



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

**“EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTINOCICEPTIVO Y
TOXICOLÓGICO DE *N*-(4-METOXI-2-NITROFENIL)
HEXADECANAMIDA, ANÁLOGO DE
PALMITOILETANOLAMIDA”**

TESIS
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO
PRESENTA
JOSÉ EDUARDO ROA CORIA



MÉXICO, D.F.

2011



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Prof. José Fausto Rivero Cruz
VOCAL: Prof. María Eva González Trujano
SECRETARIO: Prof. Myrna Déciga Campos
1er. SUPLENTE: Prof. Guadalupe Esther Ángeles López
2º SUPLENTE: Prof. Ana Laura Martínez Martínez

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER)

ASESOR DEL TEMA:

Dra. Myrna Déciga Campos

(nombre y firma)

SUSTENTANTE:

José Eduardo Roa Coria

(nombre y firma)

Este trabajo se desarrolló bajo la asesoría de la

Dra. Myrna Déciga Campos,

Profesor Titular C de la Sección de Estudios de Posgrado e Investigación de la Escuela Superior de Medicina del Instituto Politécnico Nacional.

El presente trabajo fue apoyado por la **Secretaría de Investigación y Posgrado del IPN** en el proyecto *“Evaluación farmacológica de sustancias nuevas para el tratamiento del dolor”* clave SIP: **20091164 y 20100483**.

Parte del presente trabajo se presento en el Congreso Anual de la Sociedad de Ciencias Fisiológicas realizado en Morelia Michoacán del 26 al 30 de Septiembre de 2009.

Agradecimientos

Dr. Gabriel Navarrete Vázquez de la Facultad de Farmacia de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos, por la síntesis del compuesto *N*-(4-metoxi-2-nitrofenil)hexadecanamida.

Dr. Vinicio Granados Soto del Departamento de Farmacobiología del CINVESTAV, por su asesoría técnica.

M. en C. Gabriela Castañeda Corral del Departamento de Farmacobiología del CINVESTAV, por la asesoría técnica brindada.

Dra. Myrna Déciga Campos, por todo el apoyo, el conocimiento y los consejos brindados durante 3 años de arduo trabajo.

Dra. Ma. Eva González Trujano, Dr. José Fausto Rivero Cruz, M. en C. Gaudalupe Esther Ángeles López y M. en C. Ana Laura Martínez Martínez, por el tiempo invertido en la revisión de este trabajo escrito, así como por los comentarios que enriquecieron al mismo.

Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México, por la educación y las experiencias tanto profesionales como personales.

Dedicatoria

A mis padres y hermanos, que gracias a su ayuda y apoyo incondicional concluí una etapa importante de mi desarrollo profesional.

A mis amigos, a quienes les doy mi gratitud por su amistad y por todos los momentos compartidos dentro de las aulas de clase, así como fuera de ellas.

ÍNDICE

i) Lista de figuras.....	III
ii) Lista de tablas.....	IV
iii) Lista de diagramas.....	IV
iv) Abreviaturas.....	VI
I. RESUMEN.....	1
II. INTRODUCCIÓN.....	3
III. ANTECEDENTES GENERALES.....	5
III. 1. Cannabinoides.....	5
III. 2. Sistema endocannabinoide.....	5
III. 3. Receptores a cannabinoides.....	6
III. 4. Endocannabinoides.....	7
III. 5. Biosíntesis de los endocannabinoides.....	9
III. 6. Liberación de los endocannabinoides.....	10
III. 7. Inactivación de los endocannabinoides.....	11
III. 8. N-palmitoiletanolamida.....	13
III. 9. Biosíntesis y degradación de la palmitoiletanolamida.....	13
III. 10. Efectos farmacológicos de la palmitoiletanolamida.....	14
III. 11. Enzima FAAH.....	15
III. 12. Inhibición de la enzima FAAH.....	16
III. 13. N-(4-metoxi-2-nitrofenil)hexadecanamida.....	18
IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	20
V. JUSTIFICACIÓN.....	20

CAPÍTULO 1. EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTINOCICEPTIVO A NIVEL SISTÉMICO Y LOCAL DE N-(4-METOXI-2-NITROFENIL)HEXADECANAMIDA, ASÍ COMO EL MECANISMO DE ACCIÓN FARMACOLÓGICO INVOLUCRADO

1.1 Antecedentes.....	21
1.1.1 Dolor.....	21
1.1.2 Mecanismos neurofisiológicos del dolor.....	21
1.1.3 Modelos para el estudio del dolor.....	23
1. 1. 3.1 Prueba del estiramiento abdominal.....	25

1. 1. 3.2 Prueba de la formalina.....	25
1.2 Evaluación del efecto antinociceptivo y del mecanismo de acción a nivel sistémico de N-(4-metoxi-2-nitrofenil)hexadecanamida en la prueba de estiramiento abdominal en ratón.....	26
1.2.1 Hipótesis.....	26
1.2.2 Objetivo.....	27
1.2.3 Metodología.....	27
1.2.4 Resultados.....	30
1.3 Evaluación del efecto antinociceptivo y mecanismo de acción a nivel local de N-(4-metoxi-2-nitrofenil)hexadecanamida en la prueba de la formalina en rata.....	33
1.3.1 Hipótesis.....	33
1.3.2 Objetivo.....	33
1.3.3 Metodología.....	34
1.3.4 Resultados.....	36
1.4 Análisis y Discusión.....	41
1.5 Conclusión.....	47

