuronal sensitivo compuesto por nociceptores y vías aferentes que responden a estímulos nociceptivos tisulares (Puebla Díaz, 2005), en otras palabras, el dolor es una experiencia compleja que involucra no solamente la transducción del estímulo nocivo, sino también un procesamiento emocional y cognitivo.

Por otro lado, la nocicepción (del latín *nocere*, hacer daño) es el proceso mediante el cual un estímulo produce dolor al ser detectado por neuronas sensoriales primarias y sus mecanismos moleculares (Julius & Basbaum, 2011; Daniel Le Bars, Manuela Gozariu, & Samuel W. Cadden, 2001). La nocicepción tiene 3 funciones básicas: advertir al individuo de daño real al tejido, advertir la probabilidad de que puede ocurrir un daño al tejido y alertar de un peligro a un grupo social; incluso, favorecer el trofismo y regeneración de un tejido (Daniel Le Bars et al., 2001).

La forma de experimentar el dolor depende de los aspectos biológicos y neurofuncionales involucrados; además de variables como la personalidad, experiencias dolorosas previas, status socio-cultural, estado emocional en el momento del estímulo nociceptivo e incluso experiencias dolorosas de personas cercanas. Al ser el dolor una experiencia multidimensional se pueden distinguir los componentes neurofuncionales que llevan a una mayor o menor repercusión psicoafectiva, cultural, social, económica y espiritual. A la suma de estos componentes se le ha denominado “dolor total” (Reyes Chiquete, González Ortiz, Mohar Betancourt, & Meneses García, 2011). En este contexto, la **Figura 1** muestra los diferentes factores que pueden intervenir en la experiencia dolorosa.

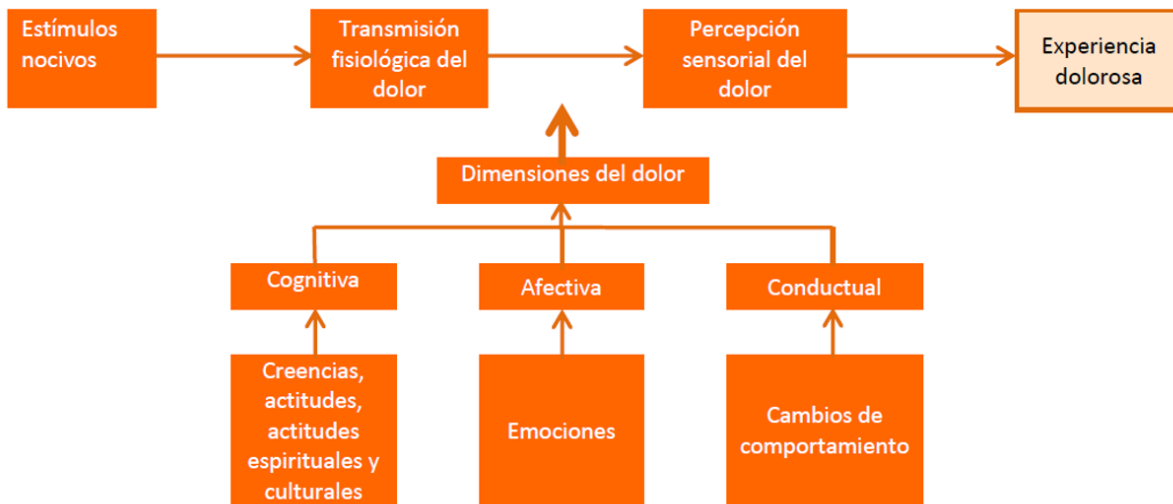


Figura 1. Esquema de los diferentes factores que intervienen en la experiencia dolorosa. Imagen obtenida de Directrices de la OMS sobre el tratamiento farmacológico del dolor persistente en niños con enfermedades médicas. (2012).

Las causas del dolor incluyen cáncer, inflamación, daño a tejido, actividad anormal de los circuitos nerviosos y daños del sistema nervioso central (SNC) y sistema nervioso periférico (SNP) (Kopf & Patel, 2010; Yekkirala, Roberson, Bean & Woolf, 2017). En enfermedades inflamatorias, neuropáticas y cancerígenas, entre otras; el dolor deja de ser un signo de alerta y se transforma en uno de los síntomas principales de la enfermedad (Ortega, Roca, & Micó, 2002).

3. 2. Tipos de dolor

Existen varios sistemas de clasificación del dolor, pero no hay ninguno adoptado internacionalmente de forma unánime. Con esto en mente, el dolor se puede clasificar tomando en cuenta su duración (agudo o crónico), su patogenia (neuropático, nociceptivo o psicogénico), su localización (somático o visceral), según su curso (continuo o irruptivo), según su intensidad (leve, moderado o severo), entre otras (Puebla Díaz, 2005).

Con respecto al dolor agudo, este resulta del daño tisular que puede ser causado por una infección, una lesión, la progresión de una disfunción metabólica o una condición degenerativa. Este tipo de dolor tiende a mejorar a medida que los tejidos sanan y responde bien a los fármacos analgésicos en general (Kopf & Patel, 2010).

En cambio, el dolor crónico tiene causas y consecuencias de larga duración a nivel biológico, psicológico y social. Entre los factores desencadenantes del dolor crónico,

se encuentra el dolor agudo: entre más severo sea el dolor agudo y mayor sea el área sensibilizada, aumenta la probabilidad de que se desarrolle el dolor crónico. Esto último se ha observado en individuos sanos a los que se les inducen estímulos nocivos repetidamente y desarrollan una plasticidad neuronal que se refleja en un dolor constante (van Hecke, Torrance, & Smith, 2013). Este hecho confirma lo señalado por Ortega y colaboradores (2002): “El dolor crónico es algo más que una mera prolongación del síntoma de dolor agudo y debe ser considerado como una patología que merece un estudio y tratamiento diferente de las situaciones de dolor agudo”.

Particularmente, el dolor crónico puede afectar negativamente todos los aspectos de la vida cotidiana o las relaciones sociales de los seres humanos (OMS, 2012). En la **Tabla 1** se muestran algunos de los factores que permiten la transformación del dolor agudo en crónico.

Tabla 1. A continuación se enlistan algunos factores fisiopatológicos que pueden llevar a que el dolor agudo se vuelva crónico (Kuner & Flor, 2016)

Factores fisiopatológicos	
Daño neuronal	Trauma
Amputación	Enfermedades metabólicas
Infección viral	Neurotoxinas
Inflamación	Alteraciones relacionadas con el estrés
Crecimiento tumoral	Enfermedades vasculares
Enfermedades autoinmunes	

De acuerdo con las características neurofisiológicas, el dolor se divide en nociceptivo y no nociceptivo. El dolor nociceptivo, como su nombre lo indica, se refiere a la nocicepción, la cual detecta estímulos potencialmente dañinos. El dolor nociceptivo se divide en somático y visceral. El primero se presenta por afección de partes blandas y óseas, está bien localizado y se describe como punzante, agudo, pulsante o compresivo; mientras que el dolor visceral involucra órganos y estructuras internas, es difuso, se percibe en áreas mayores y se describe como punzante, profundo o palpitante (OMS, 2012).

Para fines prácticos, se tomará en cuenta la clasificación del dolor más conocida (Costigan, M., Scholz, J., & Woolf, C. J.; 2009): dolor nociceptivo, dolor disfuncional,

dolor neuropático y dolor inflamatorio. En el **Diagrama 1** se presenta un resumen de lo anterior clasificando los tipos de dolor en nociceptivo y no nociceptivo.

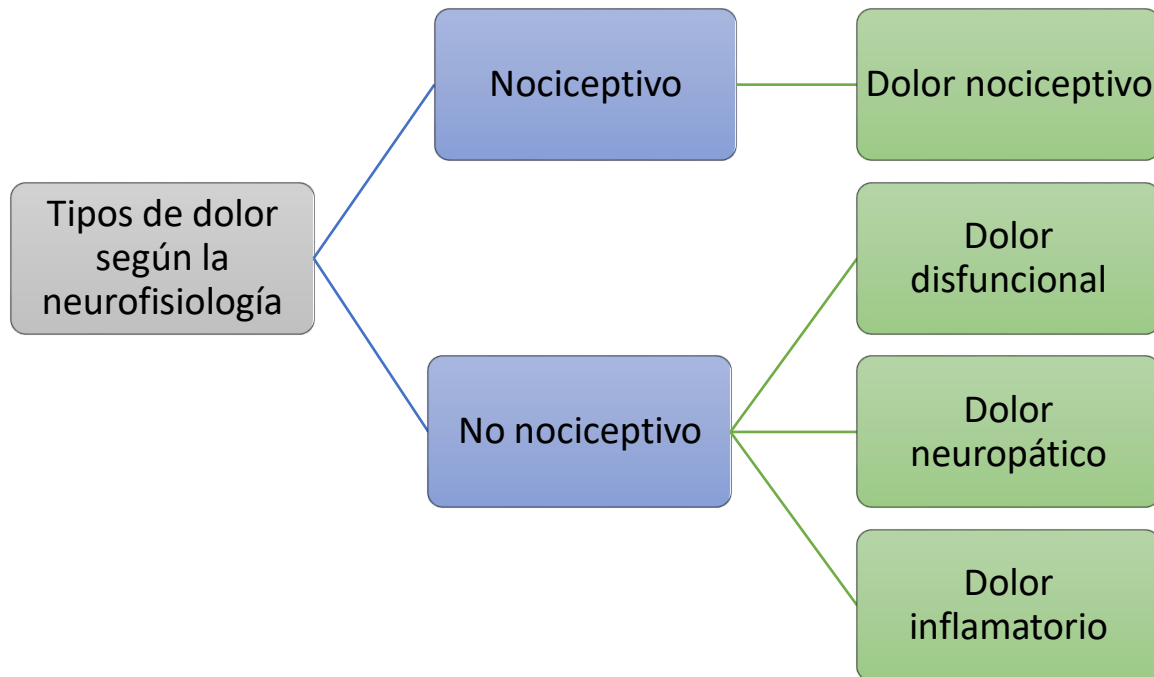


Diagrama 1. Clasificación del dolor según la neurofisiología y se indica a qué grupo pertenece la clasificación que se usará como base en este trabajo.

El dolor se convierte en una patología debido al daño o disfunción del SNC o SNP, en estos casos se le conoce como dolor neuropático. En estos pacientes, solamente 17 de cada 100 presenta una respuesta del 50% al tratamiento (Scholz & Woolf, 2002). Este tipo de dolor tiende a ser crónico y presenta poca o nula respuesta ante el tratamiento farmacológico recetado. La neuropatía periférica altera las propiedades de los nervios sensoriales, lo cual conduce a un desequilibrio entre la señalización excitatoria e inhibitoria central; además de que las interneuronas inhibitorias y los sistemas de control moduladores descendentes son disfuncionales (Colloca et al., 2017). Este tipo de dolor es causado por una lesión en el SN (sistema nervioso) [puede ser por afecciones metabólicas, traumáticas, infecciosas, isquémicas, tóxicas o inmunitarias (OMS, 2012)], tiene un alto grado de complejidad y se define con frecuencia por presentarse en ausencia de daño tisular agudo concurrente o progresivo. La intensidad de este tipo de dolor puede ir de leve a severa o incapacitante (Reyes Chiquete et al., 2011).

3. 3. Neurofisiología del dolor

Las terminales nerviosas sensoriales que detectan los estímulos dolorosos no están localizadas en una estructura anatómica particular, sino que están dispersas en el cuerpo, piel, músculos, articulaciones y órganos internos (Julius & Basbaum, 2011).

Al dolor se le puede dividir en tres procesos básicos (Meeks, Glass, & Carroll, 2015):

1. Transducción. En la piel, es el proceso de transformar un estímulo doloroso en una actividad eléctrica neuronal.
2. Transmisión. A través de la médula espinal, es la propagación de la actividad eléctrica hacia el SNC.
3. Percepción. Dentro del cerebro, se dirige a la naturaleza subjetiva del dolor que los pacientes experimentan.

En la **Figura 2** se muestran los procesos básicos de la nocicepción y algunos ejemplos de fármacos que actúan en cada etapa.

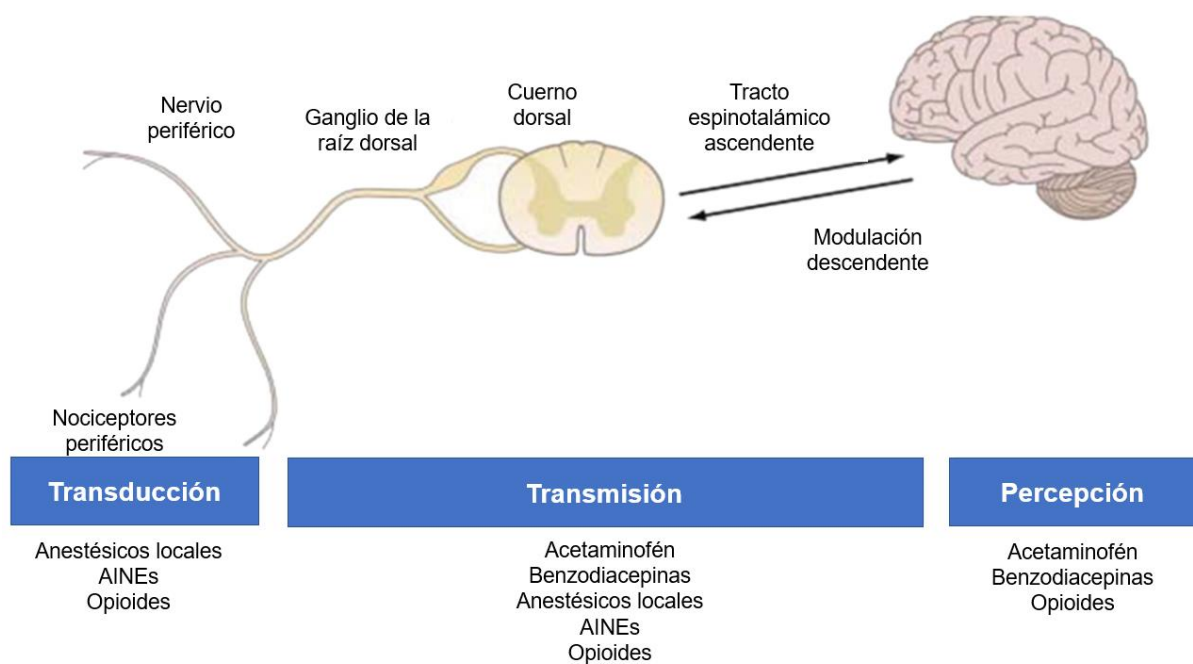


Figura 2. Vía del proceso doloroso. Se muestran los tres procesos principales del dolor; sin embargo, en muchas referencias también se incluye el proceso de la modulación, el cual se encuentra entre la transmisión y la percepción. Asimismo, se muestran los procesos en donde pueden actuar los diferentes fármacos utilizados en la terapia del dolor. Imagen traducida y modificada de Meeks, N. M., Glass, J. S. & Carroll, B. T. (2015).

El nociceptor es aquella neurona primaria sensorial que es activada por estímulos capaces de causar daño al tejido, siendo estos interpretados por el cerebro para producir la sensación de dolor. Los nociceptores tienen umbrales de activación

característicos que los distinguen de otras fibras sensoriales nerviosas. Se ha demostrado la existencia de neuronas sensoriales primarias que pueden ser excitadas por calor nocivo, presión intensa o químicos irritantes, pero no por estímulos inocuos como el calor y la luz (Julius & Basbaum, 2011; Kopf & Patel, 2010).

Los cuerpos de las células neuronales mielinizadas y con los diámetros más grandes permiten que conduzcan las señales rápidamente; estas son las fibras sensoriales primarias A β y no contribuyen al dolor. Por otro lado, hay células con un diámetro intermedio y con una capa delgada de mielina: fibra A δ ; de estas existen dos clases. Ambas clases responden ante los estímulos mecánicos, pero unas responden también al calor intenso y las otras al daño tisular. Finalmente, existen las fibras nociceptivas C, las cuales no tienen mielina y su diámetro es el más pequeño. Estas fibras; generalmente polimodales; es decir, responden a estímulos mecánicos, térmicos y químicos; son las más lentas de todas (Julius & Basbaum, 2011; Kopf & Patel, 2010). Muchas fibras aferentes desmielinizadas no son activadas en condiciones normales pero responden a estímulos térmicos o mecánicos cuando los tejidos sufren de un proceso inflamatorio; a estos nociceptores tipo C se les conoce como silenciosos o latentes (Daniel Le Bars et al., 2001). La **Figura 3** resume la información sobre las características de cada una de las fibras neuronales que perciben los estímulos.

Tomando en cuenta lo anterior, todos los sistemas sensoriales deben convertir el estímulo ambiental en una señal electroquímica. Ellos tienen la habilidad de detectar una amplia gama de modalidades de estímulos y deben de estar equipados con mecanismos de transducción. Además, diferentes estímulos químicos y físicos pueden activar, por medio de un receptor, las fibras nociceptivas, lo cual permite a las neuronas integrar la información y responder a cambios complejos en el ambiente fisiológico. Las fibras primarias nociceptivas pueden ser moduladas y es por eso que no solamente son parte de la vía del dolor agudo, sino que pueden estar participando en la generación de dolor crónico (Julius & Basbaum, 2011).

A continuación, se muestran las **Figuras 4 y 5**. En ellas se puede observar con mayor detalle el dolor nociceptivo y el dolor inflamatorio respectivamente.

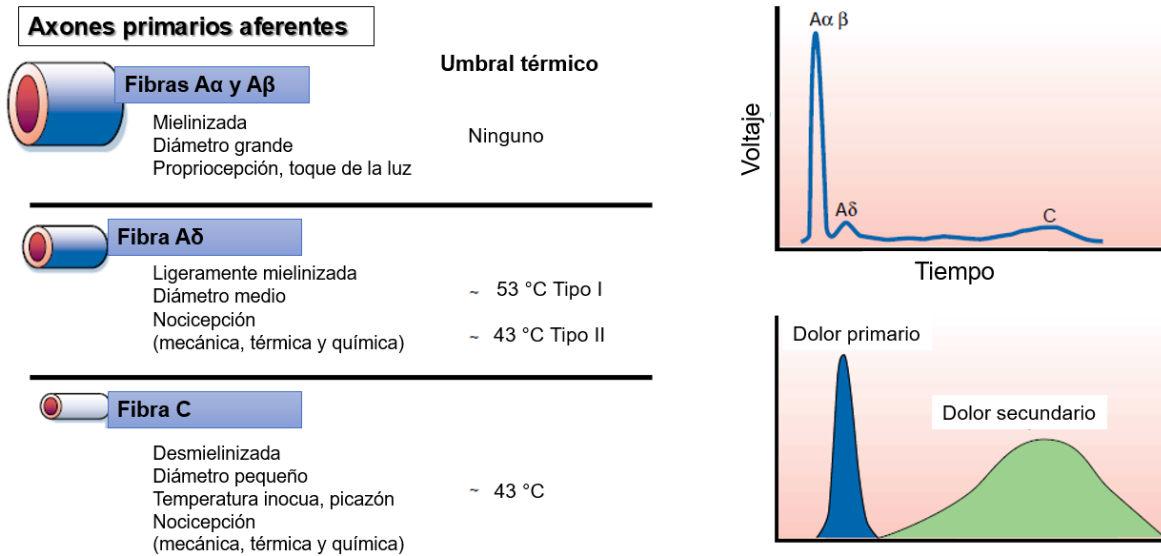


Figura 3. Del lado izquierdo se muestran las características de los nervios periféricos. Del lado derecho se muestran dos gráficas que indican el orden en el que las fibras reaccionan según su tipo y, a través de ellas, se observa cuáles participan en el dolor primario y en el dolor secundario. Imagen tomada y traducida de Julius, D. B. & Allan I. (2011).

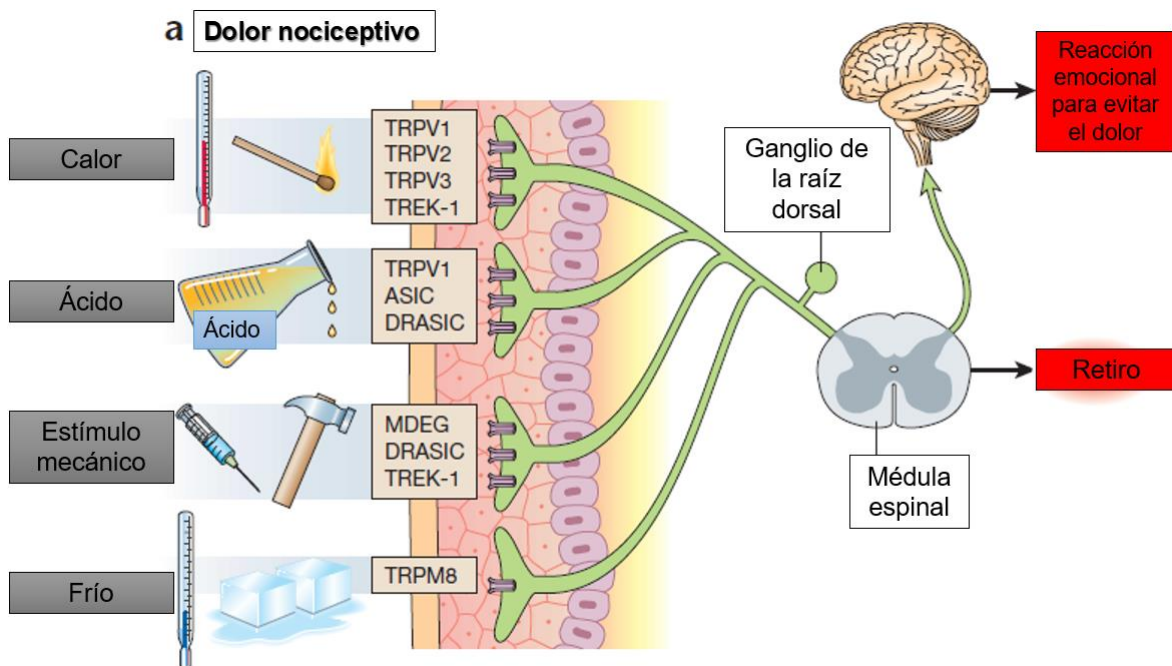


Figura 4. Dolor nociceptivo. Los estímulos nocivos son traducidos en actividad eléctrica en las terminales nerviosas de las fibras C y A δ por nociceptores o canales iónicos sensibles al calor, estímulo mecánico, H⁺ y frío. Esta actividad eléctrica es conducida a la médula espinal y, después de la transmisión en las vías centrales, a la corteza, donde la sensación de dolor es experimentada. Imagen tomada y traducida de Scholz, J. & Woolf, C. J. (2002).

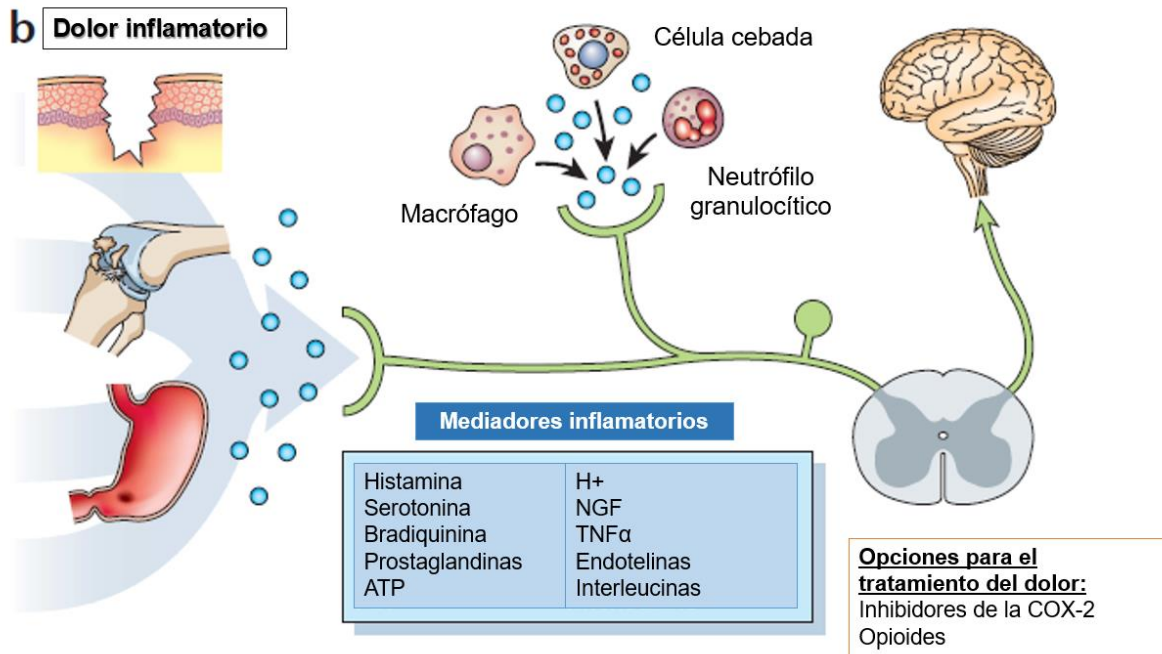


Figura 5. Dolor inflamatorio. Después de un daño al tejido, las células tumorales e inflamatorias liberan mediadores químicos que producen la “sopa inflamatoria”; la cual activa o modifica las propiedades de respuesta a estímulos de nociceptores aferentes. Esto por su parte, establece los cambios en la respuesta de las neuronas del SNC. Imagen tomada y traducida de Scholz, J., & Woolf, C. J. (2002).

