

# ACTIVIDAD ANALGÉSICA Y ANTIINFLAMATORIA DE DERIVADOS DE PODOFILOTOXINA

## ANALGESIC AND ANTI-INFLAMMATORY ACTIVITY OF PODOPHYLLOTOXIN DERIVATIVES

Estela Ivonne Guerrero\*; Andrés Abad\*\*; Gisela Montenegro\*; Esther del Olmo\*\*; José Luis López-Pérez\*\*; Arturo San Feliciano\*\*

---

### RESUMEN

La podofilotoxina es un producto natural inhibidor de la polimerización de la tubulina, que ha servido de prototipo para el desarrollo de distintos agentes anti-tumorales, actualmente en uso clínico como etopósido, tenipósido y etopophos. Reumacon, otro derivado semisintético similar a los anteriores, llegó a fase clínica para el tratamiento de la artritis reumatoide. Durante un estudio fitoquímico llevado a cabo sobre las hojas de *Juniperus thurifera* L., se aislaron, entre otros productos, varios ciclolignanos, podofilotoxina, desoxipodofilotoxina, desoxipicropodofilina y ácido thuriférico. Estos compuestos, obtenidos posteriormente mediante semisíntesis, fueron ensayados como analgésicos y antiinflamatorios. Desoxipodofilotoxina, una sustancia conformacionalmente rígida debido a la *trans*-lactona tensionada, muestra una elevada citotoxicidad; su epímero en C-8', desoxipicropodofilina, con una *cis*-lactona más flexible y cien veces menos citotóxica, muestra un potente efecto analgésico, aunque menor actividad antiinflamatoria.

**Palabras clave:** lignanos, podofilotoxina, analgesia, artritis.

### ABSTRACT

Podophyllotoxin is a natural inhibitor of tubulin polymerization, which has served as the prototype for the development of various antitumor agents currently in clinical use as etoposide, teniposide and Etopophos. Reumacon, another semisynthetic derivative, similar to the above, has reached clinical stage for the treatment of rheumatoid arthritis. During a study conducted on phytochemical leaves, *thurifera* L. *Juniperus*; several cyclolignans, podophyllotoxin, deoxypodophyllotoxin, desoxipicropodophyllin, and thuriferic acid, among other products, were isolated. These compounds subsequently obtained by semi-synthesis, were tested as analgesics and anti-inflammatories. Deoxypodophyllotoxin, a substance conformationally rigid

---

\* Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad de Panamá, Panamá. República de Panamá; <guerrerodleon@gmail.com>.

\*\* Departamento de Química Farmacéutica, Facultad de Farmacia-CIETUS, Universidad de Salamanca, 37007 Salamanca, España. <lopez@usal.es>.

due to the tension in trans-lactone, shows a high cytotoxicity, and its epimer at C-8', desoxipicropodofilina, cis-lactone has a more flexible and a hundred times less cytotoxic, displaying a powerful analgesic effect, albeit with lower antiinflammatory activity.

**Keywords:** lignans, podophyllotoxin, analgesia, arthritis.

## I. INTRODUCCIÓN

La podofilotoxina (**1a**) es un lignano de origen natural abundante en los rizomas de *Podophyllum emodi* y otras especies relacionadas, que ha servido como punto de partida para el desarrollo de distintos agentes anticancerosos como etopósido (**2a**), tenipósido<sup>1,2</sup> (**2b**) y etopofos<sup>3</sup> (**2c**). Estos fármacos se utilizan actualmente para el tratamiento de cánceres de pulmón, de testículo y de ciertas leucemias. Además de estos fármacos comercializados, un número considerable de derivados, como NK 611<sup>4</sup> (**2e**) y GL 331<sup>5</sup> (**2f**) entre otros, han llegado a distintos niveles de desarrollo en fase clínica, mejorando algunos aspectos farmacológicos de los primeros. La diacilación del etopofos ha conducido al taflupósido<sup>6</sup> (**2d**), actualmente en ensayos clínicos.

