



Universidad Autónoma de San Luis Potosí

Facultad de Ciencias Químicas

**PROGRAMA DE POSGRADO
EN CIENCIAS FARMACOBIOLOGICAS**

**EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTINOCICEPTIVO DE DISTINTAS
COMBINACIONES DE DELTA-TETRAHIDROCANNABINOL Y
CANNABIDIOL EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE DOLOR
CRÓNICO**

TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS FARMACOBIOLOGICAS

PRESENTA:

NAMBO ARCOS MÓNICA ESTHER

DIRECTOR DE TESIS

DR. JOSÉ TRINIDAD PÉREZ URIZAR

CO-DIRECTOR

DR. JUAN RAMÓN ZAPATA MORALES

PROYECTO REALIZADO:

Laboratorio de Farmacología de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Laboratorio de Farmacología de la Unidad Académica Multidisciplinaria Reynosa-Aztlán de la Universidad Autónoma de Tamaulipas y Laboratorio de Investigación FS Scientia Pharma, S. A. de C. V.

CON FINANCIAMIENTO DE:

Beca-Tesis Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCyT), Número de registro de la beca otorgada por CONAHCyT: 804471.

Número CVU: 1144264

“El programa de Maestría en Ciencias Farmacobiológicas de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí pertenece al Sistema Nacional de Posgrados (SNP) del Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCyT), con registro 003382, categorizado en el Nivel 1”.



Universidad Autónoma de San Luis Potosí

Facultad de Ciencias Químicas

PROGRAMA DE POSGRADO

EN CIENCIAS FARMACOBIOLOGICAS

**EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTINOCICEPTIVO DE DISTINTAS
COMBINACIONES DE DELTA-TETRAHIDROCANNABINOL Y
CANNABIDIOL EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE DOLOR
CRÓNICO**

TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS FARMACOBIOLOGICAS

PRESENTA:

Q.F.B. NAMBO ARCOS MÓNICA ESTHER

SINODALES:

PRESIDENTA: DRA. PATRICIA AGUIRRE BAÑUELOS

SECRETARIO: DR. JUAN MIGUEL JIMÉNEZ ANDRADE

VOCAL: DR. JUAN RAMÓN ZAPATA MORALES

VOCAL: DR. JOSÉ TRINIDAD PÉREZ URIZAR

POSGRADO EN CIENCIAS FARMACOBIOLOGICAS

Tel: 826-23-00 ext. 6541 y 6540

San Luis Potosí, S.L.P.
Noviembre 22, 2023

**Comité Académico del Posgrado
En Ciencias Farmacobiológicas
Facultad de Ciencias Químicas / UASLP
Presente.**

Por medio de la presente comunicamos que la tesis llevada a cabo por la alumna de Maestría Q.F.B. Mónica Esther Nambo Arcos, titulada “Evaluación del efecto antinociceptivo de distintas combinaciones de delta-tetrahidrocannabinol y cannabidiol en un modelo experimental de dolor crónico”, ha sido concluida y aprobada por el comité tutorial para iniciar los trámites correspondientes para su titulación, la cual tendrá lugar el próximo día 11 de enero del 2024 a las 11:00 h., en el Auditorio Chico (G203), de la Facultad.

ATENTAMENTE

Dr. José Trinidad Pérez Urizar
Director de Tesis

Dr. Juan Ramón Zapata Morales
Co-Director

Dr. Juan Miguel Jiménez Andrade
Asesor

Dra. Patricia Aguirre Bañuelos
Asesora



“Evaluación del efecto antinociceptivo de distintas combinaciones de delta-tetrahydrocannabinol y cannabidiol en un modelo experimental de dolor crónico” por Nambo Arcos Mónica Esther se distribuye bajo una licencia [Creative Commons Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

<https://creativecommons.org/share-your-work/>

EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTINOCICEPTIVO DE DISTINTAS COMBINACIONES DE DELTA- TETRAHIDROCANNABINOL Y CANNABIDIOL EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE DOLOR CRÓNICO

Por Mónica Esther Nambo Arcos

CANTIDAD DE PALABRAS 24500

HORA DE ENTREGA 22-NOV-2023 10:06A. M.

NÚMERO DE
IDENTIFICACIÓN DEL
TRABAJO 104469942

EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTINOCICEPTIVO DE DISTINTAS
COMBINACIONES DE DELTA-TETRAHIDROCANNABINOL Y
CANNABIDIOL EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE DOLOR
CRÓNICO

INFORME DE ORIGINALIDAD

12%

ÍNDICE DE SIMILITUD

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. José Pérez Urizar por haberme recibido en su equipo de investigación y brindarme el espacio requerido para la realización de esta tesis.

Al Dr. Ramón Zapata Morales, quien desde la licenciatura me ha acompañado y asesorado en mi incursión por el camino de la investigación científica.

Al Dr. Juan Miguel Jiménez Andrade, por abrirme las puertas de su laboratorio para los análisis *in vivo* y por contribuir en tan amplio grado en los análisis del modelo biológico empleado junto con todos los colaboradores en su equipo de trabajo, particularmente Ari, Norma, Magali y Angélica.

Al equipo de investigación de Scientia Pharma, David, Lau y Liz, sin cuyo valioso apoyo teórico y práctico no hubiera sido posible la realización de la validación e implementación del método analítico para la cuantificación de cannabinoides.

A la Dra. Patricia Aguirre y a la Dra. Gabriela Montero, pues siempre estuvieron dispuestas a apoyarme durante mi estancia en el laboratorio de Farmacología de la UASLP, compartieron conmigo no solamente sus conocimientos y habilidades, sino que me mostraron la gentileza y calidez humana que permite trabajar en un entorno más productivo.

A mis compañeros de maestría, con quienes experimenté gratos momentos dentro y fuera del aula y cuyos futuros espero que se encuentren llenos de éxitos a donde quiera que vayan.

A mis amigas Liz, Emma, Karla y Melisa, quienes siempre iluminaron mis días en un entorno tan nuevo y desafiante para mí.

A mis amigos insanos a quienes veo un par de veces al año, pero que nunca abandonan mi corazón ni mis pensamientos.

A mi novio, Omar, quien sostuvo mi mano en mis mejores momentos, limpió mis lágrimas y disipó mis inseguridades en cuantiosas ocasiones.

Y finalmente, a mi familia: mi papá, mi mamá y mi hermano, quienes nunca dudaron de mí y de mis capacidades. Su bondad, firmeza, honestidad y calidez siempre han sido un refugio y un faro que me muestra el camino, aún a la distancia. Así como hemos compartido las dificultades, compartamos el fruto de nuestros esfuerzos, esta tesis también es suya.

RESUMEN

Delta-9-tetrahydrocannabinol (THC) y cannabidiol (CBD) pueden ser útiles en el tratamiento de enfermedades inflamatorias como la artritis reumatoide, particularmente al emplearse en combinaciones. El propósito de este estudio fue evaluar el efecto antinociceptivo y antiinflamatorio de CBD y combinaciones THC:CBD 1:1 y 1:3 sobre conductas dolorosas en un modelo murino de artritis inducida por antígeno, así como su perfil toxicológico y la cuantificación de niveles sanguíneos de THC y CBD por UPLC-MS/MS. En suma, se encontró que la combinación THC:CBD 1:1 es particularmente útil para disminuir el dolor espontáneo, con un perfil toxicológico no relevante, particularmente cuando se alcanzan concentraciones sanguíneas menores a 200 ng/mL de CBD y menores a 100 ng/mL de THC.

Palabras clave: tetrahydrocannabinol, cannabidiol, efecto séquito, interacciones farmacocinéticas y farmacodinámicas.

ABSTRACT

Delta-9-tetrahydrocannabinol (THC) and cannabidiol (CBD) may be useful for the treatment of inflammatory diseases, such as rheumatoid arthritis, particularly by using them in combination. This study aimed to evaluate the anti-inflammatory and antinociceptive effect of CBD or a THC:CBD combination (1:1 and 1:3 dose ratio) over painful behaviors in a murine model of Antigen Induced Arthritis, as well as their toxicological profile and the THC and CBD quantification by UPLC-MS/MS. In summary, we found that the 1:1 THC:CBD combination is particularly useful to reduce spontaneous pain, without a relevant toxicological profile, particularly when reaching concentrations below 200 ng/mL for CBD and 100 ng/mL for THC.

Keywords: tetrahydrocannabinol, cannabidiol, AIA, entourage effect, pharmacokinetic and pharmacodynamic interactions.

Índice general

1. Introducción	1
2. Antecedentes	2
2.1 Cannabis y cannabinoides	2
2.1.1 Composición de la planta de Cannabis.....	2
2.1.2 Sistema endocannabinoide.....	2
2.1.3 Potencial terapéutico y farmacodinamia de los fitocannabinoides	8
2.1.4 Aspectos farmacocinéticos de los cannabinoides.....	12
2.1.5 Tetrahidrocannabinol, cannabidiol y sus combinaciones.....	14
2.2 Artritis reumatoide.....	18
2.2.1 Fisiopatología de la artritis reumatoide	18
2.2.2 Dolor y artritis reumatoide	19
2.2.3 Tratamientos actuales de la artritis reumatoide.....	21
2.2.4 Uso de Cannabis para el tratamiento de la artritis reumatoide	23
2.2.5 Uso creciente y legislación de cannabis y sus derivados	25
3. Justificación.....	27
4. Hipótesis	28
5. Objetivos	28
5.1 Objetivo general.....	28
5.2 Objetivos específicos	28
6. Materiales y métodos.....	29
<i>Tipo de estudio</i>	29
6.1 Evaluación <i>in vivo</i> del efecto antinociceptivo, antiinflamatorio y perfil toxicológico de distintas combinaciones de Delta-Tetrahydrocannabinol y cannabidiol	29
6.1.1 Animales de estudio.....	29
6.1.2 Fármacos y compuestos	30
6.1.3 Modelo de inducción de dolor crónico: Artritis Inducida por Antígeno	30
6.2 Cuantificación de punto final de los niveles sanguíneos de THC y CBD en el modelo <i>in vivo</i>	36
6.2.1 Fármacos y reactivos.....	36
6.2.2 Condiciones analíticas.....	37
6.2.3 Preparación de soluciones stock	38

5.2.4	Procesamiento de la curva de calibración, controles y muestras.....	38
6.2.5	Validación del método.....	39
6.3	Análisis estadístico	40
7.	Resultados.....	42
7.1	Establecimiento del estado artrítico y efecto de la administración repetida de CBD y las combinaciones THC:CBD 1:1 y 1:3 sobre la inflamación	42
7.2	Efecto de la administración repetida de CBD y las combinaciones THC:CBD 1:1 y 1:3 sobre las conductas indicativas de dolor.....	43
7.3	Perfil toxicológico asociado a la administración repetida de CBD y las combinaciones THC:CBD 1:1 y 1:3.....	49
7.4	Validación del método analítico para la cuantificación de THC y CBD en sangre total (EDTA) de ratón por UPLC-MS/MS.....	52
7.5	Concentraciones sanguíneas de THC y CBD asociadas a la respuesta antinociceptiva y el perfil toxicológico <i>in vivo</i>	59
8.	Discusión de resultados	69
9.	Conclusiones.....	82
10.	Perspectivas.....	83
11.	Bibliografía.....	84
12.	Anexos	93
12.1	Listado de abreviaturas	93

1. Introducción

Cannabis es una planta fenotípicamente diversa, con distintos marcadores taxonómicos que están definidos por el contenido de sus cannabinoides mayoritarios: tetrahidrocannabinol (THC) y cannabidiol (CBD). Los efectos terapéuticos asociados con el uso de los cannabinoides abarcan diversas áreas de la investigación, incluyendo los efectos antitumorales, antioxidantes, antidepresivos, antimicrobianos, neuroprotectores, analgésicos y antiinflamatorios, siendo estos dos últimos sobre los que descansa un gran número de las publicaciones recientes sobre el uso de cannabinoides.

El uso con fines analgésicos y antiinflamatorios de los cannabinoides ha cobrado relevancia en los últimos años y es particularmente interesante en el caso de padecimientos que cursan con dolor crónico, donde en un alto porcentaje de los pacientes, se reporta que las estrategias farmacológicas convencionales para el manejo del dolor son insuficientes.

A pesar del evidente potencial farmacológico de los cannabinoides, su uso individual está limitado a causa de los efectos secundarios que pueden provocar, en el caso de THC, o de la estrecha ventana terapéutica, para CBD. En los últimos años, se ha planteado que el uso combinado de THC y CBD podría ser una alternativa más favorable que su uso individual, pues se ha propuesto que CBD tiene la capacidad de modular los efectos asociados a THC a través de mecanismos tanto farmacocinéticos como farmacodinámicos. No obstante, no parece ser suficiente con administrar ambos cannabinoides en conjunto, sino que se requiere encontrar la dosis, vía de administración y la combinación ideal THC:CBD que potencie sus efectos terapéuticos a la vez que se reducen los efectos adversos asociados a su uso. En este trabajo se evaluó el efecto antinociceptivo y antiinflamatorio de CBD y combinaciones THC:CBD 1:1 y 1:3 sobre conductas dolorosas en un modelo murino de artritis inducida por antígeno, así como su perfil toxicológico y la cuantificación de niveles sanguíneos de THC y CBD asociados a tales efectos por medio de UPLC-MS/MS.

2. Antecedentes

2.1 Cannabis y cannabinoides

2.1.1 Composición de la planta de Cannabis

Cannabis (*Cannabis sativa* L.), es una planta de floración fenotípicamente diversa que ha sido ampliamente utilizada para fines comerciales y medicinales (Smith CJ., 2022). Se han reconocido más de 483 compuestos fitoquímicos en la planta de cannabis. Estos compuestos activos incluyen a los fitocannabinoides, terpenos, esteroides, etcétera (Oladimeji A.V., 2020). Los cannabinoides, que incluyen a los compuestos endógenos y a los fitocannabinoides -compuestos terpenofenólicos C₂₁ únicos derivados de la planta de cannabis- tienen la capacidad de interactuar con el sistema endocannabinoide, a través del cual ejercen sus efectos. Los fitocannabinoides más abundantes son el ácido Δ -9-tetrahidrocannabinólico (THCA) y el ácido cannabidiólico (CBDA), siendo estos precursores de sus formas neutras Δ -9 tetrahidrocannabinol (THC) y cannabidiol (CBD), respectivamente (Smith CJ., 2022).

Las diferencias cuantitativas y la proporción de THC:CBD en Cannabis aportan marcadores quimiotaxonómicos útiles para distinguir entre los biotipos de la planta, lo que la vuelve químicamente compleja. (Guy G., 2006). Los distintos fenotipos de la planta producen diferentes respuestas *in vivo*, donde *Cannabis sativa* puede ser dividida en tres fenotipos: Fenotipo 1, con THC (>0.5% y CBD<0.5% (THC/CBD >>1); Fenotipo 2 (tipo intermedio), con CBD como el cannabinoide mayoritario, pero con THC presente en varias concentraciones (THC/CBD aproximadamente de 1); y Fenotipo 3 (tipo fibra o cáñamo), con contenido de THC especialmente bajo (THC/CBD <<1). (Kinghorn D., 2017).

2.1.2 Sistema endocannabinoide

Del mismo modo que existen compuestos cannabinoides en la planta de cannabis, en el ser humano están presentes compuestos estructural y funcionalmente similares a tales compuestos, los cuales reciben el nombre de endocannabinoides, Así mismo,

los receptores y enzimas involucradas en su síntesis y metabolismo se contemplan dentro del llamado sistema endocannabinoide. De manera que, antes de abordar el mecanismo de acción de los fitocannabinoides es necesario comprender el de los endocannabinoides, puesto que estos actúan sobre los mismos receptores y ejercen sus efectos, a través de ellos.

El sistema endocannabinoide comprende a los receptores cannabinoides 1 y 2 (CB1 y CB2), a los endocannabinoides (ECB) y a las enzimas que regulan su biosíntesis e inactivación (Katz-Talmor D., 2018). Dos principales ECB fueron identificados en la década de 1990: anandamida (AEA) y 2-araquidonilglicerol (2-AG). AEA es predominantemente sintetizada por la enzima N-aciltransferasa y la fosfolipasa D hidrolizante de la N-acil-fosfatidiletanolamina, mientras que el 2-AG es sintetizado por la diacil glicerol lipasa (DAGL). Ambos ECB son sujetos de degradación por medio de oxigenación e hidrólisis. La hidrólisis de la AEA se realiza por medio de la amida hidrolasa de ácidos grasos (FAAH), mientras que para el 2-AG se requiere de la monoacilglicerol lipasa. Por otro lado, la ciclooxigenasa-2 (COX-2), lipooxigenasas o enzimas del citocromo P450 realizan la degradación por oxidación de los ECB (Katz-Talmor D., 2018).

2.1.2.1 Receptor CB1

Tanto CB1 como CB2, pertenecen a la superfamilia de las proteínas regulatorias de unión a guanina (proteína G) acopladas a receptores tipo $G_{i/o}$, siendo CB1 el principal mediador de los efectos psicotrópicos de cannabis, lo que se explica a causa de su elevada distribución a nivel de SNC (Katz-Talmor D., 2018) (Ronan P.J., 2016). CB1 se presenta en distintas estructuras del encéfalo, con una mayor concentración en amígdala, hipocampo, corteza, ganglios basales y cerebelo, siendo expresado por los axones de las terminales presinápticas. Su distribución corresponde a los efectos de comportamiento típicos del consumo de cannabis: placer, ansiedad, miedo, pánico, involucramiento en los procesos de aprendizaje/memoria, pensamiento, concentración, movimiento, coordinación, modulación del apetito y percepción

sensorial y temporal (Ronan P.J., 2016). En general, la activación de estos receptores ejerce un efecto inhibitorio sobre la célula presináptica. CB1 predomina en neuronas GABAérgicas, a través de las cuales inhibe la liberación del ácido gamma-aminobutírico (GABA); no obstante, CB1 también puede ser encontrado en neuronas glutamatérgicas, por medio de las cuales inhibe la liberación del glutamato, principal neurotransmisor excitatorio. Al actuar sobre estos dos tipos de neuronas de naturaleza opuesta, los efectos de los agonistas de CB1 pueden, a su vez, también resultar opuestos y, en consecuencia, formar intrincadas redes de vías neuronales de inhibición y excitación (Ronan P.J., 2016).

CB1 también se expresa en tejidos no neuronales, encontrándose en una variedad de tejidos periféricos como la glándula tiroidea, glándula adrenal, hígado, tejido adiposo, tracto gastrointestinal, órganos reproductivos, células del sistema inmune y, de manera destacada en el área de las enfermedades reumáticas, en condrocitos y osteocitos (Katz-Talmor D., 2018) (Ofek O., 2006). Además, se ha sugerido que CB1 facilita la adhesión de sinoviocitos tipo fibroblasto (FLSs) a fibronectina, por lo que reduce la capacidad migratoria de estas células y posiblemente contribuya a la disminución de la destrucción del cartílago (Katz-Talmor D., 2018).

2.1.2.2 Endocannabinoides como neurotransmisores retrógrados

Los ECB son considerados como neurotransmisores (NTs) puesto que median funciones de señalización interneuronal y cuya liberación desde las neuronas está regulada por la concentración de Ca^{2+} . No obstante, difieren de los NTs convencionales en cuanto a que no permanecen almacenados en vesículas sinápticas esperando su liberación en respuesta a un estímulo, sino que son sintetizados a demanda. Otra diferencia es que los ECB no transmiten el impulso eléctrico en el sentido clásico, de neurona presináptica a neurona postsináptica, sino en sentido inverso, lo cual otorga a los ECB su nombre de "neurotransmisores retrógrados" (Purves, 2016).

2.1.2.3 Señalización endocannabinoide vía receptor CB1

La producción de AEA y 2-AG es estimulada por una señal de segundo mensajero en el interior de las neuronas postsinápticas, típicamente un aumento en la concentración de Ca^{2+} postsináptico. El posible mecanismo de liberación de los ECB consiste en que estos, por su naturaleza hidrófoba, son capaces de difundir a través de la membrana postsináptica hasta alcanzar la hendidura sináptica. Subsecuentemente, los receptores cannabinoideos localizados en la terminal de la neurona presináptica son activados, exhibiendo un efecto inhibitorio transitorio de la neurona presináptica, limitando así la liberación de los NTs clásicos (GABA o glutamato) (Purves, 2016) (figura 1 a).

Hasta el momento, se conoce que CB1 actúa a través de 3 vías de señalización (figura 1 b).

Vía 1. El receptor CB1 acoplado a proteínas $G_{i/o}$, inhibe a la adenil ciclasa, lo que ocasiona una disminución de los niveles de adenosín monofosfato cíclico (cAMP) y, consecuentemente, reduce la actividad de la proteína cinasa A o PKA (también llamada proteína cinasa dependiente del cAMP) (Katz-Talmon D., 2018) (Ronan P.J., 2016). Esta pérdida de actividad inhibitoria mediada por PKA incrementa la actividad de canales de potasio, provocando la salida de K^+ al espacio extracelular, disminuyendo el potencial de membrana de la neurona presináptica hasta llevarla a un estado de hiperpolarización no responsivo a estímulos.

Vía 2. La subunidad $\beta\delta$ del receptor CB1 acoplado a proteína G activa las vías de la proteína quinasa activada por mitógeno (MAPK) y la cinasa 3-fosfoinositidol (PI3K-Akt) (Katz-Talmon D., 2018). La activación de MAPK puede desencadenar la producción de factores de transcripción, como la proteína de activación 1 (AP-1), que se relaciona con la activación de linfocitos T en la mayoría de las respuestas de este tipo de células; la señalización vía PI3K-Akt participa en la supervivencia de los linfocitos T y permite que sigan llevando a cabo sus actividades en la respuesta inmune (Abbas A. , 2015).

Vía 3. La activación de CB1 conlleva la estimulación de canales rectificadores internos de potasio a la vez que inhibe los canales de Ca^{2+} .

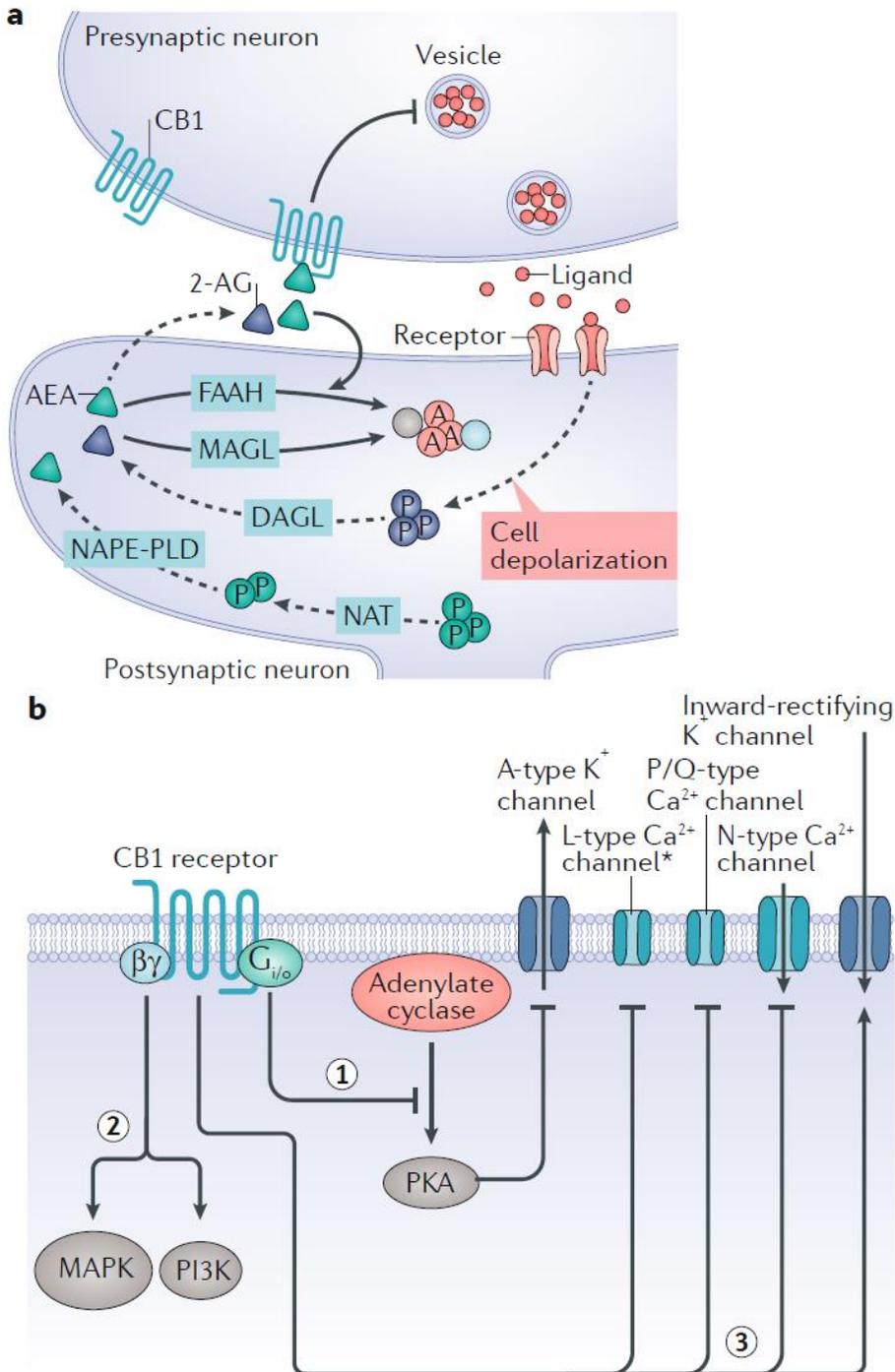


Figura 1. Señalización endocannabinoide vía CB1. Tomado de: "Cannabinoids for the treatment of rheumatic diseases — where do we stand?" (p.490). Por Katz-Talmor et al., 2018, *Nat Rev Rheumatol*, 14.

2.1.2.4 Receptor CB2

CB2 se encuentra mayoritariamente distribuido en tejidos periféricos, con elevada expresión en células inmunes (Lowin T. S. M., 2019); no obstante, ciertos estudios han demostrado que también es expresado en otros tipos de células como condrocitos, osteocitos, fibroblastos, FLSs y en algunas regiones del encéfalo (aunque en mucho menor concentración que CB1) como en el ganglio de la raíz dorsal y cerebelo (Katz-Talmor D., 2018) (Ronan P.J., 2016).

Al poseer un 48% de homología de secuencia con CB1 y pertenecer a la misma superfamilia de las proteínas G acopladas a $G_{i/o}$, las funciones del CB2 son similares al inhibir a la adenil ciclasa y activar a la MAPK. Un efecto adicional de la activación de CB2 es que puede causar un incremento transitorio de los niveles intracelulares de calcio vía fosfolipasa C (Katz-Talmor D., 2018).

Aunque la señalización de CB2 es predominantemente a nivel periférico, han aumentado las evidencias de que este receptor puede participar en cierto grado en la señalización cannabinoide cerebral, principalmente al formar heterómeros funcionales con CB1, a través de los cuales, CB2 podría reducir la señalización y, por ende, la respuesta celular mediada por CB1 (Ronan P.J., 2016).

2.1.2.5 Otros receptores cannabinoideos

A pesar de que CB1 y CB2 son los receptores más estudiados del sistema endocannabinoide, algunos de los efectos de los ligandos a estos receptores no pueden ser explicados solamente por su unión a ellos, por lo que se ha sugerido que otros receptores, como el Receptor de potencial transitorio V1 (TRPV1) y el receptor 55 acoplado a proteína G (GPR55), podrían estar involucrados.

2.1.2.6 Implicaciones analgésicas del mecanismo de los cannabinoideos

Los cannabinoideos ejercen sus efectos en 3 niveles: periférico, espinal y supraespinal. A nivel periférico la activación de los receptores CB2 puede llevar a la modulación de

la producción y liberación de mediadores inflamatorios, como las especies reactivas de oxígeno (ROS) y las citocinas; mientras que la activación de CB1 periféricos modulan la transducción del dolor. A nivel espinal, los receptores CB1 inhiben la liberación de neurotransmisores pronociceptivos (como glutamato) desde las aferencias primarias. Finalmente, a nivel supraespinal, la alta concentración de CB1 permite la modulación de señales ascendentes de dolor en el tálamo y en el circuito límbico frontal, entre otras áreas implicadas con la percepción del dolor (Narouze, 2021).

2.1.3 Potencial terapéutico y farmacodinamia de los fitocannabinoides

A causa de su naturaleza lipofílica, tanto THC (log P: 7.26 (Furqan T., 2020), log Kow = 6.97 (HSDB)) como CBD (Log P: 7.75 (Furqan T., 2020), log Kow: 8 (Tabboon P., 2022)) tienen la capacidad de atravesar la barrera hematoencefálica y ejercer sus efectos, particularmente analgésicos y antiinflamatorios, a nivel de SNC y SNP (sistema nervioso periférico) en las zonas con mayor expresión de receptores cannabinoides (Narouze, 2021).

2.1.3.1 Tetrahidrocannabinol

El THC (figura 2) es un análogo de la AEA, siendo responsable en gran parte de las acciones del cannabis, incluyendo las actividades psicoactivas, de memoria, analgésicas, antiinflamatorias, antioxidantes, antipruríticas, broncodilatadoras y antiespasmódicas (Narouze, 2021). Sus actividades analgésica y antiinflamatoria se encuentran mediadas por la activación de los receptores CB1 y CB2. El THC tiene una elevada afinidad de unión al receptor CB1 (Tabla 1) (Gallily R., 2015), mismo al que se atribuyen la mayor parte de los efectos adversos asociados al uso de THC y variedades de cannabis con alto contenido de este (Narouze, 2021). THC exhibe antinocicepción mediada por el agonismo parcial del receptor CB1 a través de la activación de sitios supraespinales y vías moduladoras del dolor serotoninérgicas y noradrenérgicas

descendientes vía activación de 5-HT₇, 5HT_{2A} y α -2 adrenergico receptor. Adicionalmente, se ha sugerido que el efecto analgésico del THC se enfoca preferencialmente en las cualidades afectivas del dolor, dada su amplia distribución en la amígdala, perteneciente al sistema límbico (Narouze, 2021).