Para activar a los nociceptores, existen dos tipos de receptores. Por un lado, los receptores ionotrópicos transmiten rápidamente la información sensorial por su asociación a canales iónicos que generan potenciales de acción. Por otro lado, los receptores metabotrópicos responden más lentamente, pero sus segundos mensajeros pueden tener un efecto más profundo en la función de los receptores ionotrópicos (Meeks et al., 2015). De acuerdo con lo anterior, los umbrales de activación de la respuesta nociceptiva no son fijos, sino que pueden subir o bajar, lo cual puede provocar que se responda de manera adecuada o inadecuada. Una respuesta nociceptiva inadecuada puede aparecer después del daño a un tejido periférico: las fibras de bajo umbral, las cuales usualmente producen solamente sensaciones inocuas, pueden comenzar a producir respuestas dolorosas. La plasticidad del sistema sensorial es lo que caracteriza a los síndromes clínicos de dolor, ya que los cambios post-traduccionales y post-transcripcionales pueden modificar el umbral, excitabilidad y propiedades de transmisión de los nociceptores (Scholz & Woolf, 2002).

Para la transmisión de estos impulsos existen las rutas espinotalámica y trigeminal, las cuales son las principales rutas nerviosas para la transmisión del dolor e

información de la temperatura normal. Los cuerpos de las células nerviosas localizados en los ganglios de la raíz dorsal o en el ganglio del trigémino envían un extremo de fibra de nervio a la periferia y el otro a la médula espinal (Kopf & Patel, 2010).

Los potenciales producidos son conducidos al cuerno dorsal de la médula espinal y el impulso es llevado, después de su procesamiento sináptico, a los centros superiores. La vía espinotalámica funciona para transportar la información sobre dolor y estímulos normales (<45°C). Esta vía comienza en las fibras A δ que inervan la zona marginal y en las fibras C que inervan principalmente las capas de la sustancia gelatinosa de la médula espinal. Estas fibras, a su vez, inervan las células del núcleo proprius, las cuales envían fibras nerviosas a través de la línea central espinal, y ascienden por la médula y el puente hasta inervar neuronas localizadas en el tálamo (Kopf & Patel, 2010; Scholz & Woolf, 2002).

Por otro lado, se encuentra la vía trigeminal, la cual transmite los estímulos nocivos del área de la cara a través de las fibras nerviosas provenientes del ganglio trigeminal; las fibras nerviosas entran al tronco cerebral y descienden a la médula donde inervan una subdivisión del complejo nuclear trigeminal; de aquí las fibras nerviosas suben a inervar las neuronas talámicas en el lado contralateral. El área del tálamo que recibe la información del dolor en el núcleo trigeminal también es el área que recibe la información sobre estímulos sensoriales normales como el tacto y la presión (Kopf & Patel, 2010). Se ha observado la participación del tálamo en el procesamiento de las memorias del dolor y la existencia de mecanismos neurales de larga vida que son capaces de almacenar los resultados de experiencias dolorosas previas por muchos años (Cervero & Laird, 1999).

Existen tres vías que llevan la información nociceptiva visceral: la vía de la columna dorsal, la vía espino-(trigémino)-parabraquial-amigdaloides y la vía espinohipotalámica. Los órganos viscerales solamente tienen nervios nociceptivos con fibra C, y así, no hay ninguna acción refleja debida al dolor (Kopf & Patel, 2010). El aparato sensorial motor del tracto gastrointestinal está dentro del tejido conectivo, el cual contribuye por sí mismo a las propiedades biomecánicas de las vísceras (Farmer & Aziz, 2014).

Por su parte, a nivel visceral se encuentran dos tipos de receptores nociceptivos sensoriales: de alto y bajo umbral de activación. El primer tipo tiene un umbral alto a estímulos naturales (usualmente mecánicos); mientras que el segundo tipo es un receptor codificador de intensidad que tiene un bajo umbral que permite que puedan percibir estímulos naturales inocuos (usualmente mecánicos) y estímulos nocivos (Cervero & Laird, 1999). Aunque algunas de las fibras aferentes viscerales responden a estímulos inocuos y nocivos, una gran parte de fibras aferentes que inervan los órganos parecen consistir en fibras aferentes insensibles (nociceptores silenciosos). La característica principal de ellos es que no se activan, al menos que un órgano o tejido sea dañado, presente isquemia y/o inflamación (Foreman, 2004).

Las fibras aferentes somáticas finas a nivel visceral incluyen dos tipos a nivel bioquímico: productoras de neurotransmisores peptídicos y no productoras de neurotransmisores peptídicos. Las primeras son mucho más abundantes en esta zona. Ambas fibras aferentes terminan en la médula espinal en las láminas I y V. Se ha sugerido que los péptidos son particularmente importantes en la transmisión de la información proveniente de las vísceras (Cervero & Laird, 1999).

Como ya se ha mencionado, el asta dorsal de la médula espinal es un sitio importante involucrado en la integración y modulación de la transferencia sináptica del estímulo desde la periferia al SNC. Varias sustancias llevan a cabo la transmisión de la información: sustancia P (SP), neuroquinina (NK) A, péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP), glutamato, 5-HT y los prostanoídes; estas sustancias se unen a receptores específicos y tienen un papel primordial en la hiperexcitabilidad del asta dorsal (Jesse, Savegnago, & Nogueira, 2007). Varios mecanismos moleculares y celulares operan juntos o separados dentro de los SNC y SNP para producir las diferentes formas de dolor (Scholz & Woolf, 2002), dicho de otra manera, la activación periférica de los nociceptores es modulada por las sustancias químicas que son producidas o liberadas cuando hay daño celular. Estos mediadores influyen en la actividad nerviosa; de ahí la intensidad del dolor. El estímulo repetido causa la sensibilización de fibras nerviosas periféricas, disminución de los umbrales de dolor y dolor espontáneo (Kopf & Patel, 2010).

El glutamato y el aspartato son los dos aminoácidos excitatorios más importantes distribuidos en el SNC. Existen dos tipos de receptores glutamatérgicos:

ionotrópicos y metabotrópicos; los primeros (NMDA, KAINATO y AMPA) son receptores de canales iónicos que provocan corrientes de Ca^{2+} , Na^+ y K^+ ; mientras que los segundos son receptores acoplados a proteínas G que producen IP_3 (inositol-1,4,5-trifosfato), diacilglicerol y nucleóticos cíclicos. Los receptores de los aminoácidos excitatorios son cruciales en la transmisión nociceptiva aferente primaria y en el mantenimiento de la respuesta nociceptiva, pese a que los subtipos de receptores involucrados aún no están bien definidos. Por otro lado, estos aminoácidos son liberados en la médula espinal o a nivel local en respuesta a estímulos nocivos causados por inyecciones de formalina, capsaicina, SP o respuestas inflamatorias subsecuentes (Beirith, Santos, & Calixto, 2002).

En relación con la 5-HT, el receptor 5-HT_3 es el único canal catiónico activado por ligando con una función excitatoria entre los receptores de 5-HT. La activación selectiva neuronal de 5HT_3 lleva a una hiperreactividad de los astrocitos y microglías, cuyo resultado es la sensibilización de la médula espinal e hipersensibilidad al dolor (Roeckel, Le Coz, Gaveriaux-Ruff, & Simonin, 2016).

Con respecto a los péptidos y factores de crecimiento, el daño a tejido promueve su liberación. La bradiquinina es uno de los ejemplos más importantes al actuar en su receptor BK_2 (acoplado a proteína G). Otro ejemplo es el factor de crecimiento neuronal (NGF), el cual es liberado por las células cebadas, y fibroblastos en el sitio de la herida y promueve la hipersensibilidad (Julius & Basbaum, 2011).

Las taquininas; las cuales incluyen la SP, la NKA y la NKB; tienen una variedad de efectos farmacológicos y patológicos como: extravasación proteica del plasma, vasodilatación, contracción del músculo liso, salivación, secreción de vías aéreas, degranulación de células cebadas, reclutamiento de células inflamatorias y respuesta inmunológica. Se ha sugerido su participación como neurotransmisores y/o neuromoduladores de la transmisión nociceptiva de la periferia hacia la médula espinal. Existen tres receptores: NK_1 , NK_2 y NK_3 ; los cuales están acoplados a proteínas G. La SP es afín a NK_1 , NKA es afín a NK_2 y NKB es afín a NK_3 (Santos & Calixto, 1997).

Entre las sustancias que contribuyen al dolor, también se encuentra el trifosfato de adenosina (ATP). Esta sustancia tiene dos tipos de dianas biológicas: P2X, familia de canales iónicos activados por ligando, los cuales son 7 (P2X1-7); y P2Y, familia

de receptores acoplados a proteína G, los cuales son 8 (P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆, P2Y₁₁, P2Y₁₂, P2Y₁₃ y P2Y₁₄). Varios de estos purinorreceptores están involucrados en las vías del dolor como iniciadores y/o moduladores. Entre los más importantes se encuentra la expresión de P2X3 en las fibras nerviosas sensoriales que inervan la piel, pues se ha documentado el incremento en las condiciones inflamatorias debidas al aumento en el número y respuesta de los receptores P2X3 y P2X2/3. Por otro lado, P2X7 está localizado en las células inmunológicas y gliales, las cuales producen la liberación de citocinas proinflamatorias, proliferación celular y apoptosis. Además, la liberación de ATP desde las células de la mucosa epitelial actúa en el receptor P2Y₁ en las células enterocromafines para liberar 5-HT. El purinorreceptor de adenosina P2(A₂), actúa sinérgicamente con el receptor P2X2/3 para potenciar su activación; así como con 5-HT, capsaicina y protones (H⁺) (Burnstock, 2016).

En general, el ATP está involucrado en señales nociceptivas rápidas, mientras el dolor persistente después del daño tisular implica a la bradiquinina, las prostaglandinas y la 5-HT; sin embargo, el dolor persistente durante la inflamación también puede implicar sensibilización y/o aumento de los receptores P2X. Los receptores P2Y₂ en las terminales de neuronas sensoriales sensibles a capsaicina median la transmisión nociceptiva, además la señalización P2Y puede contribuir a la mecanotransducción en las fibras A β de umbrales bajos (Burnstock, 2016).

Con relación a la familia de los receptores de potencial transitorio (TRP), cuya función es importante en la transmisión nociceptiva, se encuentra conformada por los canales termosensibles que se mencionan a continuación: TRPV₁, TRPV_{L1}, TRPV₂, TRPV₃, TRPV₄, TRPM₈, TRPA₁ (Rosenbaum & Simon, 2007). Entre este grupo de receptores, el canal TRPV₁ es de interés en este trabajo.

El TRPV₁ es un canal no selectivo de cationes, posee una dependencia muy importante de la temperatura y su umbral de activación es a 43 °C. Se ha demostrado que los animales que no presentan este canal pueden percibir el estímulo térmico pero no pueden inferir si es nocivo o no. Se ha sugerido que el TRPV₁ podría ser modulado por componentes de la “sopa inflamatoria”, pH bajo, voltaje y varios lípidos [endocannabinoides y eicosanoides derivados de la lipooxigenasa (LOX)]. En el caso de las fibras A δ I, las fibras reconocen el calor por el VRL-1 (*vainolloid-receptor-like-1*, por sus siglas en inglés), y este no reconoce a

los compuestos vainilloides. Tanto TRPV₁ y TRPV_{L1} son parte de la gran familia de los canales receptores transitorios de potencial, cuya estructura base es similar a un canal dependiente de voltaje. Este canal es activado por la fosfolipasa C (FLC), la cual produce la hidrólisis de la membrana del fosfolípido fosfatidilinositol-4,5-difosfato (PIP₂) y una producción consecutiva de segundos mensajeros lipídicos. Las fibras C y Aδ II son activadas por capsaicina y otros compuestos del tipo vainilloides. La capsaicina es una molécula hidrofóbica que es similar a varios segundos mensajeros hidrofóbicos, incluso, se ha observado que lípidos como el araquidonato o el diacilglicerol pueden activar al canal TRPV₁ y otros canales TRP. El TRPV₁ forma un complejo de señalización con FLC-γ y el receptor TrkA (Julius & Basbaum, 2011). En la **Figura 6** se muestran estructuras de algunos compuestos vainilloides que pueden activar al canal TRPV₁.

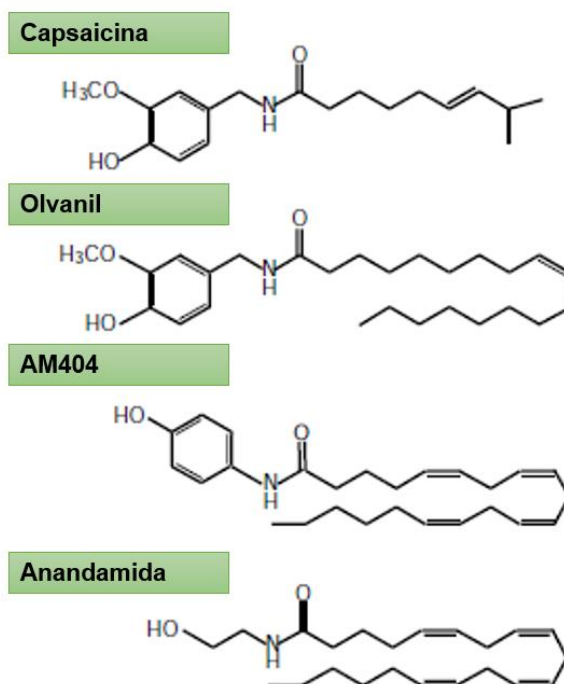


Figura 6. Estructuras de ejemplos de agonistas naturales y sintéticos del receptor TRPV₁. Todos estos compuestos son de origen lipídico.

Se ha mencionado en la literatura que la interacción funcional entre los receptores P₂Y₂ y los canales TRPV₁ de los nociceptores, podría estar involucrada en el dolor inflamatorio inducido por ATP. Se ha observado que en ratones que carecen de receptores TRPV₁, la hiperalgesia inducida por ATP se suprime (Burnstock, 2016). Incluso, se ha reportado que la activación del receptor P₂Y₂ por el ATP puede

activar al canal TRPV₁ en la ausencia de cualquier otro estímulo (Lakshmi & Joshi, 2005).

Por otro lado, los iones H⁺ pueden contribuir al aumento de la sensibilidad de los nociceptores y se han encontrado canales sensibles a ellos en las neuronas sensoriales como los TRPV₁ y la familia de los canales iónicos sensibles a ácido (ASIC, por sus siglas en inglés). Los iones H⁺ pueden tener dos funciones sobre los TRPV₁: activarlos a un pH menor de 6 o potenciar su activación por la capsaicina y el calor. Estos fenómenos son causados por una interacción directa con la función del canal al modularlo alostéricamente. (Julius & Basbaum, 2011).

La enzima COX (ciclooxigenasa) convierte el ácido araquidónico en prostanoideos proinflamatorios. La COX-1 es expresada constitutivamente en varios tejidos y provee las prostaglandinas necesarias para la homeostasis (protección gastrointestinal y función plaquetaria). La COX-2 es una forma inducible y es incrementada por mediadores inflamatorios. Las prostaglandinas activan receptores metabotrópicos que aumentan la transducción del dolor a través de receptores ionotrópicos, lo que resulta en hiperalgesia (García Meijide & Gómez-Reino Carnota, 2000; Meeks et al., 2015).

Asimismo, la prostaglandina E₂ (PGE₂) presenta la habilidad para sensibilizar las terminales periféricas de diámetro pequeño, alto umbral, fibras primarias aferentes hacia estímulos térmicos, químicos y mecánicos. La acción biológica de la PGE₂ se debe a su interacción con su receptor EP, el cual está acoplado a proteínas G y tiene cuatro subtipos. Se ha sugerido que EP₂, EP₃ y EP₄ podrían mediar el efecto sensibilizador de la PGE₂ en nociceptores de las neuronas del ganglio de la raíz dorsal. (Kassuya, Ferreira, Claudino, & Calixto, 2007). Se ha reportado que las prostaglandinas bloquean el flujo de K⁺ desde los nociceptores y hace a estos últimos más sensibles a su activación (Dinakar & Stillman, 2016).

En resumen, los nociceptores, cuando son activados, transmiten información por vías diversas. Mediadores inflamatorios son secretados en el sitio del daño para estimular más la activación del nociceptor. Estos mediadores, conocidos en conjunto como “sopa inflamatoria”, son péptidos (como bradiquinina), neurotransmisores (como 5-HT), lípidos (como prostaglandinas) y neurotrofinas (como NGF). La presencia de estas moléculas activa los receptores o baja sus umbrales de

activación. Esto inicia la inflamación neurogénica, cuyos receptores activos liberan neurotransmisores como la SP de la terminal periférica, lo que causa vasodilatación, liberación de más proteínas cerca de la terminal del nociceptor. Esto estimula a las células inmunológicas y contribuyen a la “inflamación” (Dinakar & Stillman, 2016).

Como ya se ha mencionado, la señal dolorosa puede ser modulada en el asta dorsal, llega al SNC y es conducida a la corteza cerebral (Colloca et al., 2017).

Con respecto a la modulación hacia la baja de la nocicepción, es decir, la disminución del estímulo nocivo, se han descrito tres mecanismos importantes (Foreman, 2004; Kopf & Patel, 2010; Xu et al., 2013):

- a) Inhibición segmentaria. También conocida como la “teoría de compuerta del dolor”. La teoría propone que la transmisión de la información a través del punto de contacto entre una fibra A δ , las fibras nerviosas C y el asta dorsal de la médula espinal puede ser disminuida o bloqueada; sin embargo, no hace caso de factores psicológicos e influencias culturales que afectan la percepción del dolor.
- b) Sistema opiáceo endógeno. El sistema está constituido de tres compuestos endógeno: encefalinas, endorfinas y dinorfinas; cuyos receptores son los mismos que ocupan los compuestos derivados del opio. Este sistema y el siguiente explican, de cierto modo, la modulación interna del dolor y su variabilidad subjetiva. Los receptores opioides son expresados en nervios involucrados en la transmisión de dolor en la periferia, la médula espinal y el cerebro.
- c) Sistema nervioso inhibitorio descendente. La 5-HT, la dopamina y la noradrenalina son los principales neurotransmisores de esta vía, ya que pueden modular la transmisión de la información nociceptiva al cerebro. Esta modulación es proporcionada por el núcleo de rafé y el locus coeruleus.

Cabe mencionar que los canales de Cl⁻ activados por GABA están involucrados también en la modulación del dolor (Dinakar & Stillman, 2016). Las interneuronas, las cuales son la proporción más grande (1/3) en las neuronas del asta dorsal, regulan la transmisión del dolor. La disfunción de las interneuronas inhibitorias puede llevar al desarrollo de dolor espontáneo, hiperalgesia primaria, hiperalgesia

secundaria y dolor crónico. Además, en el asta dorsal se encuentran, en abundancia, receptores GABA (Meeks et al., 2015).

Se ha observado que la hiperalgesia central se inicia por el bloqueo de la actividad de las interneuronas debido a la producción de PGE₂. La PGE₂ activa a la PKA, la cual, a su vez, provoca la fosforilación del receptor de glicina asociado al canal de Cl⁻ y reduce la probabilidad de apertura de este. Esto último ocasiona la reducción de la hiperpolarización de la neurona de segundo orden y la hace más sensible al estímulo transmitido por glutamato. Por lo tanto, la inhibición de la producción de las prostaglandinas reduce la hipersensibilidad. Además, se ha visto que la PGE₂ aumenta la sensibilidad del TRPV₁, lo cual permite la activación de receptores polimodales (Kopf & Patel, 2010).

Las células del sistema inmunológico están relacionadas con el dolor inflamatorio, disfuncional y neuropático. La reacción inmunológica puede incrementar la nocicepción a través de la secreción de citocinas (Scholz & Woolf, 2002). Las microglías, las neuronas, los astrocitos y las células endoteliales liberan citocinas proinflamatorias, óxido nítrico (NO, por sus siglas en inglés) y ATP cuando son activadas. El factor de necrosis tumoral α (TNF- α) y la interleucina-1 β (IL-1 β) contribuyen a la estimulación inductora de hiperalgesia (Roedel et al., 2016). Por otro lado, los granulocitos y monocitos pueden promover la analgesia al secretar β -endorfinas y encefalinas (Scholz & Woolf, 2002).

La **Figura 7** muestra varios de los receptores y mecanismos que participan en la transmisión y modulación del dolor.

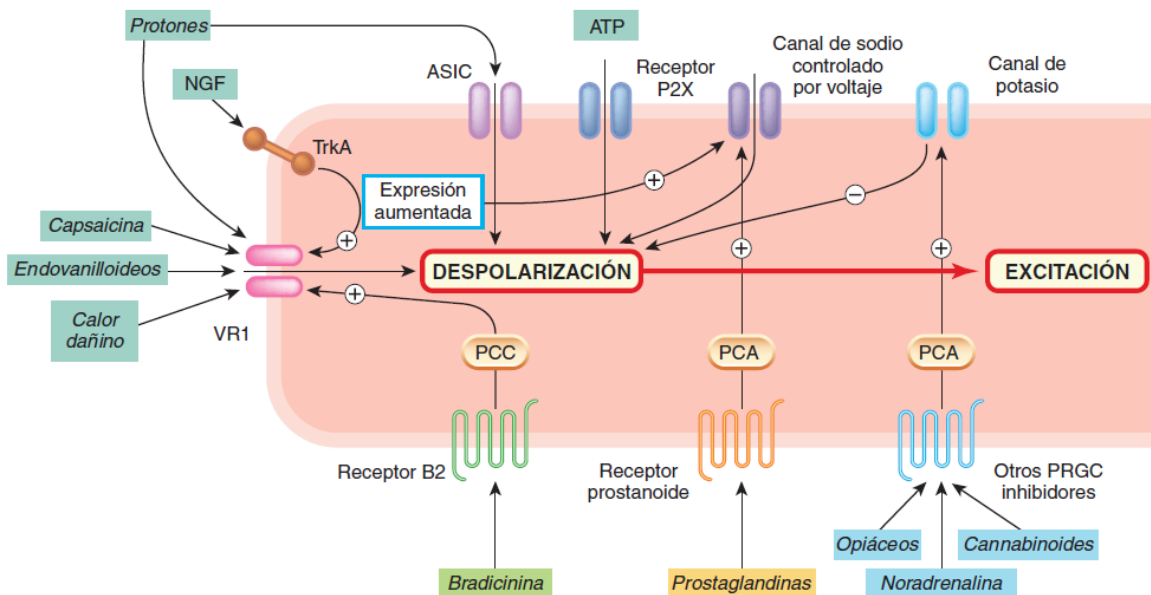


Figura 7. Canales, receptores y mecanismos de transmisión de las terminaciones aferentes nociceptivas. Sólo se muestran los canales y receptores más importantes. Los canales controlados por ligandos comprenden los canales sensibles al ácido (ASIC), los sensibles al ATP (receptores P2X) y los sensibles a la capsaicina (TRPV₁), que también son sensibles a los protones y a la temperatura. Se muestran varios receptores acoplados a la proteína G (GPCR, por sus siglas en inglés) facilitadores e inhibidores, que regulan la función del canal a través de varios sistemas de segundos mensajeros. Los factores de crecimiento tales como el factor de crecimiento nervioso (NGF) actúan a través de los receptores unidos a cinasa (TrkA), controlando la función de los canales iónicos y la expresión de los genes. PCA, proteína cinasa A; PCC, proteína cinasa C; PRGC, péptido relacionado con el gen de la calcitonina. Imagen tomada de Rang y colaboradores (2008).