Mientras que la podofilotoxina es un inhibidor de la polimerización de la tubulina<sup>7</sup>, los fármacos derivados de la epipodofilotoxina (**1b**), como **2a**, **2b** o **2c**, actúan inhibiendo la topoisomerasa-II<sup>8</sup>. El taflupósido es un inhibidor dual de las topoisomerasas I y II. Adicionalmente, la podofilotoxina es el precursor de otros derivados usados para el tratamiento de la psoriasis y la malaria<sup>9</sup>. Algunos preparados de la podofilotoxina se utilizan para el tratamiento del condiloma acuminado y otras verrugas<sup>10</sup>. Otro compuesto relacionado con la podofilotoxina es el Reumacon<sup>11</sup> (**2g**), que llegó a fase clínica para el tratamiento de la artritis reumatoide. Pacientes con artritis reumatoide trata-

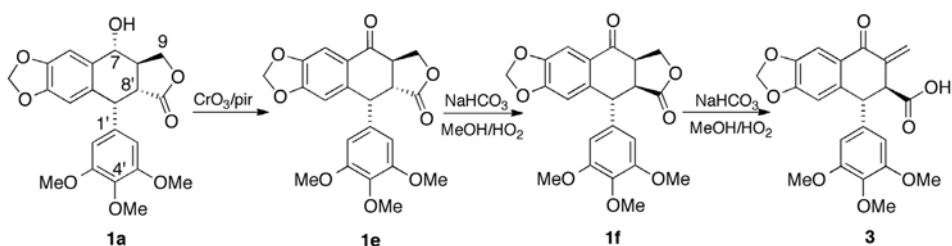
dos con Reumacon mostraron una sensible reducción de la inflamación durante los ensayos clínicos; sin embargo, esta sustancia presentó importantes efectos adversos gastrointestinales. Otras sustancias inhibidoras de la topoisomerasa II, como doxorubicina, o inhibidoras de la topoisomerasa I, como la captotecina, han resultado ser también agentes antiartríticos<sup>12</sup>.

Con estos antecedentes, se llevaron a cabo ensayos de actividad analgésica y antiinflamatoria de desoxipodofilotoxina (**1c**), desoxipicropodofilina (**1d**) y ácido thuriférico (**3**), tres ciclolignanos aislados durante un estudio fitoquímico sobre las hojas de *Juniperus thurifera* L.<sup>13</sup>. Debido a la no disponibilidad de cantidades suficientes de los productos **1d** y **3** para abordar los ensayos descritos en esta publicación, se procedió a su preparación semi-sintética a partir de desoxipodofilotoxina y podofilotoxina, respectivamente.

## II. MATERIAL Y MÉTODO

### 1. Extracción y purificación de los compuestos **1c**, **1d** y **3**

Mediante el estudio fitoquímico de las hojas de *Juniperus thurifera* L. se aislaron, entre otros compuestos, desoxipodofilotoxina (**1c**) y desoxipicropodofilina (**1d**), dos ciclolignanos perfectamente establecidos, además del ácido thuriférico (**3**). La recolección de la planta y el estudio fitoquímico realizados se describen en la



ESQUEMA 1. Obtención de ácido thuriférico (**3**) a partir de podofilotoxina (**1a**)

referencia 13. Debido a la pequeña cantidad de muestra disponible de los compuestos **1d** y **3**, se procedió a su preparación sintética para realizar los ensayos que aquí se describen.

## 2a. Preparación de **1d**

400 mg de **1a** fueron disueltos en 25 mL de una disolución de KOH al 5 % en MeOH. Después de mantenerse a temperatura ambiente y en agitación durante 2 horas, se extrajo y se dejó cristalizar, obteniéndose 390 mg de **1d** (p. f. 172-172°C). Sus propiedades físicas y espectroscópicas fueron idénticas a las descritas para el producto natural<sup>14</sup>.

## 2b. Preparación de **3**

*Podofilotoxona (1e)*. 400 mg de **1a** disueltos en 15 mL de piridina fueron tratados con 250 mg de CrO<sub>3</sub> en 5 mL de piridina. La suspensión se mantuvo en agitación durante una noche a temperatura ambiente. Después de la extracción del crudo de reacción, se sometió a cromatografía de flash, obteniéndose 350 mg de **1e** (p. f. = 190-192°C) (Esquema 1). Sus propiedades espectroscópicas fueron idénticas a las descritas para este producto<sup>15</sup>.

*Ácido thuriférico (3)*. 350 mg de **1e** fueron tratados con 10 mL de una suspensión saturada de NaHCO<sub>3</sub> en

MeOH/H<sub>2</sub>O (Esquema 1). La suspensión se mantuvo durante 60 minutos a temperatura ambiente con agitación constante. Después del proceso habitual de extracción, se sometió a cromatografía de flash en silica-gel, obteniéndose 310 mg de **3** (p. f. = 93-96°C). Sus propiedades físicas y espectroscópicas resultaron idénticas a las descritas para el producto natural **3**<sup>16</sup>.