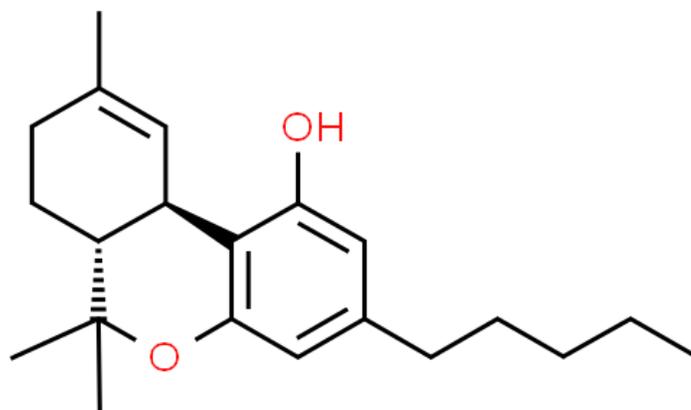


Figura 2. Estructura química del Δ -9-Tetrahydrocannabinol (THC). Tomado de (-)- δ 9-trans-Tetrahydrocannabinol, por Royal Society of Chemistry, ChemSpider (<http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.15266.html>).

2.1.3.2 Cannabidiol

CBD (figura 3) posee propiedades terapéuticas importantes, pero no se ha encontrado que induzca los efectos intoxicantes asociados a THC, pues no parece actuar como agonista de los receptores CB₁ y CB₂ al tener una baja afinidad de unión a estos (tabla 1) (Urits I., 2020). Por el contrario, CBD ha mostrado actuar como un inhibidor alostérico no competitivo del receptor CB₁, modulando así sus efectos (Urits I., 2020). De tal modo que, la actividad antinociceptiva del CBD parece ser a través de la regulación de la percepción del dolor mediante mecanismos no CB₁/CB₂, sino a través de otros receptores acoplados a proteínas G (GPCRs), como el 5-HT_{1A} (efecto antialodínico), canales iónicos TRPV1 (efecto ansiolítico y antinociceptivo), TRPA1 (canal de cationes de potencial de receptor transitorio, subfamilia A, miembro 1), TRPM8 (Canal del potencial receptor transitorio de melastatina 8), y PPARs

(Receptores activados por proliferadores peroxisomales) (De-Gregorio D., 2019). La activación de receptores de glicina contribuye a la analgesia en modelos de dolor neuropáticos e inflamatorios. Adicionalmente, CBD incrementa los efectos de AEA al inhibir su captura y metabolismo a través de la FAAH (Narouze, 2021).

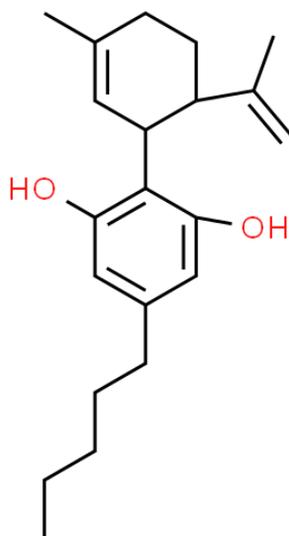


Figura 3. Estructura química del cannabidiol (CBD). Tomado de cannabidiol, por Royal Society of Chemistry, ChemSpider (<http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.454786.html>).

CBD aporta beneficios neurolépticos mediante su función anti convulsionante, en la que aumenta la cantidad de dopamina, inhibe de la captación de la serotonina y potencia la actividad noradrenérgica (Guy G., 2006). CBD también presenta efectos antioxidantes, analgésicos y un importante efecto antiinflamatorio, al inhibir la producción de enzimas ciclooxigenasas y lipooxigenasas (Guy G., 2006), factor de necrosis tumoral α (TNF- α) e interleucinas (IL) inflamatorias como IL-1 β , IL-6 e IFN- β (Interferon- β) (Anil SM., 2022).

Tabla 1. Farmacología cannabinoide. Compilación de los datos experimentales sobre afinidad y eficacia de diferentes moléculas cannabinoideas por los principales receptores endocannabinoideas

Compuesto	CB1		CB2		TPRV1		GPR55	
	Afinidad, nM	Eficacia	Afinidad, nM	Eficacia	Afinidad, nM	Eficacia	Potencia, nM	Eficacia
Endocannabinoideas principales (Agonistas parciales)								
AEA	Ki: 239.2	E_{max} : 66%	Ki: 439.5	E_{max} : 58%	Ki: 1,660–2,504	E_{max} : 100%	EC_{50} : 18	E_{max} : 73%
2-AG	Ki: 4.4–472	E_{max} : 92%	Ki: 11.2–1,400	E_{max} : 87%	Ki: –	E_{max} : –	EC_{50} : 3	E_{max} : 99%
Fitocannabinoides principales (agonistas/ agonistas inversos/antagonistas)								
Δ^9 -THC	Ki: 25.1	E_{max} : 61%	Ki: 35.2	E_{max} : 67%	Ki: –	E_{max} : –	EC_{50} : 8	E_{max} : 92%
CBD	Ki: 2,210.5	E_{max} : Nulo	Ki: 2,860	E_{max} : –15	Ki: 3,600	E_{max} : ~91%	IC_{50} : 445	E_{max} : antagonista

Compilación de datos experimentales de desplazamiento, unión a GTP γ S (análogo no hidrolizable de GTP) y ensayo de Ca²⁺ citoplasmático que proveen una medida relativa de las propiedades presentadas de las distintas moléculas cannabinoideas. K_i: Constante de inhibición; EC₅₀: Concentración efectiva 50; EC_{max}: Concentración efectiva máxima. Tomado y modificado de: Legare, C. A., Raup-Konsavage, W. M., & Vrana, K. E. (2022). Therapeutic potential of cannabis, cannabidiol, and cannabinoid-based pharmaceuticals. *Pharmacology*, 107(3-4), 131-149.

2.1.3.3 Acción antiinflamatoria de los cannabinoideas

Los cannabinoideas son potentes agentes antiinflamatorios y exhiben sus efectos a través de la inducción de apoptosis de células inmunes, inhibición de la proliferación celular, supresión de la producción de citocinas proinflamatorias e inducción de células T reguladoras (Treg) (Nagarkatti P., 2009), (Katz-Talmor D., 2018).

Desde la década de 1990, se han realizado diversos estudios que muestran que THC tiene la capacidad de inducir apoptosis en macrófagos y linfocitos T y B, presuntamente a través de la activación de Bcl-2 y caspasas. Se ha mostrado también que la inducción de apoptosis mediada por THC es mayor en linfocitos *naive* (vírgenes) en comparación con linfocitos activados por mitógeno. Es probable que este proceso esté relacionado con los receptores CB2, puesto que las células activadas presentan menores niveles de CB2 en su superficie celular. Por otra parte, CBD ha mostrado la

capacidad de inducir apoptosis *in vitro* en linfocitos CD4+ y CD8+ a concentraciones de 4-8 μM al incrementar la producción de ROS y promover la actividad de las caspasas 3 y 8. Esta función proapoptótica de los cannabinoides no se presenta en células del sistema nervioso donde, por el contrario, tienen un efecto protector sobre la apoptosis en oligodendrocitos vía receptores CB1 y CB2, al señalizar mediante la vía PI3K/Akt (Nagarkatti P., 2009).

Estudios *in vitro* han evaluado el efecto de cannabinoides como THC y CBD sobre la producción de citocinas de distintos tipos de células de la respuesta inmune, sin embargo, los resultados parecen ser dependientes de la línea celular y de la concentración de cannabinoides en estudio. De manera general, los estudios apuntan a que el THC disminuye la producción de TNF- α , factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos (GM-CSF) e IFN- γ . Otros cannabinoides también han mostrado suprimir la actividad de ciertas citocinas, tal es el caso del cannabinoide sintético no psicoactivo Ácido ajulémico (AjA), que mostró disminuir la secreción de IL-6 liberada de macrófagos en un estudio *in vitro* en un modelo de artritis inducida por adyuvante, y los cannabinoides sintéticos CP55,940 y WIN55,212-2 con potentes efectos antiinflamatorios mediante la disminución de la producción de IL-6 e IL-8 en sinoviocitos similares a fibroblastos reumatoides (Nagarkatti P., 2009).

A su vez, las citocinas también tienen efectos sobre el sistema endocannabinoide, ejemplo de ello es que IL-12 e IFN- γ han mostrado reducir la expresión y la actividad de la FAAH, mientras que IL-4 o IL-10 estimulan su actividad (Nagarkatti P., 2009).

2.1.4 Aspectos farmacocinéticos de los cannabinoides

La farmacocinética de los cannabinoides es compleja a causa de la gran variedad de interacciones que presentan cuando son administrados en conjunto con otros principios activos, los cuales pueden incluir a otros fitocannabinoides, y su comportamiento es altamente influenciado por la vía de administración (Hložek T., 2017). En humanos, la vía más común para los productos de cannabis es la vía

inhalatoria, pues presenta una mayor biodisponibilidad (THC 11-45%), al evitarse el metabolismo de primer paso, y alcanzando la concentración máxima ($C_{m\acute{a}x}$) de THC en circulación en unos pocos minutos, misma que disminuye rápidamente, mientras que en tejidos altamente lipofílicos, como el cerebro, permanece elevada por más tiempo. Por otro lado, cuando THC, CBD o sus combinaciones son administrados por vía oral, la $C_{m\acute{a}x}$ de los cannabinoides se presenta alrededor de los 120 min y se relaciona con una biodisponibilidad marcadamente menor (6-20% para THC y 6-19% para CBD) a causa del elevado metabolismo hepático. No obstante, a través de esta vía de administración, no solamente las concentraciones sistémicas permanecen elevadas durante más tiempo en comparación con la vía pulmonar, sino que también en tejidos altamente lipofílicos permanecen elevadas por periodos más largos, permitiendo que ambos cannabinoides ejerzan sus efectos durante más tiempo (Hložek T., 2017).

2.1.4.1 Metabolismo de los cannabinoides

Una importante ruta metabólica involucra la oxidación de THC en su posición 11 para formar al 11-OH-THC a través de la acción de las enzimas CYP2C9 y CYP2C19 (Nasrin, 2021). 11-OH-THC es un metabolito activo que presenta efectos psicoactivos equivalentes o incluso mayores a los del propio THC, cobrando relevancia en las vías de administración que promueven su formación. El 11-OH-THC no suele acumularse a causa de que este es, a su vez, sustrato de CYP2C9, enzima que se encarga de oxidarlo aún más hacia el metabolito inactivo 11-COOH-THC. Sin embargo, las concentraciones residuales de THC permiten la conversión a 11-OH-THC durante días, por lo que su actividad no puede ser despreciada (Andrenyak, 2017). Por otra parte, CBD también sufre procesos de oxidación a través de las enzimas CYP2C19 y CYP3A4, para formar 7-OH-CBD, y posteriormente 7-COOH-CBD, aunque en este caso ninguno de los dos metabolitos presenta actividad biológica (Andrenyak, 2017). El metabolismo de THC y CBD presenta un mayor grado de complejidad cuando estos son administrados en conjunto, pues se ha demostrado por medio de ensayos *in vitro* que tanto THC como CBD y sus metabolitos son inhibidores de enzimas del sistema CYP450. THC ha presentado inhibición competitiva de las enzimas CYP1A2, CYP2B6, CYP2C9 y CYP2D6, mientras que 11-OH-THC ha mostrado inhibir competitivamente

a CYP2B6, CYP2C9 y CYP2D9. Por otro lado, CBD puede inhibir competitivamente CYP3A4, CYP2B6, CYP2C9, CYP2D6 y CYP2E1. Adicionalmente, THC y CBD han presentado inhibición mezclada de CYP2C19 y CYP1A2 (Nasrin, 2021). Tales acciones representan potenciales interacciones farmacocinéticas no solo entre estos dos cannabinoides, sino con un amplio abanico de fármacos cuando son administrados a la par.

2.1.5 Tetrahidrocannabinol, cannabidiol y sus combinaciones

Derivado de su potencial farmacológico asociado a la ausencia de efectos intoxicantes, el uso de CBD en productos de cannabis los ha hecho más atractivos para su consumo, ya sea por sí solo o en combinación con el THC donde, presumiblemente, CBD modula los efectos asociados a intoxicación por THC, tales como defectos de memoria, paranoia, aumento del riesgo de enfermedad psicótica e incremento a la dependencia al cannabis (Pennypacker SD., 2020). A causa de esto, se ha propuesto que productos que contengan CBD pueden mitigar los efectos intoxicantes del THC en sus formulaciones y, si bien esto ha sido explorado desde épocas tan tempranas como 1970, los resultados tanto clínicos como preclínicos hasta la fecha han sido complicados y controversiales.

2.1.5.1 Variedades y extractos de Cannabis con mayor efecto terapéutico

Numerosos estudios *in vivo* han evaluado el efecto analgésico y antiinflamatorio de THC y CBD administrados individualmente, sin embargo, estos suelen presentar una limitación importante en cuanto a su relación dosis-respuesta, pues presentan una curva tipo campana que los relaciona con una estrecha ventana terapéutica, donde solo limitadas dosis de estos presentan efectos terapéuticos, lo que dificulta su uso en la clínica como agentes individuales (Gallily R., 2015). Ejemplo de esto es el trabajo de Malfait y colaboradores (2000) en donde se encontró que CBD ejerció un efecto supresor dosis-dependiente tanto en artritis clínica como en el daño a articulaciones en un modelo murino de artritis inducida por colágeno (CIA) administrado vía intraperitoneal; sin embargo, la curva dosis-efecto obtenida mostró un comportamiento en forma de campana, donde la dosis de 5 mg/kg de CBD ejerció el efecto terapéutico

óptimo, mientras que la dosis más baja (2.5 mg/kg) y la más alta (20 mg/kg) no mostraron efectos significativos (Malfait AM., 2000).

Resultados similares se presentaron cuando se evaluó la administración de CBD vía oral, donde la dosis de 25 mg/kg mostró efectos terapéuticos óptimos, mientras que la dosis más alta y la más baja no presentaron efectos significativos, siendo de 10 mg/kg y 50 mg/kg, respectivamente. Este estudio, pese a mostrar resultados prometedores respecto al uso de CBD para tratamiento de enfermedades inflamatorias, específicamente la artritis, se ve limitado a una sola dosis terapéuticamente relevante.

Con el objetivo de superar las limitaciones del uso de cannabinoides en cuanto a dosificación, se han hecho esfuerzos por encontrar patrones dosis-respuesta predecibles. En 2015, Gallily y colaboradores realizaron un estudio donde compararon el efecto antiinflamatorio y antinociceptivo en el modelo de formación de oedema inducido por zymosan de CBD administrado individualmente (1, 5, 25 y 50 mg/kg, i.p.), así como el efecto de un extracto estandarizado de cannabis clona 202 (5, 25 y 50 mg/kg) donde, en correspondencia con estudios previos, la administración de CBD puro mostró una relación dosis-respuesta tipo campana; por otra parte, el extracto de cannabis clona 202 mostró una respuesta dosis-dependiente en los tres parámetros ensayados: el extracto previno el oedema, el dolor y la producción de TNF- α inducida por zymosan, con un efecto terapéutico mejorado en dosis crecientes.

La diferencia en los efectos del CBD puro respecto al extracto estandarizado es atribuible a la diferente composición en cannabinoides en el extracto, donde por medio de cromatografía de gases acoplada a masas (GC/MS) se encontró que la composición del extracto fue la siguiente: CBD 17.9%, THC 1.1%, cannabicromeno (CBC) 1.1%, cannabigerol (CBG) 0.2% y cannabinol (CBN) y cannabidivarol (CBDV) en trazas (Gallily R., 2015). Estos resultados sugieren que la limitación del uso de CBD puro puede ser superada al presentarse en conjunto con otros componentes naturales de la planta, donde cabe resaltar la proporción de los dos cannabinoides principales de la planta THC:CBD 1:16. De esta forma, el estudio soporta lo planteado

previamente, donde el uso de combinaciones de cannabinoides, particularmente THC y CBD, posee mayor potencial terapéutico, más predecible y con probable reducción de efectos adversos en comparación con su administración individual.

En 2021, Shebaby y colaboradores realizaron la evaluación de las actividades antiinflamatorias *in vitro* e *in vivo* del aceite de cannabis libanés (COE), aceite que ha sido empleado tradicionalmente en el Líbano para tratar diversas enfermedades, principalmente cáncer, diabetes y dolor crónico asociado con artritis. En principio, se determinó por medio de GC/MS que los constituyentes principales fueron cannabinoides (85.15%), sesquiterpenos (5.89%) y monoterpenos (4.12%). La proporción de cannabinoides fue marcadamente dominada por CBD (59.1%) y THC (20.2%), que resulta en una relación aproximada de THC:CBD 1:3. El estudio reveló que la actividad antiinflamatoria del COE presentó una marcada disminución de la inflamación en modelos crónicos (formalina) y agudos (carragenina), donde en ambos casos los resultados fueron dosis dependientes con una inhibición máxima de 50% y 56% (25 y 50 mg/kg) y 41 y 47% ((25 y 50 mg/kg), respectivamente (Shebaby W., 2021).

2.1.5.2 Categorías de la interacción THC-CBD

En general, la literatura enfocada en el uso conjunto de THC y CBD señala que la interacción entre estos ya sea a nivel farmacocinético o farmacodinámico, es bastante compleja. La esperanza del uso conjunto de ambos cannabinoides sobre minimizar los efectos adversos del THC a través de la presencia del CBD podría no ser tan clara, pues existen estudios que señalan que, en lugar de atenuar estos efectos, CBD podría ser capaz de aumentarlos. El tiempo ha demostrado que es complicado establecer la razón CBD/THC que cause antagonismo o potenciación. Si bien, esto sigue siendo cierto actualmente, se cuenta con indicios que apuntan a que proporciones altas de CBD/THC son capaces de atenuar el estado intoxicante provocado por THC, mientras que dosis equivalentes o bajas de CBD/THC podrían aumentar dicho efecto. Zuardi y col., indican que considerando solo estudios de los dos cannabinoides administrados simultáneamente, la proporción media de dosis de CBD/THC fue 8.8 (± 11.1) cuando

se observaron efectos antagónicos, y de 1.8 (± 1.4) cuando los efectos del THC fueron potenciados (Zuardi AW., 2012) . Por su parte, Solowij y col., mostraron que los niveles de THC pueden ser reducidos en proporciones altas de THC:CBD, como el 1:20, pero aumentadas en bajas cantidades de CBD, como 2:1 .

Es así como, con base en una minuciosa revisión realizada por Pennypacker y col., (Pennypacker SD., 2020) (Pennypacker SD, 2022) se han establecido cuatro categorías clínicamente relevantes:

- 1) **THC:CBD \geq 1:1** CBD puede incrementar los efectos de THC;
- 2) **THC:CBD \sim 1:2** CBD no tiene efecto significativo sobre los efectos de THC;
- 3) **THC:CBD $>1:2$, $<1:6$** CBD puede no tener efecto o actuar como protector contra los efectos de THC y,
- 4) **THC:CBD $\geq 1:6$.** CBD tiene efecto protector sobre los efectos de THC.

2.1.6 Uso de cannabinoides para el tratamiento de enfermedades crónicas

Se ha explorado el rol del sistema endocannabinoide sobre la inflamación, así como en el desarrollo, remodelamiento y metabolismo óseo en patologías tales como la artritis reumatoide, principalmente en modelos animales (Ehrenkranz J., 2019), mientras que los estudios en humanos son muy escasos, esto puede ser reflejo de las restricciones legislativas que históricamente han rodeado la investigación con cannabis (Ehrenkranz J., 2019). Sin embargo, los modelos de dolor artrítico y neuropático en animales han demostrado una clara reducción del dolor y alodinia bajo tratamiento con cannabinoides (Lowin T. T. R., 2020), esto apunta a que la medicina basada en cannabis puede representar una opción interesante para tratar síntomas comunes y debilitantes de enfermedades reumáticas en casos particulares cuando las otras terapias convencionales han sido exploradas sin éxito (Katz-Talmor D., 2018).

2.2 Artritis reumatoide

La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad sistémica, crónica y de naturaleza autoinmune, que afecta principalmente a las articulaciones, caracterizada por la presencia de inflamación con participación de autoanticuerpos anti-inmunoglobulina G (IgG, Factor Reumatoide (FR)) y proteínas citrulinadas (anticuerpos antiproteína citrulinada (ACPAs)) (Smolen J., 2018) (Bingham B., 2009). La inflamación de la membrana sinovial de las articulaciones frecuentemente resulta en la erosión ósea y la eventual destrucción de las articulaciones cuando no es tratada (Shams S., 2021).

2.2.1 Fisiopatología de la artritis reumatoide

El curso inicial de la patogénesis de la AR está marcado por la activación de la respuesta inmune innata, donde la estimulación de las células presentadoras de antígeno (CPA) mediadas por la presencia de FR y ACPAs en la sinovia derivan en una quimioatracción de linfocitos B, linfocitos T CD4+, células dendríticas, neutrófilos, mastocitos y macrófagos en el área afectada, que eventualmente resulta en la hiperplasia y neovascularización de la membrana sinovial (Cisneros-Caballero A.F., 2017).

Por otro lado, los osteoclastos, condrocitos y fibroblastos sinoviales son activados en respuesta a la inflamación del tejido sinovial, y posteriormente contribuyen a la destrucción del cartílago y hueso. La médula ósea subyacente también es infiltrada y dañada por agregados de linfocitos T y B autorreactivos que perpetúan la reacción autoinmune patogénica (Cisneros-Caballero A.F., 2017).

Los estudios epidemiológicos de la AR han mostrado que su prevalencia se encuentra en el rango de 0.5-1.0% en la población occidental blanca. Se estima que la prevalencia es similar entre los distintos países occidentales, aunque difiere entre etnicidades (Smolen J., 2018).

El tratamiento de la AR es desafiante dada la elevada inervación de las articulaciones, la cual incluye la presencia de nociceptores que rodean la articulación, lo que explica

la marcada relación entre las patologías de las articulaciones y el severo dolor que las acompaña. Esto resulta en la sensibilización de las neuronas nociceptivas aferentes primarias (Bingham B., 2009). De hecho, el dolor es el síntoma más común de la AR, presentándose en hasta el 97% de los pacientes, siendo también la principal razón que motiva a los pacientes a acudir a consulta médica (Cao Y., 2020).

2.2.2 Dolor y artritis reumatoide

La cápsula y la sinovia de las articulaciones tienen una gran cantidad de fibras aferentes periféricas del ganglio de la raíz dorsal, mismas que poseen un elevado número de neuronas sensitivas primarias $A\alpha$, $A\beta$, $A\delta$ y C. Cuando se presenta inflamación de la sinovia se activa y sensibiliza a los nervios aferentes presentes en ella, lo que conduce a la percepción de dolor. Este mecanismo ocurre no solo en la sinovia, sino también en la cápsula de las articulaciones, el menisco lateral, hueso subcondral, ligamentos, la envoltura del tendón y el músculo, todo lo cual contribuye de manera importante a la generación del dolor crónico (Cao Y., 2020) (Figura 4).

Si bien, la inflamación en las articulaciones es un mecanismo importante para la generación del dolor en la AR, este también puede presentarse en ausencia de inflamación y expandir su distribución hacia tejidos adyacentes al de las articulaciones, lo que sugiere que la hiperalgesia puede ser causada por mecanismos de regulación central más que por la sola estimulación de nociceptores periféricos (Figura 4) (Cao Y., 2020) (Zhang A., 2018).

En la AR a nivel local de las articulaciones, la inflamación de la sinovia puede ser causada por la presencia de citocinas proinflamatorias que activan o sensibilizan fibras nociceptivas aferentes y transmiten las señales del dolor vía tracto espinotalámico hacia zonas implicadas con la percepción del dolor como la corteza somatosensorial y el sistema reticular y límbico. Las citocinas proinflamatorias como el TNF, IL-1 β e IL-6 pueden actuar directamente sobre nociceptores mecanosensoriales o en vías postsinápticas en la médula ósea y circuitos supraespinales. La actividad de las citocinas en estos sitios de unión puede reducir los umbrales de activación de los

transductores de estímulos evocados en los nociceptores primarios (sensibilización periférica) (Simon, 2021) (Figura 4).

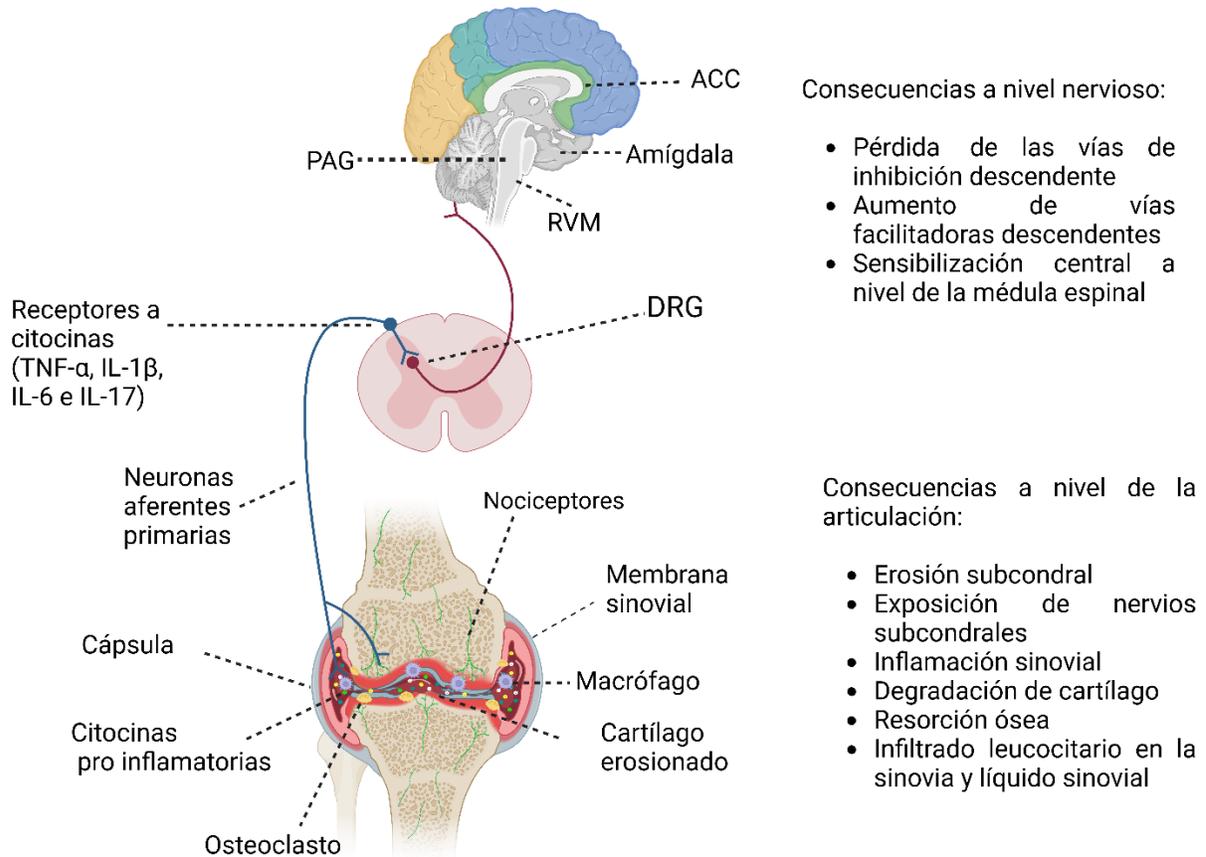


Figura 4. Mecanismos fisiopatológicos asociados a la presencia de dolor e inflamación en artritis reumatoide. ACC: Corteza Cingulada Anterior; PAG: Sustancia Gris Periacueductal; RVM: Médula Rostral Ventromedial; DRG: Ganglio de la raíz dorsal; TNF- α : Factor de necrosis tumoral α ; IL-1 β : Interleucina 1 β ; IL-6: Interleucina 6; IL-17: Interleucina 17.

2.2.2.1 Sensibilización inmune de los canales iónicos en nociceptores

La modificación de la actividad de los canales iónicos también es un mecanismo clave para la conducción del dolor (Baral P., 2019), estando relacionada con la actividad de los canales de sodio de apertura de voltaje, los cuales son proteínas importantes en la excitabilidad y transducción sensorial, puesto que son responsables de la

despolarización del potencial de membrana en reposo, y la subsecuente iniciación del potencial de acción (PA) en neuronas (Campos-Ríos A., 2021).

TRPV1

El receptor TRPV1 es un canal de cationes de apertura por ligando no selectivo, activado por capsaicina, calor, protones y lípidos endógenos llamados endovaniloides (Palazzo, 2010) (Abbas M. , 2020) (Cao Y., 2020). Así como se encuentran en las neuronas aferentes primarias periféricas y del ganglio de la raíz dorsal, los receptores TRPV1 también se expresan en estructuras espinales y supra espinales, así como en aquellas que pertenecen a la vía descendente antinociceptiva endógena, el cual es un circuito del SNC supraespinal cuya tarea es contrarrestar el dolor. Incluye la PAG y la RVM, cuya activación lleva a la analgesia (Palazzo, 2010). La activación de los receptores TRPV1 causa dos efectos: la despolarización de la membrana y el eflujo de calcio. Las consecuencias de estos efectos varían dependiendo del tipo de célula desde la excitación neuronal hasta la secreción y contracción del músculo liso (Abbas M. , 2020).

Durante la inflamación de tejidos o daño, las citocinas, prostaglandinas, NGR y bradicininas promueven en las neuronas un incremento en la expresión y/o actividad de TRPV1. Se ha encontrado que la neutralización de TRPV1 puede reducir la hipersensibilidad mecánica de ratones en el modelo de artritis inducida por antígeno (CIA); sin embargo, el rol del TRPV1 en el dolor relacionado a AR es controversial (Cao Y., 2020).

2.2.3 Tratamientos actuales de la artritis reumatoide

El tratamiento de la AR tiene dos metas terapéuticas, siendo 1) la disminución de la inflamación y el dolor en las articulaciones y 2) maximizar la función de las articulaciones, previniendo su destrucción y deformación. Para lograr esto se emplea una combinación de aproximaciones farmacológicas, actividad física, control de peso y buenos hábitos como evitar fumar y descansar apropiadamente.

2.2.3.1 Alivio del dolor y la disminución de la inflamación

Los fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) incluyendo al ácido acetil salicílico (aspirina), el naproxeno e ibuprofeno son considerados como de rápida acción. Su uso a largo término está asociado con efectos secundarios como náusea, dolor abdominal, úlceras y sangrado gastrointestinal. Los corticoesteroides también son fármacos con potente acción antiinflamatoria, pero acarrear serios efectos secundarios, por lo que solo son recomendados en dosis bajas y por periodos cortos de tiempo. Los opioides débiles como la codeína, el dextropropoxifeno y el tramadol podrían tener un rol efectivo en el manejo del dolor a corto término causado por la AR, pero sus efectos adversos superan a los beneficios (Bullock J., 2018).