CAPÍTULO 2. EVALUACIÓN DEL EFECTO TOXICOLÓGICO DE N-(4-METOXI-2-NITROFENIL)HEXADECANAMIDA

2.1 Antecedentes.....	48
2.1.1 Fundamentos de los estudios toxicológicos.....	48
2.1.2 Clasificación de los agentes tóxicos.....	50
2.1.3 Pruebas toxicológicas para el estudio de la seguridad de HD	50
2.1.3.1 Prueba toxicológica en <i>Artemia salina</i> L.....	51
2.1.3.2 Prueba de toxicidad aguda en ratón.....	52
2.1.3.3 Ensayo de los micronúcleos en médula ósea de ratón.....	53
2.1.4 N-(4-metoxi-2-nitrofenil)hexadecanamida y su potencial terapéutico.....	54
2.2 Hipótesis.....	54
2.3 Objetivos.....	55
2.4 Metodología.....	55
2.5 Resultados.....	59

2.6 Análisis y Discusión.....	60
2.7 Conclusión.....	62
VI. PERSPECTIVAS.....	62
VII. REFERENCIAS.....	63

APÉNDICE 1. Procedimiento para la síntesis de <i>N</i> -(4-metoxi-2-nitrofenil)hexadecanamida.....	79
APÉNDICE 2. Determinación de la capacidad inhibitoria de <i>N</i> -(4-metoxi-2-nitrofenil)hexadecanamida sobre la enzima FAAH.....	80

i) Lista de figuras

Figura 1. Representación esquemática de los receptores CB ₁ y CB ₂	7
Figura 2. Estructura química de endocannabinoides.....	8
Figura 3. Diagrama de las vías metabólicas implicadas en la biosíntesis de los dos principales endocannabinoides (AEA y 2-AG).....	10
Figura 4. Diagrama de las vías implicadas en la activación de los dos principales endocannabinoides (AEA y 2-AG).....	12
Figura 5. Diagrama de la vía de biosíntesis e inactivación de la palmitoiletanolamida.	13
Figura 6. Mecanismo de inactivación de los endocannabinoides que lleva a cabo la enzima FAAH.....	16
Figura 7. Estructura química de palmitoiletanolamida y del compuesto sintetizado (HD).....	19
Figura 8. Mediadores moleculares en el mecanismo del dolor.....	23
Figura 9. Curso temporal de la prueba de la formalina en rata.....	26
Figura 10. Curso temporal de la prueba de estiramiento abdominal en ratón.....	30
Figura 11. Efecto antinociceptivo de HD en la prueba de estiramiento abdominal en ratón.....	31
Figura 12. Efecto de la administración de naltrexona, paraclorofenilalanina ó bicuculina en el efecto antinociceptivo de HD en la prueba de estiramiento abdominal en ratón.....	32

Figura 13. Efecto de la administración de L-NAME, ODQ ó glibenclamida en el efecto antinociceptivo de HD en la prueba de estiramiento abdominal en ratón.....	33
Figura 14. Efecto antinociceptivo que presenta HD en la prueba de la formalina...	37
Figura 15. Efecto antinociceptivo de HD en diferentes concentraciones.....	38
Figura 16. Efecto de la administración de AM281 y SR144528 en el efecto antinociceptivo local de HD en la prueba de la formalina en rata.....	39
Figura 17. Efecto de la administración de metiotepina y naloxona en el efecto antinociceptivo local de HD en la prueba de la formalina en rata.....	40
Figura 18. Efecto de la administración de capsazepina y flumazenil en el efecto antinociceptivo local de HD en la prueba de la formalina en rata.....	41
Figura 19. Ensayo de los micronúcleos en la médula ósea de ratón. Porcentaje de genotoxicidad ante la exposición con HD , ciclofosfamida y vehículo.....	60

ii) Lista de tablas

Tabla 1. Aplicaciones terapéuticas de los inhibidores de FAAH.....	18
Tabla 2. Características de diversas pruebas experimentales para el estudio de la nocicepción.....	24
Tabla 3. Clasificación de los xenobióticos según la dosis letal media en humanos.	50
Tabla 4. Dosis evaluadas en la fase 1 y 2 de la determinación de la toxicidad aguda.....	53
Tabla 5. Efectos toxicológicos potenciales de HD en el método de Lorke en ratón y la prueba de toxicidad en <i>Artemia salina</i> L.....	59

iii) Lista de diagramas

Diagrama 1. Diseño experimental de la evaluación del efecto antinociceptivo de HD en la prueba de estiramiento abdominal en ratón.....	28
Diagrama 2. Diseño experimental de la evaluación del mecanismo de acción del efecto antinociceptivo de HD en la prueba de estiramiento abdominal en ratón.....	29
Diagrama 3. Diseño experimental de la evaluación del efecto antinociceptivo de HD en la prueba de la formalina en rata.....	35
Diagrama 4. Diseño experimental de la evaluación del mecanismo de acción del efecto antinociceptivo de HD en la prueba de la formalina en rata.....	36