3. 4. Epidemiología del dolor

El dolor es el problema más común por el que los pacientes requieren asistencia médica. La OMS ha indicado en un estudio que el dolor persistente es un problema de salud comúnmente reportado entre los pacientes de primeros auxilios (Kopf & Patel, 2010). Se ha encontrado que una de las formas más comunes de dolor que presentan las personas durante su vida es el dolor de tipo visceral (Foreman, 2004); de hecho, el dolor visceral crónico es una de las características de los desórdenes de la función intestinal, lo cual reduce la calidad de vida de los pacientes (Farmer & Aziz, 2014). Casi una cuarta parte de los días de trabajo perdidos se atribuyen al dolor (Reyes Chiquete et al., 2011). Se ha observado que con frecuencia el dolor se vuelve crónico y los pacientes caen víctimas de abuso del alcohol o desórdenes depresivos (Kopf & Patel, 2010).

En el contexto internacional, aproximadamente uno de cada 5 adultos en Europa sufre de dolor crónico; sin embargo, menos del 2% de esta población es atendida

por un especialista. El costo financiero a la sociedad es alto: 200 000 millones de euros y 635 000 millones de dólares en E.E. U.U. durante el 2008 (van Hecke et al., 2013). Otro estudio ha estimado que el costo en salud para el dolor crónico es de 150 000 millones de dólares en E.E. U.U. En el 2002, el costo de recetas de analgésicos antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) fue de 312 millones y de opioides de 137 millones de dólares (Reyes Chiquete et al., 2011). De manera general, el dolor crónico es considerado como una causa importante de sufrimiento mundial (Kuner & Flor, 2016).

Por su parte, México enfrenta un problema de salud pública: la prevalencia del dolor. Este síntoma y/o enfermedad modifica de forma significativa las condiciones de vida de los enfermos que lo padecen y deteriora considerablemente su funcionalidad. En el 2000, la Encuesta Nacional de Salud identificó que 3,5 millones de mexicanos fueron hospitalizados y 96,3% de estos presentaron dolor. Se ha estimado que el 80% de los pacientes hospitalizados por un procedimiento quirúrgico presenta dolor de moderado a severo. Al mismo tiempo, se estima que 28 millones de mexicanos padecen algún tipo de dolor (Guevara López & Covarrubias Gómez, 2008).

Por otro lado, cada año se diagnostican aproximadamente nueve millones de personas con cáncer. El dolor es uno de los síntomas más comunes en esta población. Aquellos pacientes que no refirieron dolor tenían mejor calidad de vida, menor ansiedad y depresión, así como un adecuado patrón del sueño (Guevara López & Covarrubias Gómez, 2008; Reyes Chiquete et al., 2011).

Con relación a la incidencia y prevalencia del dolor neuropático, ha sido difícil de estimar un número debido a la falta de criterios diagnósticos para inspecciones epidemiológicas grandes en la población general. La prevalencia del dolor crónico con características neuropáticas ha sido estimada entre el intervalo de 7-10% (Colloca et al., 2017).

3. 5. Farmacoterapia para el tratamiento del dolor

3. 5. 1. Farmacoterapia principal para el tratamiento del dolor

La primera tentativa en el manejo del dolor en los pacientes es el uso de remedios caseros, herbolarios y la automedicación. Estos pueden ser analgésicos simples,

preparaciones herbales o medicinas complementarias: este tipo de preparaciones pueden ser útiles para dolores sencillos o simples, pero no en casos severos, ya que se requiere de un especialista para el tratamiento de casos más complejos y el uso de fármacos y/o técnicas específicos. (Kopf & Patel, 2010).

El tratamiento óptimo del dolor puede necesitar un enfoque integral que consista en la combinación de analgésicos antiinflamatorios no esteroideos, analgésicos opioides, adyuvantes y estrategias no farmacológicas (OMS, 2012).

Los AINEs, también conocidos como los inhibidores de la COX, inhiben la hiperalgesia periférica y central producida por la producción de prostaglandinas al sensibilizar los nociceptores. Entre este grupo de fármacos se pueden hacer algunas diferencias por sus características; por ejemplo: algunos agentes no ácidos no actúan como antiinflamatorios (acetaminofén y dipirona); otros agentes ácidos logran altas concentraciones en el tejido inflamado, tienen efecto analgésico y antiinflamatorio, y pueden presentar toxicidad gástrica y/o renal (todos los compuestos menos el acetaminofén y la dipirona); y finalmente, existen los inhibidores selectivos de la COX de tipo 2 y/o 3, los cuales presentan menor toxicidad gastrointestinal, no presentan interferencia con la coagulación y asma, pero presentan otras reacciones adversas; como es el caso del acetaminofén (Kopf & Patel, 2010).

En el caso de los fármacos opioides, se clasifican como naturales (morfina, codeína, noscapina), semisintéticos [hidromorfona, oxicodona, diacetilmorfina (heroína)], así como totalmente sintéticos (metadona, pentazocina, fentanilo, alfentanilo). Este grupo de fármacos producen una fuerte analgesia cuando son administrados de manera sistémica y espinal. Actualmente, se reconocen tres receptores opioides principales: δ , μ y κ ; de entre ellos, μ es el más importante debido a que es el receptor usado por la mayoría de los fármacos. Existen agonistas completos (fentanilo, sulfentanilo), agonistas parciales (buprenorfina) y antagonistas (naloxona y naltrexona). A pesar de los beneficios ofrecidos por este grupo de analgésicos, estos presentan reacciones adversas como sedación, mareo, estreñimiento, náusea, vómito, deterioro cognitivo e insuficiencia respiratoria (Kopf & Patel, 2010). En la **Tabla 2** se muestran los opioides más representativos y el mecanismo de acción que presentan.

Tabla 2. Fármacos opioides y fármacos relacionados en el tratamiento del dolor junto con su mecanismo de acción

Fármaco	Mecanismo de acción
Morfina	Agonista μ
Oxicodona	Agonista μ
Hidromorfona	Agonista μ
Metadona	Agonista μ y antagonista NMDA
Tramadol	Inhibidor selectivo de 5-HT y norepinefrina/un metabolito es agonista μ
Fentanilo	Agonista μ
Meperidina	Agonista μ (débil)
Sulfentanilo	Agonista μ (muy fuerte)
Buprenorfina	Agonista κ y antagonista μ
Naloxona/naltrexona	Antagonista de receptores opioides con preferencia por μ

La OMS ha propuesto una escala analgésica con la que se puede tratar al 80% de los casos. La subida a un escalón superior depende de si el escalón anterior falla. Entre ellos se incluyen los AINEs (primer escalón), los cuales tienen una dosis máxima de analgesia y su acción es principalmente periférica; los opioides (a partir del segundo escalón) pueden ser aditivos, sinérgicos, no presentan dosis máxima de analgesia (pero a mayor dosis, mayor probabilidad de reacción adversa) y actúan en el SNC; finalmente, en el cuarto escalón, se pueden utilizar procedimientos invasivos como el bloqueo de nervios periféricos o la analgesia continua espinal. Es conveniente el uso de analgésicos desde los primeros síntomas de dolor (Puebla Díaz, 2005). La **Figura 8** muestra la escala para el tratamiento del dolor propuesto por la OMS.

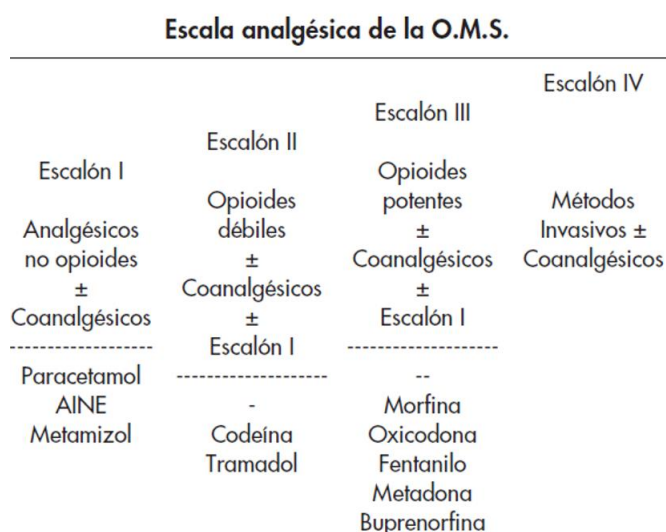


Figura 8. Escala analgésica de la O.M.S. Esta escala terapéutica empieza por el escalón I hasta llegar a los métodos invasivos en el escalón IV. Siempre es recomendable que si no existe mejora en un escalón, se debe pasar al siguiente. Imagen tomada de Puebla Días, F. (2005).

3. 5. 2. Adyuvantes

Los fármacos adyuvantes tienen indicaciones primarias distintas del dolor, pero poseen propiedades analgésicas en algunas afecciones dolorosas y pueden administrarse junto con los analgésicos para potenciar el alivio del dolor. Entre los adyuvantes se encuentran (OMS, 2012):

Esteroides. Están indicados en el tratamiento de otras afecciones específicas, como la reducción peritumoral, el tratamiento del dolor neuropático debido a la compresión de la médula espinal o de nervios periféricos.

Bisfosfonatos. Se ha sugerido, mas no comprobado, que estos compuestos proporcionan un alivio moderado del dolor en pacientes con metástasis óseas dolorosas.

Antidepresivos tricíclicos. Indicados en casos de dolor neuropático como la neuropatía diabética. Ejemplos de estos medicamentos son la amitriptilina y la nortriptilina

Inhibidores selectivos de la recaptura de serotonina. Recomendados principalmente en los adultos y aún sin datos en niños, para el tratamiento del dolor neuropático. Un fármaco ejemplo de este grupo es la fluoxetina.

Anticonvulsivantes. Principalmente carbamazepina, gabapentina y pregabalina son utilizadas en dolor de tipo neuropático.

En situaciones de dolor crónico severo se utilizan combinaciones de medicamentos opiáceos con adyuvantes como los antidepresivos (por medio de la recaptura de monoaminas) (Ortega et al., 2002). Además, la ketamina, la cual es un antagonista del receptor NMDA puede usarse a dosis bajas como medicamento de rescate (Kopf & Patel, 2010). También se ha reportado, en el caso de dolor neuropático, como tratamiento de primera línea la pregabalina, la duloxetina y los antidepresivos tricíclicos; como tratamiento de segunda línea se pueden usar altas concentraciones de capsaicina en parche (activación de TRPV₁ en fibras nociceptivas produce la desensibilización y disfunción del mismo receptor), lidocaína en parche y tramadol; y como tratamiento de tercera línea (poco recomendado) se encuentran los opioides fuertes y la toxina botulínica A. La combinación de gabapentina o pregabalina con

antidepresivos tricíclicos u opioides a bajas dosis es mejor que la monoterapia en casos de dolor severos (Colloca et al., 2017).

3. 6. Fitofármacos

Para abordar este tema, es importante mencionar la clasificación propuesta por Newman y Cragg (2016), la cual se basa en el origen del fármaco y es la siguiente: producto natural, producto botánico, derivado natural, fármaco sintético, fármaco imitador de un producto natural, fármaco totalmente sintético y vacuna. Dentro de esta clasificación, los productos naturales, particularmente los fitofármacos (fármacos que provienen de plantas), han sido y continúan siendo de importancia para el tratamiento de varias enfermedades de interés.

Las sustancias químicas aisladas como fitofármacos son conocidas como metabolitos. Los metabolitos son intermediarios en los procesos metabólicos en la naturaleza y son usualmente moléculas pequeñas. Un metabolito primario es aquel que está directamente involucrado en el crecimiento normal, el desarrollo y la reproducción de un ser vivo; mientras que un metabolito secundario no se encuentra directamente involucrado en esos procesos y usualmente tiene una función sin ser tan importante para el organismo (Cooper & Nicola, 2015).

La presencia de más de un metabolito activo en las plantas justifica el uso de sus extractos como terapias para las enfermedades (Montiel-Ruiz, Gonzalez-Trujano, & Deciga-Campos, 2013); sin embargo, se debe de considerar que los extractos herbales son mezclas complejas de múltiples compuestos que pueden interactuar entre sí. Además, la estabilidad de los agentes químicos en los extractos puede ser de difícil control en los extractos (Cooper & Nicola, 2015). Se sabe que algunos de los productos farmacéuticos más potentes son derivados de plantas; sin embargo, las hierbas y los compuestos derivados de estas deben ser vistos como productos farmacéuticos diluidos y sin refinar (Kopf & Patel, 2010); pues, los metabolitos varían dentro de la planta completa dependiendo del estado del material (seco o húmedo) o del área de la planta (raíz o parte aérea).

Estos metabolitos se dividen en varias clases dependiendo de la funcionalidad de la molécula (esteroides, alcaloides, ácidos fenólicos, terpenos, entre otros). Los

terpenos constituyen la clase más grande y diversa de los productos naturales, además de ser los más abundantes en las plantas. (Cooper & Nicola, 2015).

Los polifenoles pueden ser clasificados como ácidos fenólicos, flavonoides y con menor frecuencia como estilbenos y ligninas. Los flavonoides han sido más estudiados que los ácidos fenólicos (Itagaki et al., 2009). El aumento en el consumo de polifenoles, incluyendo los ácidos cinámicos, ha sido reportado para disminuir la incidencia de varias enfermedades (Vashistha, Sharma, & Jain, 2017). Los flavonoides son una de las subfamilias de polifenoles naturales, cuyas múltiples propiedades biológicas observadas experimentalmente y su abundancia en la dieta los convierten en posibles candidatos para explicar la asociación encontrada entre el consumo de determinados productos de origen vegetal y la disminución del riesgo de presentar enfermedades crónicas como el cáncer y las enfermedades cardiovasculares (Álvarez Castro & Orallo Cambeiro, 2003).

En la **Figura 9** se muestran tres estructuras como ejemplos de fármacos aprobados que fueron obtenidos a partir de productos naturales.

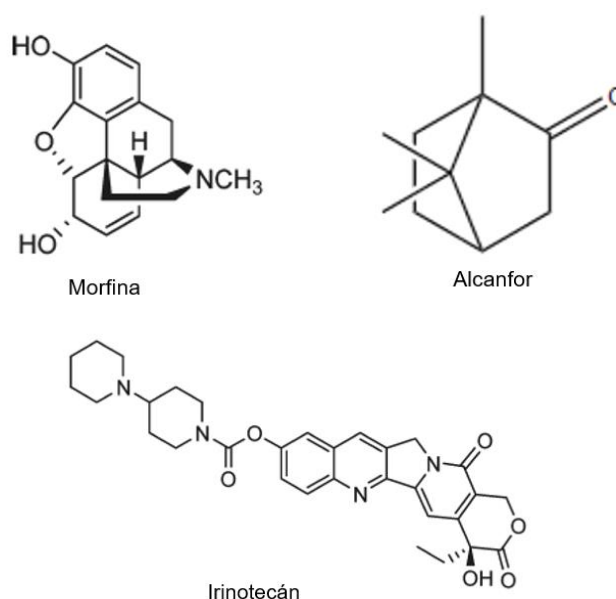


Figura 9. Estructuras de algunos compuestos que fueron obtenidos a partir de metabolitos secundarios de plantas.

En la **Figura 10** se muestra el papel importante que han tenido los productos naturales, ya que se observan los porcentajes de cada origen de los compuestos aprobados en el período de 1981 y 2014 para su uso terapéutico.

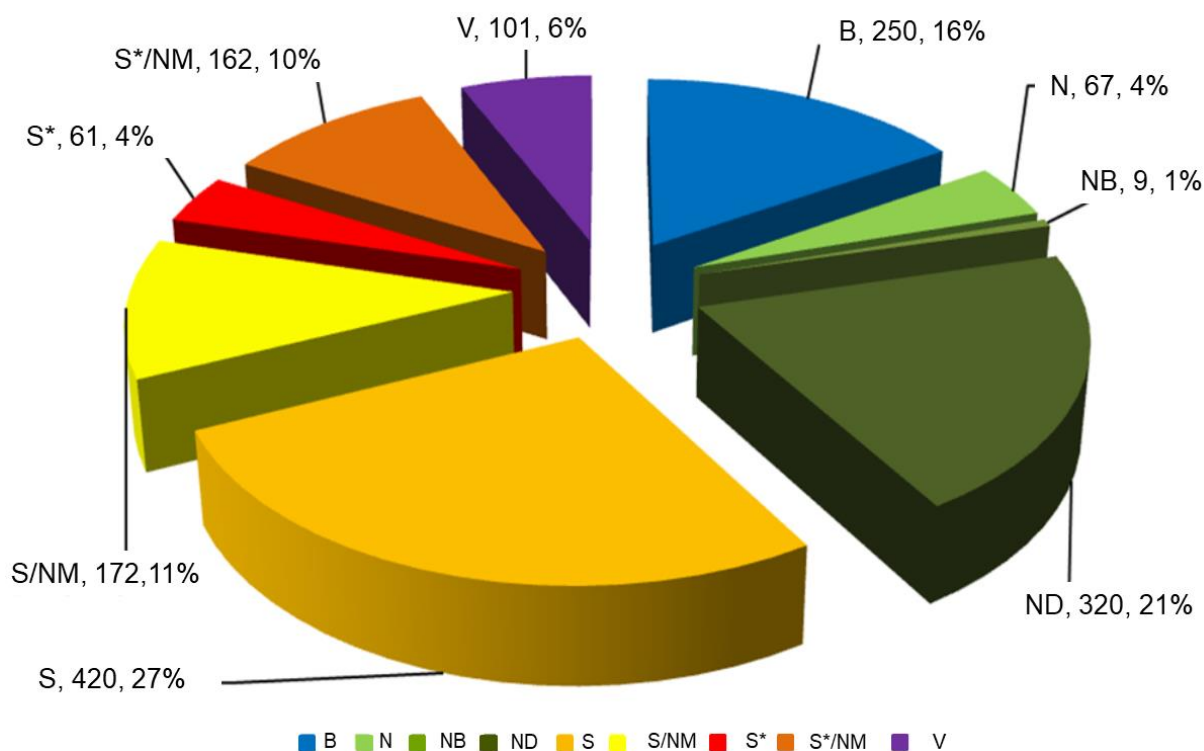


Figura 10. Porcentaje de cada tipo de nuevas moléculas aprobadas como fármacos durante el período de 1981-2014. Donde N=producto natural, NB= producto botánico, ND=derivado natural, S=fármaco sintético, /NM=fármaco imitador de un producto natural, S*=fármaco totalmente sintético y V=vacuna. Imagen obtenida de Newman, D. J., & Cragg, G. M. (2016).

En este contexto, se dice que los productos naturales siguen teniendo un papel principal en el desarrollo de nuevos fármacos para el tratamiento de enfermedades (Newman & Cragg, 2016); no obstante, existen plantas utilizadas con fines terapéuticos, como es el caso de la garra del diablo y el beleño, que han presentado eventos adversos (Kopf & Patel, 2010). Por esta razón los productos naturales son importantes como fuente de nuevas terapias, pero se debe de tener cuidado en su uso.

3. 7. Ácido ferúlico

3. 7. 1. Características generales y propiedades farmacocinéticas

El *ácido ferúlico (AF)* [ácido 4-hidroxi-3-metoxicinámico o ácido (*E*)-3-(4-hidroxi-3-metoxi-fenil)prop-2-enoico] es un polifenol clasificado como un ácido cinámico, que se encuentra en tejidos vegetales. Se puede hallar en varios alimentos como el salvado de grano, granos completos, frutas cítricas, plátano, café, jugo de naranja,

jugo de uva, berenjena, betabel, col, espinaca, brócoli, frambuesa y brotes de bambú; así como en extractos herbales, especias y granos de salvado (J. Chen et al., 2015; Mancuso & Santangelo, 2014; Zhao & Moghadasian, 2008). En la **Figura 11** se muestra la estructura del *AF*. En la **Tabla 3** se muestran algunos alimentos que contienen este metabolito secundario y la cantidad por cada 100 g de alimento.

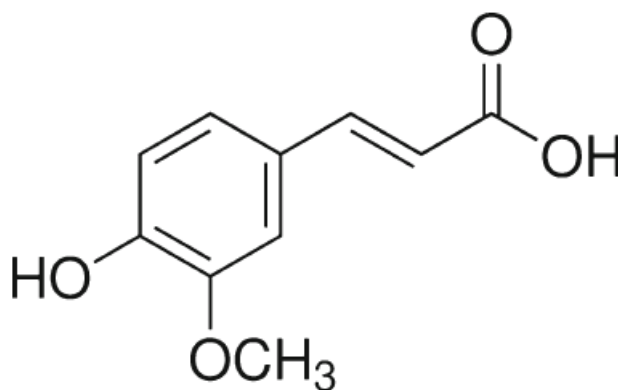


Figura 11. Estructura química del *ácido ferúlico*.

Tabla 3. Algunos alimentos que contienen *ácido ferúlico* y los mg que contienen por cada 100 g de dicho alimento

Alimento	AF (mg / 100 g de alimento)
Pan de trigo blanco	8,2
Pasta	12
Salvado de cereales	1351-3300
Jitomates	6
Alcachofas	275
Berenjena	7,3-35
Brocoli	4,1
Toronja	11
Naranja	9,5
Plátano	5,4
Café	9,1-14,3
Palomitas de maíz	313
Angelica sinensis	20-175
Cimicifuga foetida	25

El consumo diario total de polifenoles es aproximadamente de 1000 mg en personas que consumen frutas, verduras y bebidas que contienen ácidos fenólicos. Otros han sugerido que quienes consumen los consumibles anteriores más café, cerveza y cereales podrían ingerir 500-1000 mg de ácido cafeico y *AF*. El consumo de cereales, verduras, frutas, café y jugos puede alcanzar 150-250 mg/día de *AF*; no obstante, no está claro aún si esta dosis de *AF* es adecuada para generar un efecto biológico (Zhao & Moghadasian, 2008).

El *AF* es un antioxidante abundante en la dieta, el cual ofrece beneficios en contra del cáncer, enfermedades cardiovasculares (hipertensión y aterosclerosis), diabetes, y Alzheimer; incluso presenta actividad antimicrobiana (Tu, Cheng, Sun, Ma, & Zhang, 2012; Zhao & Moghadasian, 2008). El *AF* ha sido aprobado en Japón como un aditivo antioxidante y preservativo; mientras que el ferulato de sodio (una sal del *AF*) se utiliza en China como tratamiento de enfermedades cardiovasculares y cerebrovasculares. En otros estudios se ha reportado su potencia antiaterosclerótica por el vínculo entre inflamación y el estrés oxidante. Se ha sugerido su efecto en contra de enfermedades inflamatorias; y por su estructura, el *AF* dota de protección a la piel al absorber los rayos UV (Zhao & Moghadasian, 2008).

El *AF* es uno de los metabolitos en la biosíntesis de la lignina a partir de la fenilalanina y tirosina en las plantas. Se le puede encontrar en los tejidos vegetales en dos formas: libre y conjugado; a la suma de ambos se le conoce como *AF* total. En la mayoría de los vegetales y frutas se le encuentra conjugado con ácidos hidroxílicos (ácido quínico, glucárico, galatárico, tartárico y málico), o con mono o disacáridos (glucosa, digalactosa y gentiobiosa); glicoproteínas, poliaminas, ácidos grasos hidroxílicos y ligninas. En raíces vegetales y granos el *AF* se encuentra en polisacáridos pécticos o hemicelulósicos a través de sus dímeros (ácido diferúlico) y/o esterificado con residuos de arabinosa y galactosa. En algunos vegetales, como la berenjena, el *AF* libre es del 50-90%; mientras que en los cereales es de 0,1-0,5%. Se ha descrito que el *AF* y el 5-O-refuloil-L-arabinofuranosa no son degradados por el ácido estomacal (Mancuso & Santangelo, 2014; Zhao & Moghadasian, 2008)

Se ha sugerido una absorción del *AF* en la dieta en humanos puede ser similar al consumido por los animales. El *AF* puede absorberse en el estómago, yeyuno e íleon. Se considera que más del 70% se absorbe en 25 minutos y se distribuye en la mucosa gástrica, sangre, bilis y orina; lo cual sugiere una absorción rápida. El *AF* presenta una curva de absorción típica de primer orden con un pico de absorción entre 1 y 3 horas, así como una depuración que alcanza la línea base después de las 24 horas. La concentración máxima en plasma se alcanza a los 24 minutos después de la administración oral. El *AF* se absorbe por difusión pasiva en un 90%. La otra porción se absorbe por transporte activo vía el transportador del ácido

monocarboxílico. Al parecer, estos transportadores no son saturables. Básicamente la absorción del *AF* depende de la dosis y la forma en la que se encuentre. Cabe resaltar que el *AF* se queda más tiempo en la sangre que otros antioxidantes como el ácido ascórbico (Itagaki et al., 2009; Mancuso & Santangelo, 2014; Perez-Ternero et al., 2017). Se ha reportado que el *AF* puede atravesar la barrera hematoencefálica y llegar al cerebro (Tu et al., 2012). Con toda esta información, se puede decir que la biodisponibilidad del *AF* es alta, pese a su metabolismo, el cual se abordará en los párrafos próximos.