2.3.3.2 Remisión y disminución de la progresión de la destrucción de las articulaciones y su deformación

Los llamados fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad (DMARDs) son considerados fármacos de acción lenta, pero a diferencia de los AINEs y glucocorticoides, estos además de minimizar el componente inflamatorio de la enfermedad también reducen la destrucción de las articulaciones, por lo que se han posicionado como los fármacos de elección en el tratamiento de la AR. Usualmente la terapia comienza con metotrexato (MTX), fármaco inmunosupresor que requiere pruebas sanguíneas regulares para identificar posibles efectos adversos. No obstante, tiene la ventaja de poder ajustar la dosis de manera flexible, y posee menores efectos adversos que otros DMARDs (Bullock J., 2018).

Los DMARDs biológicos, son fármacos de rápida efectividad en la disminución de la progresión del daño a las articulaciones causado por la AR; sin embargo, presentan serios efectos secundarios, como incremento de riesgo a infecciones (Bullock J., 2018). Son recomendados cuando otros fármacos de segunda línea no son efectivos. Desafortunadamente, estos fármacos son caros y no se encuentran al alcance de todos los pacientes (Bullock J., 2018).

Lamentablemente, tras haber intentado muchas de las opciones terapéuticas convencionales, algunos pacientes deben continuar viviendo con un control

inadecuado o mínimo del dolor reumático. Investigaciones recientes han sugerido que los cannabinoides como el THC y el cannabidiol CBD podrían ser útiles en el tratamiento de la AR (Ehrenkranz J., 2019) (Lowin T. T. R., 2020) (Katz-Talmor D., 2018) (Gonen T., 2020) (Hendricks O., 2019) (Zhu M., 2018) (Lowin T. S. M., 2019) al actuar como moduladores de la actividad del sistema inmune. Se ha observado que los ligandos endocannabinoides y sus receptores son críticos en la neurotransmisión, el control del apetito, las emociones, la percepción del dolor y la respuesta inmune (Zhu M., 2018).

2.2.4 Uso de Cannabis para el tratamiento de la artritis reumatoide

En 2008, el estudio de Richardson y colaboradores apuntó que los receptores del sistema endocannabinoide pueden ser objetivos terapéuticos en el tratamiento del dolor y la inflamación asociados con osteoartritis (OA) y artritis reumatoide. Esta predicción está sustentada en que los investigadores identificaron que AEA y 2-AG estaban presentes en fluido sinovial de pacientes con AR y OA, mientras que no fueron detectados en fluidos de la sinovia de voluntarios normales (Richardson D., 2008). Más aún, en otro estudio se encontró, que tanto mRNA como la proteína CB2 se encontraron en pacientes con AR, y que la expresión de CB2 está aumentada por mediadores proinflamatorios (Gui H., 2015).

En 2015, el estudio de Gui y colaboradores mostró una disminución de los síntomas y un marcado alivio de la destrucción articular en ratones con CIA tratados con HU-308 (dosis de 0.3 y 1.0 mg/kg), un cannabinoide sintético agonista selectivo del receptor CB2. Los resultados indicaron que la administración de 1.0 mg/kg de HU-308 permitió que los ratones desarrollaran una enfermedad significativamente menos severa con menor infiltración sinovial de células mononucleares y polimorfonucleares y menor erosión del cartílago y hueso en comparación con los ratones CIA tratados con vehículo (evaluado por análisis histológico). Además, por medio de estudios radiográficos se encontró en los ratones que recibieron la misma dosis del cannabinoide, este previno la erosión focal ósea y articular de las rodillas. Por otro

lado, se observó una reducción de anticuerpos anti-CII en los ratones CII tratados con HU-308 en comparación con el grupo control (Gui H., 2015).

Adicionalmente, un estudio *in vitro* por Gui y col. analizando macrófagos peritoneales de ratones CB2^{+/+} y CB2^{-/-}, mostró que HU-308 inhibe la producción IL-6 y TNF- α de manera dosis-dependiente. La deficiencia de CB2 eliminó completamente estos efectos, lo que implica que CB2 media los efectos inhibitorios de HU-308 sobre la producción de IL-6 y TNF- α en macrófagos. La función de los macrófagos es particularmente distinguida en la patogénesis de la AR, pues son los principales productores de citocinas proinflamatorias (Gui H., 2015).

En otro estudio llevado a cabo por Hammell y colaboradores en 2016 se probó la eficacia *in vivo* de una administración transdérmica de CBD para reducir la inflamación y los comportamientos asociados a dolor en un modelo de monoartritis inducida por adyuvante en ratas (Hammell D.C., 2016). Los resultados mostraron que la administración de CBD en dosis de 6.2 y 62.3 mg/día (por 4 días) disminuyen la inflamación de la rodilla ipsilateral y la puntuación del dolor, así como la hipersensibilidad al calor en el modelo de monoartritis inducida.

En 2018, Zhu y colaboradores encontraron una disminución de la severidad de la enfermedad en ratones tratados con JWH133, un agonista selectivo de CB2, en un modelo de CIA, así como una marcada reducción en la producción TNF- α , IL-1 β e IL-6.

Estudios como los que se han expuesto muestran la importancia del receptor CB2 en la inducción de efectos antiinflamatorios, en gran parte debido a la regulación que ejercen sobre los macrófagos, mismos que juegan un rol crucial en enfermedades como la AR. Por otro lado, el receptor CB1 ha mostrado inducir efectos proinflamatorios al promover la polarización de los macrófagos M1, la generación de especies reactivas de oxígeno, fibrosis y aumento de la señalización de TLR4 (Lowin T. S. M., 2019). Como consecuencia, puede concluirse que en materia del uso de cannabinoides para tratamiento de la AR es importante procurar el uso de

cannabinoides, o combinaciones de estos, que induzcan preferencialmente la activación del receptor CB2, de tal forma que se minimicen los efectos proinflamatorios mediados por el CB1, así como sus efectos intoxicantes a nivel de sistema nervioso.

En humanos, Blake y colaboradores llevaron a cabo un estudio preliminar multicéntrico sobre la eficacia, tolerabilidad y seguridad de CBM (Sativex) en el dolor causado por AR, donde se encontró que, en comparación con el grupo placebo, la terapia basada en cannabis se asoció con mejoras significativas en parámetros del dolor y la calidad de sueño (Blake D. R., 2006). Esto se demostró empleando un aerosol consistente en extracto de cannabis con cantidades en relación 1:1 de los cannabinoides mayoritarios THC y CBD. Sativex fue administrado por vía oromucosal con cada activación del aerosol conteniendo 2.7 mg de THC y 2.5 mg de CBD.

2.2.5 Uso creciente y legislación de cannabis y sus derivados

A causa de los numerosos efectos terapéuticos potenciales de cannabis, un creciente número de países que incluyen a Canadá, India, Tailandia, Alemania, Turquía, Italia, Brasil, Francia y algunas regiones en Estados Unidos han aprobado el uso de cannabis y sus derivados para uso medicinal, particularmente para el tratamiento de patologías asociadas al dolor crónico (Abuhasira, 2018) (Ransing R., 2022).

Un estudio en 2018 realizado en población francesa reveló que en aquellos pacientes con tratamiento establecido de cannabis medicinal estaba indicado principalmente para el tratamiento de dolor crónico, condiciones de salud mental, desórdenes del sueño y enfermedades de carácter artrítico o musculoesquelético (Baron E., 2018).

En 2017, México dio el primer paso en la regulación sobre el uso de la Cannabis, al publicar en el Diario Oficial de la Federación el Anteproyecto de Ley para la regulación del Cannabis, mismo que estipula los usos del cannabis y sus derivados (capítulos I, IV y V), entre las que se encuentran el uso científico y de investigación en las áreas de medicina o farmacéutica, terapéutica o paliativa e industrial, el cual fue aprobado y

expedido como Ley Federal para la Regulación del Cannabis, con diversas disposiciones de la ley General de Salud y del Código Penal Federal en el año 2021.

En virtud de la repentina afluencia de productos derivados de cannabis en el mercado y del creciente movimiento en México hacia la legalización de tales productos el desafío al que se enfrenta la comunidad científica es grande. Por un lado, la literatura existente en torno al uso eficaz y seguro de cannabis y sus derivados es escasa y, en muchas ocasiones, contradictoria, lo que limita en gran medida su recomendación de uso en la clínica para el tratamiento de distintas patologías. Por otra parte, el surgimiento de tan extensa cantidad de productos basados en cannabis encontrados ya en un mercado que ofrece limitado control sobre ellos y se reduce a la prohibición de tales productos en consecuencia de los riesgos asociados a su uso que, si bien son reales, también ofrecen un evidente potencial terapéutico en patologías donde las estrategias farmacológicas convencionales son insuficientes. En consecuencia, el desafío presentado resulta ineludible pues la alternativa implicaría negar a la población la información necesaria para la toma de decisión acertada con base en sus necesidades y objetivos clínicos. En este sentido, es indispensable profundizar en el conocimiento sobre la farmacocinética y farmacodinamia de los cannabinoides, así como la búsqueda de las combinaciones, dosis y vías de administración ideales para el tratamiento de distintas enfermedades, principalmente aquellas asociadas a procesos de inflamación y dolor crónico.

3. Justificación

Existen diversas opciones terapéuticas para el alivio del dolor crónico, en el cual se incluyen patologías como la artritis reumatoide; sin embargo, ninguno de los fármacos empleados de primera y segunda línea para tratar la AR tienen actividad analgésica a largo término que no venga acompañada de significativos efectos secundarios que varían desde la intolerancia gástrica que lleva a la ulceración y sangrado gastrointestinal de los AINEs, los problemas hepáticos y deterioración de la médula ósea de los DMARDs hasta los riesgos de tolerancia y adicción de los opioides (Bullock J., 2018). Por lo que es necesario continuar explorando nuevos fármacos con potencial analgésico que, idealmente, reduzcan la progresión del daño a las articulaciones. Los cannabinoides, principalmente el THC y CBD, han mostrado tener un significativo potencial terapéutico para el alivio del dolor y enfermedades inflamatorias, por lo que son una opción atractiva en el alivio de la AR.

En las últimas décadas, ha habido un creciente movimiento hacia la legalización de la planta de cannabis y de sus derivados cannabinoides (Romero-Sandoval EA, 2018), al ser estos productos orientados hacia objetivos clínicamente no satisfechos en muchos pacientes afectados de enfermedades clínicas resistentes al tratamiento (Guy G., 2006). Puesto que la situación clínica y social tiene una fuerte tendencia hacia la legalización de estos productos, sería imprudente permanecer con tan limitado conocimiento sobre su farmacocinética, farmacodinamia, vía de administración y proporciones ideales de los cannabinoides principales. Puesto que los inconvenientes deben coexistir con las ventajas del uso de cannabis y sus derivados, para encontrar el balance entre estos dos aspectos es necesario profundizar nuestro conocimiento en ambos.

La relación THC:CBD resulta particularmente llamativa, puesto que promete una aproximación hacia el entendimiento del máximo efecto terapéutico de estos cannabinoides, acompañado de la menor cantidad de efectos adversos, entre los que se incluye la acción psicoactiva del THC.

4. Hipótesis

La combinación de THC:CBD en proporción 1:3 tiene un efecto analgésico y antiinflamatorio mayor, con un perfil toxicológico más favorable que la combinación THC:CBD en proporción 1:1.

5. Objetivos

5.1 Objetivo general

Evaluar el efecto antinociceptivo y antiinflamatorio individual de CBD y las combinaciones THC:CBD en una proporción 1:1 y 1:3 sobre conductas de tipo doloroso en un modelo de artritis unilateral crónica por administración de adyuvante completo de Freund (CFA) en ratones macho ICR, así como su perfil toxicológico y los niveles sanguíneos de THC y CBD.

5.2 Objetivos específicos

- Determinar el efecto antinociceptivo y antiinflamatorio de CBD y la combinación de THC:CBD en proporción 1:1 y 1:3 administrados vía intraperitoneal, por medio de la medición de las conductas indicativas de dolor espontáneo y medición del % de inflamación, en el modelo de dolor crónico de tipo artrítico por administración unilateral de adyuvante de Freund (CFA) en ratones macho ICR.
- Evaluar el perfil toxicológico a través de signos y síntomas espontáneos después de la administración de CBD y las combinaciones THC:CBD en proporciones 1:1 y 1:3, en los animales de experimentación mencionados previamente.
- Comparar los niveles de la concentración sanguínea de THC y CBD, después de la administración individual de CBD y las combinaciones de THC:CBD 1:1 y 1:3.

6. Materiales y métodos

Tipo de estudio

Estudio experimental, prospectivo, de asignación aleatorizada a dosis repetidas.

6.1 Evaluación *in vivo* del efecto antinociceptivo, antiinflamatorio y perfil toxicológico de distintas combinaciones de Delta-Tetrahidrocannabinol y cannabidiol

6.1.1 Animales de estudio

6.1.1.1 Consideraciones bioéticas

Este estudio fue aprobado por el Comité de Investigación de la empresa de investigación FS Scientia Pharma, S.A. de C.V. (Reg. COFEPRIS No. 20 CI 24 028 032) bajo el título "Evaluación del efecto antinociceptivo de distintas combinaciones de delta-tetrahidrocannabinol y cannabidiol en un modelo experimental de dolor crónico" con código: FS-PC-22-001. El modelo animal se realizó de acuerdo con lo estipulado por la NOM-062-ZOO-1999: Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. Los tratamientos administrados fueron proporcionados por medio de una donación de productos de investigación por parte de la Asociación de la Industria Nacional del Cannabis de México.

6.1.1.2 Condiciones de alojamiento

La parte experimental del modelo se realizó en las instalaciones del Laboratorio de Farmacología de la Unidad Académica multidisciplinaria Reynosa-Aztlán de la Universidad Autónoma de Tamaulipas. Se emplearon 52 ratones macho de la cepa ICR (Institute of Cancer Research) adquiridos de una fuente certificada (Laboratorios Harlan, México) con pesos entre los 25-34 gramos (28.88 ± 2.29 g, media \pm SD) y con 4 semanas de edad. Los ratones fueron hospedados en cajas colectivas de acrílico estándar con un máximo de 4 ratones por caja; se mantuvieron las condiciones de ciclos de luz/oscuridad de 12 horas, temperatura de 21 ± 2 °C y humedad relativa de 40-70% de acuerdo con los lineamientos descritos por la NOM-062-ZOO-1999. Los animales de experimentación recibieron agua y comida *ad libitum* y fueron

aconicionados por 2 semanas previo al inicio de la inducción del estado artrítico. Los ratones fueron aleatorizados para su integración a los diferentes grupos de evaluación con base en el tratamiento a ser administrado. El tamaño de muestra para cada tratamiento fue el siguiente: PBS n=9, vehículo n=9, CBD n=12, combinación THC:CBD 1:1 n=11 y combinación THC:CBD 1:3 n=11.

6.1.2 Fármacos y compuestos

Las combinaciones THC:CBD 1:1 y 1:3 se encontraron en extractos diluidos en aceite de coco. Aceite de triglicéridos de cadena media (aceite de coco, MCT oil) grado reactivo, Beyond Raw Chemistry Labs. Cannabidiol Pure 2000 CBD Paradise (2000 mg, 30 mL). CFA (Cat. F5881) Sigma-Aldrich (Toluca, México). Solución salina amortiguada con fosfatos (PBS) pH 7.4.

6.1.3 Modelo de inducción de dolor crónico: Artritis Inducida por Antígeno

Con el objetivo de evaluar el efecto antinociceptivo y antiinflamatorio de los distintos tratamientos, se empleó el modelo de Artritis Inducida por Antígeno (AIA), en el cual se hace uso del Adyuvante Completo de Freund (CFA). El fundamento de este modelo se describe a continuación.

Fundamento del modelo de inducción del estado artrítico

El modelo de AIA se basa en la inmunización con antígenos exógenos contenidos en el CFA, el cual es una emulsión que contiene aceites minerales (aceite de parafina, monooleato de manida como agente emulsificante) y antígenos, frecuentemente albúmina sérica metilada (mBSA) o micobacterias inactivadas por calor. Un esquema prototipo del uso de CFA para hiperinmunizar animales de experimentación consiste en administrar el CFA con antígeno en uno o varios sitios locales seguido por una o varias inyecciones de refuerzo, cada una de ellas en intervalos establecidos (usualmente una semana entre cada administración) (Billiau, 2001). Es común que las administraciones sean en el espacio intraarticular de la extremidad ipsilateral de los animales de experimentación, mientras que la extremidad contralateral sirve como control negativo de la administración. Esto genera una respuesta inmune y la subsecuente artritis limitada a la articulación administrada por el antígeno (Choudhary,

2018). La AIA crea un estado patológico local transitorio que simula la AR que dura de semanas a meses [Bas et al, 2016], y se desarrolla en dos fases: una inflamación aguda articular e hipertrofia sinovial seguida por una fase de involucramiento óseo (Billiau, 2001). Los ratones expuestos a AIA desarrollan sensibilidad transitoria a estimulación mecánica y a calor en la pata ipsilateral de la articulación de la rodilla inflamada, así como comportamientos de evasión y resguardo (Bas, 2016), conductas que son empleadas para determinar el estado de hiperalgesia. El grado de hipersensibilidad mecánica sigue un curso similar al de la inflamación en la articulación.

6.1.3.1 Inducción del estado artrítico

Se empleó una versión modificada del modelo de inflamación artrítica de la rodilla, previamente validada en diversos laboratorios (figura 5) (Jimenez-Andrade, 2012) (Ghilardi JR, 2012) (Fernandes ES, 2011). Primeramente, los ratones fueron anestesiados con mezcla de ketamina/xilazina (100/ 5 mg/kg vía i.p.). Una vez alcanzado el plano anestésico, el CFA (5 μ L) fue administrado vía intraarticular (femorotibial), en la

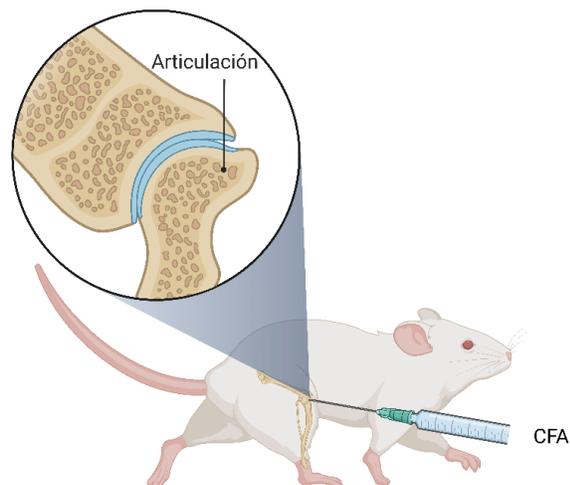


Figura 5. Imagen representativa de la administración intraarticular de CFA/PBS. CFA: Adyuvante completo de Freund; PBS: Solución Buffer de Fosfatos

extremidad posterior derecha de los ratones, proceso repetido de manera espaciada, llevándose a cabo en los días 0, 7, 14 y 21 (4 inyecciones en total). Adicionalmente, se incluyó un grupo control de la administración (control negativo), el cual fue administrado intraarticularmente con PBS, con la finalidad de permitir comparar la evolución del estado artrítico en los ratones administrados con CFA en comparación con este grupo control.

Una vez establecido el proceso artrítico en el día 14 (post administración de CFA), se procedió a la administración de los distintos tratamientos (tabla 2): 1) vehículo, conteniendo aceite de coco, en el cual se encuentran disueltos los cannabinoides (tabla 3) en los siguientes grupos (n=9), 2) CBD (15 mg/kg) (n=12), 3) Combinación THC:CBD 1:1 (THC: 13.5 mg/kg, CBD: 15.7 mg/kg) (n=11) y 4) Combinación THC:CBD 1:3 (THC: 13.5 mg/kg, CBD 41.9 mg/kg) (n=11). Los tratamientos fueron administrados diariamente a la misma hora (7:30 h) vía intraperitoneal de los días 14-26 post administración de CFA.

Tabla 2. Tratamientos administrados

Agente administrado (i.a)	Tratamiento	n	Volumen de administración i.p. (µl)	Concentración de THC (mg/mL)	Concentración de CBD (mg/mL)	Dosis de THC (mg/kg)	Dosis de CBD (mg/kg)
PBS	N/A	9	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
CFA	Vehículo	9	100	N/A	N/A	N/A	N/A
CFA	CBD	12	100	N/A	6	N/A	15
CFA	THC:CBD 1:1	11	100	5.41	6.26	13.5	15.7
CFA	THC:CBD 1:3	11	100	5.38	16.76	13.5	41.9

Concentración de los extractos determinada por medio de cromatografía de líquidos de alta resolución con detección por espectrometría de masas. Dosis estimada para un peso promedio de 40 g por ratón, no se realizó ajuste de dosis. Peso de los ratones previo a la administración de los tratamientos 37.98 ± 3.89 g (media \pm SD). i.p.: Vía intraperitoneal; i.a.: vía intraarticular.

Tabla 3. Cuantificación de contenido de THC y CBD en extractos

Analito	Extracto	Concentración calculada (ng/mL)	Concentración promedio sin factor de dilución (ng/mL)	Concentración promedio x factor de dilución (mg/mL)
CBD	THC:CBD 1:1	0.966	0.9786	6.26304
		0.9533		
	1.0165			
	2.4462			
THC	THC:CBD 1:3	2.7051	2.6188	16.76032
		2.7051		
	0.8706			
	0.8413			
THC	THC:CBD 1:1	0.8234	0.8451	5.40864
		0.8059		
	0.8444			
	0.8731			

Datos obtenidos mediante UPLC acoplada a masas.

6.1.3.2 Evaluación del efecto antinociceptivo y antiinflamatorio

Para la evaluación del efecto antinociceptivo se realizó la determinación de las siguientes conductas asociadas a dolor: 1) número de sacudidas de la extremidad afectada (dolor espontáneo), 2) tiempo de resguardo de la extremidad afectada (tiempo en el que el animal evita su uso) y 3) número de levantamientos verticales (conducta que requiere el uso de ambas extremidades). Las magnitudes de las primeras dos conductas son directamente proporcionales a la nocicepción percibida por los ratones, mientras que el número de levantamientos verticales es inversamente proporcional a la nocicepción. Estos parámetros fueron medidos en los días 0, 1, 5, 8, 12, 15, 19, 22 y 26 posteriores a la primera administración de CFA. Las mediciones del día 0-12 permitieron demostrar el estado basal (día 0), curso y establecimiento del proceso artrítico, mientras que las mediciones de los días 15-26 se emplearon para evaluar el efecto antinociceptivo de los tratamientos. En este último caso, las conductas fueron evaluadas a las 2 horas post administración de los tratamientos, donde se espera encontrar la $C_{m\acute{a}x}$ de los cannabinoides. Estas mismas consideraciones fueron aplicadas para la medición de la acción antiinflamatoria de los compuestos, así como los parámetros indicativos del perfil toxicológico que son descritos posteriormente.

Como medida cuantitativa de la acción antiinflamatoria de los compuestos se determinó el % de incremento de inflamación de la rodilla afectada (ipsilateral) con respecto a la rodilla control (contralateral). Para ello, los ratones fueron anestesiados con isofluorano (5 mg/kg, vía inhalatoria), tras lo cual se empleó un vernier electrónico para la medición por triplicado del ancho y largo de rodilla, tanto de la rodilla posterior administrada con CFA, como de la rodilla contralateral. Estas mediciones fueron determinadas en los días 2, 9, 16 y 23 post administración de CFA para cada grupo evaluado. Los datos por triplicado fueron promediados y empleados para determinar el diámetro de la rodilla ipsilateral y contralateral de acuerdo con la fórmula 1.

$$D = \frac{(A + L)}{2} \qquad \text{Fórmula 1}$$

Donde:

D= Diámetro de rodilla ipsilateral (CFA) o contralateral (control).

A= Promedio de las 3 mediciones de ancho de rodilla ipsilateral o contralateral.

L= Promedio de las 3 mediciones de largo de rodilla ipsilateral o contralateral.

El porcentaje de incremento en la inflamación fue calculado de acuerdo con la fórmula 2.

$$\% \text{ Incremento en la inflamación} = \frac{D_{CFA} - D_{Ctl}}{D_{Ctl}} \times 100 \quad \text{Fórmula 2}$$

Donde:

D_{CFA} = Diámetro de la rodilla administrada con CFA

D_{Ctl} = Diámetro de la rodilla control

6.1.3.3 Evaluación del perfil toxicológico

En roedores, está bien caracterizado que los agonistas del receptor CB1, como lo es el THC, inducen lo que se ha denominado como la "tétrada cannabinoide" que se caracteriza por manifestaciones de antinocicepción, hipotermia, supresión/alteración de la actividad motora (hipolocomoción) y catalepsia (Metna-Laurent M., 2017).

Se evaluaron la hipotermia, hipolocomoción y catalepsia como manifestaciones de toxicidad relacionada con la naturaleza cannabinoide de los tratamientos. Estas manifestaciones fueron determinadas en los días 0, 16, 20 y 24 post administración del CFA, que corresponden con una determinación basal (día 0), y a los días 2, 6 y 10 post administración de los distintos tratamientos.

Evaluación de la hipotermia. La temperatura corporal se determinó por triplicado a través de un termómetro infrarrojo digital Kent Scientific DT-811, el cual mide de manera exacta la temperatura de la piel ($\pm 2\%$ de la lectura o $\pm 4^\circ\text{F}$) la cual, permite estimar cambios en la temperatura de los ratones a causa del efecto de los cannabinoides con mínima invasividad en mediciones repetidas.

Evaluación de la hipolocomoción. Se empleó una versión modificada del paradigma de campo abierto para evaluar la actividad exploratoria horizontal (Morado-Urbina, 2014). Para ello, los ratones fueron colocados en el centro de una cámara de acrílico

rectangular (18 x 27 x 15 cm) dividida en 9 cuadrantes (9 x 6 cm) marcados con líneas en el piso de la cámara, y se cuantificó el número de cruces de cada ratón durante un periodo de observación de 2 minutos, donde un cruce es considerado como aquel en el que el cuerpo total del ratón atraviesa la línea de un cuadrante hacia otro, con las 4 patas del ratón en el nuevo cuadrante al que se atraviesa.

Evaluación de la catalepsia (o inmovilización) se evaluó mediante la prueba de la barra. Para ello, se empleó un dispositivo consistente en una barra redondeada colocada a 12 cm de altura. Los animales fueron sujetos de la base de la cola, de tal modo que se logró asegurar que el ratón colocara ambas patas delanteras en contacto con la barra. Se cronometró la duración del contacto con la barra, deteniendo el ensayo una vez que se retiraron ambas patas (Metna-Laurent M., 2017). El tiempo total (segundos) pasado en contacto con la barra se registró hasta un máximo de 180 s. Los ensayos se repitieron después de 2 minutos para un total de 3 ensayos por prueba. Se utilizó el promedio de los 3 ensayos como medida de la catalepsia.

El esquema general del modelo de AIA empleado, así como de la medición de los parámetros nociceptivos, de inflamación y perfil toxicológico asociados se resumen en la figura 6, todos ellos siendo evaluados a las 2 horas post administración de los tratamientos.

El último día del experimento se procedió a la administración de la última dosis de los tratamientos y tras un lapso de dos horas, se obtuvo una muestra sanguínea pericárdica de cada ratón, misma que fue contenida en microtubos con EDTA como agente anticoagulante. Para ello, los ratones fueron previamente anestesiados con una sobredosis de mezcla de ketamina/xilazina vía intraperitoneal, y una vez alcanzado el plano anestésico se procedió a la obtención de la muestra. Este proceso fue realizado de acuerdo con los lineamientos éticos para la investigación en concordancia con la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. Una vez extraídas las muestras, estas fueron conservadas en ultracongelación (-80°C) hasta el momento de su análisis.

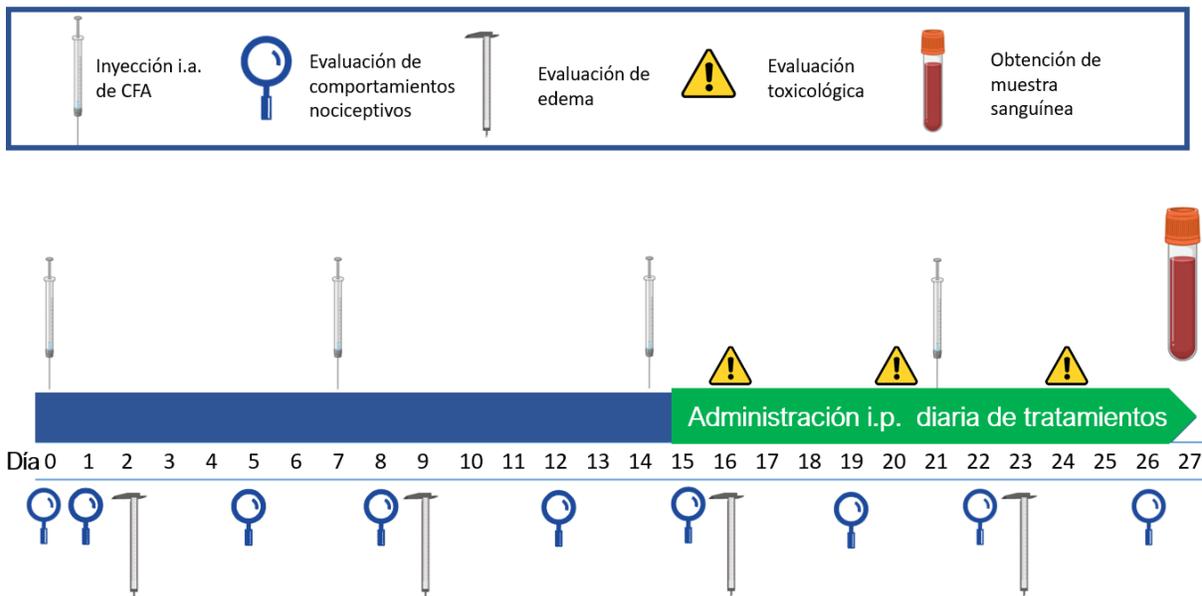


Figura 6. Esquema de inducción de AIA y evaluación de efecto antinociceptivo, antiinflamatorio y tetrada cannabinoide.

6.2 Cuantificación de punto final de los niveles sanguíneos de THC y CBD en el modelo *in vivo*

Las concentraciones de THC y CBD en circulación el último día de la administración de los tratamientos fueron cuantificadas por medio de Cromatografía de Líquidos de Ultra Alta Resolución con detección por Espectrometría de Masas (UPLC-MS).

6.2.1 Fármacos y reactivos

Los estándares de THC y CBD fueron obtenidos como material de referencia certificado y manufacturado por Cerilliant (C-219, Lote FE06162201). Se empleó la mezcla de 8 cannabinoides neutros disueltos en metanol en concentración de 500 µg/mL de cada cannabinoide, siendo estos (-)- δ 8-THC, (-)- δ 9-THC, Cannabidiol (CBD), Cannabigerol (CBG), Cannabinol (CBN), Cannabicromeno (CBC) , Cannabidivarina (CBDV) y tetrahidrocannabivarina (THCV), contenidos en ampula de 1.0 mL.