Diagrama 5. Diseño experimental de la prueba toxicológica en <i>Artemia salina</i> L...	56
Diagrama 6. Diseño experimental de la prueba de toxicidad aguda en ratón utilizando el método de Lorke.....	57
Diagrama 7. Diseño experimental del ensayo de los micronúcleos en médula ósea de ratón.....	58

iv) Abreviaturas

2-AG	2-araquidonilglicerol
5-HT	Serotonina
AA	Ácido araquidónico
ABC	Área bajo la curva
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AEA	Anandamida
AINE	Analgésico antiinflamatorio no esteroideo
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
ANADEVA	Análisis de varianza
ATP	Adenosín trifosfato
Ca ²⁺	Ión calcio
CB ₁	Receptor cannabinoide tipo 1
CB ₂	Receptor cannabinoide tipo 2
CF	Ciclofosfamida
CGRP	Péptido relacionado con el gen de la calcitonina (por sus siglas en inglés)
CI ₅₀	Concentración inhibitoria 50
CL	Contralateral
CL ₅₀	Concentración letal 50
COX	Ciclooxigenasa
CMC	Carboximetilcelulosa
DE ₅₀	Dosis efectiva 50
DMSO	Dimetilsulfóxido
EEM	Error estándar medio
ENC	Eritrocitos normocromáticos
EPC	Eritrocitos policromáticos
EPCMN	Eritrocitos policromáticos micronucleados
FAAH	amidohidrolasa de ácidos grasos (por sus siglas en inglés)
FAAH-KO	FAAH-knockout mice
FEUM	Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos
GABA	Ácido γ-aminobutírico

GP-NAE	Glicerofosfo- <i>N</i> - acil etanolamina
GMPc	Guanosín monofosfato cíclico
GRD	Ganglio de la raíz dorsal
H ⁺	Ión Hidrógeno (protón)
HD	<i>N</i> -(4-metoxi-2-nitrofenil)hexadecanamida
IASP	Organización Internacional para el Estudio del Dolor (por sus siglas en inglés)
ICH	Conferencia Internacional de Armonización (por sus siglas en inglés)
IL	Interleucina
K ⁺	Ión potasio
kg	kilogramos
LOX	Lipooxigenasa
L-NAME	<i>NG</i> -nitro- <i>L</i> -arginina metilester
LPS	Lipopolisacáridos
mg	miligramos
MGL	Monoacilglicerol lipasa
mL	mililitros
µg	microgramos
µL	microlitros
NAAA	Amidasa hidrolizadora de <i>N</i> -acil etanolaminas (por sus siglas en inglés)
NAEs	<i>N</i> -acil etanolaminas
NAPE	<i>N</i> -acil fosfatidiletanolamina
NGF	Factor de crecimiento neuronal (por sus siglas en inglés)
NMDA	<i>N</i> -metil- <i>D</i> -aspartato
NOS	Sintasa de óxido nítrico
ODQ	1H-[1,2,4]oxadiazolo-[4,3-a]quinoxalin-1-ona
OEA	Oleoiletanolamida
OMS	Organización Mundial de la Salud
ON	Óxido nítrico
PCPA	Paraclorofenilalanina
PEA	Palmitoiletanolamida

PGE	Prostaglandina E
PGE ₂ -EA	Prostaglandina E ₂ etanolamina
PGE ₂ -G	Prostaglandina E ₂ glicerol éster
PPAR	Receptor activador de la proliferación de peroxisoma
SNC	Sistema Nervioso Central
SSI	Solución salina isotónica
TNF	Factor de necrosis tumoral (por sus siglas en inglés)
THC	Δ^9 -tetrahydrocannabinol
TRP	Receptor de canal de potencial transitorio (por sus siglas en inglés)