Con respecto al sistema circulatorio, la albúmina sérica parece ser el acarreador principal del *AF* (~7%). El *AF* administrado oralmente puede ser encontrado en la mucosa gástrica (4%), sangre (10%) y otros tejidos (53%). El *AF* perfundido en el intestino de rata puede ser distribuido en el hígado y otros tejidos en un 49% (Zhao & Moghadasian, 2008).

El *AF* es metabolizado *in vivo* en varios compuestos como: glucuronato de *AF*, sulfato de *AF*, diglucuronato de *AF*, sulfoglucuronato de *AF* (un conjugado de *AF*, sulfato y glucuronato), ácido m-hidroxifenilpropiónico, feruloilglicina, ácido dihidroferúlico, ácido m-hidroxipúrico, ácido vainílico y vainolliolglicina. Los conjugados con ácido glucurónico, y sulfato [glucuronato de *AF* (aproximadamente 3-20 %) y el sulfo-glucuronato de *AF* (aproximadamente 60-90%)] son los metabolitos principales del *AF in vivo*; cuyas enzimas encargadas del metabolismo son UDP glucuronosil transferasas (isoforma 1A1 2B7) y sulfotransferasas respectivamente. El *AF* no modificado se encuentra en menor porcentaje (aproximadamente 9-20%). Los órganos involucrados en el metabolismo son el hígado y en menor medida la mucosa intestinal y los riñones (se ha sugerido una filtración rápida). La conjugación es dosis dependiente, ya que a mayores dosis del *AF*, más fácilmente se satura y se produce la acumulación del *AF* en plasma. La biodisponibilidad del *AF* libre es muy baja debido a su proceso rápido de conjugación en el hígado. La excreción urinaria es influenciada por la conjugación del *AF*; después del consumo de salvado: la eliminación de *AF* es 15 veces más lenta que después del consumo de la molécula pura (Mancuso & Santangelo, 2014; Zhao & Moghadasian, 2008). La excreción del *AF* es realizada principalmente a través de la orina en ratas tanto el compuesto libre, como conjugado; también puede ser excretado por la bilis (se requieren altos niveles de *AF*). El 92% del *AF* administrado

es excretado por la orina como *AF* libre y sus conjugados con glucuronato y/o sulfato después de 2,4 mg. (Perez-Ternero et al., 2017; Zhao & Moghadasian, 2008).

Por su parte, la farmacocinética del compuesto de estudio cumple con el modelo de un compartimiento *in vivo* (Tu et al., 2012). La vida media del *AF* puede variar de 10-42 minutos en ratas dependiendo de la dosis y la vía de administración; no obstante, otros autores indican que el *AF* tiene un tiempo de vida media de $1,3 \pm 0,1$ h. En este aspecto, se puede decir que la vida media varía pero que en general es corta. La mayoría de los metabolitos de *AF* han sido reportados como compuestos con capacidad antioxidante similar a la que tiene el *AF*. La farmacocinética en el humano es similar a la de los animales (Perez-Ternero et al., 2017; Zhao & Moghadasian, 2008). Aunque los valores para cada parámetro farmacocinético del *AF* varían de una referencia a otra, en la **Tabla 4** se muestran los que Mancuso y Santangelo reportan.

Tabla 4. Parámetros farmacocinéticos del *ácido ferúlico* reportados por Mancuso y Santangelo

	Biodisponibilidad (%)	T _{máx} (min)	C _{máx} (μM)	T _{1/2} (min) ^a
Rata	9-20	5-15 30	~25 ^b ~1,3-23 ^c	30 100 ^c
Humano	~20	24 180 ^e	2-3 ^d 0,2	42 325

- T_{1/2} de unión a proteína plasmática.
- Después de la administración de *AF* (70 mg/kg) v.o.
- 5-O-feruloil-arabinofuranosa o feruloil-arabinoxilano.
- Después de la administración de *AF* (4,3 μmol/kg) v.o.
- Después de la ingestión de fibra de trigo (22,5 μmol/kg).

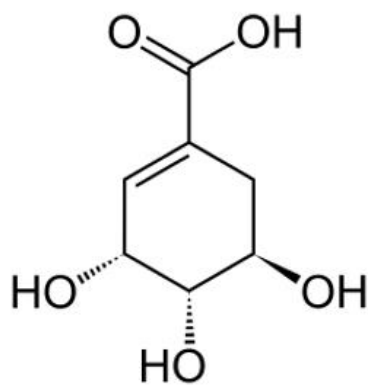
Entre las principales limitaciones del uso clínico del *AF* se encuentran su baja biodisponibilidad después de la administración oral, la cual puede mejorarse por nuevas formulaciones; la comprensión completa del uso clínico del compuesto, ya que la mayoría de los estudios en humanos se llevaron a cabo con comida que contenía el *AF*, pero no se realizaron con la sustancia pura, lo que evita el establecimiento de la dosis exacta; y finalmente, los suplementos alimenticios que presentan el *AF* no han sido sometidos a estudios clínicos exhaustivos para demostrar su eficacia, por lo tanto el *AF* es comercializado en ausencia de evidencia clínica. Se han hecho nuevas formulaciones del *AF* en nanopartículas sólidas lipídicas. Estas nuevas formulaciones mejoran el efecto antioxidante del *AF* en modelos preclínicos; los cuales podrían servir para una estrategia de evaluación en modelos clínicos (Mancuso & Santangelo, 2014).

3. 7. 2. Biosíntesis del *ácido ferúlico*

El *AF* es sintetizado en las plantas por el metabolismo de la tirosina y la fenilalanina (Lalith Kumar & Muralidhara, 2014). En la pared celular vegetal, el *AF* puede experimentar una dimerización (Rondoni et al., 2004).

Existen dos principales vías para producir compuestos fenólicos: la vía del ácido shikímico en plantas y la vía del ácido malónico en hongos. Esta vía es usada por bacterias, hongos, algas, parásitos y plantas para la síntesis de aminoácidos aromáticos como la fenilalanina, la tirosina y el triptófano. Estos aminoácidos, a su vez, producen indoles, derivados tipo indol y alcaloides. En la vía del ácido shikímico la remoción de la función amina por la enzima fenilalanina amonio liasa, produce el ácido cinámico (un fenilpropanoide). Se piensa que los aminoácidos fenilalanina y tirosina son precursores de la biosíntesis de fenilpropanoides. Estos fenilpropanoides son utilizados después para poder elaborar las clases principales de compuestos fenólicos como los flavonoides, las cumarinas, los taninos, las antraquinonas, las antocianinas y las ligninas (Cooper & Nicola, 2015). La **Figura 12** muestra la estructura del compuesto inicial de esta vía: el ácido shikímico. En la **Figura 13** se muestra la ruta biosintética general sin enzimas de los compuestos fenólicos.

La vía del shikimato comienza con la enzima shikimato cinasa, una enzima que cataliza la fosforilación dependiente de ATP del shikimato para formar shikimato-3-fosfato. El shikimato-3-fosfato se combina con el fosfoenolpiruvato para producir 5-enopiruvilshikimato-3-fosfato a través de la enzima 5-enopiruvilshikimato-3-fosfato (EPSP) sintasa. El 5-enopiruvilshikimato-3-fosfato es transformado en corismato por la corismato sintasa. El ácido prefénico resultante se sintetiza mediante una reordenación del corismato. El prefenato es descarboxilado oxidativamente con retención del grupo hidroxilo para generar *p*-hidroxifenil-piruvato, que a su vez se somete a transaminación usando glutamato como fuente de nitrógeno, para dar dos compuestos: tirosina y alfa ceto-glutarato (Cooper & Nicola, 2015). En la **Figura 14** se muestra la biosíntesis del *AF* y compuestos relacionados.



Ácido shikímico

Figura 12. Estructura del ácido shikímico. Este compuesto es la sustancia inicial de la vía que lleva su nombre. A partir de esta vía se producen varios metabolitos entre los que se encuentra el *ácido ferúlico*.

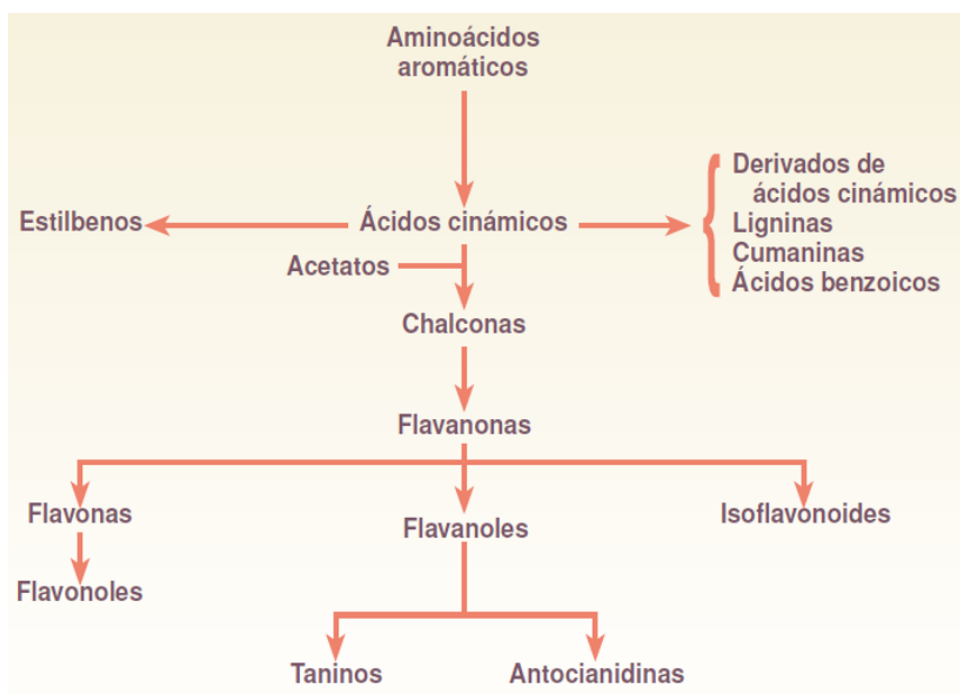


Figura 13. Ruta biosintética de los flavonoides y compuestos derivados como los ácidos cinámicos. Imagen obtenida de Álvarez Castro, E., & Orallo Cambeiro, F. (2003).

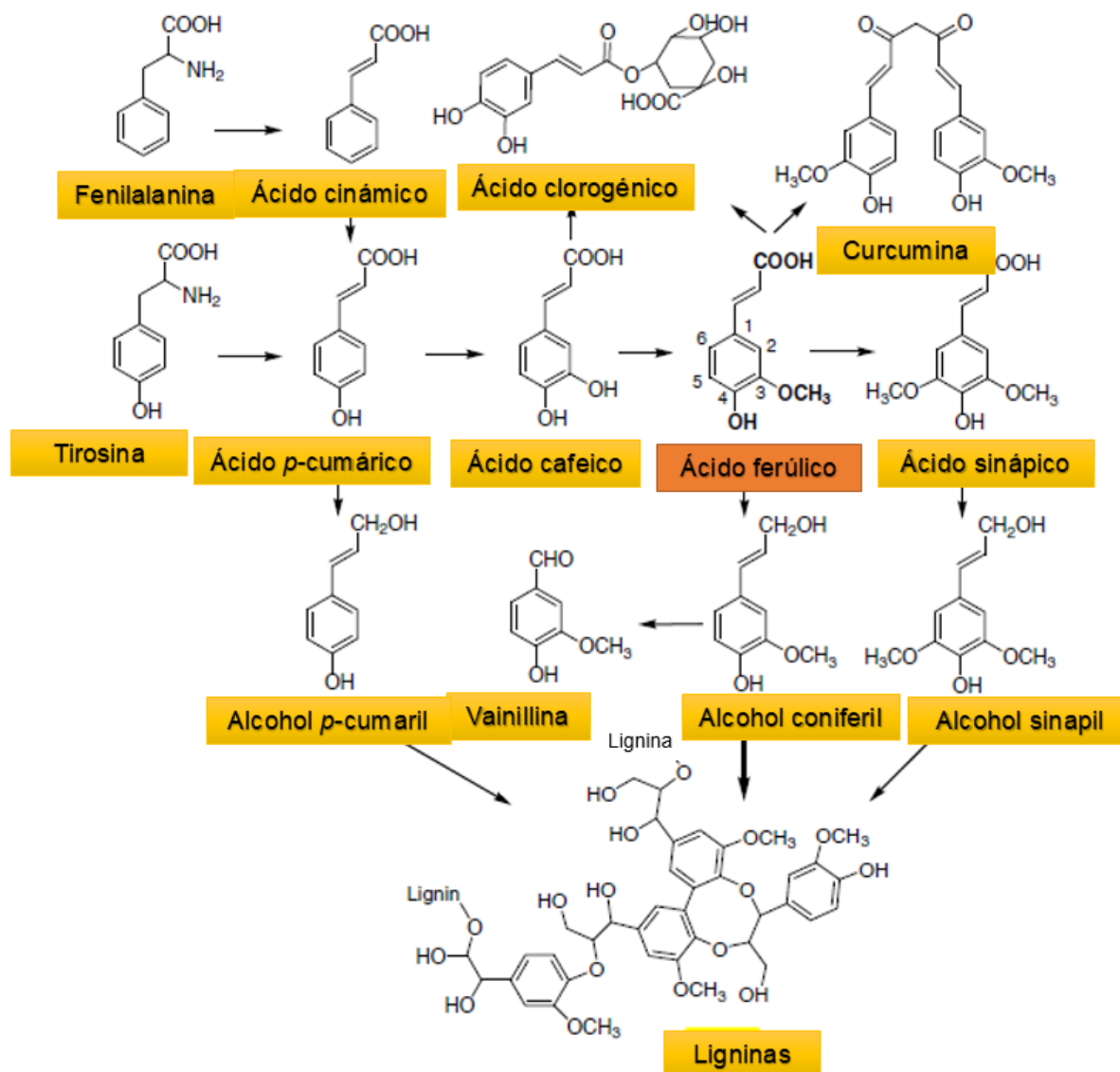


Figura 14. Síntesis del *ácido ferúlico* y compuestos relacionados. Una vez que se ha obtenidos la fenilalanina, esta sufre una desaminación para producir ácido cinámico, el cual sufre una hidroxilación en la posición *para* y se forma ácido *p*-cumárico. Posteriormente sufre una segunda hidroxilación en la posición *meta* para formar ácido cafeico, cuya adición de un metilo en el alcohol de la posición *meta* forma el AF. Imagen modificada de Zhao, Z., & Moghadasian, M. H. (2008).

3. 7. 3. Efectos farmacológicos del *ácido ferúlico*

El AF ha sido utilizado como adyuvante en diferentes terapias para diversas enfermedades inducidas por radicales libres (Mancuso & Santangelo, 2014), y no solamente eso, sino que el AF presenta propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y anticancerígenas; así como se ha descrito un efecto neuroprotector y se ha descartado su participación en la actividad locomotora (J. Chen et al., 2015). Otros

autores han señalado su efecto terapéutico en enfermedades de la piel y enfermedades cardiovasculares (Mancuso & Santangelo, 2014).

El *AF* ejerce un efecto neuroprotector en contra del estrés oxidante relacionado con la apoptosis después de isquemia cerebral. También, se ha reportado que el *AF* puede atenuar la muerte celular neuronal causada por la toma de lipoproteínas oxidadas de baja densidad, radicales hidroxilo y radicales peroxilo *in vitro* (Tu et al., 2012).

Se ha reportado que en cultivos de espermatozoides, la administración del *AF* (0,1-1,6 mM) presenta resultados benéficos en la viabilidad y motilidad al reducir la peroxidación de la membrana celular al incrementar los niveles de adenosín monofosfato cíclico (AMPC) y guanosín monofosfato cíclico (GMPc) (Mancuso & Santangelo, 2014).

La Hps-70 es una proteína chaperona que ejerce citoprotección al regular los factores clave en la activación de la apoptosis. El etil-éster del *AF* eleva la cantidad de Hps-70 en las neuronas corticales y previene la toxicidad inducida por ROS (Mancuso & Santangelo, 2014).

Con respecto a la toxicología, la administración del *AF* a dosis mayores a 1292 mg/kg causa la muerte de ratas durante las primeras 24 horas. La DL₅₀ calculada en ratas es de 2445 mg/kg y 2113 mg/kg en machos y hembras, respectivamente. Por otro lado, la DL₅₀ calculada en ratones es de 3200 mg/kg (Mancuso & Santangelo, 2014).

Se ha reportado que el *AF* no tiene ningún efecto sobre la actividad locomotora en cepas de ratones ICR o ratones Swiss. Esto permite sugerir que el *AF* ejerce efectos específicos a nivel SNC (Chen et al., 2005; Xu et al., 2013; Zeni et al., 2008).

La vida media corta del *AF* podría explicar su baja toxicidad. Estudios han reportado la DL₅₀ del *AF* en ratas macho y hembra ; las cuales son de 2,1 g/kg y 2,4 g/kg, respectivamente (Zhao & Moghadasian, 2008).

A continuación, se mencionan los efectos farmacológicos específicos que presenta el *AF* y los mecanismos moleculares por los que se han propuesto sus actividades farmacológicas.

3. 7. 3. 1. Inflamación y estrés oxidante

Se ha reportado que en ratones Swiss albino, el *AF* disminuye la respuesta inflamatoria inducida por radiación y previene el incremento de la COX-2, la expresión del gen de la sintasa de óxido nítrico inducible (iNOS-2), la peroxidación de lípidos en el hígado, el incremento de glutamato piruvato transaminasa (GPT), Glutamato-oxalacetato transaminasa (GOT) y alanina aminotransferasa (ALT) (indicador de daño hepático), y el incremento del TNF- α y la IL-6. La exposición a la radiación puede disminuir la actividad de las enzimas superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) (enzimas con actividad antioxidantes), y el glutatión (GSH); no obstante, la administración del *AF* como pretratamiento aumenta la actividad de la SOD, la CAT y nivel de la GSH. El *AF* también puede aceptar un electrón extra de los radicales superóxido, lo cual previene la reacción en cadena de radicales libres y la generación de las ROS (especies reactivas de oxígeno, por sus siglas en inglés). Se reporta la captura de las ROS, lo cual disminuye la peroxidación de lípidos y restaura el balance redox. En conclusión, el *AF* ofrece protección en contra de la inflamación inducida por la radiación gamma y por ello tiene la cualidad de ser un potente radioprotector y mejorar la función hepática (Das et al., 2014).

Se ha reportado que el ferulato de sodio tiene un efecto benéfico como tratamiento adyuvante en la artritis reumatoide (inducida por colágeno) mediante la reducción de los niveles de IL-15 e IL-23; así como, influenciando la expresión del TNF- α . Se estimó que la dosis óptima del *AF* para modificar la expresión del TNF- α y la IL-1 β es de 1,28 $\mu\text{g/g/día}$ (Zhu et al., 2014).

Otros autores muestran que el *AF* exhibe una propiedad antioxidante de manera tópica por 7 días, lo cual incrementa la actividad de la enzima SOD y reduce los biomarcadores inflamatorios en la mucosa del colón en un modelo de rata por inducción de colitis con ácido acético (Mancuso & Santangelo, 2014).

Además, soluciones saturadas del *AF* a un pH de 7,2 administradas tópicamente, han demostrado un efecto protector en el eritema causado por rayos UVB. Se preve que la molécula presente un efecto dermoprotector administrado de manera oral (Mancuso & Santangelo, 2014).

Por otro lado, el *AF* restaura la actividad de la deshidratasa del ácido 5-aminolevulínico (ALAD), baja el estrés oxidante en el cerebelo y el hipocampo. Se

ha sugerido que su efecto se lleva a cabo por su actividad antioxidante (por su estructura con resonancia estable del radical fenoxi), antiinflamatoria y antiapoptótica. Además, el *AF* aumenta el AMPc, revierte la actividad de la reserpina y disminuye la cantidad de norepinefrina, 5-HT y dopamina en la corteza frontal y en el hipocampo. En un modelo con ratas prepubertas, la ingestión de compuestos fenólicos como el *AF* puede aliviar significativamente los efectos neurotóxicos del plomo (Pb), cuya actividad se atribuye a su capacidad antioxidante (Lalith Kumar & Muralidhara, 2014).

Las propiedades antioxidantes del *AF* se deben a su núcleo y a una cadena lateral extendida, lo cual le permite formar fácilmente una resonancia que estabiliza el radical fenoxi y explica su efecto como captador de radicales libres. Esta capacidad le permite al *AF* proteger el ácido desoxirribonucleico (ADN) y lípidos en contra de las ROS (Zhao & Moghadasian, 2008). Tanto el grupo 3-metoxi y el grupo 4-hidroxilo pueden contribuir a la estabilidad del radical fenoxilo (Mancuso & Santangelo, 2014). La resonancia del radical fenoxi se muestra en la **Figura 15**.

Además, el radical fenoxi no tiene la capacidad de propagar una reacción en cadena de radicales libres, sino que es más probable que haya una condensación de dos radicales ferulato para formar el dímero: curcumina (Srinivasan et al., 2007). La estructura de la curcumina se muestra en la **Figura 16**.

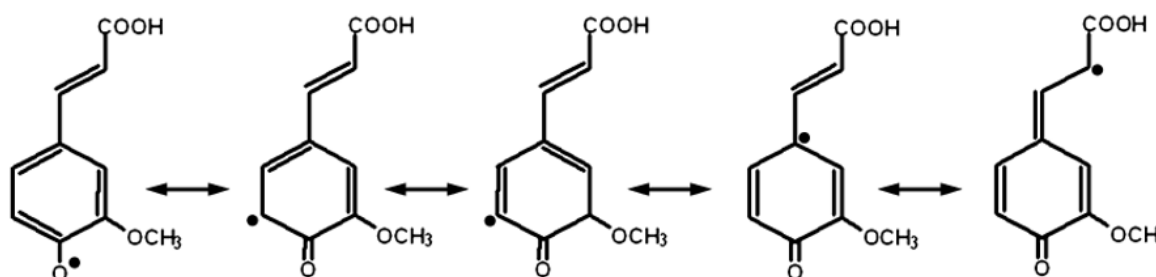


Figura 15. Se muestran las resonancias posibles que permiten que el *ácido ferúlico* presente su efecto antioxidante (Srinivasan, Sudheer, & Menon, 2007).

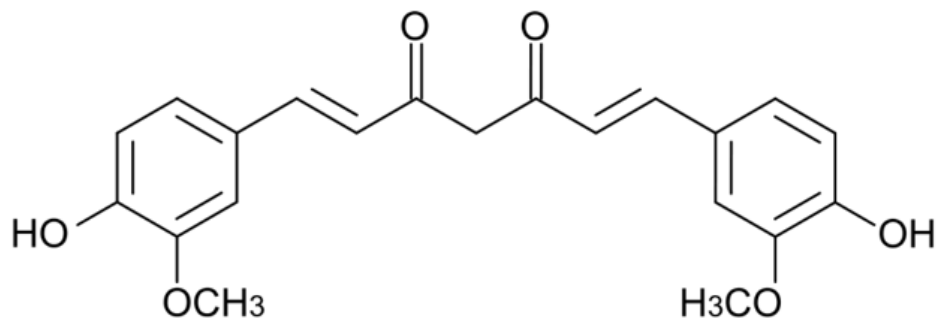


Figura 16. Una de las reacciones que ocurren para detener la reacción en cadena de radicales libres, es la unión de dos radicales fenoxi para forma la curcumina, la cual se muestra en esta imagen.