Se utilizaron acetonitrilo, ácido fórmico, formiato de amonio, n-hexano e isopropanol de la marca Thermo Fisher Scientific grado LC/MS.

6.2.2 Condiciones analíticas

El sistema de UPLC-MS consistió en un Cromatógrafo Acquity Waters con bomba binaria y sample manager, mientras que el detector fue un espectrómetro Acquity Waters TQD (Triple Quadripole Detector). Todos los datos analíticos fueron procesados utilizando el software MassLynx 4.1. Las condiciones cromatográficas se presentan en la tabla 4, mientras que las condiciones del detector, así como las del monitoreo de MRM se muestran en la tabla 5 y 6, respectivamente.

Tabla 4. Condiciones cromatográficas

Fase móvil orgánica (A):	Acetonitrilo	
Fase móvil acuosa (B):	Formiato de amonio 10 mM, pH 3.2 (ajuste con ácido fórmico)	
Proporción de Fase móvil:	A (%)	B (%)
	80	20
Flujo (isocrático)	0.3 mL/min	
Volumen de Inyección:	5 µL	
Tiempo de Corrida:	4.0 min	
Características de la columna:	Acquity UPLC BEH C18 1.7 µm 2.1 x 100 mm	
Temperatura de Columna	50 °C	
Detección:	ESI +	
Tiempo de Retención Analito (CBD):	1.67 (min)	

Tabla 5. Condiciones del detector

Modo (MS o MSMS)	MSMS
Modo de ionización:	ESI +
Voltaje del capilar (kV):	3
Voltaje de cono (V):	20
Extractor (V):	4
RF Lens (V)	0.1
Temperatura de desolvatación (°C):	500
Flujo del gas de desolvatación (L/h):	650
Flujo del gas de cono (L/h):	150
LM Resolution 1:	13
HM Resolution 1:	15
Ion Energy 1:	1
LM Resolution 2:	12
HM Resolution 2:	13
Ion Energy 2:	0.5
Flujo del gas de colisión (mL/min):	0.25
Temperatura de Source (°C):	150
Entrance:	1
Exit:	0.5
Gain:	1

Tabla 6. Condiciones del monitoreo de la reacción múltiple (MRM)

Compuesto	Parent (m/z)	Daughter (m/z)	Dwell (s)	Cono (V)	Colisión (V)
THC	315	193.2	0.061	20	25
CBD	315.2	193.2	0.061	20	25

6.2.3 Preparación de soluciones stock

Se prepararon soluciones stock de 5000 ng/mL y 50000 ng/mL empleando el mix 8 de cannabinoides. A partir de estos se realizaron soluciones estándar de 100, 250, 500, 1500, 3500, 5000, 6500, 7500, 300, 1000, 6000 y 9000 ng/mL, mismos que se utilizaron para construir la curva de calibración en sangre, de tal modo que al adicionar 20 μ L del stock con factor de ajuste a 80 μ L de sangre blanco se alcanzaran las concentraciones de 20, 50, 100, 300, 700, 1000, 1300 y 1500 ng/mL, así como las muestras control baja, media, alta y de dilución, siendo estas 300, 1000, 6000 y 9000 ng/mL, respectivamente.

5.2.4 Procesamiento de la curva de calibración, controles y muestras

Los puntos de la curva de calibración y de las muestras control (20 μ L estándar + 80 μ L sangre blanco), así como las muestras problema (100 μ L) fueron procesadas con una extracción líquido-líquido (Figura 7). Esta consistió en la adición de 200 μ L de isopropanol, seguida de una agitación en vórtex por 30 segundos. Posteriormente, se adicionaron 500 μ L de hexano con agitación en vórtex por 1 min, tras lo cual las muestras fueron centrifugadas por 7 min a 14000 rpm. 300 μ L del sobrenadante fueron transferidos cuidadosamente a un nuevo recipiente con posterior evaporación a sequedad en atmósfera de nitrógeno a 40°C por 10 min. Finalmente, la muestra fue adicionada con 100 μ L de fase de reconstitución acetonitrilo:formiato de amonio 10 mM pH 3.2 (70:30) y mezclada en vórtex por 10 segundos. 5 μ L de la muestra procesada fueron inyectados al sistema cromatográfico.

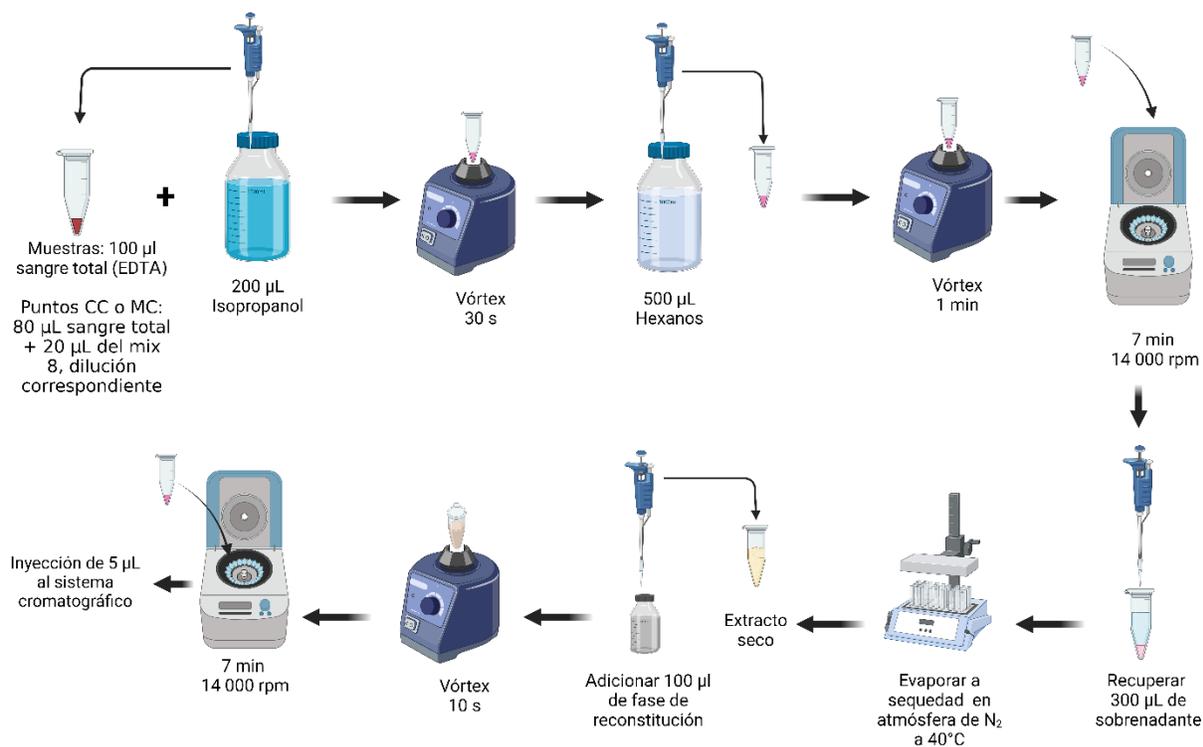


Figura 7. Método de extracción de muestras, puntos de la curva de calibración (CC) y muestras control (MC).

6.2.5 Validación del método

El método analítico fue validado en concordancia con lo estipulado por la Guía ICH, *International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use* (European Medicines Agency, 1995), y de la Normatividad Mexicana correspondiente, la *NOM-177-SSA1-2013*. A continuación, se presentan los parámetros de validación realizados, mientras que los datos obtenidos se muestran en la sección de resultados.

Selectividad

La selectividad del método fue determinada al ensayar 4 muestras de sangre blanco para demostrar que no existen interferencias de compuestos endógenos en la matriz biológica. Las respuestas analíticas cercanas a los tiempos de retención de THC y CBD deben ser menores al 20% de la respuesta del límite inferior de cuantificación (LIC) para ambos analitos.

Linealidad

La linealidad fue demostrada al preparar 8 soluciones estándar dentro del rango de concentración teórico esperado (20-1500 ng/mL). Se realizaron 3 curvas de calibración, incluyendo una muestra blanco de matriz en cada una, en días distintos. Se obtuvo el valor de R^2 para demostrar la bondad del ajuste del modelo matemático, así como la determinación de la ecuación de la recta por medio de regresión lineal empleando el método de mínimos cuadrados con ajuste por ponderación ($weighting = 1/X^2$). Posteriormente, empleando los parámetros de la ecuación de la recta (para cada curva) y las respuestas ($Y=Área$) para cada punto se realizó la cuantificación de la concentración experimental recuperada. De este modo, se determinó el porcentaje de coeficiente de variación para cada punto de las 3 curvas de calibración.

Repetibilidad

Se analizaron por sextuplicado las siguientes muestras control: Límite inferior de cuantificación (LIC), muestras control baja (MCB), media (MCM), alta (MCA) y diluida (MCD). Para cada muestra control se cuantificó la concentración obtenida interpolando su respuesta analítica en la curva de calibración.

Reproducibilidad

Se analizaron por sextuplicado, en tres corridas analíticas distintas las muestras LIC, MCB, MCM y MCA. En cada MC se calculó la concentración recuperada interpolando la respuesta analítica en la curva de calibración.

Exactitud

Con base en los datos obtenidos de repetibilidad y reproducibilidad se calculó la desviación de la concentración obtenida respecto al valor nominal (% de desviación).

6.3 Análisis estadístico

Para cada variable analizada, se realizaron las pruebas de determinación de normalidad Kolmogorov-Smirnov, Shapiro-Wilk, D'Agostino-Pearson y Anderson-

Darling. Cuando las variables resultaron paramétricas los datos fueron expresados como media \pm desviación estándar, mientras que las variables no paramétricas se expresaron como mediana y rango intercuartílico. Con base en ello, se definió el uso de las pruebas estadísticas apropiadas. En todos los casos se considera que existen diferencias estadísticamente significativas para un valor obtenido de $p < 0.05$.

Se utilizó la prueba ANOVA de dos vías con medidas repetidas seguida de post-hoc de Tukey para determinar si existieron diferencias significativas entre los tratamientos evaluados en los diferentes tiempos de evaluación seleccionados para las variables nociceptivas, así como para la determinación del % del efecto antiinflamatorio de los tratamientos administrados en el modelo in vivo. Para cada uno de estos parámetros se determinó el área bajo la curva (AUC) de la respuesta de curso temporal desde el día 0 al día 26 empleando la regla del trapecio. En este caso, el AUC es una medida de resumen que integra las evaluaciones seriadas del criterio de valoración de cada grupo a lo largo de la duración del estudio. Se determinó la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre las AUC por medio de la prueba Kruskal-Wallis con post-hoc de Dunn.

La comparación de las concentraciones alcanzadas de CBD fue realizada con la prueba de Kruskal-Wallis con comparaciones múltiples de Dunn, mientras que para las concentraciones de THC se utilizó ANOVA de una vía con comparaciones múltiples de Tukey.

El análisis de correlaciones entre las distintas variables fue realizado a través de la determinación de r Spearman. En caso de la correlación resultara positiva se empleó un análisis de regresión para evaluar la causalidad de estas correlaciones.

Todos los datos fueron analizados mediante el software estadístico GraphPad Prism version 8, o bien, Excel Microsoft Office 365 (versión 2304 compilación 16.0.16327.20200).

7. Resultados

7.1 Establecimiento del estado artrítico y efecto de la administración repetida de CBD y las combinaciones THC:CBD 1:1 y 1:3 sobre la inflamación

Para demostrar el establecimiento del estado inflamatorio asociado al proceso artrítico en el modelo de Artritis Inducida por Adyuvante (CFA), se obtuvo el % de incremento de inflamación de la rodilla ipsilateral a lo largo del curso temporal del modelo. Las primeras dos mediciones sirven como con este propósito, donde se puede observar que tanto en el día 2 (vehículo $p = 0.0012$, CBD $p < 0.0001$, THC:CBD 1:1 $p < 0.0001$, THC:CBD 1:3 $p = 0.0035$), como en el día 9 (vehículo $p < 0.0001$, CBD $p < 0.0001$, THC:CBD 1:1 $p < 0.0001$, THC:CBD 1:3 $p = 0.0008$) en todos los casos, los grupos que fueron administrados con CFA presentaron un % de incremento en la inflamación estadísticamente significativo en comparación con el grupo control de PBS (**Figura 8**).

Por otro lado, dado que los distintos tratamientos fueron administrados a partir del día 15, las dos mediciones finales del % de inflamación sirven al propósito de evaluar el efecto antiinflamatorio resultante de cada tratamiento; sin embargo, ningún tratamiento disminuyó de manera significativa el % de inflamación en los días 16 (vehículo $p = 0.0095$, CBD $p = 0.0021$, THC:CBD 1:1 $p = 0.0048$, THC:CBD 1:3 $p = 0.0035$) y 23 (vehículo $p < 0.0001$, CBD $p < 0.0001$, THC:CBD 1:1 $p = 0.0002$, THC:CBD 1:3 $p < 0.0001$) (**Figura 8 A**). La inspección del gráfico de AUC del % de aumento en la inflamación (**Figura 8 B**) reafirma los resultados del gráfico de curso temporal, pues existe diferencia estadísticamente significativa en cada grupo (vehículo $p = 0.003$, CBD $p = 0.003$, THC:CBD 1:1 $p = 0.0090$, THC:CBD 1:3 $p = 0.0055$) con respecto al control. De este modo, si bien, no se encontró algún tratamiento con efecto antiinflamatorio, la evidencia sugiere el establecimiento del proceso inflamatorio de carácter artrítico.

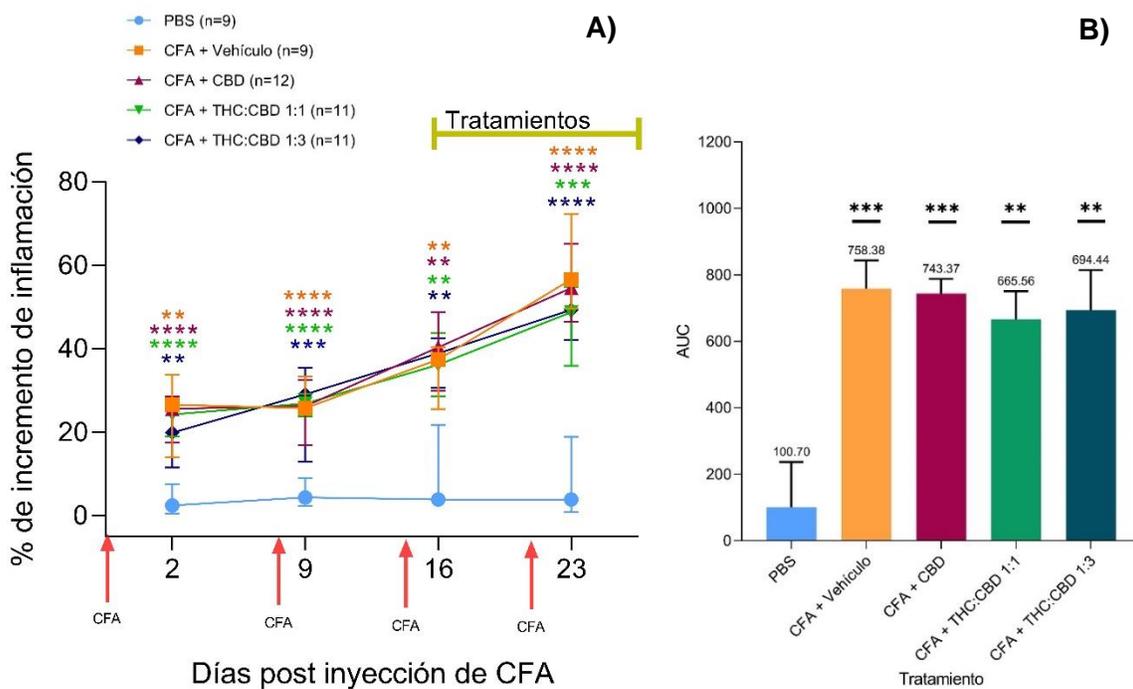


Figura 8. A) Establecimiento del estado artrítico (días 2 y 9) y evaluación del efecto antiinflamatorio (días 16 y 23) de los distintos tratamientos. **B)** Área bajo la curva (AUC) del curso temporal del % de incremento de inflamación. Datos presentados como mediana y rango intercuartílico. A) ANOVA de dos vías con medidas repetidas, comparaciones múltiples de Tukey. B) Kruskal-Wallis, post hoc comparaciones múltiples de Dunn. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ tratamientos vs PBS. Flechas rojas indican los días de administración de CFA.

7.2 Efecto de la administración repetida de CBD y las combinaciones THC:CBD 1:1 y 1:3 sobre las conductas indicativas de dolor

Los datos obtenidos el día 0 (**Figura 9 A**) representan el parámetro basal de levantamientos verticales previo a la administración de CFA o PBS, donde resulta relevante que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos (CFA + vehículo vs PBS $p = 0.9345$, CFA + CBD vs PBS $p = 0.9771$, CFA + THC:CBD 1:1 vs PBS $p = 0.9962$, CFA + THC:CBD vs PBS 1:3 $p = 0.8939$, CFA + vehículo vs CFA + CBD $p = 0.9988$, CFA + vehículo vs CFA + THC:CBD 1:1 $p = 0.9727$, CFA + vehículo vs CFA + THC:CBD 1:3 $p = 0.6306$, CBD + vehículo vs CFA + THC:CBD 1:1 $p = 0.9963$, CBD + vehículo vs CFA + THC:CBD 1:3 $p = 0.6637$, CFA + THC:CBD 1:1 vs CFA + THC:CBD 1:3 $p = 0.5978$) antes de la inducción del estado artrítico.

Los levantamientos correspondientes a los días 1, 5, 8 y 12 muestran la diferencia entre la nocicepción presente en los ratones administrados como control (PBS) y aquellos que se encontraban en proceso de inducción de artritis (CFA), por lo que se esperaba que existieran diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de CFA vs PBS, sin embargo, este no fue el resultado que arrojó el experimento, pues se observa que, si bien, el número de levantamientos decrece a medida que transcurre el tiempo ($p < 0.0001$) y, por lo tanto, aumenta el número de administraciones recibidas de CFA, este mismo comportamiento es experimentado por el grupo de PBS, por lo que esta conducta no muestra que la administración repetida de CFA provoque una mayor hipersensibilidad en comparación al control de administración (**Figura 9 A**).

De este modo, una vez que se inició con la administración de tratamientos diarios (día 15) no se logró percibir cambios en los levantamientos verticales (tratamiento $p = 0.8297$), situación que continuó hasta el último día del experimento. La inspección del gráfico del área bajo la curva (**Figura 9 B**) revela una tendencia al aumento del número de levantamientos en el grupo que recibió el tratamiento con CBD, sin embargo, este aumento no fue significativo ($p = 0.6316$, Kruskal-Wallis) (CFA + vehículo vs PBS $p > 0.9999$, CFA + CBD vs CFA vehículo $p > 0.9999$). Estos datos pueden implicar que, por sí sola, la punción intraarticular genera un estado de hipersensibilidad tal que no permite distinguir entre aquellos ratones que padecen o no el proceso artrítico, esto respecto al uso sostenido de ambas extremidades traseras al cargar el peso total del ratón sobre ellas, por lo que esta conducta tampoco posibilita la discriminación entre los efectos antinociceptivos de los distintos tratamientos.

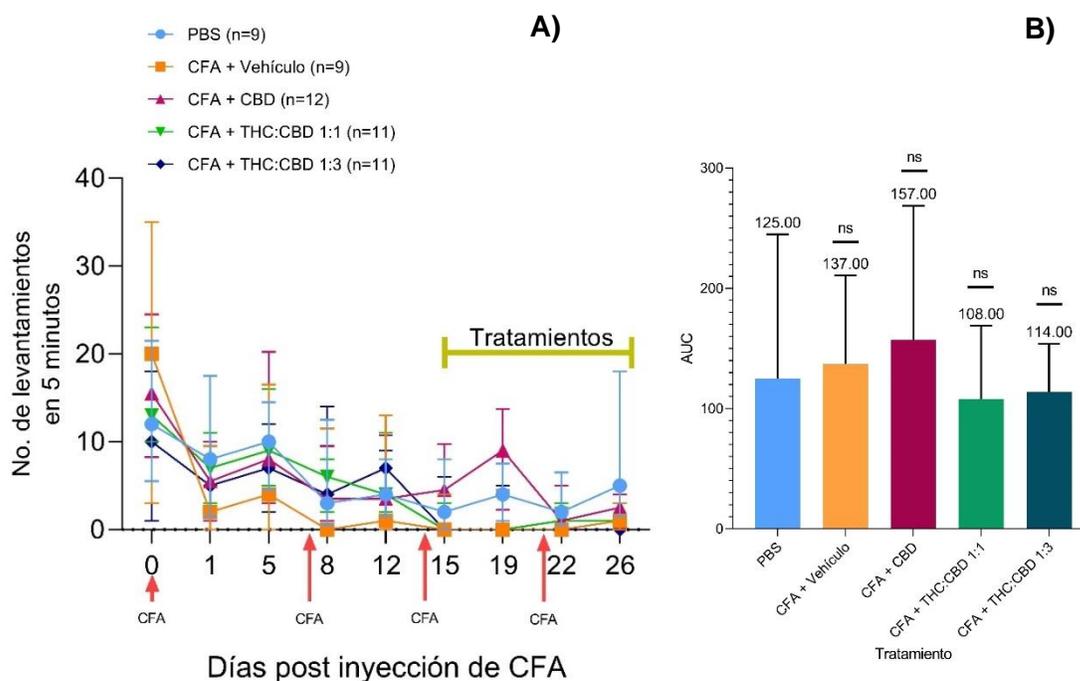


Figura 9. A) Curso temporal de la actividad exploratoria vertical a través del número de levantamientos. Establecimiento del estado artrítico (días 1, 5, 8 y 12) y evaluación del efecto antinociceptivo (días 15, 19, 22 y 26) de los distintos tratamientos. **B)** Área bajo la curva (AUC) del curso temporal del número de levantamientos. Datos presentados como mediana y rango intercuartílico. A) ANOVA de dos vías con medidas repetidas, comparaciones múltiples de Tukey. B) Kruskal-Wallis, post hoc comparaciones múltiples de Dunn. * $p < 0.05$, ns= diferencia no significativa tratamientos vs PBS. Flechas rojas indican los días de administración de CFA.

El tiempo de resguardo de la extremidad afectada es un parámetro que indica la intención del animal por evadir la alodinia mecánica. En el gráfico de curso temporal del tiempo de resguardo (**Figura 10 A**) el día 0 representa el estado basal, donde no se presenta la conducta de resguardo en ninguno de los grupos, mientras que los días 1, 5, 8 y 12 muestran el efecto que tiene la administración de CFA sobre el tiempo de resguardo con respecto al grupo control.

A partir del día 15 se indican los resultados asociados al efecto antinociceptivo de los distintos tratamientos sobre el tiempo de resguardo; sin embargo, la variabilidad de respuesta entre los sujetos de estudio es tal (variabilidad = 16.64%, $p < 0.0001$) que gráficamente no permite observar diferencias estadísticamente significativas entre ninguno de los tratamientos, a pesar de que la prueba de Kruskal-Wallis arroje un

resultado estadísticamente significativo en cuanto al efecto del tratamiento ($p = 0.0226$). Por otro lado, el análisis del área bajo la curva (**Figura 10 B**) muestra cómo el tiempo de resguardo fue significativamente mayor para los tratamientos con vehículo ($p = 0.0059$), THC:CBD 1:1 ($p = 0.0155$) y THC:CBD 1:3 ($p = 0.0036$) con respecto al control de la administración, mientras que el grupo que recibió CBD no resultó en diferencias significativas respecto al control de PBS ($p = 0.0559$). Esto indica que, de los distintos tratamientos ensayados, el único que presenta una acción antinociceptiva significativa es el de CBD (individual), a tal grado que reduce el tiempo de resguardo a un nivel comparable con el control.

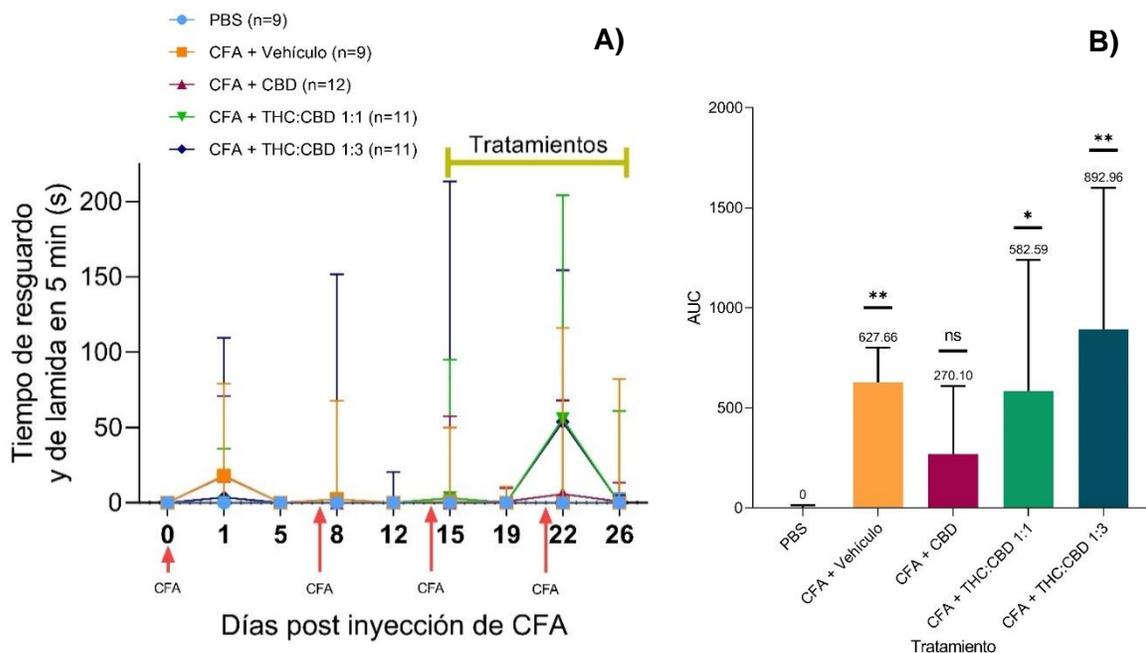


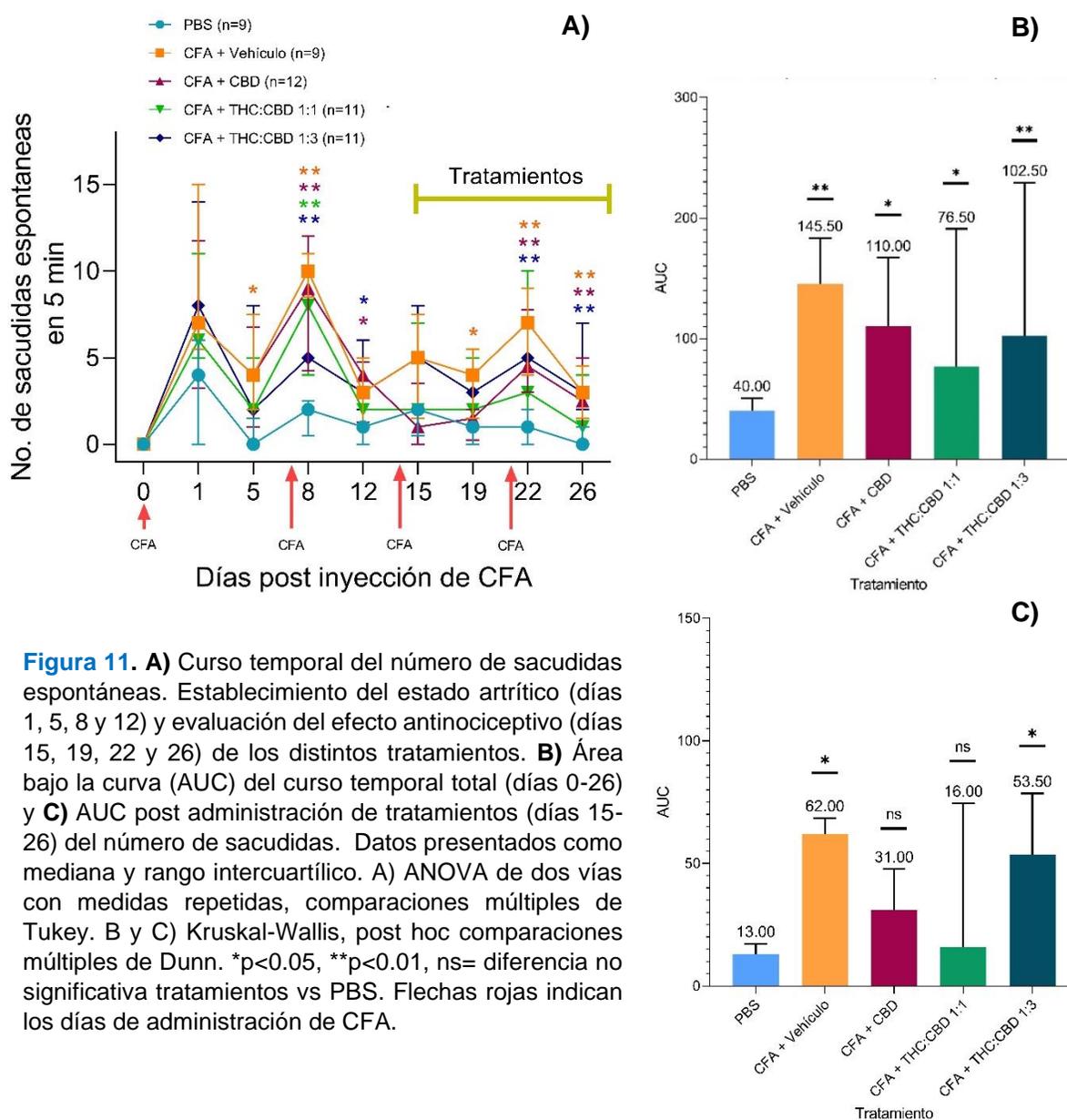
Figura 10. A) Curso temporal del tiempo de resguardo. Establecimiento del estado artrítico (días 1, 5, 8 y 12) y evaluación del efecto antinociceptivo (días 15, 19, 22 y 26) de los distintos tratamientos. **B)** Área bajo la curva (AUC) del curso temporal del tiempo de resguardo. Datos presentados como mediana y rango intercuartílico. A) ANOVA de dos vías con medidas repetidas, comparaciones múltiples de Tukey. B) Kruskal-Wallis, post hoc comparaciones múltiples de Dunn. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ ns= diferencia no significativa tratamientos vs PBS. Flechas rojas indican los días de administración de CFA.