## 3. Modelado molecular

Los estudios de modelado molecular de **1c**, **1d** y **3** se llevaron a cabo en una estación de trabajo Silicon Graphics Indigo. Los modelos fueron contruidos usando las facilidades de Macromodel v.5.5<sup>17</sup>. Se realizó un análisis conformacional de los tres compuestos utilizando el método de Montecarlo y MM2<sup>18</sup> como campo de fuerza. Para reproducir las condiciones experimentales en las que se registraron los espectros de RMN de protón, los cálculos se realizaron considerando cloroformo como disolvente de manera explícita. Se generaron 1000 conformaciones para cada uno de los compuestos, seleccionando aquellas que presentaban hasta 10 kJ/mol por encima del mínimo global. Con el fin de obtener un mayor grado de precisión en sus energías, posteriormente se sometieron a un cálculo mecano-cuántico utilizando el método de Hartee-Fock con la base 6-31+G\* en el programa Spartan 8.1<sup>19</sup>.

#### 4. Actividad analgésica

En la evaluación de la actividad antinociceptiva de los compuestos se emplearon ratones Swiss machos (25-30 g), que fueron divididos en 5 grupos (n=6). A cada grupo le fue suministrado por vía oral uno de los siguientes tratamientos: ácido acetilsalicílico (AAS) (200 mg/kg), morfina (4 mg/kg), desoxipodofilotoxina (**1c**) (50 mg/kg), desoxipicropodofilina (**1d**) (50 mg/kg) y ácido thuriférico (**3**) (50 mg/kg). Todos los productos fueron suspendidos en carboximetilcelulosa al 2 %, por lo que además se incluyó un grupo control que recibió el vehículo (CMC 2 %; 0,1 mL/100 g). Una hora después de haber recibido el tratamiento, se les administró ácido acético al 1 % (AcH), vía intraperitoneal e inmediatamente los animales fueron colocados en recipientes transparentes, apropiados para determinar el número de contorsiones en un período de observación de 20 minutos<sup>20</sup>.

El porcentaje de inhibición de contorsiones se calculó utilizando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Inhibición} = 100 - (Ct / Cc) * 100$$

Donde *Ct*: número de contorsiones del grupo tratado, y *Cc*: número de contorsiones del grupo control.

#### 5. Actividad antiinflamatoria

Para evaluar la actividad antiinflamatoria se empleó el test del edema plantar por carragenina en ratas Sprague Dawley (150-200 g)<sup>21</sup>. Se utilizaron grupos de seis animales, cada uno de los cuales recibió indometacina (10 mg/kg), desoxipodofilotoxina (**1c**) (10 mg/kg), desoxi-

picropodofilina (**1d**) (10 mg/kg) o ácido thuriférico (**3**) (10 mg/kg). Se mantuvo un grupo control que recibió el vehículo empleado para la suspensión de los productos (CMC 2 %; 0.1 mL/10 g). La administración de los diferentes tratamientos fue realizada por vía oral; 1 h después de la administración de los tratamientos se indujo el edema, inyectando 0,1 mL de carragenina al 1 % en la almohadilla plantar de la pata trasera derecha.

La inflamación se cuantificó determinando la diferencia de desplazamiento de volumen de la pata trasera derecha antes de la administración de los tratamientos y 1, 3 y 6 h después de la inyección de carragenina, utilizando un pletismómetro (Ugo Basile) como modelo oncométrico.

#### 6. Análisis estadístico

Los datos se expresan como media  $\pm$  S.E. El porcentaje de analgesia se calculó considerando el número de contorsiones del grupo Control-CMC como el 100 % de analgesia (antes descrito). Por otra parte, los resultados en el test de inflamación se expresan como porcentaje de cambio con respecto al control (antes del tratamiento) y los valores de volumen de desplazamiento para cada uno de los tiempos de observación. Los resultados se analizaron estadísticamente mediante Anova de una vía, seguido de una prueba de Tukey para comparaciones múltiples; un valor de probabilidad  $< 0,05$  fue considerado como estadísticamente significativo.

### III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La desoxipodofilotoxina (**1c**) ensayada en el curso de este trabajo fue aislada durante un estudio fitoquímico llevado a cabo