I. RESUMEN

N-palmitoiletanolamida es un endocannabinoide al cual se le ha encontrado actividad antiinflamatoria y analgésica, además es un sustrato para la amidohidrolasa de ácidos grasos (FAAH, por sus siglas en inglés), enzima encargada del catabolismo de otro endocannabinoide -anandamida-. Anandamida, por su parte, es un endocannabinoide con diversas funciones en el sistema nervioso central del cual se ha encontrado que puede generar analgesia. *N*-(4-metoxi-2-nitrofenil)hexadecanamida (**HD**) es un análogo de palmitoiletanolamida, éste puede inhibir a la enzima FAAH con lo cual aumenta la activación de receptores cannabinoide y del efecto analgésico. El presente trabajo demuestra que el compuesto **HD** produce efecto antinociceptivo a nivel sistémico y local, adicionalmente se indica el posible mecanismo de acción farmacológico por el cual **HD** lleva a cabo su acción antinociceptiva. Asimismo, se evaluó el posible efecto toxicológico producido por este compuesto. Para evaluar el efecto antinociceptivo a nivel sistémico se utilizó la prueba de estiramiento abdominal en ratón, la cual consiste en la administración vía intraperitoneal de ácido acético al 0.6%, posterior a la administración se cuantifica el número de estiramientos que presenta el animal en un período de 30 minutos. Para determinar el mecanismo de acción de **HD** a nivel sistémico, se realizaron pretratamientos con L-NAME (inhibidor de la sintasa de ON, 10 mg/kg s.c.), ODQ (inhibidor de la guanilato ciclasa, 1 mg/kg s.c.), glibenclamida (bloqueador de canales sensibles de K⁺, 10 mg/kg, s.c.), naltrexona (antagonista opioide, 1 mg/kg, i.p.), PCPA (inhibidor de la síntesis de serotonina, 80 mg/kg, i.p., durante 4 días) y bicuculina (antagonista GABA_A, 5 mg/kg, s.c.). Los pretratamientos se realizaron 15 min antes de la administración de **HD** (30 mg/kg, i.p.). La evaluación del efecto antinociceptivo a nivel local se llevó a cabo empleando la prueba de la formalina en rata, la cual consiste en inducir nocicepción por la administración de formaldehído (1%, 50 µL) de manera subcutánea en el dorso de la extremidad posterior derecha de la rata. El posible mecanismo de acción involucrado en la generación de la antinocicepción local se demostró mediante pretratamientos 20 min antes de la administración de **HD** (100 µg/pata) con AM281 (antagonista de receptores CB₁, 30 y 0.3 µg/pata), SR144528 (antagonista de receptores CB₂, 30 y 0.3 µg/pata), metiotepina (antagonista de receptores serotoninérgicos, 0.3 y 0.03 µg/pata), naloxona (antagonista de receptores opioide, 50 y 5 µg/pata), capsazepina (antagonista de los canales TRPV1, 0.05 y 0.5 µg/pata) y flumazenil (antagonista GABA_A, 0.1 y 1 µg/pata). Para la evaluación del efecto toxicológico del compuesto se realizaron 3 pruebas, de las

cuales se obtuvieron resultados sobre la seguridad del análogo de palmitoiletanolamida, éstas consistieron en la prueba de mortalidad en *Artemia salina*, el método de Lorke para determinar la DL_{50} en ratón, así como el ensayo de micronúcleos en la médula ósea de ratón. Los resultados muestran que **HD** produce un efecto antinociceptivo a nivel sistémico cuyo mecanismo de acción involucra la vía de los opioides y la vía serotoninérgica. Así mismo, se presentó un efecto antinociceptivo a nivel local, el cual es mediado por la activación a los receptores CB_1 y CB_2 , además se ven involucradas las vías serotoninérgica, opioide y la unión a canales TRPV1. Con respecto al efecto toxicológico de **HD**, este no produjo toxicidad en la *Artemia salina* L. ($CL_{50} > 1000$ ppm) y en el método de Lorke en ratón la $DL_{50} = 3807$ mg/kg. Mientras que en el ensayo de micronúcleos no se observó un efecto genotóxico hasta la dosis de 300 mg/kg, i.p.

II. INTRODUCCIÓN

En la actualidad, la búsqueda de nuevos fármacos para el tratamiento de las enfermedades que aquejan a la humanidad, se ha convertido en uno de los principales objetivos en la investigación médica. De esta manera, el desarrollo de nuevos fármacos es un proceso que requiere de tiempo y recursos. Se estima que en promedio se requieren de 12 años para llevar un fármaco desde su descubrimiento hasta su uso en seres humanos. La evaluación de una nueva molécula con efecto farmacológico requiere de dos etapas, la preclínica y la clínica. En la fase preclínica se realizan los estudios necesarios para obtener información acerca de la actividad farmacológica y toxicológica de una nueva molécula, para progresar hacia la realización de los ensayos clínicos en humanos y finalmente proseguir con la comercialización.

Actualmente, la investigación básica esta generando una gran cantidad de información referente al conocimiento sobre funciones neurológicas como el dolor, tanto en situación fisiológica, como en diferentes situaciones patológicas. En gran medida, estos avances se producen como consecuencia de la utilización de los modelos *in vitro* e *in vivo*.

Para crear un nuevo fármaco, se requiere diseñar una molécula con actividad sobre mecanismos farmacológicos o fisiopatológicos conocidos a nivel molecular. Para esto, una de las tantas opciones, es la realización del diseño de una molécula, tomando como base un compuesto con estructura química conocida, que tenga un efecto biológico; así puede tomarse como referencia fármacos que ya se conoce su efecto terapéutico, ó incluso se puede tomar como modelo algunas moléculas de origen biológico que tienen una función en los organismos vivos.

El trabajo que a continuación se presenta esta dividido en 2 capítulos, los cuales dan a conocer la actividad antinociceptiva y toxicológica que presenta *N*-(4-metoxi-2-nitrofenil)hexadecanamida (**HD**), este compuesto fue sintetizado por el Dr. Gabriel Navarrete Vázquez de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos. El origen de este compuesto se realizó pensando en el potencial terapéutico que se ha descrito en la inhibición de las enzimas encargadas de la degradación de endocannabinoides.