El número de sacudidas de la extremidad ipsilateral es un parámetro que refleja el dolor espontáneo de los ratones. El gráfico del curso temporal de esta conducta (**Figura 11 A**) muestra cómo al inicio del experimento no existieron diferencias

significativas entre los distintos grupos (Día 1: CFA + vehículo vs PBS $p = 0.0561$, CFA + CBD vs PBS $p = 0.1442$, CFA + THC:CBD 1:1 vs PBS $p = 0.0625$, CFA + THC:CBD vs PBS 1:3 $p = 0.1188$, CFA + vehículo vs CFA + CBD $p = 0.9143$, CFA + vehículo vs CFA + THC:CBD 1:1 $p = 0.9675$, CFA + vehículo vs CFA + THC:CBD 1:3 $p > 0.9999$, CBD + vehículo vs CFA + THC:CBD 1:1 $p = 0.9988$, CBD + vehículo vs CFA + THC:CBD 1:3 $p = 0.9515$, CFA + THC:CBD 1:1 vs CFA + THC:CBD 1:3 $p = 0.9839$) previo al establecimiento del estado artrítico; sin embargo, al aumentar el número de administraciones intraarticulares ($p < 0.0001$), aquellos grupos que recibieron CFA presentaron un aumento significativo en el número de sacudidas en comparación con el grupo control, teniendo su pico en el día 8 (CFA + vehículo vs PBS $p = 0.0017$, CFA + CBD vs PBS $p = 0.0015$, CFA + THC:CBD 1:1 vs PBS $p = 0.0062$, CFA + THC:CBD vs PBS 1:3 $p = 0.0456$).

En cuanto al efecto de los tratamientos sobre el número de sacudidas, se observó un efecto significativo ($p = 0.0040$) con interacción sobre el tiempo ($p < 0.0101$). A través de comparaciones múltiples es posible distinguir cómo el primer día de administración de tratamientos no hubo diferencias significativas entre los grupos que recibieron tratamiento y el control de PBS (CFA + vehículo vs PBS $p = 0.1128$, CFA + CBD vs PBS $p = 0.9925$, CFA + THC:CBD 1:1 vs PBS $p = 0.6150$, CFA + THC:CBD vs PBS 1:3 $p = 0.1482$), lo que indica que ese día la nocicepción de los grupos inducidos con el estado artrítico fue mínimo con una respuesta equiparable a la del control. El día 19 esta situación se mantuvo excepto para el grupo vehículo ($p = 0.0327$), y para el día 22 y 26, todos los grupos presentaban diferencias significativas respecto al grupo control, excepto el grupo que recibió THC:CBD 1:1, que siguió manteniendo un perfil equiparable al control de administración (día 22 $p = 0.1622$, día 26 $p = 0.2341$ vs PBS). En cuanto al área bajo la curva (**Fig 11 B**), se muestra que, a lo largo de los 26 días de seguimiento de la conducta nociceptiva, ninguno de los grupos tiene una reducción significativa del número de sacudidas, pues presentan una respuesta mayor ($p = 0.0011$). Sin embargo, dado que el gráfico de curso temporal sugiere un efecto de disminución de la nocicepción en los grupos que recibieron los tratamientos se decidió

analizar el AUC del número de sacudidas entre los días 15 y 26 (administración de tratamientos) (**Fig. 11 C**) y los resultados muestran que los tratamientos con CBD y la combinación THC:CBD 1:1 muestran una reducción de las sacudidas de forma que no se encuentran diferencias entre la respuesta de estos grupos y el control de PBS (CFA + CBD vs PBS $p = 0.2994$, CFA + THC:CBD 1:1 vs PBS $p = 0.6903$). En conjunto, estos datos conducen a la conclusión de que el tratamiento más efectivo para reducir la nocicepción medida a través del número de sacudidas espontáneas es el tratamiento con THC:CBD 1:1, seguido por el CBD administrado individualmente.

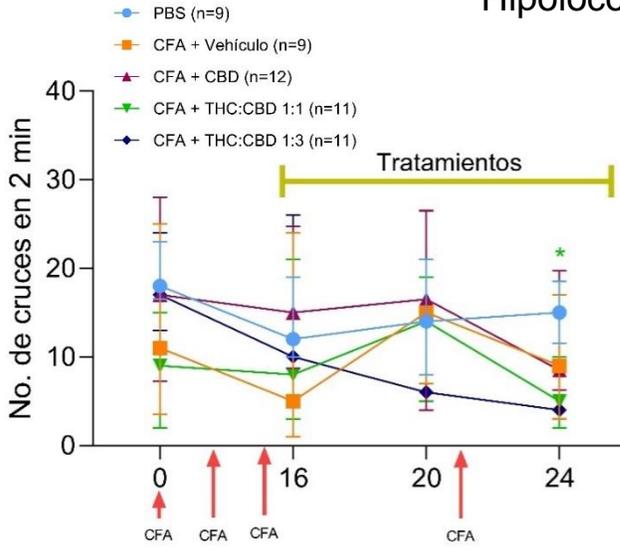


7.3 Perfil toxicológico asociado a la administración repetida de CBD y las combinaciones THC:CBD 1:1 y 1:3

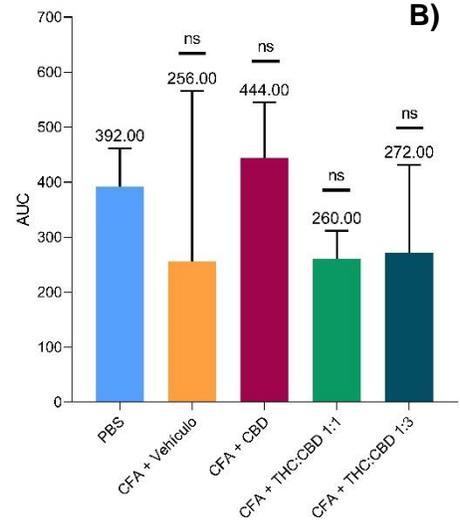
La tétrada inducida por cannabinoides es un modelo preclínico comúnmente empleado para evaluar los efectos de los agonistas del receptor CB1 en roedores (Metna-Laurent M., 2017). A las dosis empleadas de los tratamientos de CBD, THC:CBD 1:1 y THC:CBD 1:3 no se encontraron diferencias significativas entre estos y los controles de vehículo y PBS, tanto en el gráfico de curso temporal (**Figura 12 A, C, E**) como en el AUC (**Figura 12 B, D, F**), medido a través del número de cruces (actividad locomotora) (Curso temporal $p = 0.3776$, AUC $p = 0.3546$), tiempo de contacto con la barra (catalepsia) (curso temporal $p = 0.4812$, AUC $p = 0.2264$) y temperatura (curso temporal $p = 0.7621$, AUC $p = 0.5372$) o % cambio en la temperatura ($p = 0.5561$) (**Figura 11 G**). De modo que, dentro de las dosis y tratamientos evaluados, ninguno presentó un perfil toxicológico relevante.

Por otro lado, se investigó el efecto de los tratamientos sobre el cambio de peso de los ratones, puesto que investigaciones previas han mostrado que mientras los agonistas de CB1, tales como THC, estimulan el apetito cuando son administrados de manera aguda, su administración crónica diaria suprime el aumento de peso, el aumento de grasa corporal y disminuye la ingesta calórica de ratas obesas. (Farokhnia, 2020). En este estudio, se registraron los pesos a medida que los ratones crecían y el aumento de peso fue consistente con la edad de los ratones; sin embargo, una vez que se iniciaron los tratamientos, se observó un decremento de peso en aquellos grupos que fueron administrados con las combinaciones THC:CBD 1:1 y 1:3, (**Figura 13 A**) aunque esta reducción no fue estadísticamente significativa ($p = 0.5679$). No obstante, el análisis del % de cambio de peso en las dos semanas en las que se administraron los tratamientos, sí revela una disminución significativa de peso en la semana 1 (post administración de cannabinoides) ($p < 0.0001$) en los grupos administrados con THC:CBD 1:1 y 1:3 ($p < 0.0001$ THC:CBD 1:1 y 1:3 vs PBS) (**Figura 13 B**).

Hipolocomoción

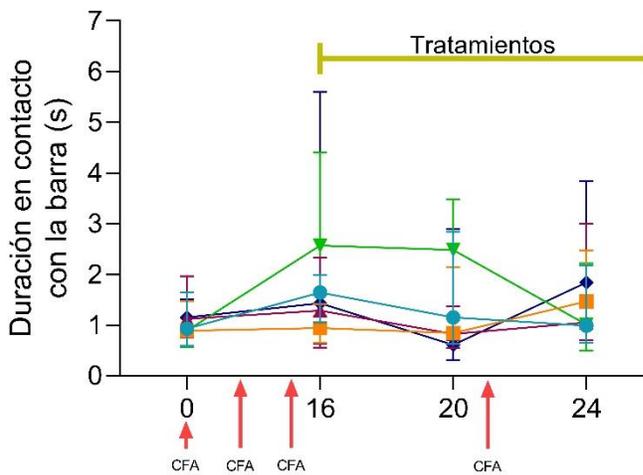


A)

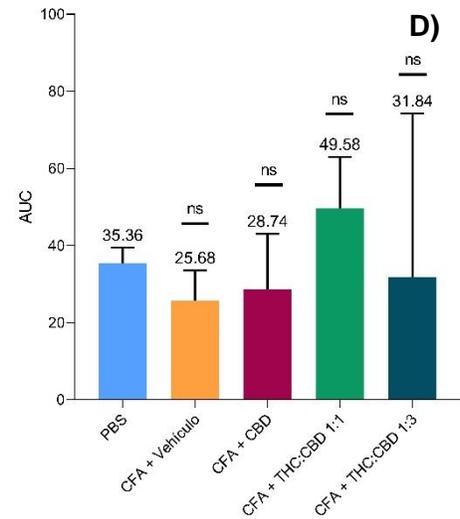


B)

Catalepsia

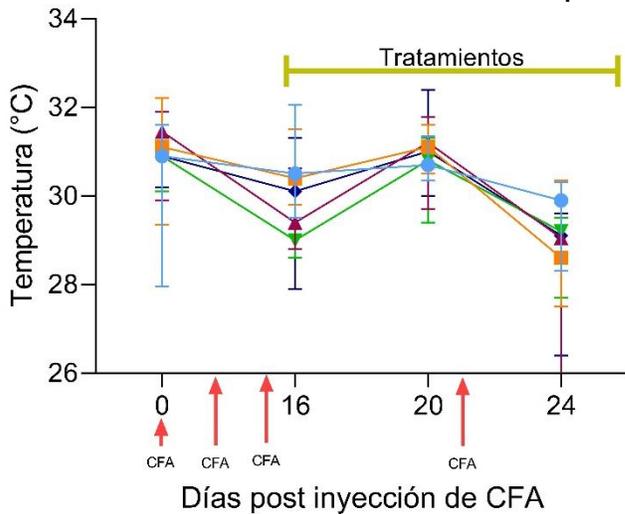


C)

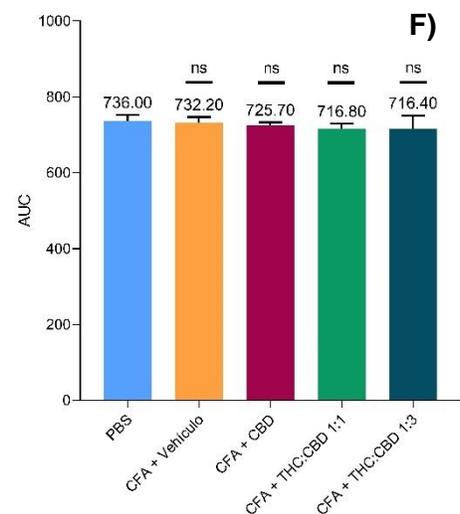


D)

Hipotermia



E)



F)

Días post inyección de CFA

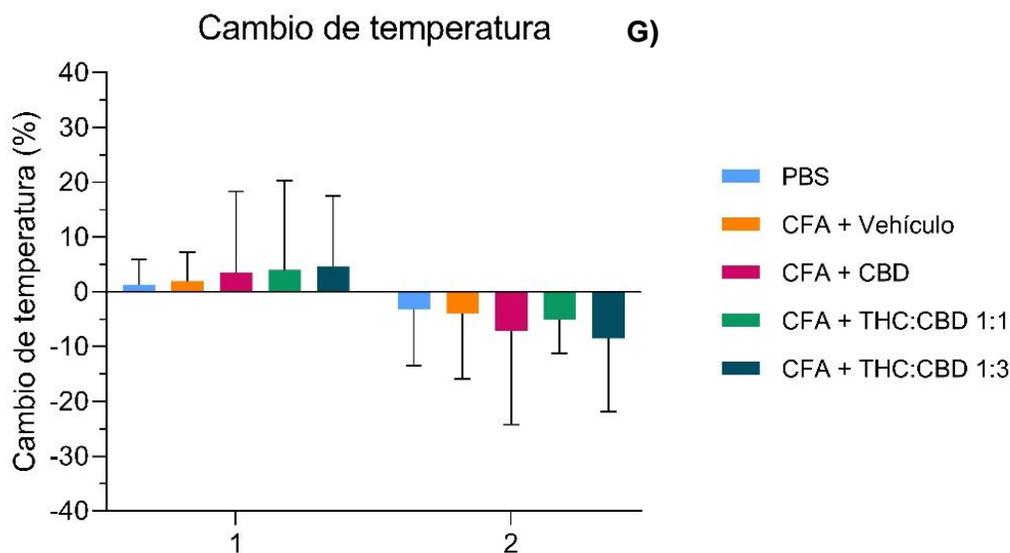


Figura 12. Curso temporal del perfil toxicológico a través de la tétrada cannabinoide A) hipolocomoción, C) catalepsia y E) hipotermia. Área bajo la curva (AUC) del curso temporal B) hipolocomoción, D) catalepsia y F) hipotermia. G) Cambio de temperatura en las dos semanas de administración de los tratamientos. Datos presentados como mediana y rango intercuartílico. A, C, E y G) ANOVA de dos vías con medidas repetidas, comparaciones múltiples de Tukey. B, D y F) Kruskal-Wallis, post hoc comparaciones múltiples de Dunn. * $p < 0.05$, ns= diferencia no significativa. Flechas rojas indican los días de administración de CFA.

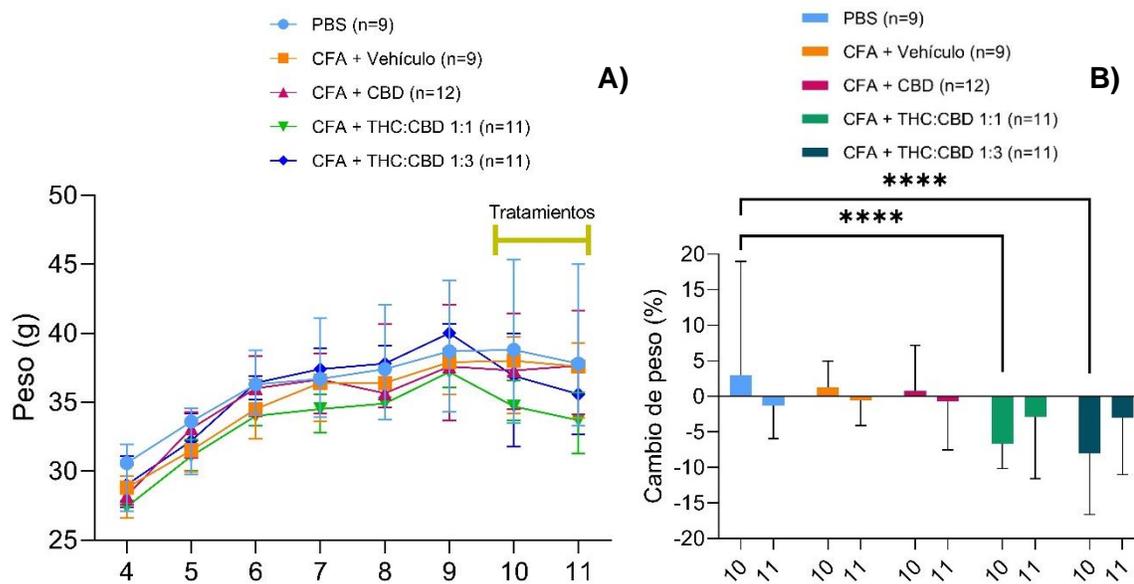
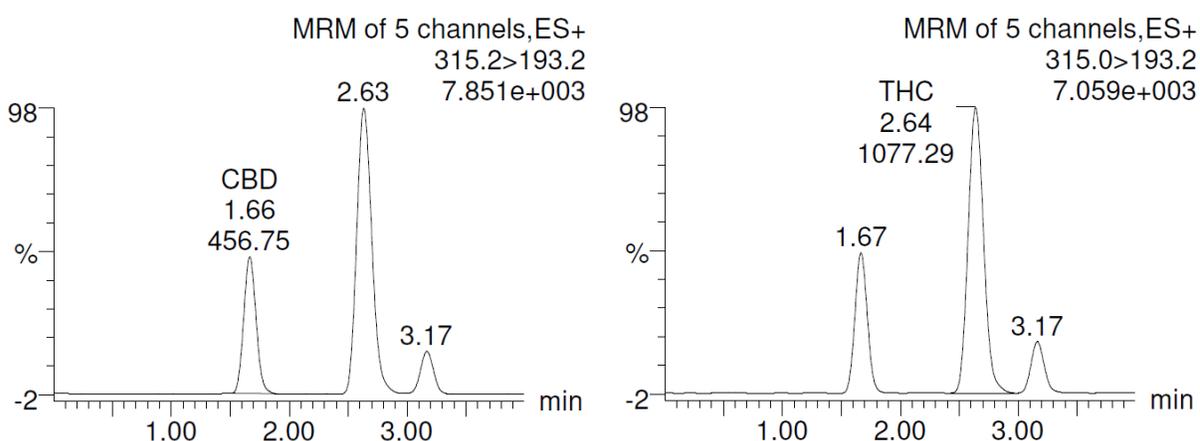


Figura 13. Peso de los ratones A) curso temporal, siendo las semanas 10 y 11 las correspondientes a la administración de tratamientos, B) % de cambio de peso en las semanas 10 y 11. Datos representadas como la media y el rango intercuartílico. ANOVA de dos vías con medidas repetidas, comparaciones múltiples de Tukey. **** $p < 0.0001$.

7.4 Validación del método analítico para la cuantificación de THC y CBD en sangre total (EDTA) de ratón por UPLC-MS/MS

Con el objetivo de determinar las concentraciones sanguíneas de THC y CBD en las muestras de ratón extraídas el último día del experimento, se realizó la validación del método analítico empleado bajo las condiciones detalladas en la sección de métodos.

En primer lugar, se demostró la selectividad del método analítico en la matriz blanco, siendo sangre total humana. En principio, dado que las muestras para analizar fueron muestras de sangre total de ratón, se podría haber realizado la validación en sangre de ratón; sin embargo, la cantidad de sangre blanco de ratón que se tenía a disposición era limitada, por lo que se realizaron pruebas para evaluar si existían diferencias entre las respuestas en sangre humana vs sangre de ratón, y se encontró que no existieron diferencias entre ambos. De este modo, se procedió a realizar la validación en sangre humana. En la **figura 14** se muestran los cromatogramas ilustrativos obtenidos para todos los analitos en el MIX de cannabinoides, donde se observa que los tiempos de retención de THC y CBD se encuentran con una amplia separación entre sí y que los otros cannabinoides presentes en el MIX de estándares no se traslapan con los picos de los compuestos de interés.



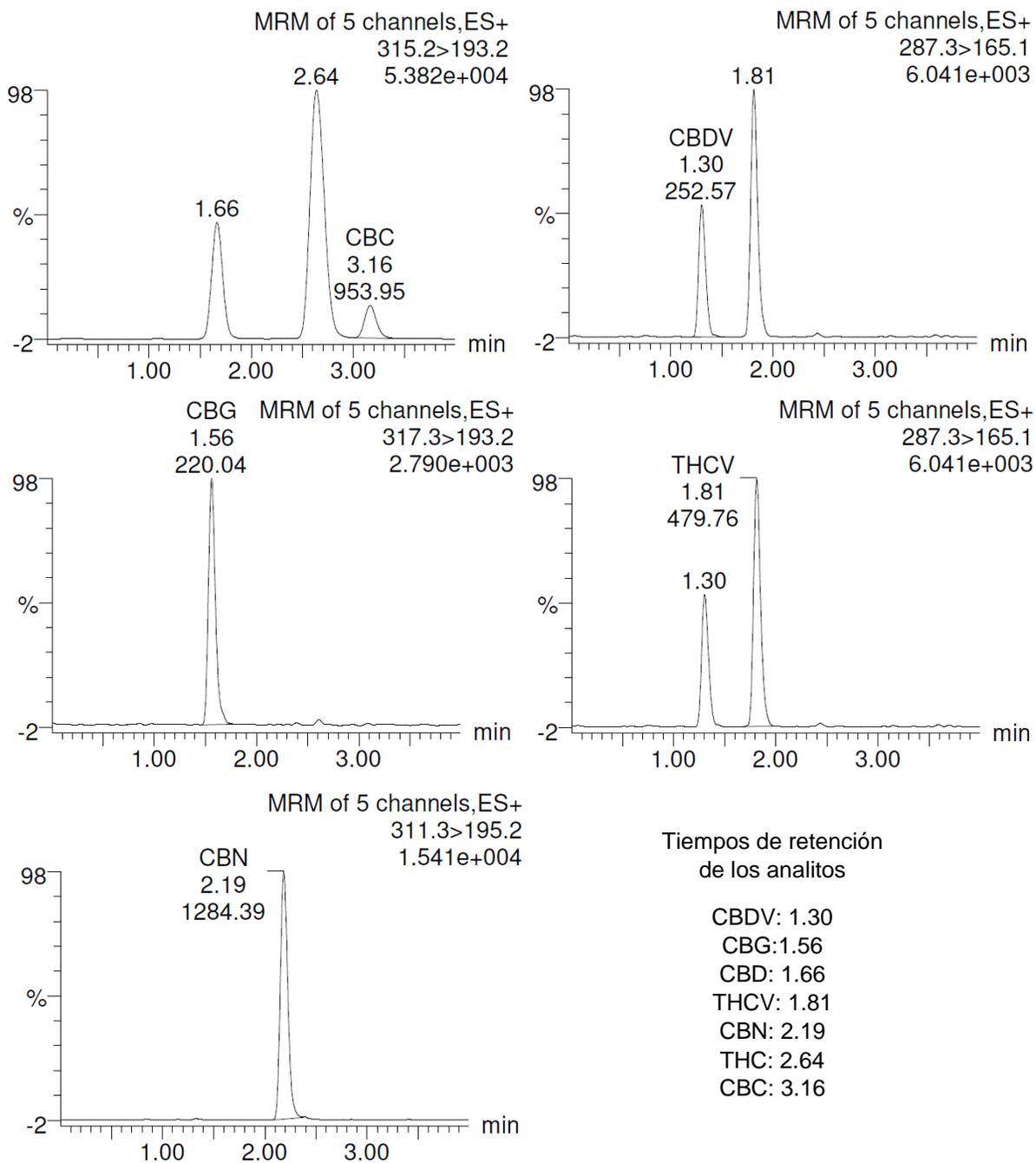


Figura 14. Cromatogramas representativos para los distintos cannabinoides. THC: (-)- δ^9 -Tetrahidrocannabinol, CBD: Cannabidiol; CBG: Cannabigerol; CBN: Cannabinol; CBC: Cannabicromeno; CBDV: Cannabidivarina; THCv: tetrahidrocannabivarina.

En las **tablas 7 y 8**, se presentan los datos obtenidos respecto a la selectividad en la matriz biológica para THC y CBD, respectivamente, donde se hace notar que no existe interferencia de los compuestos endógenos de la muestra biológica sobre la respuesta de los analitos a cuantificar.

Tabla 7. Selectividad en matriz biológica del método para cuantificación de THC

	RT (min)	Respuesta (Área)
Blanco 1	N/A	0
Blanco 2	N/A	0
Blanco 3	N/A	0
Blanco 4	N/A	0
LIC 1	1.66	117.505
LIC 2	1.66	137.222
LIC 3	1.66	138.913
LIC 4	1.66	142.58

La respuesta analítica de las interferencias próximas al tiempo de retención debe ser menor al 20% del LIC del analito. LIC: Límite inferior de cuantificación.

Tabla 8. Selectividad en matriz biológica del método para cuantificación de CBD

	RT (min)	Respuesta (Área)
Blanco 1	N/A	0
Blanco 2	N/A	0
Blanco 3	N/A	0
Blanco 4	N/A	0
LIC 1	1.66	60.297
LIC 2	1.66	65.664
LIC 3	1.66	57.08
LIC 4	1.66	70.925

La respuesta analítica de las interferencias próximas al tiempo de retención debe ser menor al 20% del LIC del analito. LIC: Límite inferior de cuantificación.

Respecto a la linealidad del método, se determinó que este fuera lineal en el rango de 20 a 1800 ng/mL. Para ello, se realizaron 3 curvas de calibración independientes (**Figura 15**) en días distintos, y se determinó que todas ellas cumplen con los requisitos establecidos por la normatividad aplicable, por lo que el método es lineal en el rango establecido (**tablas 9 y 10**).

Por otro lado, para evaluar la precisión del método se demostró la repetibilidad y reproducibilidad de este al cumplirse los límites del porcentaje de coeficiente de variación (%CV) para ambos parámetros (**tablas 11, 12, 13 y 14**) y, posteriormente, se emplearon estos datos para calcular la concentración de THC y CBD para demostrar la exactitud del método validado al calcularse el % de desviación de la concentración obtenida (**tablas 13 y 14**).

De tal forma, al cumplir con los criterios estipulados por la *NOM-177-SSA1-2013*, se puede concluir que el método utilizado para la cuantificación de THC y CBD en sangre total (EDTA) por medio de UPLC acoplado a masas/masas es selectivo, lineal, preciso y exacto bajo las condiciones empleadas.

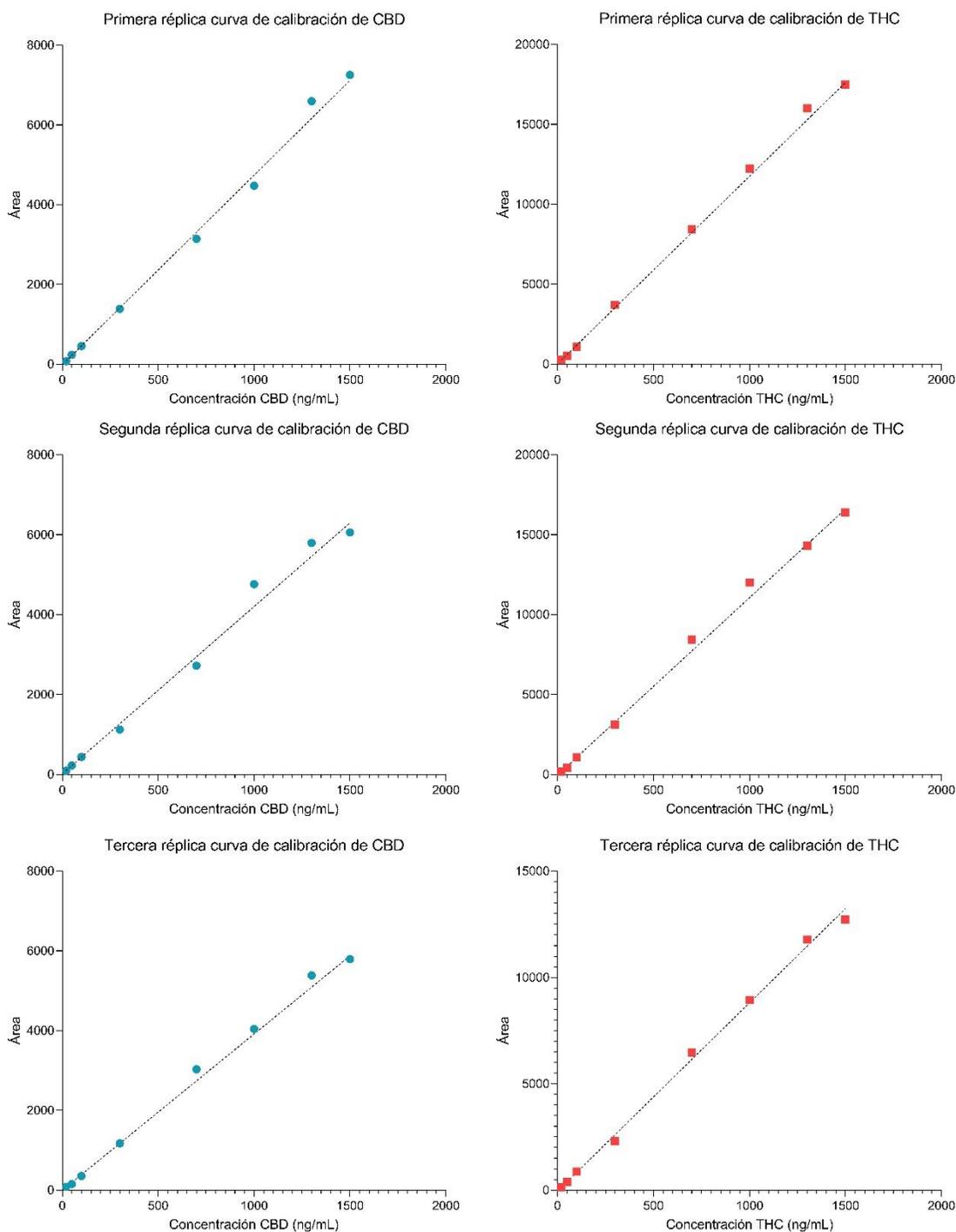


Figura 15. Linealidad del método. Curvas de calibración independientes para THC y CBD.