3. 7. 3. 2. Nocicepción

El *AF* produce una disminución dosis-dependiente de la SP, NF- κ B p65 y la caspasa 3 en la corteza frontal y en el hipocampo de ratones administrados con reserpina, el cual es un agente inductor de conductas dolorosas. Con respecto a las proteínas GSH y SOD en la corteza frontal y el hipocampo, el *AF* tiene la capacidad de prevenir su disminución inducida por reserpina en ratón. Lo mencionado anteriormente ocasiona que el *AF* disminuya las conductas dolorosas en los ratones administrados con reserpina (Y. Xu et al., 2013).

Se ha reportado que el *AF* revierte las conductas de alodinia mecánica e hiperalgesia térmica en el modelo de constricción crónica del nervio ciático en la rata. Este efecto podría deberse a la inhibición de la recaptura de monoaminas como la noradrenalina y la 5-HT (Ying; Xu et al., 2016).

Además se ha observado que el *AF* disminuye las conductas tipo alodinia e hiperalgesia en un modelo de dolor neuropático inducido por vincristina en rata. Esta disminución de las conductas dolorosas posiblemente se debe a la disminución de los niveles de GSH que se observa en ratas con vincristina, así mismo, en estas ratas, la administración del *AF* revierte el incremento de TNF- α e IL-6 (Vashistha et al., 2017).

3. 7. 3. 3. Cáncer

El *AF* constituye el 0,5% de la masa total del salvado de trigo. Este compuesto se encuentra esterificado con los residuos de arabinosa y se ha reportado que inhibe la carcinogénesis en modelos animales, protege de la formación de compuestos derivados del nitrógeno y reduce la formación de aductos de ADN en cultivos de células cancerígenas (Kroon et al., 1997).

Otros estudios muestran que el *AF* (50-100 nM) reduce la genotoxicidad del naranja de acridina. Asimismo, el *AF* reduce el número de micronúcleos en eritrocitos policromáticos y el número de aberraciones cromosómicas en la médula ósea en hámsters. Por otro lado, el *AF* reduce la isoforma 1A del citocromo P450 y aumenta la actividad de la uridina difosfato glucuroniltransferasa (UGT); además, ayuda a una mejor desintoxicación de compuestos carcinogénicos en el hígado e intestino (Mancuso & Santangelo, 2014).

El *AF* ha sido sugerido como un adyuvante en la terapia del cáncer, ya que tiene la habilidad de regular el crecimiento celular, la proliferación, puede capturar radicales libres, estimular enzimas citoprotectoras e inhibir los sistemas citotóxicos. Se ha demostrado que el *AF* (150 µM) tiene efecto antiproliferativo en células cancerígenas de colon Caco-2, ya que bloquea la fase S del ciclo celular. Algunos derivados del *AF* han demostrado que bloquean el crecimiento de células tumorales de mama, pulmón, colon y del SNC. En otro estudio con el *AF* o el extracto de *Ixora javanica*, cuyo componente activo es el *AF*, previene la carcinogénesis inducida por un derivado del antraceno. La actividad antioxidante del *AF* y la modulación de las enzimas desintoxicantes tipo II contrarrestan el crecimiento del sarcoma-80 y el carcinoma de Ehrlich (Mancuso & Santangelo, 2014).

Se ha observado que el *AF* potencia la citotoxicidad del 5-fluorouracilo y de los agentes con base de platino en células de cáncer cervical humano. Adicionalmente, el *AF* (1-40 µg/mL) solo, o en combinación con la 2-desoxiglucosa, mejora el mecanismo de acción por el cual se presenta la inducción de muerte celular, lo cual involucra una alteración en el estado redox y la expresión de vías proapoptóticas como p53, p21, NF-kB y la caspasa-3 (Mancuso & Santangelo, 2014).

3. 7. 3. 4. Convulsión y depresión

El *AF* ha mostrado un efecto sinérgico con el pentobarbital al acortar la latencia de hipnosis y prolongar la duración de la hipnosis; sin embargo, su administración individual no presenta estos efectos. Se han realizado pruebas que señalan que el efecto del *AF* en la inducción de la hipnosis con pentobarbital no está relacionada con el sistema GABAérgico, sino con el sistema serotoninérgico (Tu et al., 2012).

En otro estudio, la administración del *AF* (20-80 mg/kg) produjo el aumento de 5-HT y norepinefrina en el hipocampo y corteza frontal en ratones. Además, la inhibición de la MAO podría contribuir parcialmente a los niveles elevados de monoaminas. Esto se ha relacionado con el efecto antidepresivo del *AF* (Chen et al., 2015).

Se ha reportado que el *AF* ejerce un efecto de tipo antidepresivo a través del sistema serotoninérgico en el hipocampo (aumento de 5-HT y activación de los receptores 5-HT_{1A} y 5-HT_{2A}); aumenta los niveles de norepinefrina y dopamina; y activa la vía MAPK/ERK (Zeni et al., 2012). Además, el *AF* mostró un efecto antidepresivo en dos modelos diferentes a través de la regulación del sistema monoaminérgico (Xu et al., 2013).

3. 7. 3. 5. Alzheimer

En un modelo de ratones transgénicos que simula la enfermedad de Alzheimer, se demostró que la administración oral del *AF* (5,3 mg/kg/día) por 6 meses, reduce significativamente la deposición del péptido A β y de los niveles de IL-1 β en la corteza frontal, asimismo, se observó una mejora de la actividad cognitiva. En otro estudio, el *AF* (150 g/kg i.p.) presentó un efecto neuroprotector al reducir la inducción de ROS y RNS provocado por el péptido A β y regula positivamente tanto la Hemo-oxigenasa-1 (HO-1) y la proteína del choque térmico (Hsp-70) en el sinaptosoma de cerebro de jerbo. Se ha sugerido que el *AF* ejerce neuroprotección a través de la modulación de la β -secretasa, lo que ejerce una mejora en las tareas cognitivas de los animales (Mancuso & Santangelo, 2014).

3. 7. 3. 6. Cardiovascular

Mancuso y colaboradores (2014) reportan que el *AF* (1-100 mg/kg oral) disminuye la presión sanguínea en ratas hipertensas espontáneamente de manera dosis-dependiente. En otro estudio, con la administración del *AF* (50 mg/kg) se muestra una actividad antihipertensiva, efecto comparado con 10 mg/kg de captopril. Además, el efecto vasodilatador del *AF* involucra la reducción de la angiotensina II por la inhibición de la enzima convertidora de angiotensina (ECA), el incremento de NO por la activación de eNOS y finalmente la reducción de la producción de NADPH dependiente del anión superóxido. Asimismo, el *AF* (50 mg/kg) reduce la rigidez ventricular diastólica, atenúa la infiltración celular inflamatoria, la acumulación de hierro y la deposición de colágeno en los ventrículos izquierdos y riñones. Se ha atribuido un efecto antiarrítmico al *AF* mediado por el bloqueo de canales de K^+ y receptores β adrenérgicos. El consumo del *AF* (9,5 mg/kg oralmente) reduce los triglicéridos en ratas y conejo; así como el nivel de colesterol en ratas. El ferulato de sodio potencia el efecto terapéutico de nitratos, β -bloqueadores, bloqueadores de canales de calcio e inhibidores de la ECA; así mismo, ha demostrado un efecto como adyuvante en enfermedades coronarias y como una opción en sujetos intolerantes a nitratos y β -bloqueadores (Mancuso & Santangelo, 2014).

En un estudio se indujo una oclusión arterial del cerebro medio de ratas, el cual aumenta el número de células dañadas, aumenta la sintasa se óxido nítrico neuronal (nNOS, por sus siglas en inglés) y la sintasa se óxido nítrico inducible (iNOS, por sus siglas en inglés); y disminuyó la sintasa se óxido nítrico endotelial (eNOS, por sus siglas en inglés). El *AF* preserva las células neuronales de la isquemia cerebral y la excitación inducida por glutamato. Por tanto, el *AF* atenúa el incremento de iNOS y nNOS y la disminución de eNOS (Koh, 2012).

3. 7. 2. 7. Diabetes

Se ha demostrado que el *AF* mejora la respuesta al estrés celular y reduce la inmunorreactividad del NF- κ B en el páncreas, hígado, riñón y suero de ratones diabéticos y ratas diabéticas. En ratones diabéticos, el *AF* aumenta la insulina plasmática, baja la glucosa en sangre, aumenta la síntesis de glucógeno hepático y la actividad de la glucocinasa (Mancuso & Santangelo, 2014). Existe una interacción

sinergista del *AF* con agentes hipoglucemiantes (metformina y tiazolidinediona) en un modelo de ratas diabéticas inducidas por estreptozotocina (Mancuso & Santangelo, 2014).

En un estudio, el tratamiento con el *AF* en ratas diabéticas lleva a la normalidad los niveles de glucosa, colesterol, triglicéridos, urea y albumina en sangre. Además, se presentó una mejora en el peso de las ratas tratadas con el *AF* y disminuyó la peroxidación de lípidos en el páncreas al neutralizar los radicales libres (Roy, Metya, Sannigrahi, Rahaman, & Ahmed, 2013).

3. 8. Modelos para el estudio del dolor

Un modelo de dolor es aquel procedimiento por el cual se valora la reacción de un animal ante un estímulo nocivo de naturaleza variada o situación patológica inducida, que puede ser utilizado en circunstancias fisiológicas o patológicas. En estos modelos se valora fundamentalmente la dimensión somática de la respuesta nociceptiva ante un estímulo; dado que no se puede valorar la dimensión afectiva inherente al dolor en el ser humano y posiblemente en los animales (Ortega et al., 2002). Las respuestas conductuales pueden ser: escape, destrucción del objeto que causa la nocicepción, agresividad, evitación, la modificación de un comportamiento (social, comida, sexual, sueño), entre otras. En los casos que se presenta un estímulo suficientemente intenso, la reacción sería escapar o atacar (Daniel Le Bars et al., 2001).

En estos modelos, la duración de los experimentos debe ser tan corta como el experimento lo permita; así como, la cantidad de animales a utilizar debe ser la mínima posible. Asimismo, las investigaciones deben de tener una adecuada planificación con la intención de minimizar al máximo el sufrimiento del animal. (Daniel Le Bars et al., 2001; Ortega et al., 2002; Zimmermann, 1983).

El estímulo debe de ser cuantificable, reproducible y no invasivo. Hay diferentes tipos de estímulos (Daniel Le Bars et al., 2001):

- a) Estímulo eléctrico. Tiene ventajas, ya que es cuantificable, reproducible y no invasivo. Entre sus desventajas se encuentran que el estímulo no es natural como los del medio ambiente, puede haber variación en las impedancias del

tejido estimulado y si el estímulo es muy intenso, se pueden excitar indistintamente todas las fibras periféricas.

- b) Estímulo térmico. Es un estímulo más selectivo, pero depende de la intensidad de la luz irradiada, del grosor, la superficie y el color de la piel. Además, cuando se activan los nociceptores de esta manera, también se activan las fibras no nociceptivas, las cuales ejercen una influencia inhibitoria en el mecanismo nociceptivo. Por otro lado, se puede sumergir una extremidad del animal en un baño termostático que permite un incremento más rápido de temperatura; sin embargo, no es instantáneo ni se puede asegurar que la temperatura del baño o la superficie de la piel sea la misma que la temperatura de las capas inferiores. En estos casos, el estimulador térmico láser de CO₂ es una buena opción, ya que abate varias de las desventajas mencionadas.
- c) Estímulo mecánico. Este estímulo se detiene tan pronto como se presenta una respuesta. Tiene la desventaja de activar mecanorreceptores de bajo umbral y nociceptores al mismo tiempo, es decir, tiene poca especificidad. En general, este estímulo tiene las mismas desventajas que el estímulo térmico.
- d) Estimulación química. Esta es la estimulación más lenta, los comportamientos varían de una prueba a otra, no se mide un umbral sino un puntaje de un comportamiento. Este tipo de estímulo es el más cercano al tipo de dolor clínico.

Para llevar a cabo cualquier prueba de dolor, se debe tener en cuenta la naturaleza del estímulo, el sitio de aplicación y el historial del sitio (si el sitio ha sido estimulado con anterioridad, cómo y el estado del tejido). Además, deben controlarse algunos parámetros: la intensidad, la duración y la superficie de estimulación. Un modelo de nocicepción en un animal debe presentar las siguientes características: especificidad, sensibilidad, validez, confiabilidad, reproducibilidad (Daniel Le Bars et al., 2001).

Los modelos que involucran algún agente irritante o algésico para producir el estímulo se consideran modelos de estímulos de larga duración. Estos modelos no son considerados como modelos de dolor crónico, ya que estos duran minutos. Por lo tanto, es el tipo de estímulo que el animal no va a poder evitar y tendrá que ser sacrificado inmediatamente. Por otro lado, usualmente las vías de administración

preferidas son intradérmica e intraperitoneal. Entre las sustancias más utilizadas de manera intradérmica se encuentran: la formalina, la solución hipertónica salina, el adyuvante de Freund y la capsaicina. El comportamiento mostrado puede ser la lamida o la sacudida de la pata (Daniel Le Bars et al., 2001; Ortega et al., 2002). También se ha sugerido el uso de mediadores inflamatorios como la histamina, serotonina, glutamato y prostaglandinas como agentes capaces de inducir comportamientos nociceptivos (Jesse et al., 2007).

En animales, parece que la sensibilidad del comportamiento en la prueba de nocicepción tiene una dependencia en la intensidad del estímulo aplicado. Por otro lado, la especificidad depende de la naturaleza y tiempo del estímulo aplicado (Daniel Le Bars et al., 2001).

La prueba de estiramiento abdominal, la cual es muy sensible pero débilmente predecible, debe reservarse para un estudio farmacodinámico inicial para que las sustancias potencialmente analgésicas no se pierdan y además para entender el mecanismo básico que subyace tras dolor y analgesia. En resumen, es débil al identificar una sustancia como analgésica, pero es muy buena prediciendo sus capacidades terapéuticas una vez que ha sido identificada como analgésica (Daniel Le Bars et al., 2001).

Los principales factores perturbadores en los modelos de dolor son (Daniel Le Bars et al., 2001):

- a) Factores ligados a la farmacocinética.
- b) Interacciones entre estímulos.
- c) Factores ambientales.
- d) Factores psicológicos y psicofisiológicos relacionados.
- e) Funciones fisiológicas relacionadas.

Ninguno de los modelos es completamente satisfactorio. La primera debilidad recae en el estímulo utilizado para producir una reacción nociceptiva; la segunda debilidad recae en la naturaleza de la variable dependiente, generalmente el umbral de la reacción motora. Los sistemas vegetativo y nociceptivo tienen una relación compleja muy fuerte tanto a nivel central como periférico, estas relaciones pueden causar malinterpretaciones (Daniel Le Bars et al., 2001).

3. 8. 1. Prueba de estiramiento abdominal

La inyección intraperitoneal de agentes irritantes es caracterizada por contracciones abdominales, movimientos del cuerpo como un todo, retorcimiento de los músculos abdominales. Es posible que este dolor no sea totalmente visceral, pero es muy similar al provocado en una peritonitis. El modelo original utilizaba fenilbenzoquinona y con el tiempo se ha modificado a acetilcolina, ácido clorhídrico diluido, ácido acético, adrenalina, triptamina, entre otros. Además, la concentración, la temperatura y el volumen también han sufrido cambios. Este método tiene falta de especificidad, pero sirve para probar fármacos con posible actividad antinociceptiva y no antinociceptiva. La especificidad puede mejorarse al realizar una prueba con rotarod (Daniel Le Bars et al., 2001).

Los compuestos que mejor producen la incidencia de las constricciones abdominales son: ácido acético, betanina, cloruro de calcio, clorobutanol, fenilbenzoquinona y triptófano. Las sustancias que tienen una latencia larga, como el ácido acético o la fenilbenzoquinona, podrían actuar de manera indirecta por la liberación de sustancias endógenas que estimulan las terminales nociceptivas (Collier, Dinneen, Johnson, & Schneider, 1968). Por lo regular, la prueba se realiza con ácido acético al 0,6% y se contabiliza la conducta nociceptiva por 30 o 40 minutos. El uso de ácido acético para inducir el síndrome nociceptivo (contracciones abdominales, contorsión de músculos dorsoabdominales y la reducción de la actividad motora) causa algesia mediante el incremento del nivel de agentes proinflamatorios endógenos y citocinas en el fluido periférico del tejido, lo cual excita las terminales nerviosas nociceptivas periféricas (Moniruzzaman, Ferdous, & Irin, 2015). Esta respuesta es conocida como “*writhing*” (del inglés) y en español estiramiento (Collier et al., 1968).

Entre los fármacos que presentan efecto en este modelo se encuentran la codeína, la morfina, la petidina (s.c.) y la procaína (i.p.). Entre las ventajas de este modelo se encuentra su capacidad de ser sensible a fármacos antipiréticos y antagonistas narcóticos (Collier et al., 1968).

3. 8. 2. Prueba de nocicepción inducida con capsaicina

En este modelo se utiliza principalmente capsaicina y esta es administrada por vía subcutánea en la pata posterior derecha de los animales de experimentación. El comportamiento nociceptivo principal en este modelo es la lamida de la pata administrada con el agente algésico.

La capsaicina, que es un compuesto irritante aislado de los pimientos, ha mostrado ser capaz de liberar neuropéptidos como las traquiquininas y el CGRP. Beirith y colaboradores (2002) han señalado la liberación de glutamato y aspartato a partir de la administración de capsaicina en la pata. Se ha reportado la participación de los receptores NK₁, NK₂ y NK₃ en la transmisión de los estímulos químicos dolorosos ocasionados por la inyección subcutánea de capsaicina en la pata de ratón (Santos & Calixto, 1997).

3. 8. 3. Prueba de nocicepción inducida con prostaglandina

Se ha observado que la administración subcutánea de la PGE₂ produce hiperalgesia y alodinia en animales y humanos. La DE₅₀ reportada para la inyección intraplantar de PGE₂ es 1,42 (1,20-1,70) nmol/pata. La principal respuesta observada después de la administración subcutánea de la PGE₂ es la lamida del sitio. Se ha reportado que los receptores EP₃ y EP₄ son los responsables de la lamida de la pata inducida por PGE₂; además de que son los receptores por los que tiene mayor afinidad la PGE₂. La lamida de la pata inducida por prostaglandina es reducida por la inhibición de la PKA. Al mismo tiempo, el antagonismo de EP₃ y EP₄ reduce la activación de la PKA y ERK en la pata inyectada con PGE₂. La activación de la PKA explica gran parte de la conducta de lamida de la pata inducida por PGE₂; mientras que ERK tiene un papel menor en este proceso. La sensibilización inducida por PGE₂ o la activación de los nociceptores es llevada a cabo tanto por EP₂ como por EP₃ (Kassuya et al., 2007).

3. 8. 4. Prueba de nocicepción inducida con glutamato

La nocicepción causada por la inyección intraplantar de glutamato involucra la activación de receptores NMDA, AMPA, KAINATO y receptores a glicina. Se ha

encontrado evidencia de que antagonistas de los receptores glutamatérgicos pueden eliminar la propagación de la sensación dolorosa. La respuesta nociceptiva por inyección intraplantar de glutamato es evidente a los 15 minutos (de 0-15 minutos se considera el período de nocicepción) y la DE_{50} reportada es de 2,6 (1,6-4,3) $\mu\text{mol/pata}$. La respuesta máxima de lamida ha sido reportada a una concentración de 30 $\mu\text{mol/pata}$ (Beirith et al., 2002). Se ha reportado la administración del vehículo (Veh) o del fármaco en prueba 1 hora antes de la inyección de glutamato (Basting et al., 2014).

Otro estudio reporta que la administración subcutánea en la pata posterior derecha de glutamato 20 μL (10 $\mu\text{mol/pata}$) provoca una respuesta nociceptiva, la cual es mediada por la liberación de neuropéptidos (NKs y quininas) desde las fibras sensoriales (Jesse et al., 2007).

3. 8. 5. Prueba de nocicepción inducida con serotonina

En los tejidos periféricos, la aplicación de 5-HT produce dolor en los humanos y comportamiento nociceptivo en animales. Este mismo neurotransmisor ha sido descrito como un agente que actúa directamente en la hiperalgesia y nocicepción. Se ha reportado que la inyección subcutánea de 5-HT produce un comportamiento de lamida o sacudida en la pata inyectada de una manera dosis-dependiente (Tambeli, Oliveira, Clemente, Pelegrini-da-Silva, & Parada, 2006).

Se ha demostrado que el efecto nociceptivo de la 5-HT en la pata es llevado a cabo mediante la acción indirecta de la 5-HT en las neuronas aferentes primarias: se ha observado que este efecto es atenuado por la reducción de leucocitos polimorfonucleares, inhibición de la COX, reducción de norepinefrina de las terminales simpáticas y por el antagonismo local de los receptores β_1 y β_2 (Jesse et al., 2007).

4. Justificación

El dolor es el síntoma que más incapacita a las personas para realizar sus actividades. Incluso, la presencia de dolor incrementa significativamente el riesgo de depresión y ansiedad en el futuro (Y. Xu et al., 2013). Cuando el dolor agudo no es tratado, este puede evolucionar a crónico y no solamente ser un síntoma, sino ser la enfermedad misma. Conforme aumenta la edad de una persona, la posibilidad de desarrollar dolor crónico aumenta. Dado que la población mundial mayor de 65 años es muy probable que se duplique en 40 años, la carga económica generada por el dolor crónico es posible que aumente exponencialmente (van Hecke et al., 2013).

Hoy en día, muchos de los tratamientos clínicos disponibles son solamente parcialmente efectivos y pueden conducir a reacciones adversas (Scholz & Woolf, 2002). Entre estos tratamientos se encuentran los opioides y los AINEs, cuya utilidad es limitada por las reacciones adversas que producen (Julius & Basbaum, 2011). Además, los medicamentos analgésicos son solamente reformulados o elaborados en combinaciones, es decir, no se investigan nuevas moléculas analgésicas, pese a la necesidad de esta área terapéutica.

Los polifenoles son compuestos considerados como benéficos para la salud humana al ejercer varios efectos biológicos como: captura de radicales libres, quelación de metales, modulación de la actividad enzimática y alteración de señales de vías de transducción (Itagaki et al., 2009). Un ejemplo dentro de este grupo de compuestos es el *ácido ferúlico*, una molécula con múltiples propiedades en áreas terapéuticas muy diferentes unas de otras. Debido a esto, es posible que presente otros efectos biológicos de importancia clínica, como es el efecto analgésico.

Se ha reportado que el *AF* podría ser un buen producto nutracéutico (alimento o parte de un alimento que proporciona beneficios médicos para la salud, incluye la prevención y/o el tratamiento de enfermedades; Stephen DeFelice, 1989), ya que tiene un alto perfil de seguridad y una carga financiera baja (Zhao & Moghadasian, 2008); sin embargo, no se ha estudiado a fondo su mecanismo de acción involucrado en diversas patologías, pues aunque lo han autorizado como aditivo alimenticio en países de Asia, no se han hecho estudios exhaustivos. En vista de la falta de estudios que sustenten el uso del *AF* como adyuvante y/o fármaco para el tratamiento del dolor; el *AF* es una molécula atractiva para su investigación.

5. Objetivos

5. 1. Objetivo General

- ❖ Evaluar el efecto antinociceptivo del *ácido ferúlico*, así como sus posibles mecanismos de acción a través de diversos modelos de dolor agudo en ratón.

5. 2. Objetivos particulares

- ❖ Evaluar el efecto antinociceptivo del *ácido ferúlico* en las pruebas de inducción de nocicepción con diversos agentes algésicos (ácido acético, capsaicina, prostaglandina E₂, serotonina, glutamato).
- ❖ Dilucidar el mecanismo de acción del *ácido ferúlico* en la prueba de estiramiento abdominal en ratón mediante el uso de antagonistas de vías antinociceptivas naturales.

6. Hipótesis

El *ácido ferúlico* presenta efecto antinociceptivo en diversos modelos de inducción de nocicepción en ratón, como son el modelo de estiramiento abdominal, capsaicina, glutamato, prostaglandina E₂ y serotonina. Además, el efecto antinociceptivo involucra el bloqueo de la vía del óxido nítrico, de la vía opiodérgica y de la vía serotoninérgica.