con las hojas de *Juniperus thurifera* L<sup>13</sup>. Debido a la pequeña cantidad de muestra natural pura disponible de desoxipicropodofilina (**1d**) y de ácido thuriférico (**3**), se realizó su preparación en el laboratorio a partir de **1c** y **1a**, respectivamente. En medios básicos, **1c**, con una *trans*-lactona tensionada, se transforma en **1d** como consecuencia de la epimerización en C-8' para dar una *cis*-lactona más relajada. El rendimiento de la reacción es prácticamente cuantitativo y la estructura de **1d** se determinó por comparación con una muestra auténtica. El compuesto **3** se preparó a partir de la podofilotoxina natural **1a** mediante oxidación a podofilotoxona **1e**, seguida de tratamiento con NaHCO<sub>3</sub> en MeOH/H<sub>2</sub>O (Esquema 1). Una vez oxidado el alcohol a la cetona (**1e**), esta se trató con bases produciendo la epimerización de la *trans*-lactona **1e** en la *cis*-lactona picropodofilotoxona **1f**, seguido de la apertura de la lactona, dando lugar al ácido thuriférico con un carbonilo  $\alpha,\beta$ -insaturado más estable. Este producto mostró características espectroscópicas idénticas a las del producto natural **3** (Figura 1).

El ácido thuriférico se diferencia de los otros dos lignanos por la ausencia de

la  $\gamma$ -lactona característica; en su lugar posee un ácido carboxílico libre y un carbonilo conjugado. Su constitución química fue determinada de manera inequívoca mediante espectros bidimensionales de correlación heteronuclear protón-carbono<sup>16</sup>. Otros estudios posteriores<sup>22</sup> permitieron reconfirmar su estructura y corregir la de su epímero, el ácido epithuriférico<sup>23</sup>. Los tres compuestos fueron caracterizados desde el punto de vista espectroscópico, y purificados mediante sucesivas recrystalizaciones antes de los ensayos.

La desoxidofilotoxina (**1c**) y la desoxipicropodofilina (**1d**) son epímeros en C-8'. La inversión de este estereocentro da lugar a cambios importantes en la disposición espacial y en la rigidez/flexibilidad entre ambas moléculas, como se pone de manifiesto mediante los estudios de modelado molecular (Figura 2).

Mientras que desoxipodofilotoxina (**1c**) presenta una única conformación principal (Figura 2-1c) con la agrupación trimetoxifenilo en disposición pseudoaxial, desoxipicropodofilina (**1d**) se encuentra distribuida en cuatro diferentes disposiciones conformacionales (**I-IV**) con una diferencia de energía electrónica

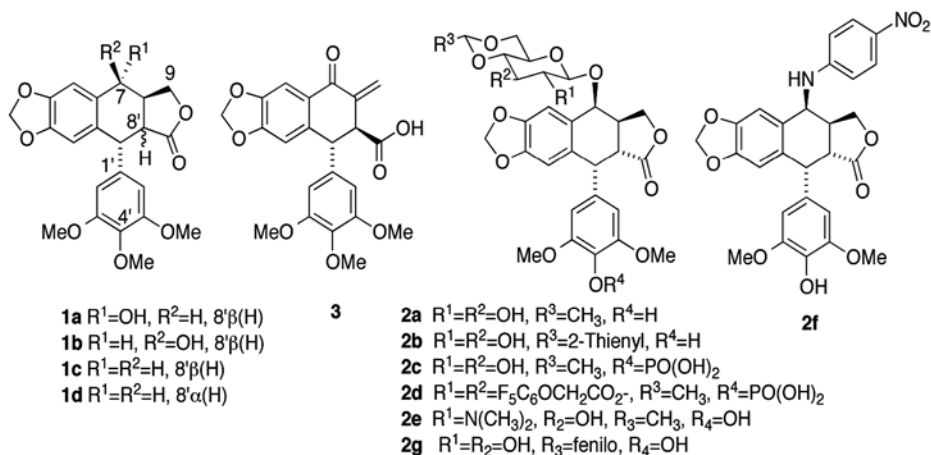
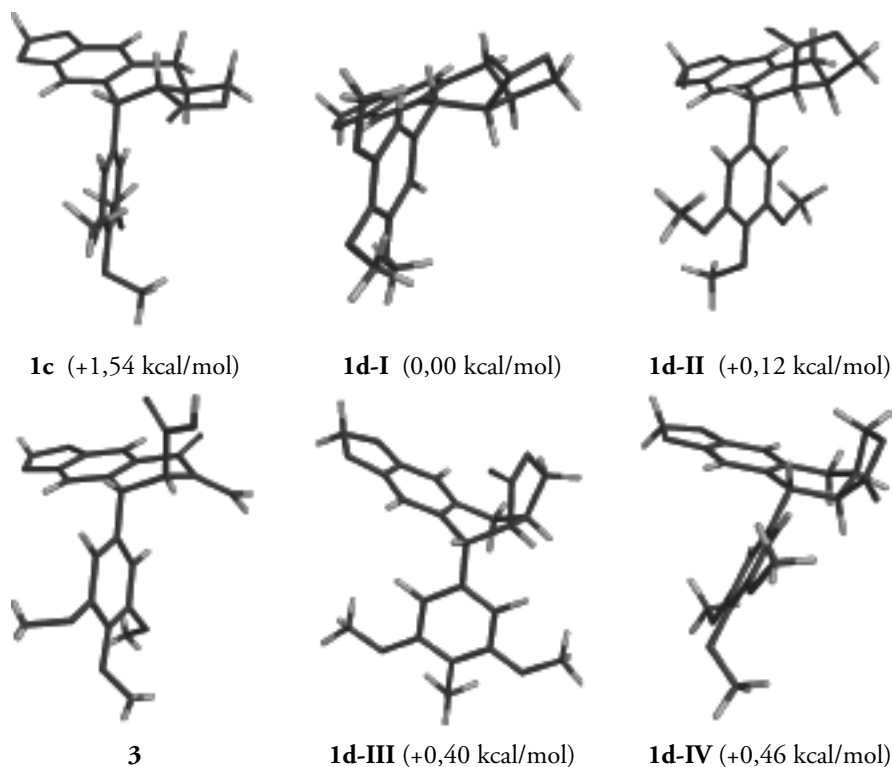