Tabla 9. Linealidad del método analítico para cuantificación de THC

Criterio de aceptación		Resultado		
% desviación de la concentración recuperada		% Desv. Curva 1	% Desv. Curva 2	% Desv. Curva 3
CC1	<20%	6.87	0.79	-1.15
CC2		-14.18	-19.32	2.38
CC3		-8.88	-3.04	3.72
CC4		5.25	-6.77	-10.80
CC5	<15%	2.73	7.16	5.42
CC6		4.09	6.88	1.53
CC7		4.78	-2.11	2.80
CC8		-0.66	-2.90	-3.90
Al menos el 75% de los puntos de la CC (6 de 8) deben cumplir con los criterios de concentración recuperada. No excluir los extremos (CC1 y CC8). Del total de las curvas evaluadas, al menos el 50% de cada nivel de concentración debe cumplir con los criterios.				
Coeficiente de determinación (r ²)	≥ 0.99	0.9927	0.9968	0.9965

Tabla 10. Linealidad del método analítico para cuantificación de CBD

Criterio de aceptación		Resultado		
% desviación de la concentración recuperada		% Desv. Curva 1	% Desv. Curva 2	% Desv. Curva 3
CC1	<20%	-1.96	-0.63	2.02
CC2		5.71	2.40	-22.05
CC3		-0.47	1.70	-10.93
CC4		-1.73	-11.50	-1.98
CC5	<15%	-5.01	-7.66	8.64
CC6		-5.51	13.39	1.47
CC7		7.00	6.11	3.89
CC8		1.97	-3.82	-3.11
Al menos el 75% de los puntos de la CC (6 de 8) deben cumplir con los criterios de concentración recuperada. No excluir los extremos (CC1 y CC8). Del total de las curvas evaluadas, al menos el 50% de cada nivel de concentración debe cumplir con los criterios.				
Coeficiente de determinación (r ²)	≥ 0.99	0.9973	0.9922	0.9957

Tabla 11. Repetibilidad del método analítico para cuantificación de THC

Criterio de aceptación			Resultado						
% desviación de la concentración recuperada en las MC	% CV	% CV	% desviación obtenido						% CV obtenido
			Número de repetición						
			1	2	3	4	5	6	
MCLIC	<20%	<20%	-7.80	14.53	-25.44	-10.99	0.85	-7.31	13.62
MCB	<15%	<15%	2.47	10.30	-4.34	3.95	-0.22	-9.61	6.79
MCM	<15%	<15%	5.81	-9.00	-0.74	-1.52	-5.85	-30.94	13.66
MCA	<15%	<15%	-12.63	-3.55	-2.86	-4.95	-7.56	-30.84	11.85
MCD	<15%	<15%	-6.03	-17.07	-13.32	-19.30	6.46	-2.80	11.03

El 75% del total de las muestras control y el 50% de cada nivel deben cumplir con el % de Desv.

MCLIC: Muestra control límite inferior de cuantificación; MCB: Muestra control baja; MCM: Muestra control media; MCA: Muestra control alta; MCD: Muestra control diluida.

Tabla 12. Repetibilidad del método analítico para cuantificación de CBD

Criterio de aceptación			Resultado						
% desviación de la concentración recuperada en las MC	% CV	% CV	% desviación obtenido						% CV obtenido
			Número de repetición						
			1	2	3	4	5	6	
MCLIC	<20%	<20%	-5.75	21.87	7.33	13.40	20.30	17.02	10.84
MCB	<15%	<15%	1.41	12.37	3.61	8.37	22.48	6.05	7.36
MCM	<15%	<15%	0.34	0.11	-1.67	-2.71	-3.57	1.15	1.93
MCA	<15%	<15%	3.99	-7.73	-1.35	-11.55	1.33	-5.57	6.08
MCD	<15%	<15%	-3.09	23.14	-3.69	-5.38	3.08	-4.38	10.74

El 75% del total de las muestras control y el 50% de cada nivel deben cumplir con el % de Desv.

MCLIC: Muestra control límite inferior de cuantificación; MCB: Muestra control baja; MCM: Muestra control media; MCA: Muestra control alta; MCD: Muestra control diluida.

Tabla 13. Reproducibilidad y exactitud del método analítico para cuantificación de THC

	Resultado			
	MCLIC % Desv	MCB % Desv	MCM % Desv	MCA % Desv
Día 1	1.48	7.69	-4.68	-7.79
	5.23	-4.82	-2.82	-23.79
	14.25	-4.74	1.20	-8.00
	-18.51	1.97	-3.08	-21.75
	-9.93	-17.81	-11.27	-6.17
	-0.99	-0.16	-4.13	-4.28
Día 2	-23.19	10.47	-0.29	-2.45
	-8.12	-8.04	-16.35	10.58
	5.18	-11.60	-14.71	-1.76
	2.08	3.45	-4.46	-25.47
	-14.91	0.45	5.05	-10.58
	-13.81	4.30	-5.26	0.86
Día 3	-6.94	3.08	-6.06	-7.03
	-12.22	9.84	-15.45	-8.56
	-17.27	-7.25	-8.38	-10.86
	-15.85	-2.85	-8.32	-7.57
	-13.44	5.13	-11.94	-2.55
	11.49	-11.36	-6.31	-11.66
% CV	11.71	10.12	6.22	9.58
% Desv. Prom.	-6.42	-1.24	-6.51	-8.27
Criterio % Desv.	< 20%	< 15%	< 15%	< 15%
Criterio % CV	< 20%	< 15%	< 15%	< 15%

El 75% del total de las muestras control y el 50% de cada nivel deben cumplir con el % de Desv.

MCLIC: Muestra control límite inferior de cuantificación; MCB: Muestra control baja; MCM: Muestra control media; MCA: Muestra control alta.

Tabla 14. Reproducibilidad y exactitud del método analítico para cuantificación de CBD

	Resultado			
	MCLIC % Desv	MCB % Desv	MCM % Desv	MCA % Desv
Día 1	36.96	8.58	7.52	-4.18
	-13.92	13.49	19.39	-19.52
	33.22	4.75	5.17	-1.40
	-2.52	0.68	14.72	-8.31
	2.84	19.26	25.56	0.10
	0.13	-1.63	12.96	-2.58
Día 2	33.82	4.95	7.26	9.79
	-6.66	25.35	-2.57	3.87
	-6.44	10.36	4.51	14.28
	4.84	8.60	15.68	8.32
	9.27	-6.24	-7.43	18.52
	-37.13	12.24	1.02	12.61
Día 3	24.29	19.13	1.45	-10.13
	0.45	-12.28	-16.33	-11.73
	-6.39	-0.99	-9.31	-10.47
	8.64	-2.29	-16.93	-5.10
	15.42	7.08	-12.40	-12.63
	35.43	0.89	-0.04	-5.00
% CV	18.39	9.04	11.88	10.69
% Desv. Prom.	7.35	6.22	2.79	-1.31
Criterio % Desv.	< 20%	< 15%	< 15%	< 15%
Criterio % CV	< 20%	< 15%	< 15%	< 15%

El 75% del total de las muestras control y el 50% de cada nivel deben cumplir con el % de Desv.

MCLIC: Muestra control límite inferior de cuantificación; MCB: Muestra control baja; MCM: Muestra control media; MCA: Muestra control alta.

7.5 Concentraciones sanguíneas de THC y CBD asociadas a la respuesta antinociceptiva y el perfil toxicológico *in vivo*

Una vez que se contó con el método validado para la cuantificación de THC y CBD en muestras de sangre se procedió a la detección de los niveles de tales cannabinoides en las muestras de ratón obtenidas el último día del experimento *in vivo*. Dado que se trata de una sola toma en el punto final del esquema de administración diaria de los distintos tratamientos por 12 días, se estima que la concentración obtenida fue aquella concentración correspondiente al T_{max} de THC y CBD más el residual de las administraciones previas (**figura 16**). En principio, se espera que esta concentración se encuentre dentro de la ventana terapéutica para THC y CBD; sin embargo, dada la escasez de estudios sistemáticos respecto a la farmacología de THC y CBD, la literatura actual no ha logrado establecer un punto específico de concentración a partir de la cual se observan efectos terapéuticos y un punto de corte a partir del que se presentan los efectos toxicológicos asociados, de modo que no nos es posible determinar si las concentraciones obtenidas en este experimento entran dentro de la ventana terapéutica de ambos o alguno de los dos cannabinoides.

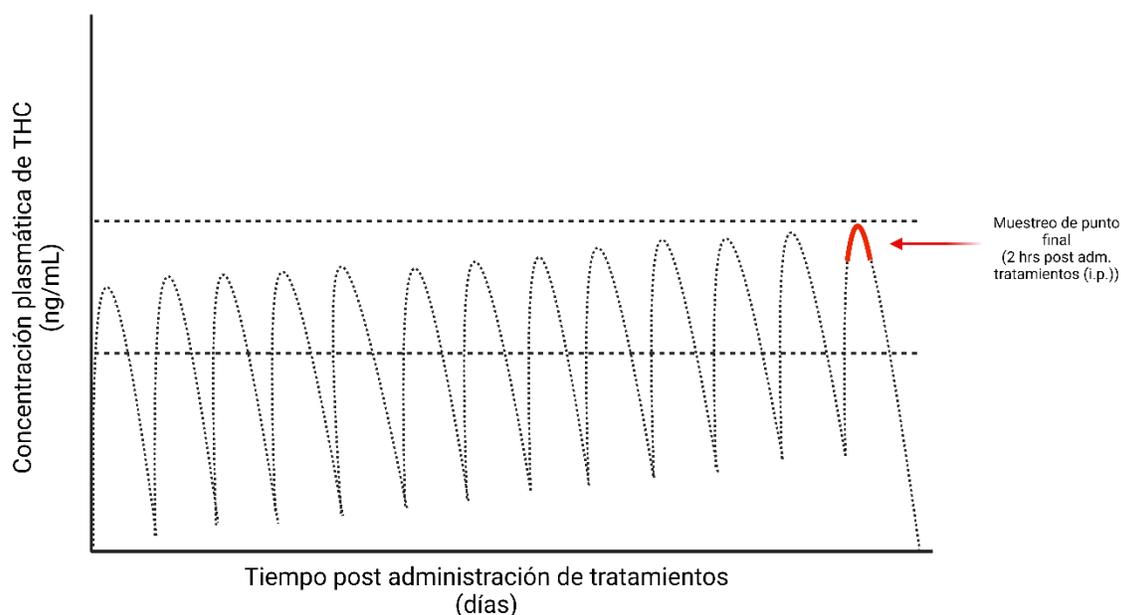


Figura 16. Esquema representativo del comportamiento ideal de las concentraciones sanguíneas de THC y CBD durante el experimento. La línea roja muestra el punto final en el que se obtuvieron las muestras sanguíneas.

Las concentraciones sanguíneas de THC y CBD fueron determinadas para todos los grupos de experimentación, incluyendo los grupos PBS y vehículo, esto para demostrar que ninguno de los ratones de estos grupos presentaba cannabinoides en circulación, lo cual, efectivamente se cumplió. Por lo anterior, los resultados obtenidos de la cuantificación de THC y CBD que se presentan a continuación corresponden solo a los grupos que recibieron los tratamientos de CBD, THC:CBD 1:1 y THC:CBD 1:3.

En la **figura 17** se presentan los resultados obtenidos respecto a las concentraciones de THC, observándose diferencias significativas ($p = 0.0026$). En ella se destaca que se encontró un aumento estadísticamente significativo ($p = 0.0403$) de THC en la combinación THC:CBD 1:1 (media 56.10 ng/mL) con respecto a la combinación 1:3 (media 190.41 ng/mL). Este hallazgo se encuentra en correspondencia con lo planteado por la bibliografía respecto a que CBD tiene la capacidad de modular la

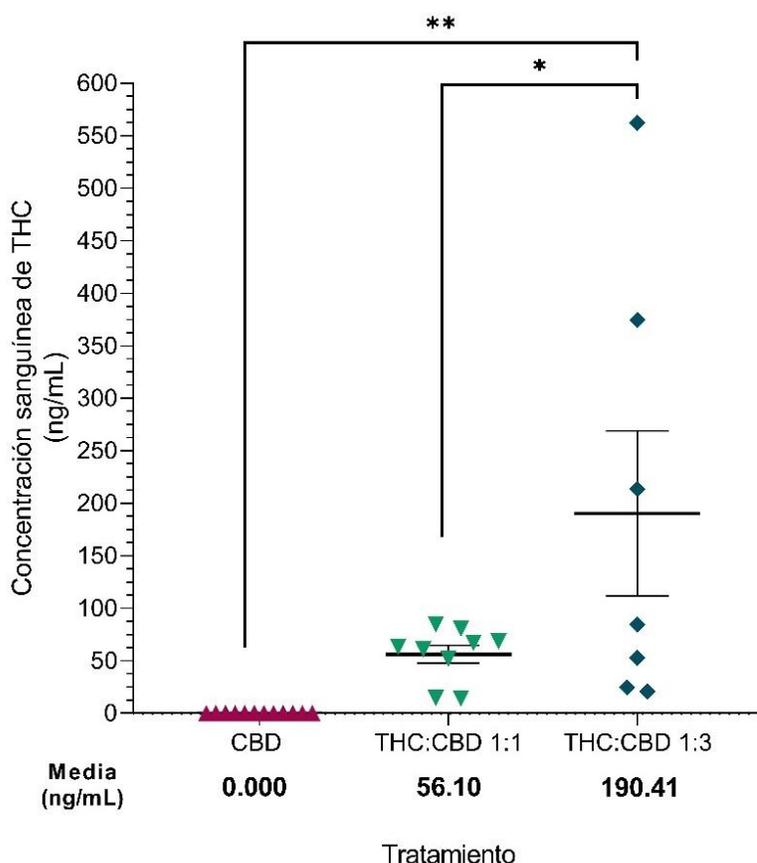


Figura 17. Concentraciones alcanzadas de THC para los distintos tratamientos. Datos representados como media y SEM. CBD ($n=12$), THC:CBD 1:1 ($n=9$), THC:CBD ($n=7$). ANOVA de una vía, comparaciones múltiples de Tukey. * $p<0.05$, ** $p<0.01$.

farmacocinética de THC, al impedir su metabolismo hacia 11-0H-THC y COOH-THC y, por ello, aumentar las concentraciones sanguíneas de THC, puesto que las dosis de THC administrados a ambos grupos eran las mismas, con la única diferencia de la

presencia de CBD en proporción 1:1 (THC: 13.5 mg/kg, CBD: 15.7 mg/kg) o 1:3 (THC: 13.5 mg/kg, CBD 41.9 mg/kg).

En la **figura 18** se ilustran los niveles de CBD obtenidos, donde se observan diferencias estadísticamente significativas entre los tres grupos ($p = 0.0076$). Resalta una tendencia al aumento de la mediana de la concentración de CBD en el grupo THC:CBD 1:1 (THC: 13.5 mg/kg, CBD: 15.7 mg/kg) (107.237 ng/mL) en comparación con el grupo que recibió CBD administrado individualmente (15 mg/kg) (32.475 ng/mL). Esta diferencia, si bien no es significativa ($p > 0.9999$) a causa de la variabilidad de los datos del grupo CBD, sí resulta en una tendencia que podría ser a causa de la presencia adicional de THC

en el grupo THC:CBD 1:1, lo cual implicaría que, al igual que CBD modula la farmacocinética del THC, THC posee también la capacidad de modular en cierto grado la farmacocinética de CBD. Por otro lado, en cuanto a la combinación de THC:CBD 1:3 (THC: 13.5 mg/kg, CBD 41.9 mg/kg) (mediana: 345.855 ng/mL), se observa un aumento significativo ($p = 0.0360$) de aproximadamente 3 veces la mediana de la concentración de CBD en el grupo THC:CBD 1:1, lo cual

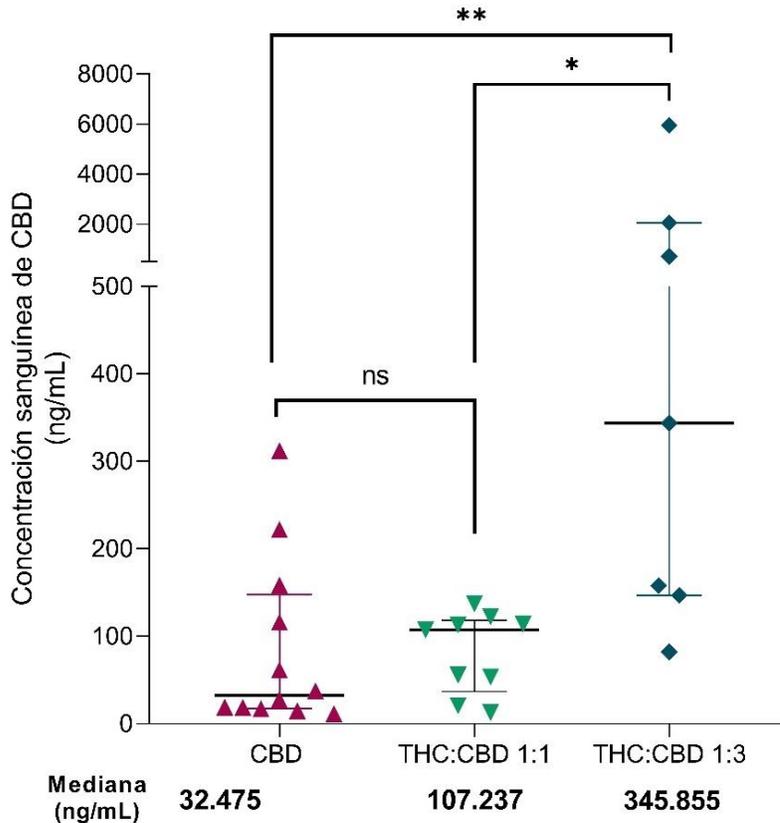


Figura 18. Concentraciones alcanzadas de CBD para los distintos tratamientos. Datos representados como mediana y rango intercuartílico. CBD (n=12), THC:CBD 1:1 (n=9), THC:CBD (n=7). Prueba de Kruskal-Wallis, comparaciones múltiples de Dunn. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. ns: diferencia no significativa.

coincide con el factor de la proporción. Sin embargo, al observar la diferencia existente en cuanto a la concentración de CBD alcanzada por el grupo THC:CBD 1:3 vs el grupo CBD individual, cabe hacerse notar que la diferencia no solo es estadísticamente significativa ($p = 0.0084$) en concordancia con el aumento de CBD en la formulación, sino que este aumento no es proporcional al factor 1:3, pues la mediana del grupo THC:CBD 1:3 es aproximadamente 12 veces mayor a la del grupo CBD, lo que subraya la probabilidad de que THC también module la farmacocinética del CBD.

Conociendo las concentraciones sanguíneas de THC y CBD en los distintos grupos experimentales se procedió a realizar un análisis de correlación de variables (conductas, perfil toxicológico, concentración de cannabinoides) para determinar si existía relación entre las respuestas observadas *in vivo* y los niveles alcanzados de los cannabinoides en circulación. Dado el número de variables a evaluar (9), se presentan los resultados del análisis de correlación de Spearman en un mapa de calor, resaltándose (*) aquellos que son significativos.

En la **figura 19 A** se presentan las correlaciones encontradas al evaluar las respuestas conjuntas de los grupos CBD, THC:CBD 1:1 y THC:CBD 1:3, encontrando que existe una fuerte correlación positiva significativa ($r=0.599$, $p = 0.0006$) entre la concentración de CBD y la de THC. La **figura 19 B** muestra una correlación positiva entre la concentración de THC y CBD en el grupo THC:CBD 1:1, sin embargo, el valor de Spearman no es significativo ($r=0.65$, $p = 0.0665$), mientras que en el análisis del grupo THC:CBD 1:3 (**figura 19 C**) sí lo es ($r=0.96$, $p = 0.0028$).

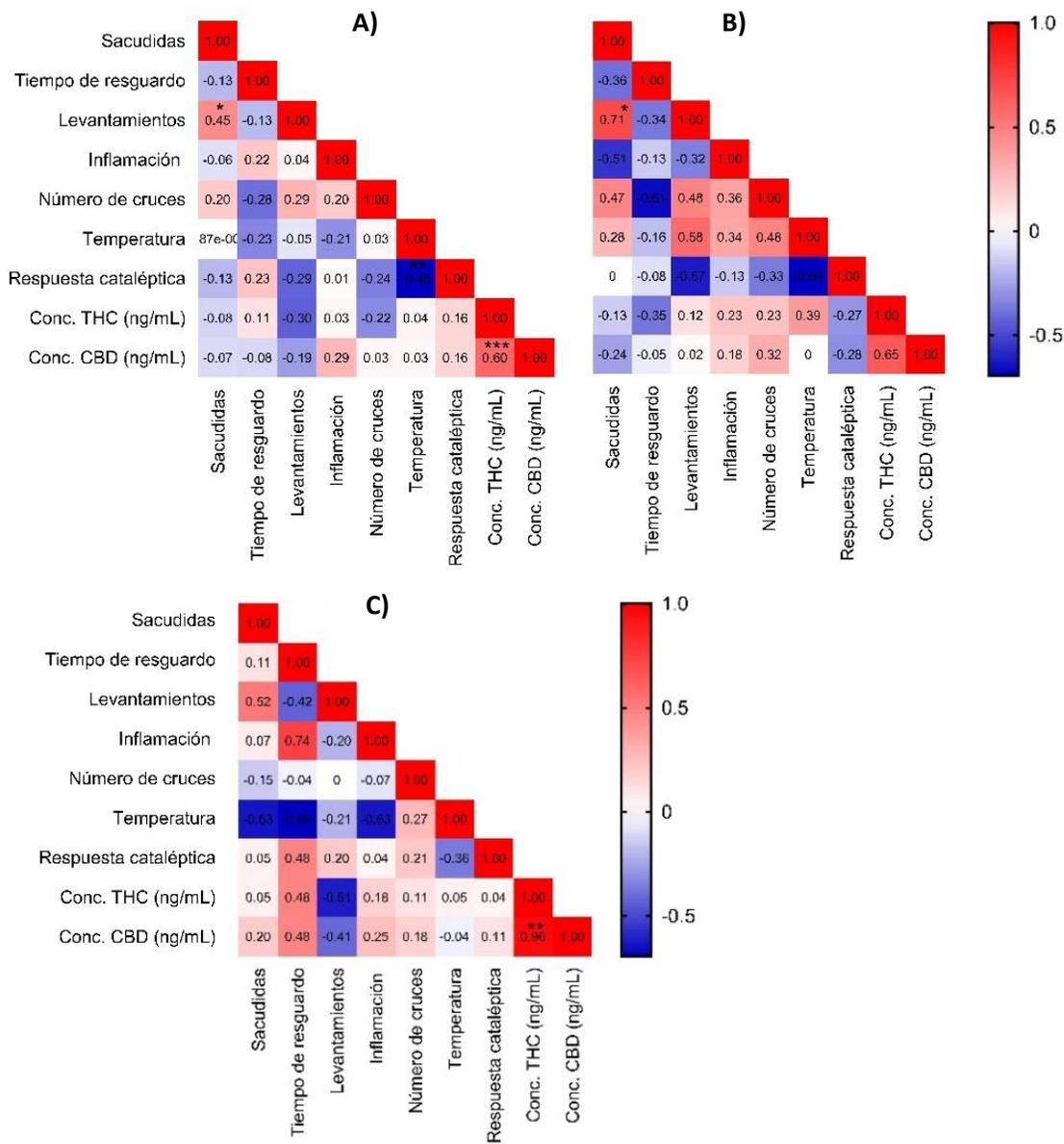
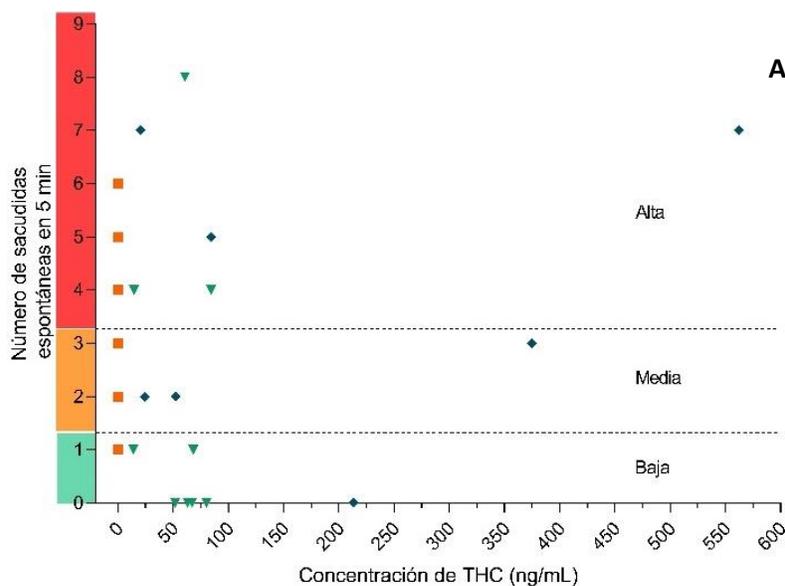


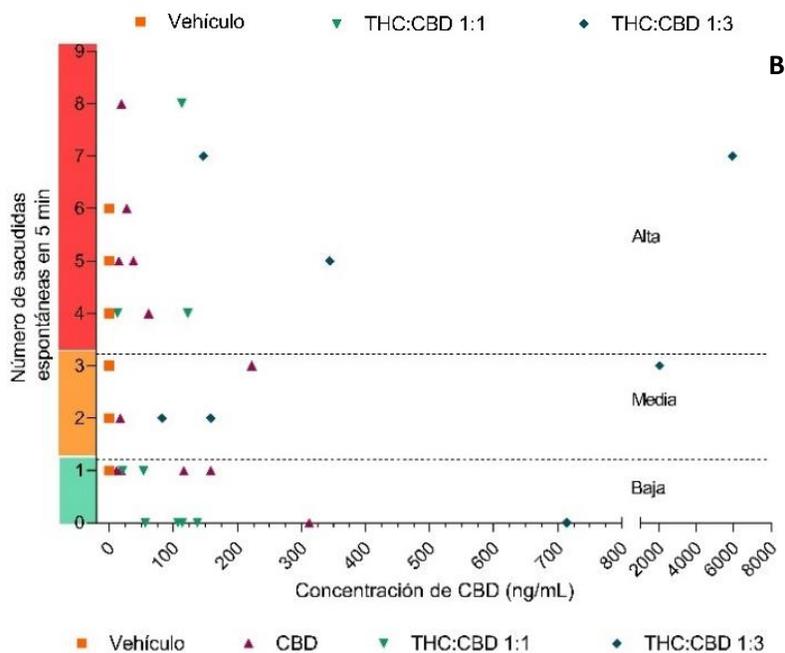
Figura 19. Análisis de correlación de variables A) Grupos CBD, THC:CBD 1:1 y 1:3, B) THC:CBD 1:1 y C) THC:CBD 1:3. Se muestran los valores de r de Spearman así como su significancia. Rojo: correlación positiva, azul: correlación negativa, blanco: sin correlación. CBD (n=12), THC:CBD 1:1 (n=9), THC:CBD (n=7). *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

Finalmente, para mostrar la relación existente entre las concentraciones de THC y CBD encontradas y las respuestas observadas en el modelo *in vivo*, se presentan los siguientes diagramas. A partir de los datos obtenidos de los comportamientos indicativos de nocicepción, se seleccionaron las dos conductas más representativas, siendo estas el número de sacudidas y el tiempo de resguardo.



A) **Figura 20.** Respuesta nociceptiva con base en el número de sacudidas (día 26) y su relación con las concentraciones sanguíneas (punto final) de A) THC y B) CBD. Se delimitan tres secciones correspondientes a nocicepción baja, media y alta, definidas con respecto a las medias del grupo control de PBS (nocicepción baja) y el grupo vehículo (nocicepción alta).

Vehículo (n=9) CBD (n=12),
 THC:CBD 1:1 (n=9),
 THC:CBD (n=7).



B)

Los gráficos **20 A y B** se dividen en 3 zonas de nocicepción con base en la media del número de sacudidas que experimentaron los ratones del grupo control de PBS (baja nocicepción) y grupo vehículo (alta nocicepción). Cada ratón perteneciente a los distintos tratamientos se colocó en una de las tres secciones y se observó la relación de esta respuesta *in vivo* con la concentración de THC y CBD en circulación el último día del experimento, de tal forma que, idealmente, se pueda proponer una relación concentración (THC y CBD) - efecto para cada tratamiento pues, como se comentó previamente, la literatura al respecto no es determinante.

En principio, se observa que los animales del grupo vehículo, efectivamente, presentaron un elevado número de sacudidas, relacionados a una nocicepción media-alta, en correspondencia con su carácter de control negativo de tratamiento. Por su parte, los ratones administrados con CBD (15 mg/kg) se muestran como una población muy heterogénea en cuanto a su comportamiento de número de sacudidas, pero, en general, se observa que la mayor parte de los ratones presenta nocicepción baja-media. Además, a pesar del tamaño reducido de la muestra (n=12) es posible percibir cómo por debajo de los 100 ng/mL de CBD, la mayor parte de los ratones experimentó dolor medio-alto, mientras que aquellos con bajo grado de nocicepción poseen concentraciones entre 100 y 350 ng/mL.

Por otro lado, la mayor parte de los ratones administrados con THC:CBD 1:1 (THC: 13.5 mg/kg, CBD: 15.7 mg/kg) presentó un bajo número de sacudidas espontáneas, en tanto que fueron pocos los casos donde se presentó nocicepción elevada. Las concentraciones de THC en estos ratones se encontraron todas por debajo de 100 ng/mL, mientras que la concentración de CBD se cuantificó por debajo de los 150 ng/mL.

En contraste, el grupo administrado con la combinación THC:CBD 1:3 presentó un mayor número de sacudidas (nocicepción media-alta), detectándose que, si bien este grupo es el que alcanza mayores concentraciones de THC (máximo=562 ng/mL), no por ello se relaciona con un menor grado de nocicepción. Algo similar ocurrió respecto

Las figuras **21 A y B**, presentan a su vez 3 zonas de nocicepción baja, media y alta delimitadas con base en la respuesta del tiempo de resguardo de los grupos control (vehículo y PBS). Primeramente, y en correspondencia con lo esperado, se observa cómo la gran mayoría de los ratones administrados con vehículo presenta nocicepción elevada. Por su parte, si bien el grupo de CBD es altamente heterogéneo en cuanto al tiempo de resguardo, sí es posible hacer notar que la mayoría de los datos se encuentran en la zona de nocicepción baja-media y que, en general, esta respuesta está asociada a concentraciones de CBD entre 100 y 350 ng/mL, mientras que menores concentraciones se relacionan con un mayor grado de nocicepción.

Por otro lado, la gran parte del grupo THC:CBD 1:1 mostró una baja nocicepción por tiempo de resguardo, con concentraciones asociadas de CBD menores a 200 ng/mL, y concentraciones de THC entre 50 y 100 ng/mL.

En cuanto al grupo THC:CBD 1:3 se observa que la mayor parte de los ratones que constituyen el grupo presentaron nocicepción baja-media y este resultado se asocia a concentraciones de CBD menores a 200 ng/mL, mientras que concentraciones superiores muestran un mayor tiempo de resguardo y, por lo tanto, de nocicepción. Por su parte, las concentraciones de THC que parecen relacionarse con menor grado de nocicepción son aquellas menores a 75 ng/mL, en cambio, concentraciones superiores no proporcionan una menor respuesta nociceptiva.

De manera similar a como se seleccionaron las conductas nociceptivas más representativas, también se eligió el parámetro toxicológico más relevante que, en este caso, fue la actividad locomotora, medida por el número de cruces. Los resultados de la relación entre las concentraciones de THC y CBD con la actividad locomotora se ilustran en la figura **22 A y B**. En la **figura 22 A** se observa que la mayor parte de los ratones con los distintos tratamientos presentaron concentraciones por debajo de 100 ng/mL de THC, y que la mayoría de los datos se encontró por debajo de la media del número de cruces del control de vehículo; sin embargo, no se aprecia que una mayor concentración de THC se relacione con una menor locomoción.