7. Metodología

7. 1. Animales

Se utilizaron ratones ICR macho (22-30 g), proporcionados por el INER-SSA. Los animales se mantuvieron en una habitación con temperatura constante ($22 \pm 1^{\circ}$ C) en ciclos de luz/oscuridad de 12 h. El alimento y el agua *ad libitum*. Los animales se trataron de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana sobre el cuidado y manejo de animales (NOM-062-ZOO-1999), así mismo se siguieron los principios éticos para la investigación del dolor en animales promulgados por la IASP (Zimmermann, 1983) y adicionalmente el protocolo se aprobó por el comité interno de ética e investigación del INER (Protocolo: B11-16, INER-SSA). Se utilizaron 6 animales por cada grupo experimental en las pruebas conductuales. Al término de cada experimento los animales se sacrificaron en una cámara de CO₂.

7.2. Reactivos

En este estudio el *ácido ferúlico*, el prostanoide PGE₂, el ácido glutámico, la serotonina y la capsaicina se adquirieron de Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA), el ácido acético utilizado se obtuvo de J.T. Baker (Pennsylvania, USA). Por su parte, la metiotepina, naloxona y L-NAME fueron comprados en Tocris Bioscience (Bristol, UK). Para disolver todos los fármacos se utilizó solución salina isotónica con 10% de Tween 20, con excepción del prostanoide E₂, el cual se disolvió en etanol al 5%; la capsaicina se disolvió en una solución al 10% de Tween 80 y 10% de etanol; y finalmente, el ácido acético se preparó con agua inyectable. En todas las pruebas el *AF* se disolvió en SSI.

7. 3. Pruebas

a) Evaluación del *ácido ferúlico* mediante la prueba de estiramiento abdominal

La prueba de nocicepción inducida por ácido acético consistió en la administración intraperitoneal de ácido acético diluido (0,6% en agua de solución inyectable), cuyo volumen dependió del peso del ratón (0,1 mL/10 g de peso del ratón), seguido de la subsecuente contabilización de los “estiramientos” (*writhes*), caracterizados por la

contracción del músculo abdominal acompañado por un movimiento extensor de las extremidades posteriores. 60 minutos antes de la administración del agente alérgico, se administró el AF (1-100 mg/kg, p.o.) a los animales; se utilizaron 6 ratones por dosis del AF o para el Veh. En la **Figura 17A** se muestra el período de ambientación; y pasado ese tiempo, se contaron los estiramientos durante períodos de 5 minutos hasta un total de 40 minutos (Collier et al., 1968), la **Figura 17B** muestra los estiramientos que presentaron los ratones frente a la administración intraperitoneal de ácido acético. En el **Diagrama 2** se muestran un cronograma de las actividades realizadas en esta prueba conductual.

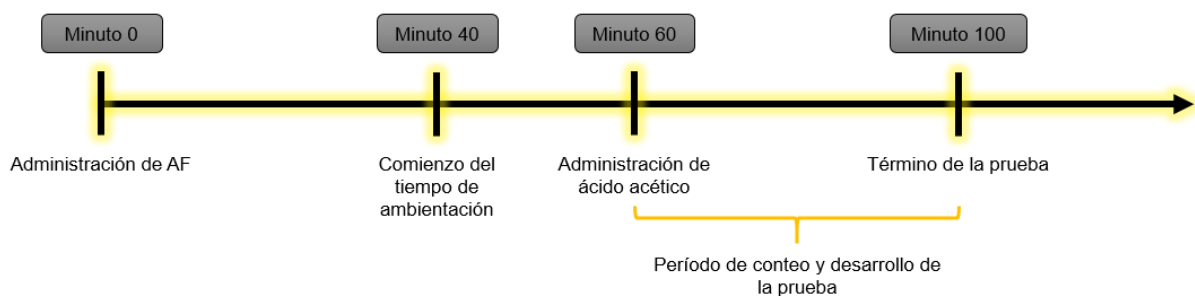


Diagrama 2. Cronograma de las actividades para realizar la prueba de estiramiento abdominal. Se cuenta con el período de ambientación, administración y contabilización de la respuesta.

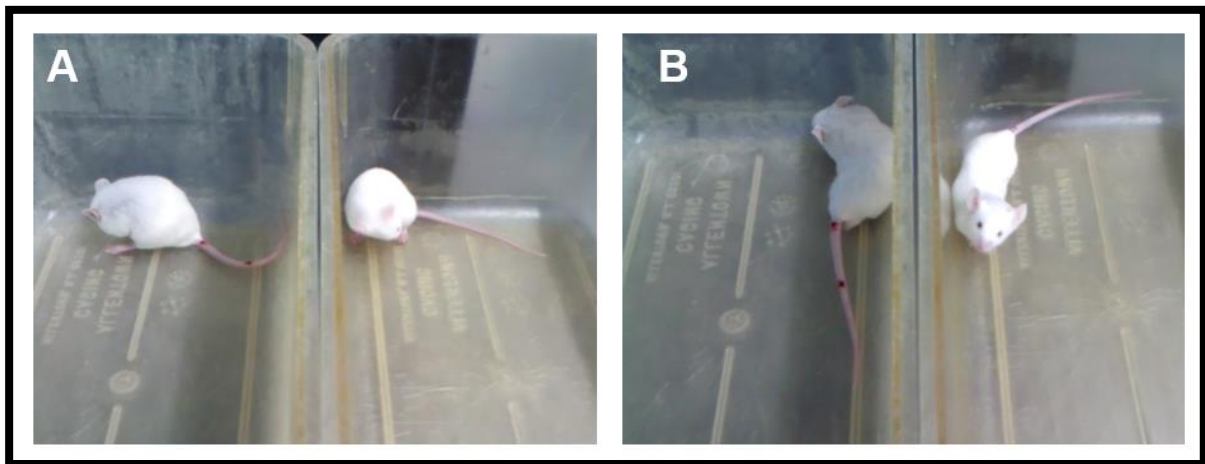


Figura 17. Ambientación y conducta de los ratones en la prueba de estiramiento abdominal. En la fotografía A se muestra el periodo de ambientación del animal, mientras que en la fotografía B se observa la conducta de estiramiento abdominal causado por el ácido acético.

b) Evaluación del mecanismo de acción del *ácido ferúlico* en la prueba de estiramiento abdominal

Los ratones recibieron pretratamientos con N(G)-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME; inhibidor de la sintasa de óxido nítrico, 10 mg/kg, i.p.), naloxona (NLX;

antagonista opioide inespecífico, 1 mg/kg, i.p.) y metiotepina (MET; antagonista de receptores serotoninérgicos [5-HT₁, 5-HT₅, 5-HT₆, 5-HT₇], 0,1 mg/kg, i.p). Los pretratamientos se realizaron 10 minutos antes de la administración del *ácido ferúlico* (100 mg/kg, p.o.), y 60 minutos después se realizó la administración del ácido acético (0,6%, i.p.); inmediatamente se contabilizaron los estiramientos abdominales presentados por el ratón en intervalos de 5 minutos durante 40 minutos. En el **Diagrama 3** se representa el cronograma de las actividades.

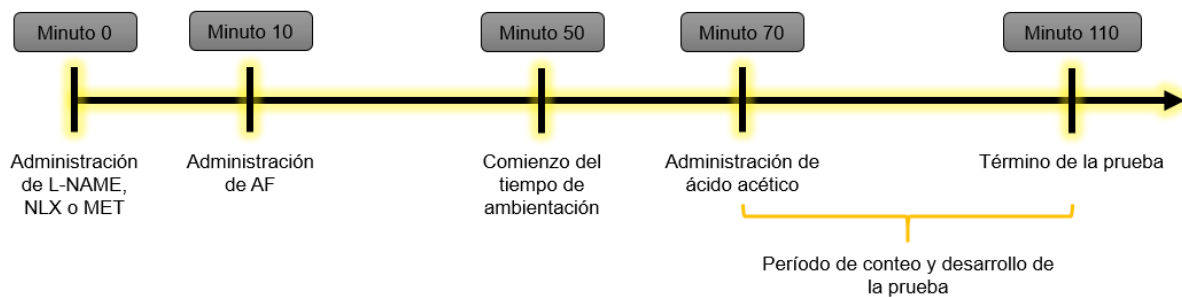


Diagrama 3. Cronograma de las actividades que se realizaron para la evaluación del AF en la prueba de estiramiento abdominal ante la presencia de los antagonistas (MET, NLX o L-NAME).

c) Evaluación del *ácido ferúlico* mediante la administración de capsaicina

Se administró el AF (10-300 mg/kg, p.o.) a los animales 60 minutos antes de la inyección de capsaicina. Se administraron 50 μ L de capsaicina (3 μ g/pata) en el dorso de la pata posterior derecha del animal. Se registró el tiempo de lamida de la extremidad administrada que se presentó durante los 5 minutos seguidos de la administración (Santos & Calixto, 1997). En la **Figura 18** se pueden observar dos fotografías: la primera es de un ratón en el cilindro de exploración durante su ambientación, mientras la segunda muestra la conducta nociceptiva presentada (lamida de la extremidad inyectada con el agente algésico). En el **Diagrama 4** se representa un cronograma que muestra el orden en el que se realizó cada actividad.

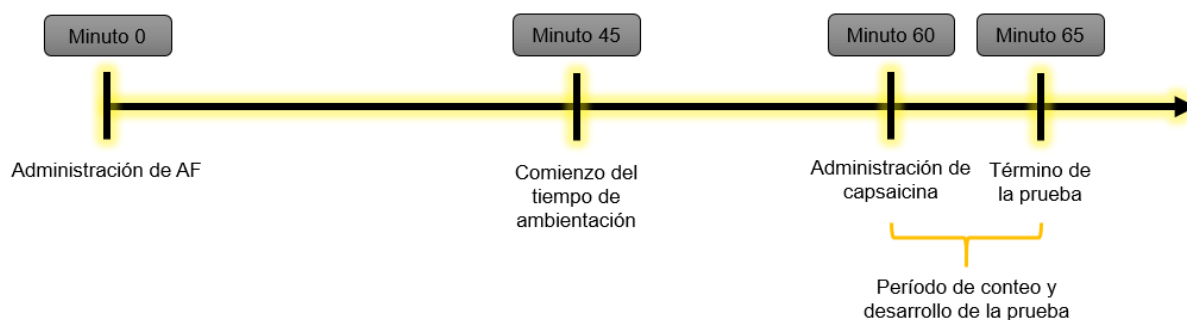


Diagrama 4. Cronograma de las actividades para realizar la evaluación del AF con capsaicina. Se cuenta con el período de ambientación, administración y contabilización de la respuesta.

d) Evaluación del *ácido ferúlico* mediante la administración de glutamato

Primeramente, se administró el AF (0,3-30 mg/kg, p.o.) a los animales 60 minutos antes de la inyección de glutamato. Se administraron de manera subcutánea 20 μ L de glutamato (15 μ mol/pata) en el dorso de la pata posterior derecha del animal. Después se registró el tiempo de lamida de la extremidad durante 20 minutos (Beirith et al., 2002). En la **Figura 18** se pueden observar dos fotografías: la primera es de un ratón en el cilindro de exploración durante su ambientación, mientras la segunda muestra la conducta nociceptiva presentada (lamida de la extremidad inyectada con el agente algésico). En el **Diagrama 5** se representa un cronograma con el orden de las actividades realizadas.

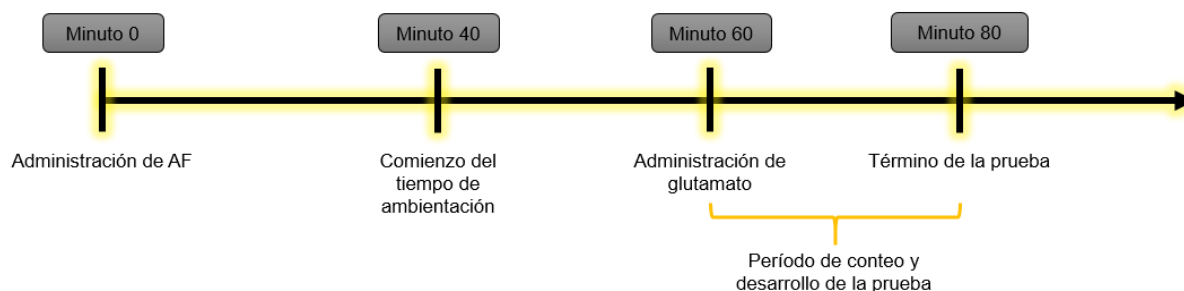


Diagrama 5. Cronograma de las actividades para realizar la evaluación del AF con glutamato. Se cuenta con el período de ambientación, administración y contabilización de la respuesta.

e) Evaluación del *ácido ferúlico* mediante la administración de prostaglandina E₂

Se administró el AF (0,03-56,6 mg/kg, p.o.) a los animales 60 minutos antes de la inyección del agente algésico (PGE₂). Se administraron 40 μ L de una disolución de prostaglandina E₂ (3 nmol/pata) en el dorso de la pata posterior derecha del animal.

Se registró el tiempo de lamida de la extremidad administrada que se presenta durante 20 minutos (Kassuya et al., 2007). En la **Figura 18** se pueden observar dos fotografías: la primera es de un ratón en el cilindro de exploración durante su ambientación, mientras la segunda muestra la conducta nociceptiva presentada (lamida de la extremidad inyectada con el agente algésico). En el **Diagrama 6** se representa un cronograma del orden en el que se realizó cada actividad.

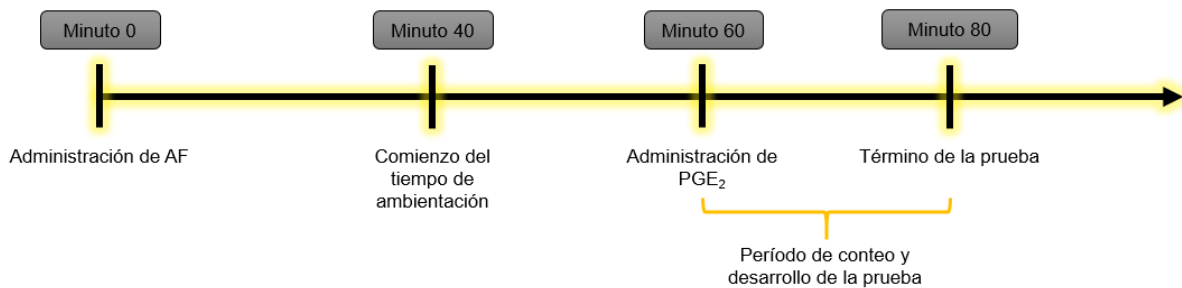


Diagrama 6. Cronograma de las actividades para realizar la evaluación del AF con PGE₂. Se cuenta con el período de ambientación, administración y contabilización de la respuesta.

f) Evaluación del *ácido ferúlico* mediante la administración de serotonina

Se administró el AF (1-30 mg/kg, p.o.) a los animales 60 minutos antes de la inyección del agente algésico (5-HT). Se inyectaron 20 µL de una solución de serotonina (20 ng/pata) en el dorso de la pata posterior derecha del animal. Se registró el tiempo de lamida de la extremidad administrada que se presenta cada 5 minutos durante 60 minutos (Jesse et al., 2007). En la **Figura 18** se pueden observar dos fotografías: la primera es de un ratón en el cilindro de exploración durante su ambientación, mientras la segunda muestra la conducta nociceptiva presentada (lamida de la extremidad inyectada con el agente algésico). En el **Diagrama 7** se representa el tiempo en que se realizó cada actividad.

El cálculo de la DE_{50} se obtuvo a partir del modelo semilogarítmico y el cálculo estadístico de una regresión lineal. Finalmente, el efecto máximo se obtuvo a través de la dosis de cada prueba con mayor efecto, se obtuvo el promedio de los valores de la respuesta y se calculó el E.E.M.

8. Resultados

8. 1. Evaluación del *ácido ferúlico* mediante la prueba de estiramiento abdominal

La primera prueba que se realizó fue la prueba de Writhing (estiramiento abdominal), la cual consiste en ocasionar una nocicepción de tipo visceral. En la **Figura 19** se muestran los resultados obtenidos de la prueba, en la cual se puede observar que la dosis de 100 mg/Kg de *AF* presenta el efecto máximo ($68,69 \pm 26,41\%$) en la evaluación. Asimismo se calculó la DE_{50} , la cual resultó de $55,6 \pm 6,9$ mg/kg.

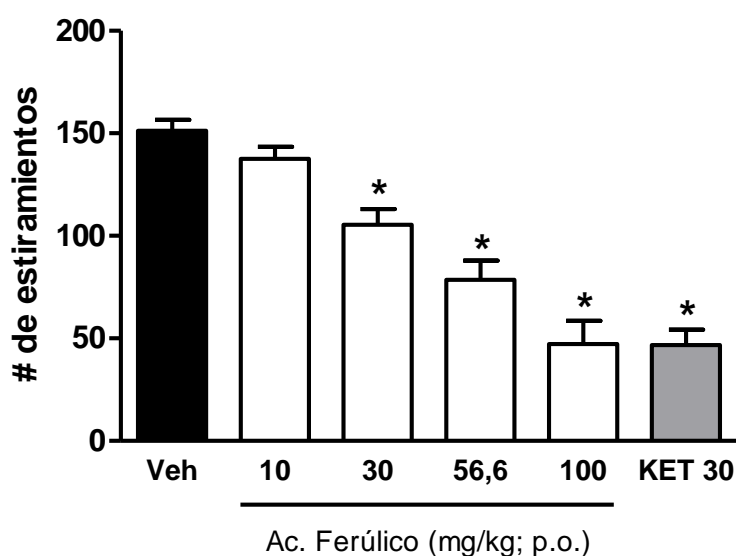


Figura 19. Efecto antinociceptivo del *ácido ferúlico* en la prueba de estiramiento abdominal en ratón. Las barras representan el número estiramientos totales promedio de 6 animales \pm E.E.M. El efecto antinociceptivo se representa como la disminución del número de estiramientos totales en un período de 40 minutos. La DE_{50} calculada en esta prueba es de $55,6 \pm 6,9$ mg/kg. Se utilizó como control positivo de la prueba el analgésico ketorolaco (KET, 30 mg/kg, p.o.). * Estadísticamente diferente con respecto al vehículo (Veh), $p < 0,05$ determinado por una ANADEVIA de una vía seguido de una prueba post-hoc de Dunnett.

8. 2. Evaluación del mecanismo de acción del *ácido ferúlico* en la prueba de estiramiento abdominal

Se evaluó el efecto antinociceptivo del *AF* con la administración previa de tres antagonistas que pueden dilucidar el mecanismo de acción del fármaco. En la **Figura 20** se muestran los resultados de este experimento. Todos los vehículos con antagonistas no presentaron diferencia significativa con el Veh, con excepción de la prueba con metiotepina. Cuando se administró el *AF* (100 mg/kg), este presentó diferencia significativa con el Veh, con L-NAME y metiotepina; mientras que la NLX

revierte el efecto antinociceptivo del AF, al no presentar diferencia significativa con el Veh.

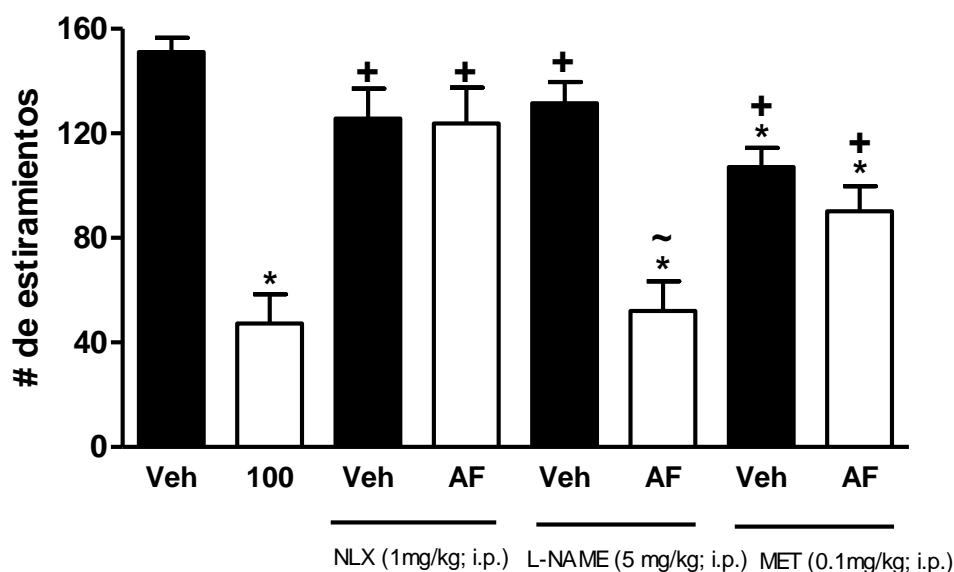


Figura 20. Efecto antinociceptivo del ácido ferúlico en la prueba de estiramiento abdominal en ratón ante la presencia de L-NAME (10 mg/kg), metiotepina (MET, 0,1 mg/kg) o naloxona (NLX, 1mg/kg). Las barras representan el número estiramientos totales promedio de 6 animales \pm E.E.M. El efecto antinociceptivo se representa como la disminución del número de estiramientos totales en un período de 40 minutos. En todos los casos se utilizó un ANADEVIA de una vía seguido de una prueba post-hoc de Neuman-keuls.

* Estadísticamente diferente con respecto al vehículo (Veh) con $p < 0.05$.

+ Estadísticamente diferente con respecto a la dosis de 100 mg de AF sin antagonista con $p < 0.05$.

~ Estadísticamente diferente el vehículo (Veh) y la dosis de 100 mg de AF de un mismo antagonista con $p < 0.05$.

8. 3. Evaluación del efecto antinociceptivo del *ácido ferúlico* en la nocicepción inducida por capsaicina

En la **Figura 21** se muestra la curva dosis-respuesta del AF, se observó una respuesta dependiente de la dosis. En esta prueba, la dosis que presenta el efecto máximo ($64,34 \pm 15,16\%$) es la dosis de 300 mg/kg. La DE_{50} obtenida en este modelo fue de $120,7 \pm 17,3$ mg/kg.

8. 4. Evaluación del efecto antinociceptivo del *ácido ferúlico* en la nocicepción inducida por glutamato

En esta prueba ninguna de las dosis presentaron una diferencia significativa con el Veh; dado que no hay un efecto dependiente de la dosis y ninguna de las dosis

presenta una disminución del estímulo nociceptivo, no se calculó la DE₅₀ para este modelo. En la **Figura 22** se pueden observar los resultados para cada dosis y del Veh.

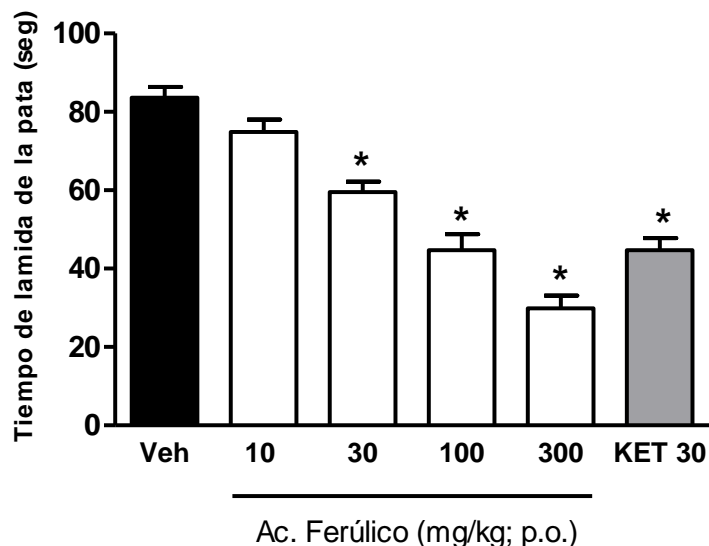


Figura 21. Efecto antinociceptivo del *ácido ferúlico* en la prueba de capsaicina en ratón. Las barras representan el tiempo de lamida promedio de 6 animales \pm E.E.M. La disminución en el tiempo de lamida que se presenta durante 5 minutos es representativo del efecto antinociceptivo del fármaco. La DE₅₀ calculada en esta prueba es de $120,7 \pm 17,3$ mg/kg. Se utilizó como control positivo de la prueba el analgésico ketorolaco (KET, 30 mg/kg, p.o.). * Estadísticamente diferente con respecto al vehículo (Veh), $p < 0.05$ determinado por una ANADEVa de una vía seguido de una prueba post-hoc de Dunnett.