Al inicio de este trabajo se presenta un panorama general de los componentes del sistema endocannabinoide, dado a que la acción del compuesto a estudiar se basa en la función de este sistema. El trabajo se dividió en dos capítulos; en el primer capítulo se da a conocer el efecto antinociceptivo y mecanismo de acción a nivel sistémico y local del compuesto **HD**. En el segundo capítulo se muestra la evaluación toxicológica del compuesto **HD**. Para facilitar la comprensión del trabajo cada capítulo está constituido de antecedentes, objetivos, hipótesis, metodología, resultados, discusión de los resultados y las conclusiones.

III. ANTECEDENTES GENERALES

III. 1. Cannabinoides

El término cannabinoide estrictamente se refiere a los compuestos que pueden activar alguno de los receptores cannabinoide ya sea CB₁ o CB₂ ó ambos. Sin embargo, otras moléculas que son estructuralmente similares al tetrahidrocannabinol, pero que no activan a los receptores CB₁ ó CB₂, han sido frecuentemente incluidas dentro de este término (Burstein y Zurier, 2009).

Una de las clasificaciones de los cannabinoides en función de su origen los divide en tres grupos: Los fitocannabinoides, grupo de compuestos terpenoides que se producen como metabolitos secundarios en la especie vegetal *Cannabis sativa*. Los cannabinoides endógenos o endocannabinoides, que se producen naturalmente en los organismos vivos. Cannabinoides sintéticos, grupo de sustancias relacionadas estructuralmente a fitocannabinoides y/o endocannabinoides, así como compuestos que se puedan unir a los receptores cannabinoide. Otra de las clasificaciones usadas es aquella que divide a los cannabinoides en ligandos exógenos y endógenos de los receptores CB (Burstein y Zurier, 2009; Pertwee, 2005).

III. 2. Sistema endocannabinoide

Los cannabinoides son compuestos secretados en una resina de las hojas y brotes de la planta *Cannabis sativa*, en la cual se han identificado aproximadamente 400 compuestos químicos diferentes de los que se consideran unos 60 como cannabinoides (Dewey, 1986). El Δ^9 -Tetrahidrocannabinol (THC), es un compuesto que se aisló de la *Cannabis* en el año de 1964 por Gaoni y Mechoulam; estudios detallados de relación estructura-actividad sugirieron que THC ejerce sus efectos debido a mecanismos mediados por receptores. De esta manera hasta el momento se han logrado clonar dos receptores para cannabinoides: el receptor CB₁, expresado principalmente en sistema nervioso central (SNC) (Matsuda et al., 1990), y el receptor CB₂, expresado principalmente en el sistema inmune (Munro et al., 1993). Debido a que estos receptores eran los responsables de la acción de los efectos centrales y periféricos de los cannabinoides, se empezó una búsqueda de ligandos endógenos que activaran estos receptores. Es así que en 1992 se

aisló la anandamida (AEA), el primer endocannabinoide conocido que resultó ser una amida de un ácido graso poliinsaturado (Devane et al., 1992). Más adelante, Mechoulam y Sugiura (1995) por separado aislaron otro ligando endógeno, el 2-araquidonil glicerol (2-AG). Todos estos descubrimientos dieron a conocer al sistema cannabinoide endógeno. Aún no se sabe del todo la función de este sistema, sin embargo, se ha encontrado que la activación de los receptores cannabinoide por parte de sus ligandos endógenos juega un papel importante en el mantenimiento y supervivencia neuronal (Hwang et al., 2010).

III. 3. Receptores a cannabinoides

A la fecha se han identificado dos tipos de receptores cannabinoide, los CB₁ y CB₂. Cada uno se diferencia por distribución en los tejidos, así como su modo de transmitir señales y ejercer efectos biológicos. En la figura 1 se muestra una representación esquemática de los receptores cannabinoide.

El receptor CB₁ es expresado en una alta proporción en ciertas regiones del cerebro que se correlacionan con los efectos observados al administrar cannabinoides, incluyendo alteraciones en la cognición, la memoria, el aprendizaje y la coordinación motora. El receptor CB₁ se ha aislado en el hipocampo, los ganglios basales (cuerpo estriado, sustancia nigra), corteza cerebral, la amígdala y el cerebelo (Herkenhan et al., 1990; Glass et al., 1997). El receptor CB₁ en la periferia se ha identificado en el bazo y en las amígdalas; y en bajos niveles en la glándula adrenal, el corazón, la próstata, útero y ovario (Galiegue et al., 1995). También se ha descrito una variante del receptor CB₁, denominado CB_{1A} (actualmente denominado CB_{1(b)}), resultante de un “splicing” alternativo que posee un modelo de distribución muy similar al del receptor CB₁ (Shire et al., 1995).