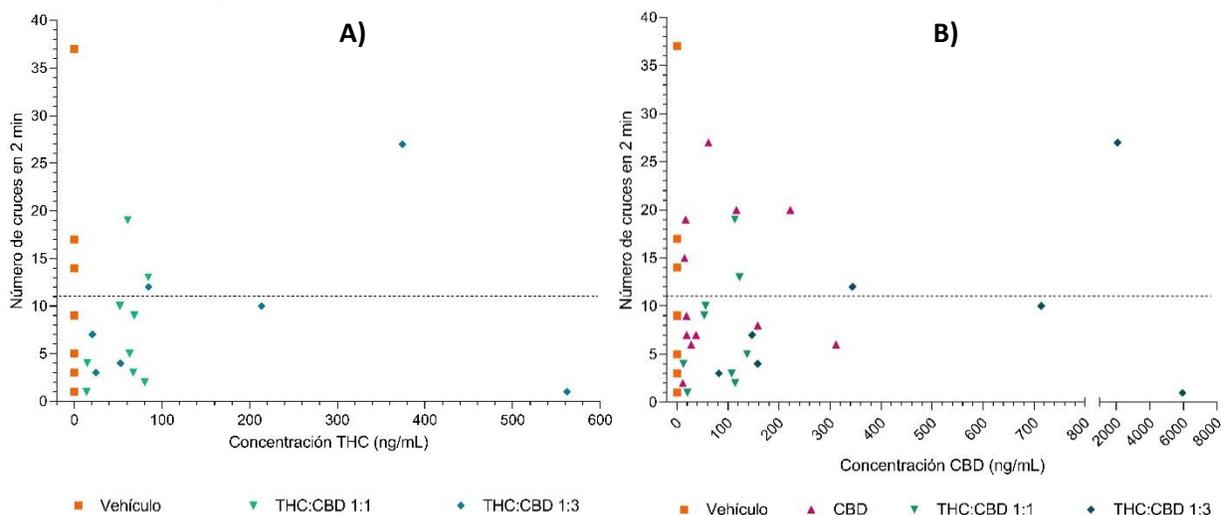


Figura 22. Respuesta toxicológica con base en la actividad locomotora (día 24) y su relación con las concentraciones sanguíneas (punto final) de A) THC y B) CBD. La línea punteada señala la media del número de cruces del grupo vehículo.

Vehículo (n=9) CBD (n=12), THC:CBD 1:1 (n=9), THC:CBD (n=7).

Con respecto al gráfico enfocado en la concentración de CBD (**figura 22 B**), se muestra que el grupo administrado con CBD individual tiene una respuesta de número de cruces muy cercana a la media del grupo vehículo, por lo que podría considerarse que son los que presentan un menor grado de hipolocomoción. Por otro lado, tanto los grupos de la combinación THC:CBD 1:1 como 1:3 presentan una locomoción disminuida respecto a la media del vehículo; sin embargo, este efecto no parece tener relación directa con la concentración de CBD alcanzada pues, en general, estos dos grupos, al igual que el de CBD individual, presentan concentraciones de CBD por debajo de los 200 ng/mL.

En resumen, si bien se observa una cierta tendencia a presentar un menor número de cruces en los ratones que recibieron las combinaciones 1:1 y 1:3 con respecto al grupo vehículo, este efecto no parece ser proporcional a la concentración de THC y CBD encontrados y, como se mostró en la figura **12 A**, la disminución de la actividad locomotora de ambos grupos no es significativa.

8. Discusión de resultados

El potencial terapéutico de la planta de cannabis es un aspecto ampliamente discutido pero estudiado muy someramente. Si bien, tanto cannabis como sus constituyentes cannabinoides han sido ligados a numerosos y variados efectos, incluyendo los antitumorales, antioxidantes, antidepresivos, antimicrobianos, neuroprotectores y anticonvulsivos (Kumar, 2021), el campo de investigación mayormente explorado es en lo que respecta a su efecto antinociceptivo y antiinflamatorio, e incluso este ha sido limitado de manera considerable a causa del marco legal aplicable. Es en el área del tratamiento del dolor crónico, donde los cannabinoides encuentran, posiblemente, su mayor aplicación, pues se ha apuntado a que estos compuestos podrían emplearse para cubrir necesidades clínicas no satisfechas con los tratamientos existentes (Guy G., 2006).

La AR es un claro ejemplo de esto pues, si bien, existen numerosas alternativas terapéuticas para el control de esta patología, el dolor y la discapacidad asociada a esto son condiciones prevalentes entre los pacientes con AR (Vergne-Salle P., 2020). THC y CBD son los cannabinoides que han sido más ampliamente estudiados como analgésicos y antiinflamatorios, por lo que, en años recientes, su posible aplicación en el campo de las enfermedades reumáticas ha sido examinada. En este sentido, puesto que CBD carece de los efectos psicoactivos que THC sí presenta (Kopustinskiene, 2022), la mayor parte de las investigaciones se ha dirigido al estudio de CBD administrado de forma individual; sin embargo, investigaciones recientes han apuntado a que el uso conjunto de diferentes cannabinoides y otros componentes de la planta podrían presentar un mayor efecto que el de los constituyentes por separado (efecto séquito o efecto entorno) (Anand, 2021). Por lo que en este proyecto estudiamos el efecto antinociceptivo y antiinflamatorio de CBD solo y en combinación con THC en la proporción THC:CBD 1:1 y THC:CBD 1:3 en un modelo de monoartritis inducida por antígeno.

En nuestro estudio, empleamos el modelo de artritis inducida por administraciones múltiples de CFA en ratones y evaluamos el efecto antiinflamatorio de los distintos

tratamientos con vehículo, CBD, THC:CBD 1:1 y THC:CBD 1:3 donde encontramos que ninguno de los tratamientos administrados logró disminuir la inflamación, parámetro medido a través del diámetro de la rodilla afectada. Nuestros resultados difieren respecto a estudios previos que han sugerido que CBD posee actividad antiinflamatoria, esto podría ser debido a una falta de sensibilidad de nuestro método para determinar diferencias sutiles a nivel celular o molecular de parámetros indicativos del proceso inflamatorio (Malfait AM., 2000) (Gallily R., 2015) (Hammell D.C., 2016). El o los mecanismos a través de los cuales se ha propuesto que CBD reduce la inflamación no han sido del todo esclarecidos, pero se ha propuesto que puede ser mediado en cierto grado debido a la reducción de citocinas proinflamatorias como TNF- α , IL-6 e IL-1 β (Henshaw, 2021).

Estas citocinas se encuentran aumentadas en el proceso inflamatorio en AR. Así mismo, ensayos *in vitro* e *in vivo* han mostrado que CBD y sus análogos inducen la polarización hacia linfocitos Treg, las cuales poseen actividad enérgica hacia la producción de IL-10, una de las principales citocinas con actividad antiinflamatoria; por otro lado, se ha mostrado que CBD también tiene la capacidad de activar y sensibilizar los canales iónicos TRPV1 y TRPA1, puede unirse al receptor gamma activado por el proliferador del peroxisoma (PPAR γ), así como a diversos GPCRs huérfanos (Lowin T. S. M., 2019), interacciones que contribuyen a su efecto sobre la inflamación.

Otro posible mecanismo al que se ha ligado el efecto antiinflamatorio de CBD en AR es su capacidad de reducir la viabilidad celular en condiciones proinflamatorias preferencialmente en fibroblastos sinoviales de artritis reumatoide (RASf) activados por TNF- α vía TRPA1 y objetivos mitocondriales (Lowin T. T. R., 2020). Al ser RASf uno de los principales contribuyentes a la destrucción del cartílago y promotores de la inflamación a través de la secreción de citocinas proinflamatorias y enzimas metaloproteinasas de matriz (MMPs), su inhibición regula selectivamente la respuesta inflamatoria (Lowin T. T. R., 2020). Adicionalmente, al ser CBD un agonista parcial del receptor CB2 (Turner, 2017) (Hashiesh, 2021), altamente expresado en la mayoría de las células de la respuesta inmune como linfocitos T, linfocitos B, basófilos, células

dendríticas, eosinófilos, macrófagos, microglía y células NK (Turcotte, 2016), CBD encuentra otra diana para ejercer sus efectos regulatorios sobre una extensa variedad de células. Un estudio de 2018 por Zhu y colaboradores mostró que JWH133, un cannabinoide sintético agonista selectivo de CB2, inhibió la respuesta inflamatoria en un modelo de CIA al promover el cambio de la polarización de los macrófagos de su fenotipo M1 (proinflamatorio) al M2 (antiinflamatorio). De este modo, al modular los efectos de los macrófagos proinflamatorios y, por ende, reducir la producción de citocinas que promueven la inflamación y resorción del cartílago y hueso, el uso de este agonista selectivo de CB2 mejoró notoriamente el grado de la severidad de los ratones CIA (Zhu M., 2018).

Nuestros datos no pueden confirmar el efecto antiinflamatorio de CBD, pues el grado de inflamación no se redujo en los grupos administrados con CBD solo o en las combinaciones con THC, por el contrario, continuó elevándose hasta la última evaluación. Es posible que las discrepancias entre nuestros resultados y aquellos estudios *in vivo* que más han mostrado el potencial antiinflamatorio de CBD en la literatura podrían ser debidas al modelo de inducción de AR utilizado, pues mientras que la mayor parte de los estudios que se han realizado han sido en el modelo de CIA, nosotros estudiamos el efecto antiinflamatorio en el modelo de AIA con CFA.

Si bien, ambos modelos son ampliamente utilizados en el campo de la investigación reumatológica, pues los dos tienen la capacidad de imitar la cualidad autoinmune de la AR, el involucramiento del sistema inmune adaptativo, la infiltración de células inmunes en los tejidos afectados, la destrucción del cartílago y hueso y la inflamación crónica derivada de esto (Bas, 2016), existen diferencias importantes entre ambos. Mientras que el modelo de CIA induce una respuesta inmune adaptativa dirigida hacia el antígeno del colágeno II administrado vía intradérmica, con la subsecuente producción de anticuerpos anti-CII que conducen a un estado poliartrítico crónico (Bas, 2016), el modelo de CFA resulta en un estado de hiperinmunización con elevados niveles de anticuerpos específicos contra el antígeno presente en CFA

(*Mycobacterium tuberculosis*), lo que resulta en una fuerte respuesta de linfocitos T e hipersensibilidad (Billiau, 2001).

Entre estos dos modelos de inducción de AR, la inducción con CFA resulta en un mayor grado de severidad, con estado de hipersensibilidad mecánica dosis-dependiente (Bas, 2016). Por lo tanto, es posible que el grado de inflamación alcanzado en nuestro modelo haya sido de tal magnitud que no haya permitido al CBD ejercer sus efectos antiinflamatorios en un grado perceptible para nuestro método de evaluación de la inflamación, el cual se limitó a la medición de las dimensiones de la rodilla ipsilateral y contralateral para el cálculo del % de incremento en la inflamación.

Sin embargo, consideramos que, puesto que ningún modelo animal simula a la perfección los aspectos patológicos de la AR en humanos, es importante explorar distintos modelos que examinen los efectos de CBD en diferentes grados de severidad en AR y es, en este sentido, donde nuestros hallazgos cobran relevancia.

Por otro lado, en 2016 Hammell y colaboradores también utilizaron el modelo de AIA por administración con CFA para evaluar los efectos de CBD en distintas concentraciones y, si bien, los autores encontraron un efecto positivo de reducción de la inflamación en el modelo con dosis de CBD de 6.2 mg/kg y 62.3 mg/kg (vía transdérmica, 4 días), incluso en este caso existen importantes diferencias metodológicas que podrían ser la causa de la diferencia en los resultados obtenidos, pues mientras en el estudio de Hammell y colaboradores la inducción del estado artrítico se obtuvo con una sola administración de CFA, en nuestro caso realizamos 3 administraciones que reforzaron la respuesta inflamatoria en la sinovia de la articulación afectada, por lo que el grado de inflamación obtenido en nuestro estudio fue, muy probablemente, superior al alcanzado por Hammell y col. Es por ello que, a nuestra consideración, es probable que la actividad antiinflamatoria de CBD sea limitada a estadios de la AR asociados a un menor grado de inflamación, preferencialmente en etapas tempranas de la enfermedad donde CBD sea capaz de limitar la respuesta inmune.

Por otro lado, si bien, consideramos que la reducción del edema es el parámetro óptimo para aseverar el efecto antiinflamatorio de un compuesto, dados los antecedentes en la bibliografía respecto a los efectos del CBD sobre distintas células de la respuesta inmune, proponemos que sería relevante identificar si existieron diferencias entre los distintos tratamientos a nivel celular, particularmente respecto a la presencia de macrófagos y RASF, pues son los principales implicados en la dirección de la inflamación en la sinovia articular. Para determinar esto, sería necesario realizar un análisis histológico para observar diferencias en el grado de hiperplasia sinovial en los distintos grupos y la valoración del número de células inmunes infiltrantes en el tejido articular. Adicionalmente, sería relevante realizar la cuantificación de citocinas en los tejidos periféricos involucrados en el proceso artrítico para determinar si existe alguna tendencia en cuanto a la reducción de citocinas proinflamatorias o un aumento en las citocinas antiinflamatorias que pudiera reflejar diferencias en el estado inflamatorio entre los distintos tratamientos administrados. De confirmarse esto, aun cuando esto no cambiaría los resultados observados respecto al edema mostrado a nivel clínico, sí podrían ser datos que apoyaran el supuesto de que CBD reduce la presencia de células y moléculas inflamatorias, pero que su uso más conveniente se encuentra en etapas tempranas de la enfermedad que se asocien con un menor grado de inflamación.

Como se ha visto hasta ahora, los efectos antiinflamatorios de los cannabinoides se presentan mayoritariamente a causa de CBD y su acción sobre una amplia variedad de receptores que pueden ser reflejo de su compleja farmacología. Por otro lado, la inclusión de THC en los tratamientos ensayados juega un papel más relevante en el contexto de la evaluación del dolor implicado en el modelo de AR puesto que, si bien, a través de la reducción de células y moléculas proinflamatorias se consigue un menor grado de la severidad del estado artrítico y esto puede asociarse con una menor nocicepción, esto en muchos casos podría no ser suficiente.

El efecto analgésico de THC ha sido ampliamente estudiado, sin embargo, la principal limitación de su uso se presenta a causa de los efectos toxicológicos que implica su

uso, principalmente el efecto psicoactivo y las alteraciones a nivel sensorimotor y cognitivo dada la cualidad de THC como agonista parcial del receptor CB1 (Devsí A., 2020). Si bien, por un lado, el hecho de conocer el mecanismo por el cual THC ejerce sus efectos representa una ventaja, también plantea una barrera difícil de franquear. A causa de esto, se ha propuesto que el uso de cannabinoides no agonistas de CB1 podrían ser una opción más atractiva para mitigar los efectos adversos asociados al uso de THC.

En este sentido, CBD ha sido ampliamente estudiado y ha mostrado resultados prometedores respecto a su efecto antinociceptivo en numerosos estudios (mayoritariamente en dolor neuropático) (Silva-Cardoso, 2021) (De-Gregorio D., 2019) (Abraham, 2020) (Hammell D.C., 2016); sin embargo, se plantea una importante limitación dosis-respuesta respecto a su uso, pues se ha encontrado que cuando se administra individualmente, suele presentar una curva tipo campana que dificulta su uso en la clínica (Gallily R., 2015). En 2015, Gallily y colaboradores encontraron que el uso de un quimiotipo particular de cannabis constituido por CBD 17.9%, THC 1.1% entre otros componentes minoritarios como CBC, CBG y CBDV permitió superar la limitación del uso de CBD puro en cuanto al efecto antiinflamatorio y antinociceptivo en el modelo de formación de oedema inducido por zymosan. En este sentido, el uso conjunto de THC y CBD parece ser de particular utilidad para superar limitaciones dosis-respuesta. En nuestro estudio, determinamos el efecto antinociceptivo de CBD y las combinaciones THC:CBD 1:1 y 1:3, encontrando que los grupos tratados con CBD y THC:CBD 1:1 fueron los que presentaron un menor grado de nocicepción, siendo la combinación 1:1 la que mostró una tendencia a mantener el efecto antinociceptivo por más tiempo.

Es necesario señalar que, entre las conductas de dolor cuantificadas, el parámetro que resultó más relevante fue el número de sacudidas espontáneas, seguido del tiempo de resguardo; mientras que, en nuestro experimento, el número de levantamientos verticales no permitió discriminar el dolor asociado al proceso inflamatorio artrítico del dolor causado por las punciones intraarticulares propias del modelo empleado. En

principio, la actividad locomotora vertical se esperaba ver aumentada en los ratones que recibieron algún tratamiento cannabinoide con respecto al grupo administrado con vehículo; no obstante, esto no sucedió, pues la cantidad de levantamientos verticales disminuyó en todos los grupos a medida que transcurría el tiempo. Es posible que las múltiples mediciones de la conducta a lo largo del establecimiento del proceso artrítico hayan facilitado a los ratones habituarse a su entorno de evaluación, reduciendo en gran medida la utilidad de esta conducta, pues la usual disminución de la actividad locomotora vertical en procesos de dolor artrítico se basa en la novedad y la naturaleza exploratoria del animal, perdiendo su utilidad cuando se realizan pruebas repetidas (Muley, 2016). Por otro lado, las sacudidas y el resguardo de la extremidad afectada son comportamientos de dolor espontáneo (Mogil J. S., 2009). Considerando que el dolor espontáneo y el resguardo de la extremidad son manifestaciones comunes en los pacientes con AR (Gregory N. S., 2013), esto subraya la importancia de los resultados obtenidos del efecto antinociceptivo a través de tales parámetros puesto que, idealmente, la medición de las conductas del dolor nociceptivo debe ser consistente con la experiencia clínica del dolor (Gregory N. S., 2013).

En cuanto al efecto de la implementación de combinaciones de THC:CBD sobre la antinocicepción nuestros resultados están en correspondencia con otros trabajos en los que se ha evaluado la combinación THC:CBD 1:1, tal es el caso de un estudio donde se ensayó la eficacia de bajas dosis de extractos aceitosos de cannabis natural en ratas Sprague Dawley en el modelo de constricción del nervio ciático, donde los autores reportaron que la combinación THC:CBD 1:1 (0.208 mg/kg de THC y de CBD 0.208 mg/kg, v.o. por 14 días) produjo una menor hipersensibilidad mecánica (umbral de respuesta mecánica a filamentos de Von Frey) en ratas macho, presentando un mayor efecto analgésico que los extractos aislados con THC (0.083 mg/kg) y CBD (0.41 mg/kg) (Linher-Melville K., 2020).

Un estudio más oportunamente comparable con el nuestro es el reciente trabajo por Britch y col., en 2023, donde los autores estudiaron el efecto de CBD, THC y sus combinaciones 3:1, 1:1, y 1:3 (i.p.) en el modelo de AIA con CFA, donde, en

concordancia con nuestros resultados, los autores encontraron que, administrados de manera individual, CBD (0.05-2.5 mg/kg) y THC (0.05-2.0 mg/kg) presentaron actividad antihiperálgica y antialodinia; sin embargo, en el caso de las combinaciones, Britch y col., encontraron que, cuando ambos cannabinoides se administraron en conjunto, CBD tendió a disminuir los efectos analgésicos de THC (Britch, 2023). En nuestro estudio, la combinación THC:CBD 1:3 no presentó actividad antinociceptiva, no obstante, la combinación THC:CBD 1:1 fue la que presentó un mayor efecto. Las discrepancias en los resultados de estos dos estudios son probablemente debidas a las dosis evaluadas, pues en nuestro caso se emplearon dosis más altas tanto para CBD solo como en combinación. Esto destaca la relevancia de la búsqueda de dosis y combinaciones ideales de THC y CBD para el alivio de dolor inflamatorio crónico.

Ahora bien, habiendo encontrado un efecto antinociceptivo de CBD (solo) y la combinación THC:CBD 1:1 aun cuando no se manifestó efecto antiinflamatorio en ninguno de los tratamientos, es necesario cuestionarse los mecanismos a través de los cuales ocurrió esto. Por un lado, en el caso del CBD se sabe que además de su actividad moduladora del receptor CB2, a través del cual disminuye la concentración de moléculas proinflamatorias (TNF- α , IL-1 β , IL-6) (Henshaw, 2021) con la capacidad de sensibilizar y/o activar aferencias primarias (Bas, 2016), limitando así la transmisión y percepción del estímulo doloroso, CBD tiene la capacidad de ejercer su actividad analgésica a través de mecanismos no CB1/CB2, incluyendo la activación de distintos receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) y canales iónicos (Narouze, 2021), dentro de los cuales se destaca el TRPV1, puesto que en el modelo de AIA el CFA causa su activación (Muley, 2016). TRPV1 se encuentra ampliamente expresado en neuronas del DRG y fibras nerviosas sensoriales, donde los canales TRPV1 actúan como integradores moleculares para múltiples tipos de entradas sensoriales, contribuyendo así a la generación y transmisión del dolor a nivel central y periférico (Narouze, 2021).

De este modo, el antagonismo de los canales TRPV1 contribuye a la analgesia en estados de dolor agudo, mientras que la desensibilización de estos canales tiene

utilidad en el tratamiento del dolor crónico, situación que requiere de agonistas de canales TRPV1 (Starkus, 2019). Por lo tanto, es posible que el efecto antinociceptivo encontrado por la administración de CBD en nuestro proyecto haya sido consecuencia de la desensibilización de canales TRPV1 que redujeron la transmisión del estímulo nociceptivo originado en la articulación ipsilateral; sin embargo, este supuesto debería ser comprobado experimentalmente en lo que respecta a la cinética de activación e inactivación de estos canales por interacción con CBD.

En cuanto al efecto antinociceptivo de la combinación THC:CBD 1:1, es probable que, aunado a la desensibilización de los canales TRPV1 por CBD, este haya sido mediado por la activación de los receptores CB1 a través del THC, disminuyendo así la liberación de neurotransmisores excitatorios como glutamato que perpetúan el estado de sobreexcitación neuronal (Purves, 2016) y transmisión del estímulo doloroso. Este aspecto farmacodinámico podría explicar el mayor efecto antinociceptivo de la combinación respecto al CBD individual, pues se ha planteado que el efecto séquito de los cannabinoides puede ser debido a mecanismos de analgesia distintos o sobrepuestos (Anand, 2021). Sin embargo, nuestras conclusiones respecto a un mayor efecto antinociceptivo de la combinación 1:1 se limitan a la comparación con el tratamiento de CBD solo, pues en nuestro estudio no fue posible la inclusión del tratamiento de THC individual, por lo que no podemos afirmar o descartar que el efecto analgésico obtenido de la combinación 1:1 habría sido superior al de THC individual, sin embargo, incluso de ser así, es altamente probable que el perfil toxicológico hubiese cobrado un papel más relevante.

A propósito de esto, cabe resaltar que ninguno de los tratamientos evaluados en este proyecto (a las dosis administradas) mostraron un perfil toxicológico relevante, pues los parámetros característicos del cuadro clínico por intoxicación con cannabinoides: hipolocomoción, hipotermia y catalepsia, no se presentaron en ninguno de los tratamientos en comparación con los grupos control. Previamente se ha planteado que el uso de combinaciones con elevado contenido de CBD tienen el potencial de reducir los efectos intoxicantes del THC (Solowij N., 2019), llegando a proponer el

establecimiento de distintas categorías de las proporciones THC:CBD con base en los efectos clínicos observados. Las combinaciones evaluadas en este trabajo incluyen la categoría 1) THC:CBD 1:1 (CBD puede incrementar los efectos de THC) y la 3) THC:CBD 1:3 (CBD puede o no tener efecto o actuar como protector contra los efectos de THC) (Pennypacker SD, 2022). En nuestra investigación, ninguna de las dos combinaciones presentó los efectos toxicológicos de THC, aunque debido a la imposibilidad técnica de implementar el tratamiento de THC individualmente no se puede aseverar que sin la adición de CBD se hubieran presentado tales efectos intoxicantes. No obstante, dado que las dosis y combinaciones aquí empleadas son similares a las reportadas en estudios previos (Hložek T., 2017), con base en esto se puede suponer que el tratamiento de THC hubiera llevado a la aparición de efectos toxicológicos que, aun siendo leves, habrían sido relevantes en comparación con las combinaciones.

Por otro lado, es necesario resaltar que tanto en lo que respecta al efecto antinociceptivo como al perfil toxicológico, nuestra hipótesis original fue que la combinación THC:CBD 1:3 sería superior a la combinación 1:1, sin embargo, esta hipótesis no puede ser soportada con nuestros datos. La dificultad de establecer qué proporciones THC/CBD causan antagonismo o potenciación de sus efectos es justamente uno de los factores que han limitado el uso las terapias basadas en cannabis. Uno de los principales retos al utilizar combinaciones entre estos cannabinoides se encuentra en identificar no solamente qué proporción, sino que dosis, vía de administración, tiempo entre administraciones entre ambos cannabinoides conducirá hacia la existencia de interacciones no solamente del tipo farmacodinámico, sino también farmacocinético.

La farmacocinética de los cannabinoides es compleja y se encuentra ampliamente dirigida por interacciones metabólicas en la coadministración de estos con otros cannabinoides, donde la vía de administración cobra especial relevancia (Hložek T., 2017). En nuestro estudio, determinamos la concentración sanguínea de THC y CBD en el punto final del experimento tras 12 administraciones diarias vía intraperitoneal.

En primer lugar, encontramos que la concentración de THC en la combinación 1:3 fue mucho mayor que en la combinación 1:1.

Dado que la dosis de THC en ambos tratamientos fue la misma, variando solamente la dosis de CBD esto implica que la presencia de una mayor cantidad de CBD en la combinación moduló la farmacocinética de THC, permitiendo alcanzar mayores concentraciones sistémicas de este.

Este resultado está en concordancia con estudios previos donde se demostró que la coadministración de estos dos cannabinoides a través de distintas vías de administración conlleva concentraciones más elevadas de THC que cuando este se administra individualmente (Hložek T., 2017). Esto es debido a la conocida inhibición de CBD sobre un amplio rango de enzimas importantes del sistema citocromo P450, como lo son CYP2C9, CYP3A4, CYP2B6, CYP2D6 y CYP2E1, destacando su acción sobre CYP2C9, pues es la enzima que se encarga de oxidar al D9-THC en su metabolito 11-OH-THC y posteriormente en 11-COOH-THC (Nasrin, 2021). Más aún, los resultados de nuestro estudio señalan que la presencia de THC en las combinaciones también permite alcanzar mayores concentraciones de CBD que cuando este se administra por sí solo, donde este aumento no se presenta en correspondencia al factor de proporción, pues en el caso de la combinación THC:CBD 1:3 la concentración de CBD fue aproximadamente 12 veces mayor a la de CBD administrado individualmente.

Esto aporta un mayor grado de complejidad al análisis farmacocinético de los cannabinoides administrados en combinación, pues implicaría que la modulación a nivel farmacocinético no es unidireccional, sino en ambos sentidos. Estos resultados se relacionan con los hallazgos de Nasrin y colaboradores en 2021, donde encontraron que THC y sus metabolitos (11-OH-THC y 11-nor-9-COOH-THC-glucurónido) también tienen la capacidad de inhibir competitivamente diversas enzimas del P450, incluyendo CYP2B6, CYP2C9, CYP2D6 e inhibición mezclada de CYP2C19 (Nasrin, 2021). Puesto que CYP2C19 es una de las enzimas encargadas de oxidar a CBD en 7-OH-

CBD, junto con CYP3A4, la inhibición de esta enzima tiene como consecuencia una mayor concentración de CBD en circulación. En conjunto, esto implica una intrincada relación farmacocinética bidireccional entre THC y CBD, donde el rol de este último podría ser incluso más delicado, pues modula tanto el metabolismo de THC como el suyo propio a través de la inhibición de CYP2C9 y CYP3A4, respectivamente. La influencia del metabolismo de ambos cannabinoides será de mayor o menor grado en relación con la vía de administración empleada. En nuestro estudio, puesto que la vía de administración fue intraperitoneal, estos fenómenos no pueden ser desestimados.

La administración intraperitoneal permite una tasa absorción aproximada entre una cuarta parte a la mitad de la correspondiente a la vía intravenosa debido a que la cavidad peritoneal se encuentra bien irrigada por capilares sanguíneos y provee una excelente superficie para el intercambio de fármacos entre la cavidad y el plasma (Al Shoyaib, 2020). Sin embargo, esta forma de administración comprende un extenso metabolismo de primer paso, en este sentido, se asemeja a la vía oral.

Este aspecto cobra relevancia en consideración de la complejidad recientemente descrita del metabolismo de cannabinoides, por un lado, el hecho de que THC y CBD se modulen mutuamente evitando que se proceda a la oxidación de ambos, permite que se alcancen mayores concentraciones sistémicas disponibles para ejercer sus acciones farmacodinámicas de analgesia, antinocicepción y, en el caso de THC, los efectos toxicológicos asociados.

No obstante, dado que el metabolito 11-OH-THC también posee efectos psicoactivos por sí mismo que son tanto o más potentes que los del THC, pero de efecto más rápido (Casajuana Kögel, 2018) (Lemberger L, 1973), la reducción de las concentraciones plasmáticas de este metabolito podría asociarse a un perfil toxicológico más favorable. En nuestro estudio, es posible que el uso de las distintas combinaciones THC:CBD haya sido la razón de que los ratones no manifestaran la clásica tétada cannabinoide por medio de la modulación del metabolismo de THC, sin embargo, del mismo modo que ocurrió con el tratamiento individual de THC, debido a complicaciones en la

obtención del estándar a causa del estatus legal de esta molécula en nuestro país no nos fue posible incluir la cuantificación del metabolito, lo que limita nuestras conclusiones al respecto. Sin embargo, estudios previos que describen la relevancia de la coadministración de estos cannabinoides por vía oral (Hložek T., 2017) sugieren la probabilidad de que este supuesto sea cierto.

Finalmente, en conjunto, los datos obtenidos respecto al efecto antinociceptivo de los distintos tratamientos con relación a las concentraciones sanguíneas de THC y CBD alcanzadas en el punto final del experimento indican que la combinación THC:CBD 1:1 es particularmente útil para disminuir el dolor espontáneo en el modelo de dolor inflamatorio inducido por CFA, con un perfil toxicológico no relevante, particularmente cuando se alcanzan concentraciones sanguíneas menores a 200 ng/mL de CBD y menores a 100 ng/mL para THC. Si bien, no es posible establecer una relación concentración-efecto exacta, puesto que no se realizó el perfil farmacocinético de los cannabinoides, sino una determinación única del punto final, estos resultados pueden ser empleados como base para el diseño y evaluación de nuevos estudios que exploren distintas combinaciones y dosis de estos compuestos.