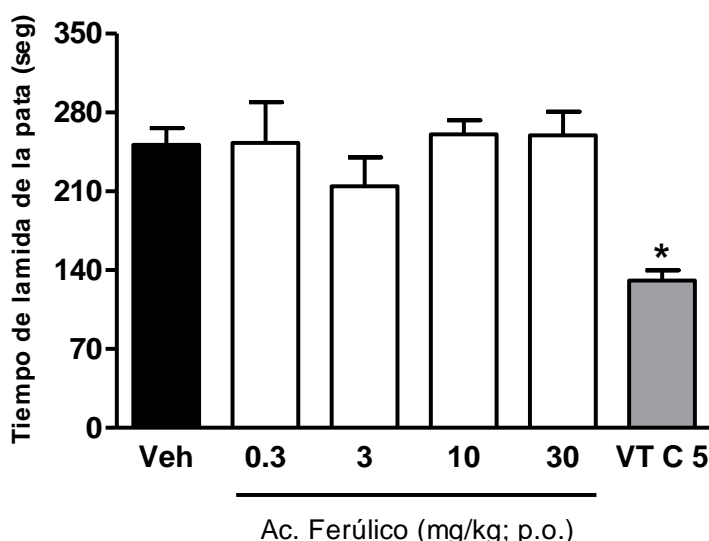


Figura 22. Efecto antinociceptivo del *ácido ferúlico* en la prueba de glutamato en ratón. Las barras representan el tiempo de lamida promedio de 6 animales \pm E.E.M. No hay disminución en el tiempo de lamida que se presenta durante 20 minutos. Se utilizó como control positivo de la prueba el antagonista no selectivo de receptores glutamatérgicos como la vitamina C (VT C, 5 mg/kg, i.p.). * Estadísticamente diferente con respecto al vehículo (Veh), $p < 0.05$ determinado por una ANADEVa de una vía seguido de una prueba post-hoc de Dunnett.

8. 5. Evaluación del efecto antinociceptivo del *ácido ferúlico* en la prueba inducida por prostaglandina

En la prueba de nocicepción inducida por prostaglandina E₂ se presenta un efecto dependiente de la dosis por parte del *AF*, por lo que la DE₅₀ calculada fue 0,44 ± 0,17 mg/kg, mientras que el efecto antinociceptivo máximo del *AF* en esta prueba fue de 76,15 ± 8,28% con la dosis de 3 mg/kg. Los resultados de la prueba se pueden observar en la **Figura 23**.

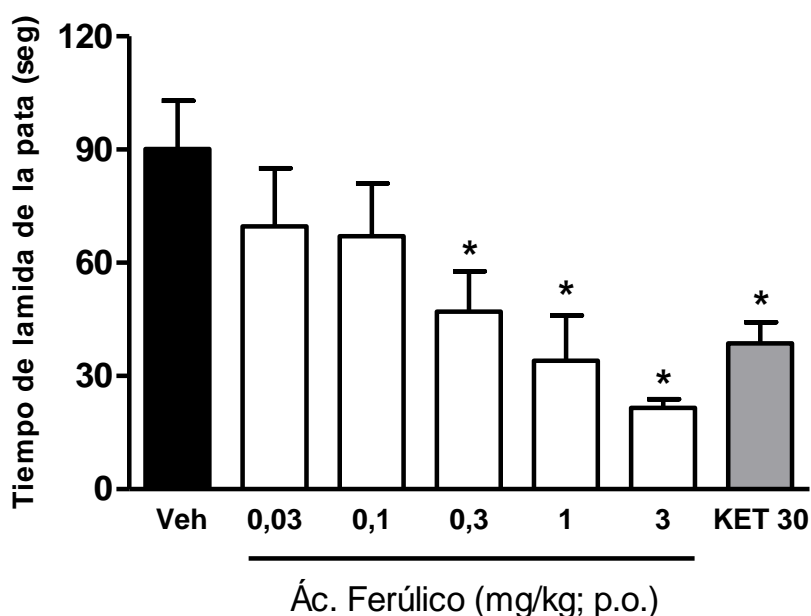


Figura 23. Efecto antinociceptivo del *ácido ferúlico* en la prueba de prostaglandina E₂ en ratón. Las barras representan el tiempo de lamida promedio de 6 animales ± E.E.M. La disminución en el tiempo de lamida que se presenta durante 20 minutos es representativo del efecto antinociceptivo del fármaco. La DE₅₀ calculada en esta prueba es de 0,44 ± 0,17 mg/kg. Se utilizó como control positivo de la prueba el analgésico ketorolaco (KET, 30 mg/kg, p.o.). * Estadísticamente diferente con respecto al vehículo (Veh), p<0.05 determinado por una ANADEVVA de una vía seguido de una prueba post-hoc de Dunnett.

8. 6. Evaluación del efecto antinociceptivo del *ácido ferúlico* en la nocicepción inducida por serotonina

En esta prueba se obtuvo una DE₅₀ de 5,16 mg/kg ± 1,89 mg/kg y un efecto antinociceptivo máximo de 79,52 ± 23,67% con una dosis de 30 mg/kg. Los resultados de la prueba se pueden observar en la **Figura 24**.

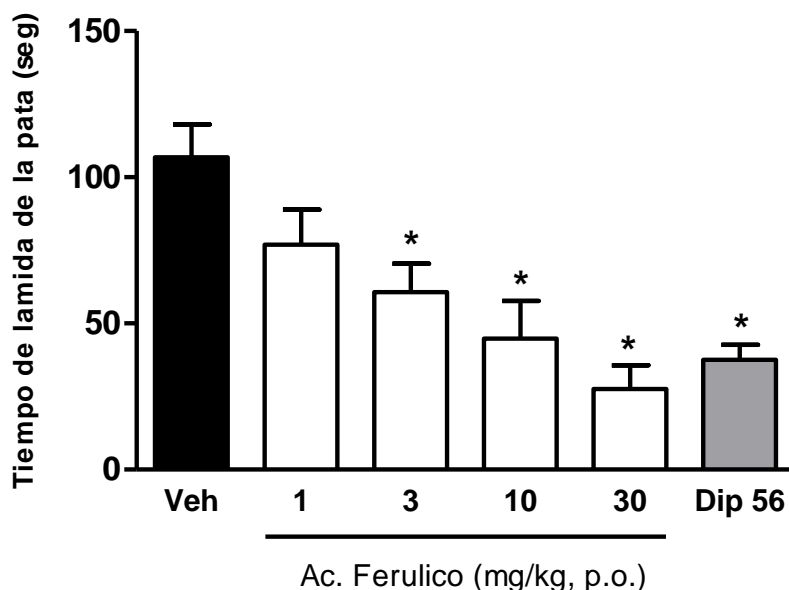


Figura 24. Efecto antinociceptivo del *ácido ferúlico* en la prueba de serotonina en ratón. Las barras representan el tiempo de lamida promedio de 6 animales \pm E.E.M. La disminución en el tiempo de lamida que se presenta durante 60 minutos es representativo del efecto antinociceptivo del fármaco. La DE_{50} calculada en esta prueba es de 5,16 mg/kg \pm 1,89 mg/kg. Se utilizó como control positivo de la prueba el analgésico dipirona (Dip, 56 mg/kg, p.o.). * Estadísticamente diferente con respecto al vehículo (Veh), $p < 0.05$ determinado por una ANADEVa de una vía seguido de una prueba post-hoc de Dunnett.

En la **Tabla 5** se resumen los valores de DE_{50} y % de efecto máximo obtenidos en cada modelo.

Tabla 5. Valores de DE_{50} y % de efecto máximo obtenidos en cada uno de los modelos realizados en este trabajo

Modelo	DE_{50} (mg/kg)	% de efecto máximo	Ventana de actividad biológica (mg/kg, p.o.)
Estiramiento abdominal (ácido acético)	55,6 \pm 6,9	68,69 \pm 26,41	10-100
Inducción de la nocicepción con capsaicina	120,7 \pm 17,3	64,34 \pm 15,16	10-300
Inducción de la nocicepción con glutamato	-	-	0.3-30
Inducción de la nocicepción con PGE_2	0,44 \pm 0,17	76,15 \pm 8,28	0.03-3
Inducción de la nocicepción con 5-HT	5,16 \pm 1,89	79,52 \pm 23,67	1-30

9. Discusión

El *AF* es un compuesto con múltiples propiedades en áreas terapéuticas muy diversas. Debido a esto, es posible que presente otros efectos biológicos de importancia, como es el efecto antinociceptivo. De acuerdo con los resultados de las pruebas en ratones ICR, se podría continuar con la investigación para profundizar en el estudio clínico y aplicabilidad terapéutica del *AF* como agente antinociceptivo.

En primer lugar, el modelo de estiramiento abdominal asemeja un dolor de tipo visceral; al aplicarse el *AF* en este modelo, se produjo una disminución en la conducta dolorosa del animal, lo cual se interpreta como un efecto antinociceptivo y es dependiente de la dosis. Con estos resultados, puede sugerirse que el *AF* puede ser útil en trastornos patológicos que cursen con cólicos o con un dolor no localizado de las vísceras como es el caso del dolor abdominal.

El modelo de estiramiento abdominal se seleccionó dado que sirve para probar fármacos con posible actividad antinociceptiva; además de ser un modelo muy sensible. La especificidad del modelo puede mejorarse al realizar una prueba con rotarod. En este caso, no se realizó la prueba de rotarod, puesto que ya varios autores han reportado que el *AF* no tiene ningún efecto sobre la actividad locomotora de ratones ICR ni ratones Swiss (Chen et al., 2015; Xu et al., 2013; Zeni, 2012). Esto incrementa la probabilidad de que el *AF* presente efecto antinociceptivo y no una sedación que pudiera disminuir la cantidad de estiramientos abdominales. Asimismo, se ha reportado el efecto antinociceptivo del *AF* en modelos de dolor neuropático, es muy probable que se presente un efecto terapéutico por parte del *AF* en estudios clínicos, ya que este modelo predice muy bien las capacidades terapéuticas de una sustancia una vez que ha sido identificada como analgésica (Daniel Le Bars et al., 2001).

El mecanismo productor de la nocicepción en el modelo de estiramiento abdominal involucra al canal TRPV₁ (pues los H⁺ son capaces de activarlo); así como, la bradiquinina, la SP, la neuroquinina y las prostaglandinas (principalmente PGI₂) (Ikeda, Ueno, Naraba, & Oh-ishi, 2001). Además, es probable que el *AF* presente un efecto antinociceptivo por medio de un mecanismo similar al que llevan a cabo los AINEs, ya que estos son efectivos en el modelo del ácido acético, donde las prostaglandinas generadas por la COX-1 en el lugar de la inyección tienen un papel

importante en la transmisión nociceptiva de este modelo (Ortega et al., 2002). Por otro lado, no se pueden descartar receptores como el NK₁, pues estos están a nivel visceral y sus antagonistas están relacionados con un efecto nociceptivo. Además, hay más neurotransmisores peptídicos a nivel visceral que en otros lugares del cuerpo (Cervero & Laird, 1999). Por último, como el ácido acético puede liberar H⁺, los canales iónicos ASIC son activados y podrían ser afectados por la administración del AF.

Con respecto al mecanismo de acción del AF en este modelo, se sugiere que esta sustancia utiliza la vía opioidérgica y serotoninérgica para producir antinocicepción a nivel visceral, pero no así la vía del óxido nítrico; se observó lo anterior dado que el pretratamiento con la NLX anula el efecto antinociceptivo que presenta el AF, lo cual sugiere que se observa una activación de los receptores μ , δ o κ por parte del AF. Por otro lado, es posible que el AF module de manera indirecta los receptores serotoninérgicos, ya que se revierte el efecto del AF en este modelo con el pretratamiento de MET; sin embargo, hay que considerar que la MET presenta diferencia significativa con respecto al Veh, lo que sugiere que la MET presenta un efecto antinociceptivo a la dosis administrada, pese a ello se revierte el efecto antinociceptivo del AF de manera parcial. Es por ello que se sugiere la participación de la vía serotoninérgica. Posiblemente el AF podría actuar como un antagonista competitivo, o puede presentar una acción indirecta sobre esta vía. El receptor 5-HT₃ es uno de los receptores serotoninérgicos de los que se encuentra involucrado en la excitación neuronal, la hipersensibilidad al dolor y la activación de células inmunológicas (Roedel et al., 2016), este podría ser el receptor candidato del efecto antinociceptivo del AF, pero hay que considerar que la MET no presenta antagonismo en este receptor, así que el AF estaría activando otros receptores de serotonina, por ejemplo, se ha visto que la activación de los receptores periféricos 5-HT_{1A}, 5-HT_{1D} y 5-HT_{1F} ocasionan un efecto antinociceptivo (Granados-Soto et al., 2010). En el caso del antagonista L-NAME, este no modifica la actividad antinociceptiva del AF. En cierto modo, esto también podría justificar la ausencia de efecto en el modelo de glutamato, debido a que los receptores de glutamato estimulan al NO y a la iNOS, y al no presentar efecto el AF en el modelo de glutamato, no se ve perdido el efecto antinociceptivo ante la presencia del antagonista L-NAME en el modelo de estiramiento abdominal. Se sugiere que el AF

no actúa en receptores glutamatérgicos ni en los segundos mensajeros mencionados. Esto es un resultado contrario al esperado, ya que se ha reportado que la disminución de las RNS se debe a la baja en la expresión de ciertas isoformas de la NOS; sin embargo, habría que considerar que alguna de las sintasas de óxido nítrico podrían no estar siendo afectadas por el *AF* (Koh, 2012).

Aunque la metiotepina tiene efecto antinociceptivo, se presenta un bloqueo de la actividad antinociceptiva ante la presencia de este antagonista al administrar *AF*. Si el *AF* es un agonista de uno o varios de los receptores opioides, asemejaría el mecanismo de acción de este grupo de fármacos. Los agonistas se unen extracelularmente al receptor opioide. Esto provoca disminución de la producción de AMPc, que las subunidades de sus proteínas G interactúen directamente con Ca^{2+} , canales TRPV₁ y otros canales iónicos en la membrana. Los agonistas opioides pueden atenuar la excitabilidad de las neuronas nociceptoras y la liberación de neuropéptidos pronociceptivos como la SP y el CGRP. Todos estos eventos pueden llevar a un efecto antinociceptivo y antiinflamatorio (Stein & Lang, 2009). Se debe de considerar que la aplicación sistémica y local de agonistas de los receptores μ , δ y κ ; así como la liberación endógena de péptidos opioides producen un efecto analgésico más pronunciado en tejidos lesionados de animales y humanos que en tejidos no lesionados (Stein & Lang, 2009). Además, dados los resultados de la prueba de glutamato, podría sugerirse que el *AF* actúa sobre los receptores δ y/o κ , pues el receptor μ tiene la capacidad de inhibir la neurotransmisión glutamatérgica, así como la transmisión nociceptiva de las fibras C y A δ (McDonald & Lambert, 2011); cuya acción no se presenta. Además, McDonald y otros autores (2011) ya han reportado que la naloxona no antagoniza al receptor ORL-1, por lo que el *AF* no lo antagoniza según los resultados obtenidos. Pese a esta última propuesta, esto se contrapone a la afinidad que presenta la naloxona, puesto que es más afín al receptor μ . Con esto en mente, se propone realizar en estudios posteriores del mismo modelo pero con antagonistas específicos de los receptores opioides [ciprodima o β -funaltrexamina para el receptor μ ; naltrindol o TIPP-ICI 174864 para el receptor δ y norbinaltorfimina o 5-guanidinonaltrindol para el receptor κ (Nava-Mesa, Téllez-Arévalo, Rojas-Kozhakin & Calderón-Ospina; 2015)].

Si el *AF* ejerce su efecto por medio de los receptores opioides, hay que tomar en cuenta que estos pueden presentarse como heterodímeros, lo cual modifica el efecto

que se obtenga (Pan et al., 2008). Se requeriría estudiar la presencia de estos heterodímeros en diferentes tejidos, cuáles de estos heterodímeros son más potentes o anulan la respuesta antinociceptiva y sus interacciones con otros neurotransmisores y receptores. También, en estudios posteriores sería importante comenzar a considerar las interacciones de las quimiocinas y las sustancias opioides. Se ha reportado que la interacción entre receptores de quimiocinas y opioides puede modificar la respuesta dependiendo de si se encuentran como heterodímeros u homodímeros (Parsadaniantz, Rivat, Rostène, & Réaux-Le Goazigo, 2015).

Con los resultados anteriores se sugiere realizar pruebas para conocer el efecto del *AF* en la transmisión colinérgica, pues se ha reportado que la coadministración de inhibidores de la acetilcolinesterasa potencializa la analgesia opioide y se ha reportado que algunos de los agonistas opioides comparten estructuras que se unen a la acetilcolinesterasa y modulan negativamente su actividad (Naser & Kuner, 2017); no obstante, las estructuras de los fármacos opioides o de la acetilcolinesterasa, difieren bastante de la estructura del *AF*. Por otro lado, puede que el *AF* aumente los niveles de acetilcolina, lo que podría explicar su efecto en el sistema opioide, ya que al parecer, los niveles altos de acetilcolina espinales incrementan la concentración de opioides endógenos (Naser & Kuner, 2017). En otras especies se ha sugerido que la transmisión colinérgica podría inhibir las neuronas GABAérgicas, lo que provocaría antinocicepción. Además, se ha mostrado que los receptores opioides pueden inhibir la actividad de las interneuronas (Favaroni Mendes & Menescal-de-Oliveira, 2008).

Posteriormente, se evaluó el *AF* en el modelo de la capsaicina; este modelo es una representación del dolor neurogénico, el cual es similar al producido por un golpe. Asimismo, se conoce que la capsaicina es un agonista de los receptores TRPV₁, receptores acoplados a un canal iónico de Na⁺ y Ca²⁺ que al abrirse ocasionan despolarizaciones en las neuronas aferentes y causan la propagación de impulsos nerviosos que se consideran señales del dolor. El *AF* produjo una reducción de la conducta nociceptiva del ratón, lo cual indica que posiblemente el *AF* se une al TRPV₁, antagonizando la acción de la capsaicina. Esto último se podría evaluar con un antagonista selectivo del receptor TRPV₁ como lo es la 5-iodoresiniferatoxina. Se debe de considerar que no solamente actúa este canal iónico en la transmisión del

dolor, sino que los receptores NK₁, NK₂ y NK₃ son parte del mecanismo nociceptivo en este modelo (lo que indica la participación de mediadores químicos, como es el caso de la SP y la NKA), por lo que pueden estar involucrados en la actividad antinociceptiva del AF. Además, existe una coactivación del receptor P2Y₂ y el canal TRPV₁ por el ATP, el cual puede liberarse como segundo mensajero (Santos & Calixto, 1997; Julius & Basbaum, 2011; Burnstock, 2016). Es por ello por lo que el receptor P2Y₂ también podría ser parte del mecanismo de acción del AF. Hay que recordar que el canal TRPV₁ tiene un período de activación, seguido de una desensibilización. La desensibilización es dependiente de Ca²⁺ y probablemente involucre la activación de la fosfatasa, la cual desactiva el canal de capsaicina (Winter, Bevan & Campbell, 1995).

En vista del efecto antagónico del AF en los receptores NMDA (Chen et al., 2015), el modelo de glutamato podría confirmar la participación de los receptores de este neurotransmisor en la vía antinociceptiva del compuesto en estudio a nivel periférico; sin embargo, en la prueba de inducción de la nocicepción por glutamato no se presentó efecto antinociceptivo en el intervalo de las dosis usadas del AF para este modelo. Con esta información, es posible que a nivel periférico el AF no presente antagonismo del receptor NMDA. La interacción de las neuronas a nivel periférico y central son diferentes, por lo que puede que la interacción entre las neuronas de primer y segundo orden y sus neurotransmisores presenten una interacción como, por ejemplo, que se antagonice el receptor NMDA pero no AMPA, lo que permitiría, en todo caso, la transmisión de la señal nociceptiva; otro ejemplo sería el antagonismo del receptor NMDA, lo que no produciría, en una segunda neurona GABAérgica, la inhibición de la transmisión del estímulo. En este contexto, la conexión de neuronas e interneuronas podría tener un papel importante, pues es posible que la activación de los receptores opioides produzca la inhibición de interneuronas inhibitorias, lo que no detendría la activación de NMDA, considerando que el AF actúa como un agonista (total o parcial) de los receptores μ , δ o κ . Además, es probable que no llegue la cantidad suficiente del AF a la médula para activar los receptores opioides como sucede a nivel visceral: no hay que olvidar que en la prueba de estiramiento abdominal se presenta una DE₅₀ elevada (hasta 100 veces mayor que la prueba de las prostaglandinas).

Se han llevado a cabo pruebas a nivel de la médula espinal, donde se ha demostrado que los receptores opioides μ inhiben la liberación de SP inducida por el receptor NMDA a través de la inactivación de canales de Ca^{2+} y la inhibición de la adenilato ciclasa (W. Chen, Ennes, McRoberts, & Marviz, 2018). Anteriormente se ha reportado que la activación de los receptores μ y δ inhibe la liberación de glutamato desde las terminales primarias aferentes hacia las neuronas del asta de la espina dorsal (Pan et al., 2008); sin embargo, no se ha reportado que la activación de los receptores opioides produzca efecto antinociceptivo potente en el sitio de administración periférico como las extremidades, pues los modelos de dolor donde se ha reportado que los agonistas opioides presentan una antinocicepción potente son de tipo: neuropático, visceral, térmico, óseo y oncológico (Stein & Lang, 2009). En este contexto, parece incierto aún saber si los agonistas opioides pueden intervenir en las extremidades o no.

Por otro lado, hay que considerar que uno de los mecanismos importantes para detener la activación de NMDA, es el bloqueo de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje, ya que la liberación sináptica de glutamato depende principalmente de los canales dependientes de Ca^{2+} : Cav2.1 y Cav2.2 (Pan et al., 2008). Hasta este momento, nadie ha reportado que el AF los bloquee de manera directa. Es probable que el AF module la actividad del receptor NMDA por medio de segundos mensajeros y no necesariamente antagonice a este receptor como Yu y colaboradores (2006) han sugerido.

Pese a las hipótesis anteriores, no se puede conocer si el AF no presenta efecto en este modelo porque no es un antagonista del receptor NMDA o porque no es un agonista de los receptores opioides; incluso, con los datos hasta ahora, no se puede saber si es un modulador alostérico o un agonista parcial de los receptores opioides o se requieren de ciertas condiciones para que presente un antagonismo en el receptor NMDA. Ya se ha reportado que el AF es un antagonista de los receptores NMDA (Yu et al., 2006); no obstante, este estudio se realizó en cerebros fetales de ratón y es posible que el ferulato de sodio en realidad involucre otras vías diferentes por las que ejerce la protección ante la neurotoxicidad de glutamato. A nivel visceral, el glutamato no tiene gran participación y es posible que solamente participe como un sustrato para la producción de otros compuestos (Wang, Wang, Xia, & Wood, 2014). Es posible que sea esta una de las razones por las que la naloxona revierte el

efecto del *AF* en el modelo de estiramiento abdominal: glutamato no ejerce efectos importantes en este punto.

Después, se procedió a evaluar la participación del *AF* en otros modelos que simulan el dolor agudo con el fin de conocer mejor su mecanismo de acción por el que realiza su efecto. Dado que la 5-HT y las prostaglandinas son muy importantes en los mecanismos inflamatorio y nociceptivo, se procedió a evaluar al *AF* en los modelos correspondientes. En el modelo en el que se administró prostaglandina E_2 se obtuvo la DE_{50} más baja ($0,44 \pm 0,17$ mg/kg) de todos los modelos probados, además de tener un porcentaje de efecto mayor al 70%, el cual es el segundo más alto comparado con los demás modelos evaluados. Con esto en mente, se sugiere que la mayor potencia se tiene sobre los receptores de prostanoïdes. La lamida de la pata inducida por PGE_2 es muy probablemente llevada a cabo por la activación de los receptores EP_3 y EP_4 con la participación de las vías de las PKA y ERK (Kassuya et al., 2007); esto permite sugerir que el *AF* actúa como un antagonista de los receptores EP_3 y EP_4 . Además, este hecho podría sugerir un efecto directo o indirecto sobre el canal $TRPV_1$, ya que el compuesto en estudio podría bloquear el canal, y además, evitar la sensibilización del canal ante la presencia de prostaglandinas; de tal manera que estos receptores son un blanco principal en el efecto antinociceptivo del *AF*, además de justificar que la DE_{50} es mayor en el modelo de la capsaicina. Asimismo, el *AF* ha mostrado un efecto antiinflamatorio y antioxidante en varios estudios (Das et al., 2014; Mansuco & Santangelo, 2014; Zhu et al., 2014); en este contexto, es muy probable que mecanismos reportados en modelos para evaluar las dos actividades anteriores sean llevados a cabo en este modelo de PGE_2 [prevención del incremento de COX-2, TNF- α e IL-6 (Das et al., 2014)], pues aunque la potencia del *AF* se puede justificar por una afinidad a los receptores EP_3 y EP_4 ; no se puede descartar la participación de otros mecanismos.