Los receptores CB₂ se limitan a la periferia donde se han observado en la zona marginal del bazo (Schatz et al., 1997), en las amígdalas y en células del sistema inmune (células B, monocitos y células T) (Munro et al., 1993; Galiegue et al., 1995, Schatz et al., 1997). La localización de los receptores CB₂ en el sistema inmune implica que algunos de los procesos de inmunosupresión de los cannabinoides son mediados por la unión a estos receptores. Sin embargo, se ha encontrado una cierta proporción de receptores CB₂ expresados en células microgliales del cerebro bajo condiciones de inflamación (Nunez et al., 2004).

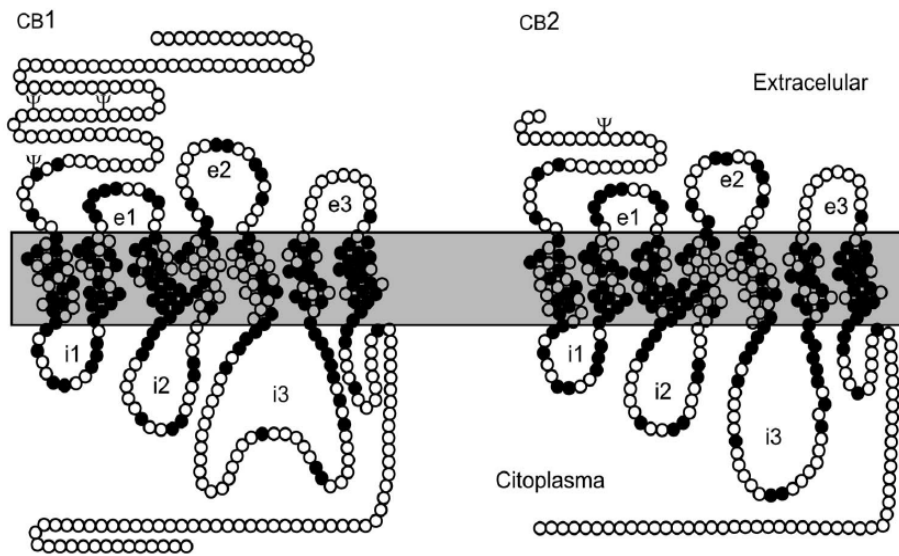


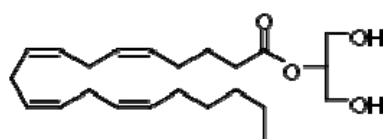
Figura 1. Representación esquemática de los receptores CB₁ y CB₂. Los receptores tienen 7 segmentos transmembranales. ● Aminoácidos comunes a los dos receptores; ○ aminoácidos diferentes entre ambos receptores (Rodríguez et al., 2005).

Los receptores CB son miembros de la familia de los receptores de siete dominios transmembranales, los cuales se asocian a las proteínas G. CB₁ y CB₂ son asociados con las proteínas G del tipo Gi/o (Gi 1, 2 y 3; y Go 1 y 2) (Kress y Kuner, 2009), también hay reportes que implican a la proteína G tipo Gq/11 mediando ciertos efectos biológicos de los cannabinoides (Lauckner et al., 2005). Mientras que los receptores CB₁ y CB₂ son objeto de estudio, recientemente se ha establecido que los cannabinoides actúan además en otros receptores denominados huérfanos, que están acoplados a proteínas G; uno ha sido identificado como GPR55 (Ryberg et al., 2007) y el otro como GPR119 (Fredriksson et al., 2003).

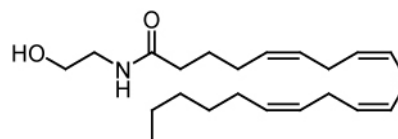
III. 4. Endocannabinoides

Tras la identificación de los receptores cannabinoides se descubrieron los ligandos endógenos para los mismos, conocidos como endocannabinoides. Todos los endocannabinoides son derivados de ácidos grasos poliinsaturados, lo que los diferencia en estructura química de los fitocannabinoides. Entre los endocannabinoides identificados hasta este momento se encuentra la anandamida (*N*-araquidonil-etanolamida, AEA) (Devane et al., 1992), el 2-araquidonil-glicerol (2-AG) (Mechoulam et al., 1995), el éter del 2-araquidonil-glicerol (éter de noladín) (Hanus et al., 2001), el *O*-araquidonil-etanolamina

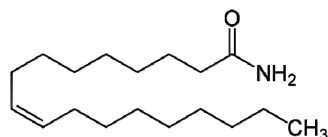
(virodhamina) (Porter et al., 2002), la *N*-araquidonil-dopamina (NADA) (Huang et al., 2002), la *N*-oleoiletanolamida (OEA) (Rodríguez de Fonseca et al., 2001), la palmitoiletanolamida (PEA) (Kuehl et al., 1957) y la oleamida (Cravatt et al., 1996). En la figura 2 se presentan las estructuras químicas de estos endocannabinoides. Los primeros dos endocannabinoides descubiertos, AEA y 2-AG, han sido los más estudiados (Grotenhermen, 2006).