FIGURA 1. Estructura de ciclolignanos naturales y fármacos anticáncer relacionados



**FIGURA 2.** Modelos moleculares de desoxipodofilotoxina (**1a**), desoxipricropodofilotoxina (**1d-I-IV**) y ácido thuriférico (**3**). En paréntesis, energías electrónicas relativas en kcal/mol obtenidas mediante cálculo RHF/6-31+G\*

ca entre ellas menor que 0,5 Kcal/mol. Esta pequeña diferencia en la estabilidad entre las cuatro distintas conformaciones permite el intercambio entre ellas; así, da lugar a una flexibilidad conformacional, frente a la rigidez mostrada por podofilotoxina, que presenta únicamente una conformación. La conformación de mínima energía de la desoxipricropodofilina muestra una disposición pseudoecuatorial para la agrupación trimetoxifenilo (**1d-I**), diferente a la encontrada para esta misma agrupación en desoxipodofilotoxina (**1c**). Esta diferencia en la disposición especial del grupo trimetoxifenilo y en la flexibilidad/rigidez del sistema tetracíclico se debe a la disposición de la lactona, *trans*-lactona en **1a** y *cis*-lactona en **1d**, como se ha mencionado anteriormente (Figura 2).

El ácido thuriférico se dispone en 2 conformaciones, una con el grupo trimetoxifenilo y el ácido carboxílico en disposición pseudoaxial (Figura 2) y otra de mayor energía con ambas agrupaciones en disposición pseudoecuatorial.

Los resultados obtenidos mediante modelado molecular para estos tres compuestos están en concordancia con los datos de RMN <sup>1</sup>H; en efecto, las constantes de acoplamiento obtenidas experimentalmente presentan una gran similitud en sus valores derivados de los modelos teóricos<sup>24</sup>. Para la obtención de estos valores en la desoxipricropodofilina y el ácido thuriférico, se hizo un promedio teniendo en cuenta la distribución entre las diferentes conformaciones según la ecuación de Boltzmann.

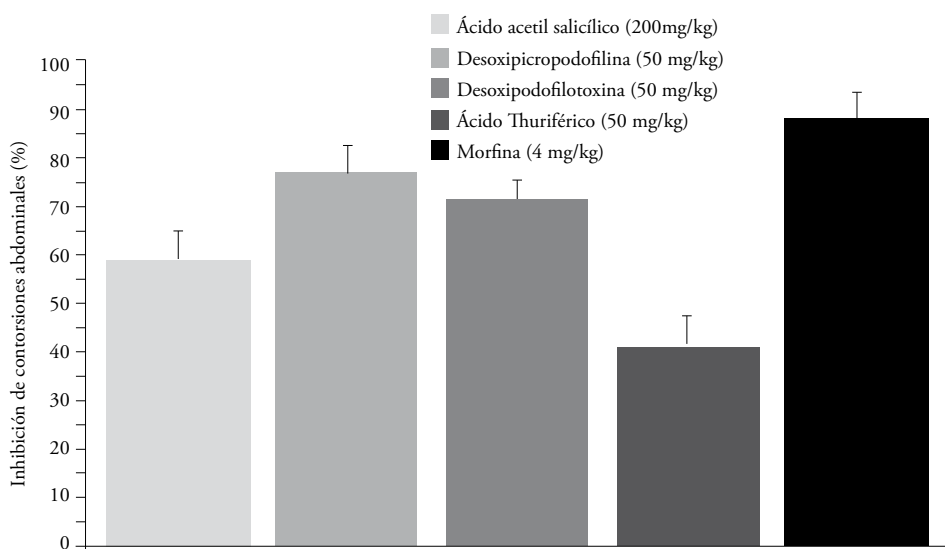
En el modelo de contorsiones abdominales inducidas por AcH al 1 % para evaluar la actividad antinociceptiva de la desoxipodofilotoxina, la desoxipicropodofilina y el ácido thuriférico, se observa que los dos primeros generan un efecto protector frente el estímulo algésico químico mayor que en el grupo que recibió AAS, logrando un porcentaje de analgesia de 77,8 y 71,3 % para los dos lignanos lactónicos **1c** y **1d** (Figura 3).