Se ha sugerido que los AINEs ejercen su actividad antinociceptiva por medio de un sistema opioide endógeno que posiblemente involucre los sistemas descendentes moduladores del dolor (Tsiklauri, Nozadze, Gurtskaia, & Tsagareli, 2017). Este último reporte, cambia el mecanismo establecido para los AINEs y moléculas que presentan actividades similares a ellos, como es el caso del *AF*. De acuerdo con los resultados de la prueba de prostaglandinas y los resultados obtenidos en la prueba de estiramiento abdominal con naloxona, se sugiere que el *AF* podría utilizar tanto

los receptores EP₃, EP₄ y la neurotransmisión opioidérgica para ejercer su efecto antinociceptivo. Faltaría confirmar si el *AF* inhibe la actividad de la COX-1 y/o COX-2, lo cual también ayudaría a predecir si podría presentar reacciones adversas como los AINEs y si este fitofármaco presenta un comportamiento más similar a los AINEs o los fármacos opioides.

En el caso del modelo de 5-HT se obtuvo una DE₅₀ de 5,16 ± 1,89 mg/kg, la cual también es una dosis bastante baja en comparación con las pruebas de capsaicina y estiramiento abdominal. Además, el porcentaje de actividad antinociceptiva más alto de todas las pruebas se obtuvo en esta prueba, lo cual confirma los resultados obtenidos en la evaluación del mecanismo de acción en el modelo de estiramiento abdominal, pues se presenta un antagonismo por parte de la MET. Este resultado concuerda con estudios previos, pues ya se ha reportado que el *AF* actúa en el SN por medio de la neurotransmisión serotoninérgica (Tu et al., 2012). Como un ejemplo de lo anterior, el *AF* presenta efecto de tipo antidepresivo (mas no sedante) a través del sistema serotoninérgico en el hipocampo (aumento de 5-HT y activación de los receptores 5-HT_{1A} y 5-HT_{2A}) (Zeni et al., 2012). De acuerdo con la literatura, no se puede sugerir un único receptor por el cual actúe el *AF* en este modelo; no obstante, ya se ha sugerido la participación de varios mecanismos que producen dolor en esta prueba. Como la producción de nocicepción involucra la participación de los receptores 5-HT₃ (responsable de la excitación neuronal), es muy probable que sea este el blanco molecular que usa el *AF* para su actividad antinociceptiva en este modelo (Tambeli et al., 2006; Roeckel et al., 2016); sin embargo, los receptores que antagoniza la MET deben de estar involucrados en su mecanismo de acción también. Estos resultados no permiten descartar su acción como un inhibidor de la recaptura de 5-HT. Estas hipótesis deben considerarse en las investigaciones posteriores. Por último, el lugar donde se encuentren los receptores puede influenciar el efecto que presentará, es por ello que también es válido sugerir que los receptores serotoninérgicos que participan a nivel visceral, no van a presentar los mismos efectos que presentan los receptores que se encuentran en la piel (somático).

Con relación al tema de la toxicología, se ha reportado ya una DL₅₀ del *AF* en ratones, la cual es mayor a los 3.2 g/kg (Mancuso & Santangelo, 2014). Esto sirve como una referencia para considerar al *AF* como un producto que solamente será

tóxico en cantidades muy elevadas; no obstante, falta realizar más pruebas en otras especies y en el ser humano. Además, ciertos reportes muestran que el *AF* no presenta un efecto sedante característico de algunos adyuvantes para el dolor (Chen et al., 2005; Xu et al., 2013; Zeni et al., 2008), puede asumirse que los efectos demostrados en este estudio son exclusivamente antinociceptivos sin presencia de efectos como el sedante. Es importante mencionar que, debido al metabolismo rápido de este compuesto, su $t_{1/2}$ y su t_{max} cortos, este compuesto muestra baja toxicidad; sin embargo, esto también es un problema, es por ello que, de llegar a estudios clínicos, se debería de considerar una formulación farmacéutica que le permita a este fármaco estar más tiempo en el organismo (liberación prolongada).

En general, los compuestos similares al *AF* como el ácido cafeico y la curcumina presentan varios efectos a parte del efecto antioxidante. El efecto antinociceptivo ya ha sido reportado en compuestos similares al *AF* y al ácido cafeico. Hay reportes sobre el último que sugieren su actividad analgésica similar a la nimesulida y sugieren su uso para el tratamiento de episodios de dolor crónico. Este mismo presenta efecto antiinflamatorio e inmunomodulador, y es muy similar al *AF* con la excepción de que en lugar de tener un grupo metoxi, el ácido cafeico presenta un grupo hidroxilo en la misma posición. En resumen, los datos muestran que el ácido cafeico posee un efecto analgésico en ratones y ratas por la reducción de neutrófilos, radicales libres y la hipernocicepción mediada por óxido nítrico (Mehrotra, Shanbhag, Chamallamudi, Singh, & Mudgal, 2011). Por otro lado, la estructura curcuminoide podría calificar como una nueva estructura para el desarrollo de nuevos moduladores del canal TRP (Nalli, Ortar, Moriello, Di Marzo, & Luciano, 2017). Se sugiere que los compuestos similares al ácido cinámico presentan actividad biológica que cambia de compuesto a compuesto por variaciones en su estructura, pero se mantienen las características de ser compuestos potenciales para su uso como fármacos.

Es posible que, en un futuro, el *AF* se incorpore a la terapia analgésica como fármaco o un adyuvante en enfermedades que impliquen dolor dentro de su sintomatología o que el dolor mismo sea la patología.

10. Conclusión

La administración oral del *ácido ferúlico* en ratón presenta un efecto antinociceptivo dependiente de la dosis en modelos de dolor agudo, como la prueba de estiramiento abdominal, la prueba de la capsaicina, la prueba de la prostaglandina E₂ y la prueba de la serotonina; el efecto antinociceptivo del *AF* en el modelo de glutamato no se presenta. Asimismo, en la prueba de estiramiento abdominal se observó que el efecto antinociceptivo se debe a una posible participación de las vías opiodérgica y serotoninérgica. Estos datos sugieren que el *AF* podría ser utilizado en la terapia del dolor.

11. Perspectivas

Realizar un estudio que evalúe la farmacocinética y la farmacodinamia del AF, ya que podría conocer la relación que existe entre el efecto que presenta el compuesto y la concentración plasmática del mismo.

Evaluar *in vitro* si el AF tiene acción inhibitoria sobre las enzimas COX-1 y la COX-2.

Se propone la realización de combinaciones con analgésicos clásicos, con el fin de disminuir las reacciones adversas que presentan y aumentar la eficacia terapéutica.

12. Referencias

- Álvarez Castro, E., & Orallo Cambeiro, F. (2003). Actividad biológica de los flavonoides (I). Acción frente al cáncer. *Offarm*, 22(10), 130-140.
- Basting, R. T., Nishijima, C. M., Lopes, J. A., Santos, R. C., Lucena Perico, L., Laufer, S., . . . Hiruma-Lima, C. A. (2014). Antinociceptive, anti-inflammatory and gastroprotective effects of a hydroalcoholic extract from the leaves of *Eugenia punicifolia* (Kunth) DC. in rodents. *J Ethnopharmacol*, 157, 257-267.
- Beirith, A., Santos, A. R. S., & Calixto, J. B. (2002). Mechanisms underlying the nociception and paw oedema caused by injection of glutamate into the mouse paw. *Brain Research*, 924(2), 219-228.
- Burnstock, G. (2016). Purinergic Mechanisms and Pain. *Adv Pharmacol*, 75, 91-137.
- Cervero, F., & Laird, J. M. A. (1999). Visceral pain. *The Lancet*, 353(9170), 2145-2148.
- Chen, J., Lin, D., Zhang, C., Li, G., Zhang, N., Ruan, L., Yan, Q., Li, J., Yu, X., Xie, X., Pang, C., Cao, L., Pan, J. & Xu, Y. (2015). Antidepressant-like effects of ferulic acid: involvement of serotonergic and norepinephrine systems. *Metab Brain Dis*, 30(1), 129-136.
- Chen, W., Ennes, H. S., McRoberts, J. A., & Marviz, J. C. (2018). Mechanisms of μ -opioid receptor inhibition of NMDA receptor induced substance P release in the rat spinal cord. *Neuropharmacology*, 128(1), 255-268.
- Collier, H. O. J., Dinneen, L. C., Johnson, C. A., & Schneider, C. (1968). The abdominal constriction response a suppression by analgesic drugs in the mouse. *British Journal Pharm*, 32, 295–310.
- Colloca, L., Ludman, T., Bouhassira, D., Baron, R., Dickenson, A. H., Yarnitsky, D., Freeman, R., Truini, A., Attai, N., Finnerup, N. B., Eccleston, C., Kalso, E., Bennett, D. L., Dworkin, R. H. & Raja, S. N. (2017). Neuropathic pain. *Nat Rev Dis Primers*, 3, 17002.
- Cooper, R., & Nicola, G. (2015). Natural Products Chemistry. Sources, separations, and structures. *Taylor & Francis Group*, 9-17, 41-47 y 65-76.
- Costigan, M., Scholz, J., & Woolf, C. J. (2009). Neuropathic Pain: A Maladaptive Response of the Nervous System to Damage. *Annu Rev Neurosci*, 32, 1–32.

- Das, U., Manna, K., Sinha, M., Datta, S., Das, D. K., Chakraborty, A., Ghosh, M., Das Saha, K. & Dey, S. (2014). Role of ferulic acid in the amelioration of ionizing radiation induced inflammation: a murine model. *PLoS One*, 9(5), e97599.
- Dinakar, P., & Stillman, A. M. (2016). Pathogenesis of Pain. *Semin Pediatr Neurol*, 23(3), 201-208.
- Farmer, A. D., & Aziz, Q. (2014). Mechanisms of visceral pain in health and functional gastrointestinal disorders. *Scandinavian Journal of Pain*, 5(2), 51-60.
- Favaroni Mendes, L. A., & Menescal-de-Oliveira, L. (2008). Role of cholinergic, opioidergic and GABAergic neurotransmission of the dorsal hippocampus in the modulation of nociception in guinea pigs. *Life Science*, 83(644-650).
- Foreman, R. D. (2004). Mechanisms of visceral pain: from nociception to targets. *Drug Discovery Today: Disease Mechanisms*, 1(4), 457-463.
- García Meijide, J. A., & Gómez-Reino Carnota, J. J. (2000). Fisiopatología de la ciclooxigenasa-1 y ciclooxigenasa-2. *Revista Española de Reumatología*, 27(1), 33-35.
- Granados Soto, V., Argüelles, C. F., Rocha-González, H. I., Godínez-Chaparro, B., Flores-Murrieta, F. J., & C.M., V. (2010). The role of peripheral 5-HT1A, 5-HT1B, 5-HT1D, 5-HT1E and 5-HT1F serotonergic receptors in the reduction of nociception in rats. *Neuroscience*, 165(2), 561-568.
- Guevara López, U., & Covarrubias Gómez, A. (2008). Cronología de eventos hacia una reforma legislativa en materia de dolor y cuidados paliativos. *Revista Mexicana de Anestesiología*, 31(4), 328-333.
- Hoyer, D., Clarke, D. E., Fozard, J. R., Hartig, P. R., Martin, G. R., Mylecharane, E. J., Saxena P. R. and Humphrey, P. P. (1994). International Union of Pharmacology classification of receptors for 5-hydroxytryptamine (Serotonin). *Pharmacological Reviews*, 46(2), 157.
- Ikeda, Y., Ueno, A., Naraba, H., & Oh-ishi, S. (2001). Involvement of vanilloid receptor VR1 and prostanoids in the acid-induced writhing responses of mice *Life Sci*, 69, 2911-2919.
- Itagaki, S., Kurokawa, T., Nakata, C., Saito, Y., Oikawa, S., Kobayashi, M., Hirano, T. & Iseki, K. (2009). In vitro and in vivo antioxidant properties of ferulic acid: A

- comparative study with other natural oxidation inhibitors. *Food Chem*, 114(2), 466-471.
- Jesse, C. R., Savegnago, L., & Nogueira, C. W. (2007). Role of nitric oxide/cyclic GMP/K(+) channel pathways in the antinociceptive effect caused by 2,3-bis(mesitylseleno)propenol. *Life Sci*, 81(25-26), 1694-1702.
- Julius, D., & Basbaum, A. I. (2011). Molecular mechanisms of nociception. *Nature*, 413(6852), 203-210.
- Kassuya, C. A., Ferreira, J., Claudino, R. F., & Calixto, J. B. (2007). Intraplantar PGE2 causes nociceptive behaviour and mechanical allodynia: the role of prostanoid E receptors and protein kinases. *Br J Pharmacol*, 150(6), 727-737.
- Koh, P. O. (2012). Ferulic acid modulates nitric oxide synthase expression in focal cerebral ischemia. *Lab Anim Res*, 28(4), 273-278.
- Kopf, A., & Patel, N. B. (2010). Guía para el manejo del dolor en condiciones de bajos recursos. *Asociación Internacional para el Estudio del Dolor*, 3-64 y 107-138.
- Kroon, P. A., Faulds, C. B., Ryden, P., Robertson, J. A., & Williamson, G. (1997). Release of covalently bound ferulic acid from fiber in the human colon. *J. Agric. Food Chem.*, 45, 661-667.
- Kuner, R., & Flor, H. (2016). Structural plasticity and reorganisation in chronic pain. *Nat Rev Neurosci*, 18(1), 20-30.
- Lakshmi, S., & Joshi, P. G. (2005). Co-activation of P2Y2 Receptor and TRPV Channel by ATP Implications for ATP Induced Pain. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 25(5), 819-832.
- Lalith Kumar, V., & Muralidhara. (2014). Ameliorative effects of ferulic Acid against lead acetate-induced oxidative stress, mitochondrial dysfunctions and toxicity in prepubertal rat brain. *Neurochem Res*, 39(12), 2501-2515.
- Le Bars, D., Gozariu, M., & Cadden, S. W. (2001). Animal models of nociception. *Pharmacological Reviews*, 53(4), 597-652.
- Mancuso, C., & Santangelo, R. (2014). Ferulic acid: pharmacological and toxicological aspects. *Food Chem Toxicol*, 65, 185-195.
- McDonald, J., & Lambert, D. G. (2011). Opioid mechanisms and opioid drugs. *Anaesthesia & Intensive Care Medicine*, 12(1), 31-35.

- Meeks, N. M., Glass, J. S., & Carroll, B. T. (2015). Acute pain management in dermatology: mechanisms and pathways. *J Am Acad Dermatol*, 73(4), 533-540; quiz 541-532.
- Mehrotra, A., Shanbhag, R., Chamallamudi, M. R., Singh, V. P., & Mudgal, J. (2011). Ameliorative effect of caffeic acid against inflammatory pain in rodents. *European Journal of Pharmacology*, 666(1-3), 80-86.
- Moniruzzaman, M., Ferdous, A., & Irin, S. (2015). Evaluation of antinociceptive effect of ethanol extract of *Hedyotis corymbosa* Linn. whole plant in mice. *J Ethnopharmacol*, 161, 82-85.
- Montiel-Ruiz, R. M., Gonzalez-Trujano, M. E., & Deciga-Campos, M. (2013). Synergistic interactions between the antinociceptive effect of *Rhodiola rosea* extract and B vitamins in the mouse formalin test. *Phytomedicine*, 20(14), 1280-1287.
- Mullard, A. (2016). 2015 FDA drug approvals. *Nat Rev Drug Discov*, 15(2), 73-76.
- Nalli, M., Ortar, G., Moriello, A. S., Di Marzo, V., & Luciano, D. P. (2017). Effects of curcumin and curcumin analogues on TRP channels. *Fitoterapia*, 122, 126-131.
- Naser, P. V., & Kuner, R. (2017). Molecular, cellular and circuit basis of cholinergic modulation of pain. *Neuroscience*.
- Nava-Mesa, M., Téllez-Arévalo, A., Rojas-Kozhakin, D., & Calderon-Ospina, C.-A. (2015). Usos terapéuticos potenciales de los antagonistas opioides: Fisiopatología y evidencia preclínica. *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, Vol. 44(3), 322-358.
- Newman, D. J., & Cragg, G. M. (2016). Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. *J Nat Prod*, 79(3), 629-661.
- NOM-062-ZOO-1999. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. (22 de agosto de 2001). *Diario Oficial de la Federación*.
- OMS. (2012). Directrices de la OMS sobre el tratamiento farmacológico del dolor persistente en niños con enfermedades médicas. *Organización Mundial de la Salud*, 16-22, 37-53.
- Ortega, A., Roca, A., & Micó, J. A. (2002). Modelos animales de dolor. Una revisión crítica. *Rev Soc Esp Dolor*, 9, 447-453.

- Pan, H.-L., Wu, Z.-Z., Zhou, H.-Y., Chen, S.-R., Zhang, H.-M., & Li, D.-P. (2008). Modulation of pain transmission by G-protein-coupled receptors. *Pharmacology and Therapeutics*, 117(1), 141-161.
- Parsadaniantz, S. M., Rivat, C., Rostène, W., & Réaux-Le Goazigo, A. (2015). Opioid and chemokine receptor crosstalk: a promising target for pain therapy? *Neuroscience*, 16, 69-78.
- Perez-Ternero, C., Werner, C. M., Nickel, A. G., Herrera, M. D., Motilva, M. J., Böhm, M., Álvarez de Sotomayor, M & Laufs, U. (2017). Ferulic acid, a bioactive component of rice bran, improves oxidative stress and mitochondrial biogenesis and dynamics in mice and in human mononuclear cells. *J Nutr Biochem*, 48, 51-61.
- Puebla Díaz, F. (2005). Tipos de dolor y escala terapéutica de la O.M.S. Dolor iatrogénico. *Oncología (Barc)*, 28(3), 139-143.
- Rang, H. P. y otros. Analgesic drugs. Rang and Dale's pharmacology. *El servier*. China: 2008. P. 588-609.
- Reyes Chiquete, D., González Ortiz, J. C., Mohar Betancourt, A., & Meneses García, A. (2011). Epidemiología del dolor por cáncer. *Rev. Soc. Esp. Dolor*, 18, 118-134.
- Roeckel, L. A., Le Coz, G. M., Gaveriaux-Ruff, C., & Simonin, F. (2016). Opioid-induced hyperalgesia: Cellular and molecular mechanisms. *Neuroscience*, 338, 160-182.
- Rondoni, L., Peyrat Maillard, M. N., Marsset Baglieri, A., Fromentin, G., Durand, P., Tome, D., Prost, M. & Berset, C. (2004). Bound ferulic acid from bran is more bioavailable than the free compound in rat. *J. Agric. Food Chem.*, 52, 4338-4343.
- Rosenbaum, T., & Simon, S. A. (2007). TRP Ion Channel Function in Sensory Transduction and Cellular Signaling Cascades. Chapter 5. TRPV1 Receptors and Signal Transduction. *Taylor & Francis Group*.
- Roy, S., Metya, S. K., Sannigrahi, S., Rahaman, N., & Ahmed, F. (2013). Treatment with ferulic acid to rats with streptozotocin-induced diabetes: effects on oxidative stress, pro-inflammatory cytokines, and apoptosis in the pancreatic beta cell. *Endocrine*, 44(2), 369-379.

- Santos, A. R. S., & Calixto, J. B. (1997). Further evidence for the involvement of tachykinin receptor subtypes in formalin and capsaicin models of pain in mice. *Neuropeptides*, 31(4), 381–389.
- Scholz, J., & Woolf, C. J. (2002). Can we conquer pain? *Nat Neurosci*, 5 Suppl, 1062-1067.
- Srinivasan, M., Sudheer, A. R., & Menon, V. P. (2007). Ferulic Acid: Therapeutic Potential Through Its Antioxidant Property. *J. Clin. Biochem. Nutr.*, 40(2), 92-100.
- Stein, C., & Lang, L. J. (2009). Peripheral mechanisms of opioid analgesia. *Current Opinion in Pharmacology*, 9(1), 3-8.
- Tambeli, C. H., Oliveira, M. C., Clemente, J. T., Pelegri-da-Silva, A., & Parada, C. A. (2006). A novel mechanism involved in 5-hydroxytryptamine-induced nociception: the indirect activation of primary afferents. *Neuroscience*, 141(3), 1517-1524.
- Tsiklauri, N., Nozadze, I., Gurtskaia, G., & Tsagareli, M. G. (2017). Antinociceptive tolerance to NSAIDs in the rat formalin test is mediated by the opioid mechanism. *Pharmacological Reports*, 69(1), 168-175.
- Tu, Y., Cheng, S. X., Sun, H. T., Ma, T. Z., & Zhang, S. (2012). Ferulic acid potentiates pentobarbital-induced sleep via the serotonergic system. *Neurosci Lett*, 525(2), 95-99.
- van Hecke, O., Torrance, N., & Smith, B. H. (2013). Chronic pain epidemiology - where do lifestyle factors fit in? *Br J Pain*, 7(4), 209-217.
- Vashistha, B., Sharma, A., & Jain, V. (2017). Ameliorative potential of ferulic acid in vincristine-induced painful neuropathy in rats: An evidence of behavioral and biochemical examination. *Nutr Neurosci*, 20(1), 60-70.
- Wang, G.-D., Wang, X.-Y., Xia, Y., & Wood, J. D. (2014). Dietary Glutamate: Interactions With the Enteric Nervous System. *Journal of Neurogastroenterology and Motility*, 20(1), 41-53.
- Winter, J., Bevan, S., & Campbell, E. A. (1995). Capsaicin and pain mechanisms. *British Journal of Anaesthesia*, 75(1), 157-168.
- Xu, Y., Lin, D., Yu, X., Xie, X., Wang, L., Lian, L., Fei, N., Chen, J., Zhu, N., Wang, G., Huang, X., & Pan, J. (2016). The antinociceptive effects of ferulic acid on neuropathic pain: involvement of descending monoaminergic system and opioid receptors. *Oncotarget*, 7(15), 20455-20468.

- Xu, Y., Zhang, L., Shao, T., Ruan, L., Wang, L., Sun, J., Li, J., Zhu, X., O'Donnel, J. M. & Pan, J. (2013). Ferulic acid increases pain threshold and ameliorates depression-like behaviors in reserpine-treated mice: behavioral and neurobiological analyses. *Metab Brain Dis*, 28(4), 571-583.
- Yekkirala, A. S., Roberson, D. P., Bean, B. P., & Woolf, C. J. (2017). Breaking barriers to novel analgesic drug development. *Nat Rev Drug Discov*, 16(8), 545-564.
- Yu, L., Zhang, Y., Ma, R., Bao, L., Fang, J., & Yu, T. (2006). Potent protection of ferulic acid against excitotoxic effects of maternal intragastric administration of monosodium glutamate at a late stage of pregnancy on developing mouse fetal brain. *European Neuropsychopharmacology*, 16(3), 170-177.
- Zeni, A. L., Zomkowski, A. D., Maraschin, M., Rodrigues, A. L., & Tasca, C. I. (2012). Involvement of PKA, CaMKII, PKC, MAPK/ERK and PI3K in the acute antidepressant-like effect of ferulic acid in the tail suspension test. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 103(2), 181-186.
- Zhao, Z., & Moghadasian, M. H. (2008). Chemistry, natural sources, dietary intake and pharmacokinetic properties of ferulic acid: A review. *Food Chem*, 109(4), 691-702.
- Zhu, H., Liang, Q. H., Xiong, X. G., Chen, J., Wu, D., Wang, Y., Yang, B, Zhang, Y., Zhang, Y. & Huang, X. (2014). Anti-Inflammatory Effects of the Bioactive Compound Ferulic Acid Contained in *Oldenlandia diffusa* on Collagen-Induced Arthritis in Rats. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2014, 573801.
- Zimmermann, M. (1983). Ethical Guidelines for Investigations of Experimental Pain in Conscious Animals. *Pain*, 16, 109-110.