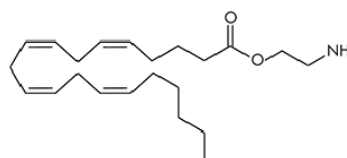
2-Araquidonilglicerol



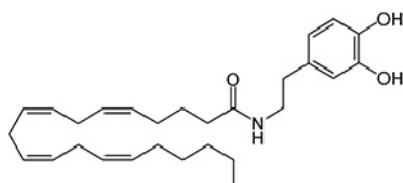
Anandamida



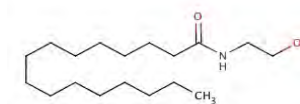
Oleamida



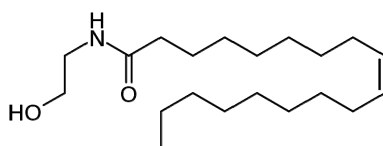
Virodhamina



N-araquidonil dopamina



N-palmitoiletanolamida



N-oleoiletanolamida

Figura 2. Estructura química de endocannabinoides

III. 5. Biosíntesis de los endocannabinoides

La síntesis de AEA y 2-AG se basa en la transformación de los fosfolípidos de la membrana como son fosfatidiletanolamina, fosfatidilcolina y fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (Ahn et al., 2008; Lovinger, 2008). Las vías de síntesis para las *N*-acil etanolaminas (NAEs), como la anandamida, han sido muy bien estudiadas. Datos recientes sugieren una vía de biosíntesis de AEA, la cual consta de dos fases, la primera es la acción de una transacilasa dependiente de calcio que transforma los fosfolípidos de la membrana para generar *N*-acil fosfatidiletanolamina (NAPE), la segunda fase es la hidrólisis por parte de una fosfolipasa tipo D de NAPE para generar finalmente AEA (Natarajan et al., 1983; Cadas et al., 1997). Se han descrito dos vías paralelas en la formación de AEA independientes de la acción de la fosfolipasa tipo D. Una de las vías es la hidrólisis de NAPE a glicerofosfo-*N*-acil etanolamina (GP-NAE) mediado por la fosfolipasa A1/A2 (en el SNC por la serina α/β -hidrolasa-4), finalmente se genera AEA a partir de la acción de la glicerofosfodiesterasa-1 sobre GP-NAE. La segunda vía implica la conversión de NAPE a fosfo-anandamida por la fosfolipasa C, seguida de la hidrólisis por una fosfatasa para obtener AEA (Hwang et al., 2010).

Se han propuesto varias vías para la formación de 2-AG. La vía mejor estudiada que implica la formación de 2-AG, inicia por una elevación del calcio intracelular o por la activación de un receptor acoplado a $G_{\alpha/11}$. Estas señales estimulan a la fosfolipasa C β para hidrolizar los fosfolípidos (sobre todo, fosfatidilinositol 4,5-bifosfato) y así generar trifosfato de inositol y diacilglicerol, las lipasas selectivas para diacilglicerol catalizan el paso final en la formación de 2-AG (Jung et al., 2005; Vandevorde y Lambert, 2007). La figura 3 muestra una representación esquemática de la biosíntesis de los endocannabinoides AEA y 2-AG.