Como se puede observar en la metodología y en los resultados, para este modelo se emplean dos compuestos patrones, AAS y morfina. Este patrón metodológico responde a que las contorsiones abdominales inducidas por AcH no constituye un modelo de nocicepción específico, ya que el ácido provoca la liberación de mediadores algésicos como bradiquinina y serotonina, que estimulan fibras nociceptivas periféricas sensibles a las acciones de agentes opioides. Por otra parte, las prostaglandinas generadas por

la COX-1 en el lugar de la inyección tienen un papel importante en la transmisión nociceptiva, lo que explica la efectividad de los antiinflamatorios no esteroideos en este modelo experimental<sup>25</sup>.

Es conocido que los mediadores antes descritos, bradicinina, serotonina y prostaglandinas, no solo median dolor, sino que también producen una inflamación aguda en la zona peritoneal, por lo que los resultados de actividad analgésica fueron complementados con estudios de inflamación, empleando un modelo de edema plantar inducido por carragenina. En estos ensayos se pudo observar que el agente inflamatorio ocasionó enrojecimiento evidente, y se logró determinar que inducía edema pronunciado, que se desarrolló visiblemente durante las primeras 6 horas y persistió durante más de 24 horas.

Como se puede observar en la Figura 4, los resultados de actividad antiinflamatoria obtenidos con desoxipodofilotoxina



**FIGURA 3.** Porcentaje de inhibición de las contorsiones abdominales como parámetro de la actividad analgésica del ácido acetilsalicílico, morfina, desoxipicropodofilina (**1d**), desoxipodofilotoxina (**1c**) y ácido thuriférico (**3**). \* $p < 0.05$  vs AAS;  $p < 0.05$  vs morfina;  $n=6$ .

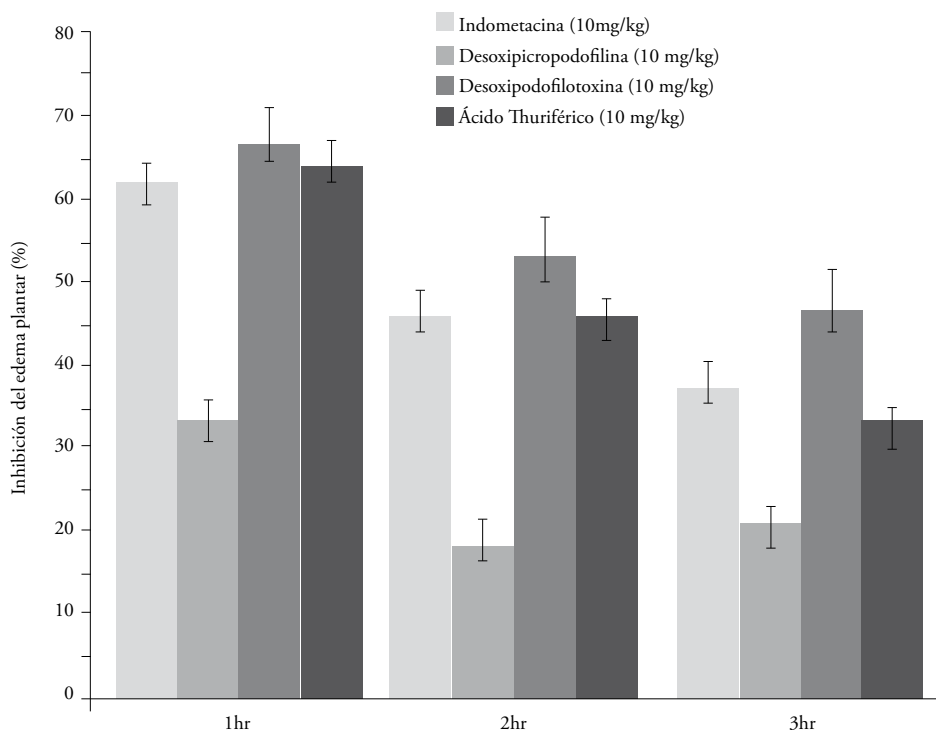
y ácido thuriférico (68±8 % y 64±6 %, respectivamente), a la primera hora de observación, fueron similares a los observados en el grupo que recibió indometacina, empleado como antiinflamatorio control (62±8 %). Por su parte, desoxipicropodofilina, aunque mostró actividad antiinflamatoria, fue estadísticamente inferior al resto de los tratamientos ensayados.