9. Conclusiones

Se encontró un efecto antinociceptivo del tratamiento con CBD y la combinación THC:CBD 1:1 a través de la evaluación de conductas de dolor espontáneo en el modelo de artritis unilateral crónica por administración de CFA, encontrando que la combinación 1:1 permitió un efecto más sostenido a lo largo del tiempo.

Ninguno de los tratamientos resultó en un efecto antiinflamatorio relevante, posiblemente debido al elevado grado de inflamación alcanzado en este modelo, por lo que se sugiere que el efecto antiinflamatorio de estos cannabinoides podría ser útil en estados tempranos de AR asociados a un menor grado de inflamación.

Ninguno de los tratamientos evaluados mostró un perfil toxicológico relevante, por lo que las dosis empleadas en este estudio podrían seguir siendo exploradas en ensayos posteriores.

Se realizó la validación del método analítico para la cuantificación simultánea de THC y CBD en sangre total por medio de UPLC-MS/MS, confirmando que el método fue selectivo, lineal, preciso y exacto en un rango de 20-1500 ng/mL, por lo que es adecuado para la cuantificación de ambos cannabinoides en las condiciones descritas.

Por otro lado, las concentraciones sanguíneas de THC y CBD relacionadas a los efectos *in vivo* fueron: 1) THC: 56.10 ± 25.58 ng/mL y 190.41 ± 207.9 ng/mL para las combinaciones THC:CBD 1:1 y 1:3, respectivamente y 2) CBD: 32.48 ng/mL, 107.2 ng/mL y 343.9 ng/mL para los tratamientos con CBD, THC:CBD 1:1 y 1:3, respectivamente.

La combinación THC:CBD 1:1 es particularmente útil para disminuir el dolor espontáneo en el modelo de AIA, con un perfil toxicológico no relevante, particularmente cuando se alcanzan concentraciones sanguíneas menores a 200 ng/mL de CBD y menores a 100 ng/mL de THC.

10. Perspectivas

Si bien, en nuestro estudio encontramos que la combinación con mayor actividad antinociceptiva fue la de THC:CBD 1:1, recomendamos continuar con la búsqueda de la combinación ideal de ambos cannabinoides, así como de las dosis que presenten un mayor efecto no solo antinociceptivo, sino también antiinflamatorio, siendo la combinación THC:CBD 1:20 particularmente prometedora, de acuerdo con lo planteado por la literatura.

Investigar la implicación de THC y CBD solos y en combinación sobre la resorción ósea, pues como se ha planteado previamente, los agonistas del receptor CB2 han sido implicados en la disminución de la pérdida del tejido óseo, posicionando a los cannabinoides como potenciales fármacos con implicaciones relevantes sobre distintos parámetros clínicos que afectan a enfermedades como la AR.

Dado el potencial antiinflamatorio atribuido a los cannabinoides por la literatura, pero no evidenciado en nuestro estudio, sería relevante realizar un análisis histopatológico del infiltrado leucocitario en la articulación de los ratones sometidos a los distintos tratamientos, con particular énfasis en las poblaciones celulares implicadas en el proceso inflamatorio de la sinovia de las articulaciones, tales como de macrófagos y RASF. Del mismo modo, sería útil realizar la cuantificación de citocinas tanto proinflamatorias como antiinflamatorias que pudieran evidenciar alguna diferencia entre aquellos ratones que recibieron los tratamientos con THC y CBD.

Adicionalmente, dada la naturaleza altamente lipofílica de THC y CBD, resultaría de utilidad realizar la determinación de ambos en otras matrices biológicas con alto grado de lipofilicidad, tales como el tejido cerebral y tejido adiposo, pues es en ellos donde podrían acumularse ambos cannabinoides y ejercer sus efectos durante más tiempo.

Una vez encontrada una dosis y combinación ideal para el mejoramiento de la AR en el modelo ideal, se recomienda realizar una formulación que permita su potencial administración en la práctica clínica, lo cual deberá ser realizado en estricto apego con las disposiciones legales aplicables.

11. Bibliografía

- Abbas, A. (2015). *Inmunobiología celular y molecular* (8a ed.). Elsevier Saunders.
- Abbas, M. (2020). Modulation of TRPV1 channel function by natural products in the treatment of pain. *Chemico-Biological Interactions*. doi:<https://doi.org/10.1016/j.cbi.2020.109178>
- Abraham, A. D. (2020). Orally consumed cannabinoids provide long-lasting relief of allodynia in a mouse model of chronic neuropathic pain. *Neuropsychopharmacology*, 45(7), 1105-1114. doi:<https://doi.org/10.1038/s41386-019-0585-3>
- Abuhasira, R. S. (2018). Medical use of cannabis and cannabinoids containing products— Regulations in Europe and North America. *European journal of internal medicine*, 49, 2-6. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ejim.2018.01.001>
- Al Shoyaib, A. A. (2020). Intraperitoneal route of drug administration: should it be used in experimental animal studies? *Pharmaceutical research*, 37(1), 1-17. doi:12. doi:[10.1007/s11095-019-2745-x](https://doi.org/10.1007/s11095-019-2745-x)
- Anand, U. P. (2021). Cannabis-based medicines and pain: A review of potential synergistic and entourage effects. *Pain Management*, 11(4), 395-403. doi:<https://doi.org/10.2217/pmt-2020-0110>
- Andrenyak, D. M. (2017). Determination of Δ -9-tetrahydrocannabinol (thc), 11-hydroxy-thc, 11-nor-9-carboxy-thc and cannabidiol in human plasma using gas chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of analytical toxicology*, 41(4), 277-288. doi:[10.1093/jat/bkw136](https://doi.org/10.1093/jat/bkw136)
- Anil SM., P. H. (2022). Medical cannabis activity against inflammation: active compounds and modes of action. *Front. Pharmacol.* doi:[10.3389/fphar.2022.908198](https://doi.org/10.3389/fphar.2022.908198)
- Anil, S. M. (2022). Medical Cannabis Activity Against Inflammation: Active Compounds and Modes of Action. *Frontiers in pharmacology*, 13. doi:[10.3389/fphar.2022.908198](https://doi.org/10.3389/fphar.2022.908198)
- Baral P., U. S. (2019). Pain and immunity: implications for host defence. *Nat Rev Immunol*, 19, 433–447. doi:<https://doi.org/10.1038/s41577-019-0147-2>
- Baron E., L. P. (2018). Patterns of medicinal cannabis use, strain analysis, and substitution effect among patients with migraine, headache, arthritis, and chronic pain in a medicinal cannabis cohort. *The Journal of Headache and Pain*, 19(1), 1-28. doi: <https://doi.org/10.1186/s10194-018-0862-2>

- Bas, D. B. (2016). Pain in rheumatoid arthritis: models and mechanisms. *Pain management*, 6(3), 265-284. doi:<https://doi.org/10.2217/pmt.16.4>
- Billiau, A. M. (2001). Modes of action of Freund's adjuvants in experimental models of autoimmune diseases. *Journal of leukocyte biology*, 70(6), 849-860. doi:<https://doi.org/10.1189/jlb.70.6.849>
- Bingham B., A. S. (2009). The molecular basis of pain and its clinical implications in rheumatology. *Nature Clinical Practice Rheumatology*, 5(1). Obtenido de [10.1038/ncprheum0972](https://doi.org/10.1038/ncprheum0972)
- Blake D. R., R. P. (2006). Preliminary assessment of the efficacy, tolerability and safety of a cannabis-based medicine (Sativex) in the treatment of pain caused by rheumatoid arthritis. *Rheumatology*, 45(1), 50-52. doi:[10.1093/rheumatology/kei183](https://doi.org/10.1093/rheumatology/kei183)
- Bridgestock C., R. C. (2013). Anatomy, physiology and pharmacology of pain. *Anaesthesia and intensive care medicine*, 14(11). doi:<https://doi.org/10.1016/j.mpaic.2013.08.004>
- Britch, S. C. (2023). Cannabidiol and delta-9-tetrahydrocannabinol interactions in male and female rats with persistent inflammatory pain. *The Journal of Pain*, 24(1), 98-111. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jpain.2022.09.002>
- Bullock J., R. S. (2018). Rheumatoid arthritis: a brief overview of the treatment. *Med Princ Pract.*, 27, 501–507. doi:[10.1159/000493390](https://doi.org/10.1159/000493390)
- Campos-Ríos A., R.-R. L.-P.-R. (2021). etrodotoxin: A New Strategy to Treat Visceral Pain? *Toxins*, 13(7). doi:<https://doi.org/10.3390/toxins13070496>
- Cao Y., F. D. (2020). Pain mechanism in rheumatoid arthritis: from cytokines to central sensitization. 2020. *Mediators of Inflammation*, 2020. doi:<https://doi.org/10.1155/2020/2076328>
- Casajuana Kögel, C. L.-P.-F. (2018). Constituyentes psicoactivos del cannabis y sus implicaciones clínicas: una revisión sistemática. *Adicciones*, 30(8), 140-151. Obtenido de http://www.cij.gob.mx/tratamiento/pages/pdf/CONST_CANNABIS.pdf
- Chayasirisobhon, S. (2020). Mechanisms of Action and Pharmacokinetics of Cannabis. *The Permanent Journal*, 1-3. doi:[10.7812/TPP/19.200](https://doi.org/10.7812/TPP/19.200)
- Chen, T. T.-Y.-S.-H.-S.-H.-C.-Q. (2018). Top-down descending facilitation of spinal sensory excitatory transmission from the anterior cingulate cortex. *Nat Commun*, 9, 1886. doi:<https://doi.org/10.1038/s41467-018-04309-2>

- Choudhary, N. B. (2018). Experimental animal models for rheumatoid arthritis. *Immunopharmacology and immunotoxicology*, 40(3), 193-200. doi:https://doi.org/10.1080/08923973.2018.1434793
- Cisneros-Caballero A.F., F.-P. M.-J.-M. (2017). Estrategias terapéuticas para la artritis reumatoide: hacia las terapias biotecnológicas. *Investigación en Discapacidad*, 6(2), 69-87. doi:https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=71918
- De-Gregorio D., M. R.-S.-C. (2019). Cannabidiol modulates serotonergic transmission and reverses both allodynia and anxiety-like behavior in a model of neuropathic pain. *Pain*, 160(1), 136. doi:http://dx.doi.org/10.1097/j.pain.0000000000001386
- Devs A., K. B.-A. (2020). A pharmacological characterization of Cannabis sativa chemovar extracts. *Journal of Cannabis Research*, 2(17). doi:https://doi.org/10.1186/s42238-020-00026-0
- Ehrenkranz J., L. M. (2019). Bones and joints: the Effects of Cannabinoids on the Skeleton. *J Clin Endocrinol Metab*, 104(10), 4683–4694. doi:10.1210/jc.2019-00665
- Ellison, D. (2017). Physiology of Pain. *Critical care nursing clinics of North America*, 29, 397–406. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.cnc.2017.08.001
- Farokhnia, M. M. (2020). Effects of oral, smoked, and vaporized cannabis on endocrine pathways related to appetite and metabolism: a randomized, double-blind, placebo-controlled, human laboratory study. *Translational psychiatry*, 10(1), 1-11. doi:https://doi.org/10.1038/s41398-020-0756-3
- Fernandes ES, R. F. (2011). A distinct role for transient receptor potential ankyrin 1, in addition to transient receptor potential vanilloid 1, in tumor necrosis factor α -induced inflammatory hyperalgesia and Freund's complete adjuvant-induced monarthritis. *Arthritis & Rheumatism*, 63(3), 819-829. doi:10.1002/art.30150
- Furqan T., B. S. (2020). Cannabis constituents and acetylcholinesterase interaction: molecular docking, in vitro studies and association with CNR1 rs806368 and ACHE rs17228602. *Biomolecules*, 10(5), 758. doi:10.3390/biom10050758
- Gallily R., Y. Z. (2015). Overcoming the bell-shaped dose-response of cannabidiol by using cannabis extract enriched in cannabidiol. *Pharmacology & Pharmacy*, 6, 75-85. doi:http://dx.doi.org/10.4236/pp.2015.62010
- Ghilardi JR, F. K.-A.-C. (2012). Neuroplasticity of sensory and sympathetic nerve fibers in a mouse model of a painful arthritic joint. *Arthritis & Rheumatism*, 64(7), 2223-2232. doi:10.1002/art.34385

- Ghlichloo I, G. V. (Enero de 2023). *Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs (NSAIDs)*. Recuperado el Junio de 2023, de StatPearls Publishing: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK547742/>
- Gonen T., A. H. (2020). Cannabis and Cannabinoids in the Treatment of Rheumatic Diseases. *Rambam Maimonides Med J*, 11(1). doi:10.5041/RMMJ.10389
- Gregory N. S., A. L. (2013). An overview of animal models of pain: disease models and outcome measures. *The journal of pain*, 14(11), 1255-1269. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.jpain.2013.06.008
- Gui H., L. X. (2015). Activation of cannabinoid receptor 2 attenuates synovitis and joint destruction in collagen-induced arthritis. *Immunobiology*, 220(6), 817-822. doi:10.1016/j.imbio.2014.12.012
- Guo, Q. W. (2018). Rheumatoid arthritis: pathological mechanisms and modern pharmacologic therapies. *Bone Res*, 6(15). Obtenido de <https://doi.org/10.1038/s41413-018-0016-9>
- Guy G., W. B. (2006). *Uso terapéutico del cannabis y los cannabinoides*. Pharma.
- Hammell D.C., Z. L. (2016). Transdermal cannabidiol reduces inflammation and pain-related behaviours in a rat model of arthritis. *European journal of pain*, 20(6), 936-948. doi:10.1002/ejp.818
- Hammell, D. C. (2016). Transdermal cannabidiol reduces inflammation and pain-related behaviours in a rat model of arthritis. *European journal of pain*, 20(6), 936-948. doi:10.1002/ejp.818
- Hashiesh, H. M. (2021). Pharmacological properties, therapeutic potential and molecular mechanisms of JWH133, a CB2 receptor-selective agonist. *Frontiers in Pharmacology*, 12, 702675. doi:10.3389/fphar.2021.702675
- Hendricks O., A. T. (2019). Efficacy and safety of cannabidiol followed by an open label add-on of tetrahydrocannabinol for the treatment of chronic pain in patients with rheumatoid arthritis or ankylosing spondylitis: protocol for a multicentre, randomised, placebo controlled study. *BMJ Open*, 9. doi:10.1136/bmjopen-2018-028197
- Henshaw, F. R. (2021). The effects of cannabinoids on pro-and anti-inflammatory cytokines: a systematic review of in vivo studies. *Cannabis and Cannabinoid Research*, 6(3), 177-195. doi:10.1089/can.2020.0105
- Hložek T., U. L. (2017). Pharmacokinetic and behavioural profile of THC, CBD, and THC+ CBD combination after pulmonary, oral, and subcutaneous administration in rats and confirmation of conversion in vivo of CBD to THC. *European*

Neuropsychopharmacology, 27(12), 1223-1237.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2017.10.037>

International Association for the Study of Pain (IASP). (2017). *IASP*. Recuperado el Enero de 2023, de IASP terminology: <https://www.iasp-pain.org/Education/Content.aspx?ItemNumber=1698&navItemNumber=576>

Jimenez-Andrade, J. M. (2012). Sensory and sympathetic nerve fibers undergo sprouting and neuroma formation in the painful arthritic joint of geriatric mice. *Arthritis research & therapy*, 14(3), 1-15. doi:<https://doi.org/10.1186/ar3826>

Katz-Talmor D., K. I.-K.-S. (2018). Cannabinoids for the treatment of rheumatic diseases, where do we stand? *Nat Rev Rheumatol*, 14, 488–498. doi:<https://doi.org/10.1038/s41584-018-0025-5>

Kinghorn D., F. H. (2017). Unraveling the complex chemistry and pharmacology of Cannabis sativa. *Springer*, 103. doi:10.1007/978-3-319-45541-9

Kirkpatrick D., M. D. (2015). Therapeutic basis of clinical pain modulation. *Clin Trans Sci*, 8, 848–856. doi:10.1111/cts.12282

Kopustinskiene, D. M. (2022). Cannabis sativa L. Bioactive compounds and their protective role in oxidative stress and inflammation. *Antioxidants*, 11(4), 660. doi:<https://doi.org/10.3390/>

Kumar, P. M. (2021). Pharmacological properties, therapeutic potential, and legal status of Cannabis sativa L.: An overview. *Phytotherapy Research*, 35(11), 6010-6029. doi:10.1002/ptr.7213

Latremoliere, A. W. (2009). Central sensitization: A Generator of Pain Hypersensitivity by Central Neural Plasticity. 895. *The journal of pain : Official journal of the American Pain Society*, 10(9), 895. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jpain.2009.06.012>

Lemberger L, M. R. (1973). Comparative pharmacology of Delta9-tetrahydrocannabinol and its metabolite, 11-OH-Delta9-tetrahydrocannabinol. *J Clin Invest.*, 52, 2411-2417. doi:10.1172/JCI107431

Linher-Melville K., Z. Y. (2020). Evaluation of the preclinical analgesic efficacy of naturally derived, orally administered oil forms of Δ 9-tetrahydrocannabinol (THC), cannabidiol (CBD), and their 1: 1 combination. *PLoS One*, 15(6). doi:<https://doi.org/10.1371/journal>.

Lowin T., S. M. (2019). Joints for joints: cannabinoids in the treatment of rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol*, 31, 271–278. doi:10.1097/BOR.0000000000000590

- Lowin T., T. R. (2020). Cannabidiol (CBD): a killer for inflammatory rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Cell Death Dis*, 11(714). doi:<https://doi.org/10.1038/s41419-020-02892-1>
- Lowin, T. S. (2019). Joints for joints: cannabinoids in the treatment of rheumatoid arthritis. *Current opinion in rheumatology*, 31(3), 271-278. doi:<https://doi.org/10.1097/bor.0000000000000590>
- Malfait AM., G. R. (2000). The nonpsychoactive cannabis constituent cannabidiol is an oral anti-arthritic therapeutic in murine collagen-induced arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(17). doi:<https://doi.org/10.1073/pnas.160105897>
- Metna-Laurent M., M. M.-V. (2017). Cannabinoid-induced tetrad in mice. *Current Protocols in Neuroscience*, 80, 9.59.1–9.59.10. doi:10.1002/cpns.31
- Mogil, J. S. (2004). What should we be measuring in behavioral studies of chronic pain in animals? *Pain*, 112(1), 12-15. doi:10.1016/j.pain.2004.09.028
- Mogil, J. S. (2009). Animal models of pain: progress and challenges. *Nature Reviews Neuroscience*, 10(4), 283-294. doi:10.1038/nrn2606
- Morado-Urbina, C. E.-V.-R.-G.-C.-A. (2014). Early, middle, or late administration of zoledronate alleviates spontaneous nociceptive behavior and restores functional outcomes in a mouse model of CFA-induced arthritis. *Drug development research*, 75(7), 438-448. doi:<https://doi.org/10.1002/ddr.21183>
- Muley, M. M. (2016). Preclinical assessment of inflammatory pain. *CNS neuroscience & therapeutics*, 22(2), 88-101. doi:10.1111/cns.12486
- Nagarkatti P., P. R. (2009). Cannabinoids as novel anti-inflammatory drugs. *Future medicinal chemistry*, 1(7), 1333-1349. doi:10.4155/fmc.09.93
- Narouze, S. (2021). Cannabinoids and pain: mechanisms of action. *Springer, Cham*. doi:https://doi.org/10.1007/978-3-030-69186-8_24
- Nasrin, S. W.-P. (2021). Cannabinoid metabolites as inhibitors of major hepatic CYP450 enzymes, with implications for cannabis-drug interactions. *Drug Metabolism and Disposition*, 49(12), 1070-1080. doi:<https://doi.org/10.1124/dmd.121.000442>
- Ofek O., K. M.-N. (2006). Peripheral cannabinoid receptor, CB2, regulates. *PNAS*, 103(3), 696-701. doi:10.1073/pnas.0504187103
- Oladimeji A.V., V. M. (2020). Phytochemical profile of cannabis plant: a review. *J Pharmacogn Phytochem*, 9(3), 680-687. doi:<https://doi.org/10.22271/phyto.2020.v9.i3k.11350>

- Oreja-Guevara. (2012). Clinical efficacy and effectiveness of Sativex, a combined cannabinoid medicine, in multiple sclerosis-related spasticity. *Expert Review of Neurotherapeutics*, 12(4), 3-8. doi:10.1586/ern.12.11
- Orr P.M., S. B. (2017). The role of pain classification systems in pain management. *Critical care nursing clinics of North America*, 29, 407-418. doi:https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0899588517300552?via%3Dihub
- Palazzo, E. L. (2010). Moving towards supraspinal TRPV1 receptors for chronic pain relief. *Mol Pain*, 6(66). doi:https://doi.org/10.1186/1744-8069-6-66
- Patel, N. (2010). Guide to Pain Management in Low-Resource Settings. *International Association for the Study of Pain.*, 13-17. doi:https://crh.arizona.edu/sites/default/files/2022-07/Guide_to_Pain_Management_in_Low-Resource_Settings.pdf
- Pennypacker SD, C. K.-S. (2022). Potency and Therapeutic THC and CBD Ratios: U.S. Cannabis Markets Overshoot. *Front Pharmacol*, 6(13). doi:10.3389/fphar.2022.921493
- Pennypacker SD., R.-S. A. (2020). CBD and THC: Do they complement each other like Yin and Yang? *Pharmacotherapy*, 40(11), 1152–1165. doi:https://doi.org/10.1002/phar.2469
- Purves, D. (2016). *Neurociencias* (6a ed.). Panamericana.
- Ransing R., D. I.-S. (2022). Current state of cannabis use, policies, and research across sixteen countries: cross-country comparisons and international perspectives. *Trends in psychiatry and psychotherapy*, 44. doi:http://dx.doi.org/10.47626/2237-6089-2021-0263
- Richardson D., P. R. (2008). Characterisation of the cannabinoid receptor system in synovial tissue and fluid in patients with osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *Arthritis research & therapy*, 10, 1-14. doi:10.1186/ar2401)
- Romero-Sandoval EA, F. J.-V. (2018). Cannabis for Chronic Pain: Challenges and Considerations. *Pharmacotherapy*, 38(6), 651-662. doi:10.1002/phar.2115
- Ronan P.J., W. N. (2016). Molecular Mechanisms of Cannabis Signaling in the Brain. *Progress in Molecular Biology and Translational Science, Progress in Molecular Biology and Translational Science*, 123-147. doi:https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2015.10.002
- Salazar H., J.-O. A. (2009). El canal TRPV1 como diana para tratar el dolor. *Rev Neurol*, 48(7), 357-364. doi:10.33588/rn.4807.2009124

- Shams S., M. J. (2021). The therapeutic landscape of rheumatoid arthritis: current state and future directions. *Front. Pharmacol.*, 12(680043). doi:10.3389/fphar.2021.680043
- Shebaby W., S. J. (2021). In vivo and in vitro anti-inflammatory activity evaluation of Lebanese Cannabis sativa L. ssp. indica (Lam.). *Journal of Ethnopharmacology*. doi:https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.113743
- Silva-Cardoso, G. K.-L.-C.-P. (2021). Cannabidiol effectively reverses mechanical and thermal allodynia, hyperalgesia, and anxious behaviors in a neuropathic pain model: Possible role of CB1 and TRPV1 receptors. *Neuropharmacology*, 197. doi:https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2021.108712
- Simon, L. S. (2021). The Jak/STAT pathway: A focus on pain in rheumatoid arthritis. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*, 51(1), 278-284. doi:https://doi.org/10.1016/j.semarthrit.2020.10.008
- Smith CJ., V. D. (2022). The phytochemical diversity of commercial Cannabis in the United States. *PLoS ONE*, 17(5). doi:https://doi.org/10.1371/journal.pone.0267498
- Smolen J., A. D. (2018). Rheumatoid arthritis. *Nature Reviews, Disease primers.*, 4 (18001). Obtenido de 10.1038/nrdp.2018.1
- Solowij N., B. S.-H. (2019). A randomised controlled trial of vaporised Δ^9 -tetrahydrocannabinol and cannabidiol alone and in combination in frequent and infrequent cannabis users: acute intoxication effects. *European archives of psychiatry and clinical neuroscience*, 269(1), 17-35. doi:https://doi.org/10.1007/s00406-019-00978-2
- Starkus, J. J.-H. (2019). Diverse TRPV1 responses to cannabinoids. *Channels*, 13(1), 172-191. doi:10.1080/19336950.2019.1619436
- Tabboon P., P. T. (2022). Mucosal Delivery of Cannabidiol: Influence of Vehicles and Enhancers. *Pharmaceutics*, 14(8). doi:https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14081687
- Turcotte, C. B. (2016). The CB 2 receptor and its role as a regulator of inflammation. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 73, 4449-4470. doi:10.1007/s00018-016-2300-4
- Turner, S. E. (2017). Molecular Pharmacology of Phytocannabinoids. *Prog. Chem. Org. Nat. Prod.*, 61–101. doi:10.1007/978-3-319-45541-9_3

- Urits I., G. K. (2020). Use of cannabidiol (CBD) for the treatment of chronic pain. *Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology*, 34(3), 463-477. doi:10.1016/j.bpa.2020.06.004
- Vergne-Salle P., P. S.-L. (2020). The burden of pain in rheumatoid arthritis: Impact of disease activity and psychological factors. *European Journal of Pain*, 24(10), 1979-1989. doi:10.1002/ejp.1651
- Woodhams, S. G. (2015). The role of the endocannabinoid system in pain. *Pain control*, 119-143. doi:10.1007/978-3-662-46450-2_7
- Zhang A., L. Y. (2018). Mechanisms for joint pain in rheumatoid arthritis (RA): from cytokines to central sensitization. *Curr Osteoporos Rep.*, 16(5), 603–610. doi:doi:10.1007/s11914-018-0473-5.
- Zhu M., Y. B. (2018). Cannabinoid Receptor 2 Agonist Prevents Local and Systemic Inflammatory Bone Destruction in Rheumatoid Arthritis. *Journal of Bone and Mineral Research*, 14(4), 739-751. doi:https://doi.org/10.1002/jbmr.3637
- Zuardi AW., H. J. (2012). Interaction between cannabidiol (CBD) and Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC): influence of administration interval and dose ratio between the cannabinoids. *Psychopharmacology*, 247–249. doi:https://doi.org/10.1007/s00213-011-2495-x

12. Anexos

12.1 Listado de abreviaturas

(-)- δ 8-THC: tetrahidrocannabinol	Delta-8-	AUC: Área bajo la curva
11-COOH-THC: carboxitetrahidrocannabinol	11-	cAMP: Adenosín monofosfato cíclico
11-OH-THC: hidroxitetrahidrocannabinol	11-	CB1: Receptor cannabinoide 1
2-AG: 2-araquidonilglicerol		CB2: Receptor cannabinoide 2
5-HT: 5-hidroxitriptamina o serotonina		CBC: cannabicromeno
7-COOH-CBD: 7-carboxicannabidiol		CBD: cannabidiol
7-OH-CBD: 7-hidroxicannabidiol		CBDA: ácido cannabidiólico
ACC: corteza cingulada anterior		CBDV: cannabidivarol
ACPs: anticuerpos antiproteína citrulinada		CBG: cannabigerol
AEA: anandamida		CBM: medicina basada en cannabis
AIA: Artritis inducida por antígeno		CBN: cannabinol
AINEs: antiinflamatorios no esteroideos		CC: curva de calibración
AjA: Ácido ajulémico (cannabinoide sintético no psicoactivo)		CFA: adyuvante completo de Freund
ANOVA: Análisis de varianza		CIA: artritis inducida por colágeno
AP-1: proteína de activación 1		C _{máx} : concentración máxima de THC
AR: Artritis Reumatoide		COE: aceite de cannabis libanés
		COX-2: ciclooxigenasa-2
		CP55,940 y WIN55,212-2: cannabinoides sintéticos
		CPA: células presentadoras de antígeno

CV: Coeficiente de variación

DAGL: diacil glicerol lipasa

DMARDs: fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad

EC₅₀: Concentración efectiva 50

ECB: endocannabinoides

EC_{max}: Concentración efectiva máxima

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

FAAH: amida hidrolasa de ácidos grasos

FLSs: sinoviocitos tipo fibroblasto

FR: Factor Reumatoide

GABA: ácido γ -aminobutírico

GC/MS: cromatografía de gases acoplada a masas

GM-CSF: factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos

GPCRs: receptores acoplados a proteínas G

GPR55: receptor 55 acoplado a proteína G

GTP γ S: Guanosina 5'-O -[γ -tio] trifosfato. Análogo no hidrolizable de GTP.

i.a.: Vía intraarticular

i.p.: Vía intraperitoneal

IFN- β : Interferon- β

IFN- γ : Interferón γ

IgG: inmunoglobulina G

IL: Interleucina

K_i: Constante de inhibición

LIC: Límite inferior de cuantificación

MAGL: monoacilglicerol lipasa

MAPK: proteína quinasa activada por mitógeno

mBSA: albúmina sérica metilada

MC: muestras control

MCA: muestra control alta

MCB: muestra control baja

MCD: muestra control diluida

MCM: muestra control media

MCT: Aceite de triglicéridos de cadena media

MMPs: metaloproteinasas de matriz

mRNA: Ácido ribonucleico mensajero

MTX: metotrexato

NAPE-PLD:	N-acil-	RVM: médula rostral ventromedial
fasfatidiletanolamina		S.D.: Desviación estándar
NAT: N-aciltransferasa		SNC: Sistema Nervioso Central
NK: Células natural killer		SNP: sistema nervioso periférico
NLRP3: Inflamosoma		THC: Δ -9 tetrahidrocannabinol
NTs: neurotransmisores		THCA :ácido Δ -9-
OA: osteoartritis		tetrahidrocannabinólico
PA: potencial de acción		TNF- α : Factor de necrosis tumoral α
PAG: sustancia gris periacueductal		TPRM8: Canal del potencial receptor transitorio de melastatina 8
PBS: solución salina amortiguada por fosfatos		Treg: células T reguladoras
PI3K-Akt: cinasa 3-fosfoinositidol		TRPA1: canal de cationes de potencial de receptor transitorio, subfamilia A, miembro 1
PKA: proteína cinasa A		TRPV1: Receptor de potencial transitorio V1
PPARs: Receptores activados por proliferadores peroxisomales		UPLC: Cromatografía de líquidos de ultra-alta resolución
RASF: fibroblastos sinoviales de artritis reumatoide		
ROS: especies reactivas de oxígeno		