Cabe señalar que, para todos los grupos, el efecto antiinflamatorio máximo fue observado a la primera hora después de la administración de la carragenina.

Si se compara el perfil de actividad de cada tratamiento en función de indometacina, se observa que el compuesto **3** muestra características antiinflamatorias muy similares al antiinflamatorio no

esteroideo (Figura 4). Indometacina y ácido thuriférico comparten la presencia de un ácido carboxílico libre, similitud estructural que podría estar relacionada con su analogía en el perfil de actividad antiinflamatoria. Por otra parte, desoxipodofilotoxina, que también desarrolló un efecto antiinflamatorio significativo, posee un perfil de mayor potencia durante más tiempo, observándose que aún después de 6 horas de la administración de carragenina, el efecto de inhibición del edema plantar era superior al 55 %.

Estos resultados ponen de manifiesto un cambio significativo en el perfil analgésico y antiinflamatorio cuando se produce la epimerización en la posición 8' de **1c** para dar **1d**, y que también implica una disminución significativa de la citotoxicidad. También se observa un cambio importante en el modelo cuan-



**FIGURA 4.** Porcentaje de inhibición del edema plantar por la administración de indometacina, desoxipicropodofilina (**1d**), desoxipodofilotoxina (**1c**) y ácido thuriférico (**3**). \* $p < 0.05$  vs Indometacina; n=6.



do se produce la apertura de la lactona para dar al ácido thuriférico, en el que la presencia del ácido carboxílico libre hace que su perfil farmacológico sea similar a la indometacina en la inhibición del edema plantar.

#### IV. CONCLUSIONES

La podofilotoxina es una molécula que presenta distintas actividades farmacológicas; sin embargo, su elevada toxicidad no permite su uso sistémico en clínica. Una modificación simple, como es la epimerización en el C-8' de la molécula, provoca cambios importantes en su disposición espacial y disminuye la reactividad de la  $\gamma$ -lactona como consecuencia de la disminución de su tensión. Este cambio produce la desaparición de la citotoxicidad y un incremento de la actividad analgésica. De forma paralela, se aprecia una disminución del efecto antiinflamatorio. Por consiguiente, se puede proponer a la desoxipicropodofilina como un prototipo para el desarrollo de fármacos analgésicos libres de efectos citotóxicos, a diferencia del compuesto patentado Reumacon.

#### V. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Schacter L. Etoposide Phosphate: What, Why, Where and How? *Semin-Oncol* 1996, 23, 1-7.
2. Stahelin H; Von Wartburg A. From podophyllotoxin glucoside to etoposide. *Prog Drug Res* 1989, 33, 169-266.; Stahelin HF; Von Wartburg A. The chemical and biological route from podophyllotoxin glucoside to etoposide: ninth Cain memorial Award lecture. *Cancer Res* 1991, 51, 5-15.
3. Kluza J; Mazinghien R; Irwin H; Hartley JA; Bailly C. Relationships between DNA strand breakage and apoptotic progression upon treatment of HL-60 leukemia cells with tafluposide or etoposide. *Anticancer Drugs* 2006, 17, 155-164.
4. Rassmann I; Thodtmann R; Mross M; Huttmann A; Berdel WE *et alii*. Phase I clinical and pharmacokinetic trial of the podophyllotoxin derivative NK611 administered as intravenous short infusion. *Invest New Drugs* 1998, 16, 319-324.
5. Chang H; Shyu KG; Lee CC; Tsai SC; Wang BW *et alii*. GL331 inhibits HIF-1 $\alpha$  expression in a lung cancer model. *Biochem Biophys Res Commun* 2003, 302, 95-100.
6. Kluza J; Mazinghien R; Irwin H; Hartley JA; Bailly C. Relationships between DNA strand breakage and apoptotic progression upon treatment of HL-60 leukemia cells with tafluposide or etoposide. *Anticancer Drugs* 2006, 17, 155-164.
7. Dumontet C; Jordan MA. Microtubule-binding agents: a dynamic field of cancer therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* 2010, 9, 790-803.
8. a) Jordan A; Hadfield JA; Lawrence NJ; McGown AT. Tubulin as a target for anticancer drugs: agents which interact with the mitotic spindle. *Med Res Rev* 1998, 18, 259-296; b) Hande KR. Etoposide: four decades of development of a topoisomerase II inhibitor. *Eur J Cancer* 1998, 34, 1514-1521; Jordan A; Hadfield JA; Lawrence NJ; McGown AT. Tubulin as a target for anticancer drugs: agents which interact with the mitotic spindle. *Med Res Rev* 1998, 18, 259-296; c) Meresse P; Dechaux E; Monneret C; Bertounesque E. Etoposide: discovery and medicinal chemistry. *Curr Med Chem* 2004, 11, 2443-2466; d)

- You, Y. Podophyllotoxin derivatives: current synthetic approaches for new anticancer agents. *Curr Pharm Des* 2005, *11*, 1695-1717.
9. Moraes RM; Lata H; Bedir E; Maqbool M, Cushman K. The American mayapple and its potential for podophyllotoxin production. 2002, p. 527-532. In: J. Janick and A. Whipkey (eds.), Trends in new crops and new uses. ASHS Press, Alexandria, VA.
10. Hartwell JL; Schrecker AW. The chemistry of Podophyllum. *Fortschr Chem Org Naturst* 1958, *15*, 83-166.
11. Cph 82. *BioDrugs* 2003, *17*, 373-374.
12. Jackson JK; Higo T; Hunter WL; Burt HM. Topoisomerase inhibitors as anti-arthritic agents. *Inflamm Res* 2008, *57*, 126-134.
13. San Feliciano A; Medarde M; Lopez JL; Puebla P; Miguel del Corral JM; Barrero AF. Lignans from Juniperus thurifera. *Phytochemistry* 1989, *28*, 2863-2866.
14. San Feliciano A; López JL; Medarde M; Miguel del Corral JM. Asignación de espectros de Resonancia Magnética Nuclear de Lignanos mediante experimentos bidimensionales. *Studia Chemica* 1986, *X-XI*, 575-583.
15. Dewick PM; Jackson DE. Cytotoxic Lignans from Podophyllum, and the Nomenclature of Aryltetralin Lignans. *Phytochemistry* 1981, *20*, 2277-2280.
16. San Feliciano A; López-Pérez JL; Medarde M; Miguel del Corral JM; Pascual-Teresa B. Puebla, P. Thuriferic acid. A novel lignan type from Juniperus thurifera L. *Tetrahedron* 1988, *44*, 7255-7260.
17. Mohamadi F; Richards NGJ; Guida WC, Liskamp R; Lipton M; Caufield C; Chang G; Hendrickson T; Still WC. Macro-Model an integrated software system for modeling organic and bioorganic molecules using molecular mechanics. *J Comput Chem* 1990, *11*, 440-467.
18. Allinger NL. Conformational-Analysis. 130. Mm2 - Hydrocarbon Force-Field Utilizing V1 and V2 Torsional Terms. *J Am Chem Soc* 1977, *99*, 8127-8134.
19. Spartan 08, Wavefunction, Inc.: Irvine, CA, 92612.
20. Collier HDJ; Dinnen LC; Johnson CA; Scheider C. The abdominal constriction response and its suppression by analgesic drugs in the mouse. *B J Pharmacol Chemother.* 1968, *32*, 295-310.
21. Winter CA; Risley EA; Nuss GW. Carrageenan-induced edema in hind paw of the rat as an assay for antiinflammatory drugs. *Proc Soc Exp Biol Med* 1962, *111*, 544-552.
22. López-Pérez JL; Del Olmo E; De Pascual-Teresa B; Merino M; Martín S; San Feliciano A. Unambiguous Configurational and Conformational Determination of Thuriferic Acid. *Tetrahedron* 1995, *51*, 6343-6348.
23. López-Pérez JL; Del Olmo E; De Pascual-Teresa B; Merino M; San Feliciano A. The stereochemistry of thuriferic and epithuriferic acids. *Tetrahedron* 1996, *52*, 4903-4910.
24. Haasnoot CAG; Deleuw F; Altona C. The Relationship between Proton-Proton NMR Coupling-Constants and Substituent Electronegativities. 1. An Empirical Generalization of the Karplus Equation. *Tetrahedron* 1980, *36*, 2783-2792.
25. Ortega A; Roca A; Mico JA. Modelos animales de dolor: una visión crítica, *Rev Soc Esp Dolor* 2002, *9*, 447.