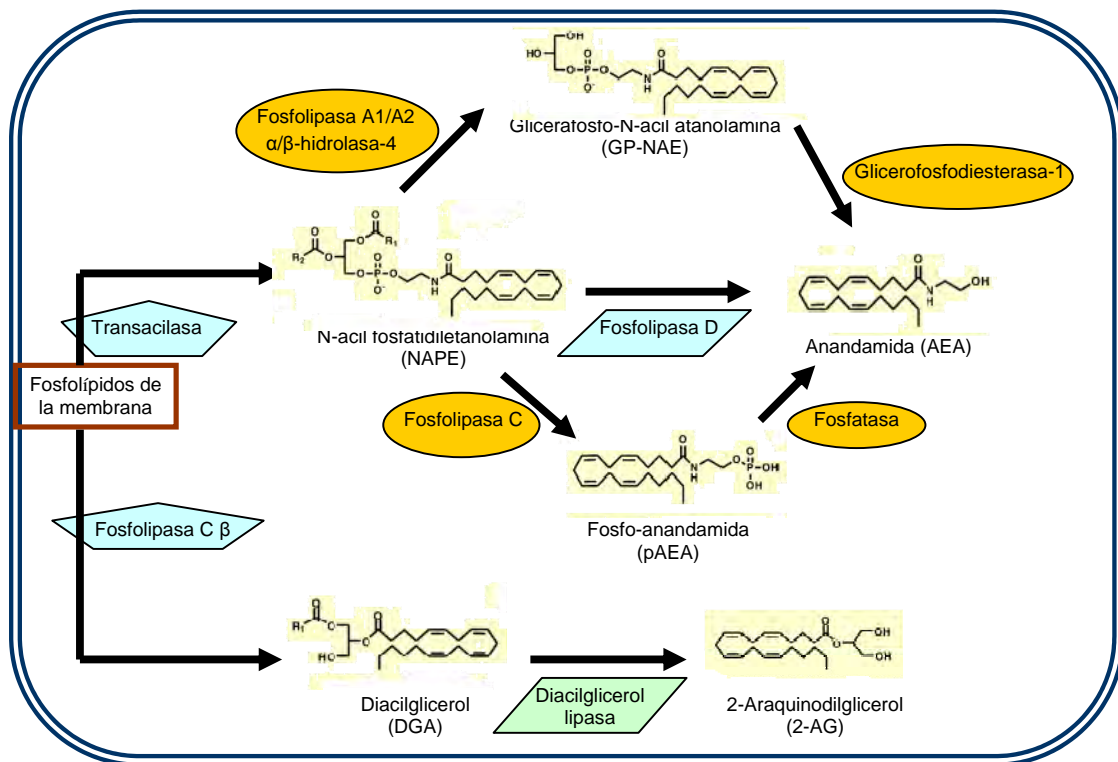


Figura 3. Diagrama de las vías metabólicas implicadas en la biosíntesis de los dos principales endocannabinoides (AEA y 2-AG). Modificado de Hwang et al., 2010.

III. 6. Liberación de los endocannabinoides

Tanto AEA como 2-AG pueden ser generados y liberados por neuronas a través de mecanismos que no requieren de la secreción vesicular. Sin embargo, a diferencia de ciertos neurotransmisores y péptidos que fácilmente se difunden a través de las hendiduras sinápticas, AEA y 2-AG son moléculas hidrófobas, por lo cual se ven limitados en sus movimientos en los medios acuosos presentes en las células (Freund et al., 2003).

El precursor lipídico de AEA y 2-AG se localiza en la superficie celular, esto sugiere que los endocannabinoides se pueden generar en el plasmalema, donde están preparados para acceder al medio externo. Así como otros componentes lipídicos, el paso para la liberación puede estar mediada por la difusión pasiva y/o la facilitación por la presencia de proteínas transportadoras de lípidos como las lipocalinas (Akerstrom et al., 2000).

La existencia de diferentes vías para la síntesis de AEA y 2-AG sugiere que estos dos endocannabinoides podrían en principio funcionar de manera independiente entre sí. Esta conclusión se apoya en tres ideas principales; la estimulación eléctrica en rebanadas del hipocampo aumenta los niveles de 2-AG, pero no los niveles de AEA (Stella et al.,1997); la activación de los receptores D₂ de dopamina en el cuerpo estriado aumenta la liberación de anandamida, pero no de 2-AG (Giuffrida et al.,1999); la activación de los receptores NMDA en las neuronas corticales aumenta los niveles de 2-AG, pero no hay ningún efecto sobre la formación de AEA (Stella y Piomelli, 2001).

III. 7. Inactivación de los endocannabinoides

AEA y 2-AG se inactivan en el sistema nervioso principalmente por una hidrolasa específica, que genera un ácido graso poliinsaturado con importancia biológica, el ácido araquidónico (AA). La amidohidrolasa de ácidos grasos (FAAH, por sus siglas en inglés) es la principal enzima responsable de poner fin a la señalización de AEA, esta se expresa ampliamente en todo el SNC como una proteína integral de membrana (Di Marzo, 2008; Vandervoorde y Lambert, 2007).

Una amidasa hidrolizadora de ácidos NAE (NAAA) se ha identificado en células del sistema inmune y tejidos periféricos. NAAA es diferente a FAAH, ya que no es una serina hidrolasa, su localización es intracelular (lisosomas), su contribución en la inactivación de AEA y palmitoiletanolamida se ha propuesto; sin embargo, aún se desconoce esta función (Tsuboi et al., 2007 a,b).

Aunque FAAH hidroliza tanto AEA y 2-AG en proporciones similares *in vitro* (Goparaju et al., 1998), varias pruebas sugieren que FAAH no es la responsable de la inactivación de 2-AG. Una serina hidrolasa, monoacilglicerol lipasa (MGL), es considerada como la principal enzima que inactiva 2-AG, puesto que cataliza la conversión de 2-AG a AA en el SNC (Vandevoorde y Lambert, 2007).

Tanto AEA y 2-AG pueden servir como fuentes directas e indirectas de sustratos para la transformación a derivados lipídicos. Tanto la oxidación, epoxidación, o hidrólisis por la ciclooxigenasa (COX), la lipoxigenasa (LOX), puede generar derivados de ácidos grasos como prostaglandinas, prostaciclina, tromboxanos, leucotrienos y diversos eicosanoides

(Khanapure et al., 2007). Así por ejemplo, la prostaglandina E (PGE₂) es un potente modulador del tono muscular y esta involucrado en la mediación de respuestas inmunitarias e inflamatorias. Tanto AEA y 2-AG pueden ser catalizados por COX para generar prostaglandinas etanolamidas (prostamidas) (por ejemplo, la prostaglandina E₂ etanolamina (PGE₂-EA), la prostaglandina E₂ glicerol éster (PGE₂-G)). COX-1 es mucho menos eficaz que la COX-2 en la catálisis del metabolismo oxidativo de los endocannabinoides (Woodward et al., 2008). Asimismo, AEA y 2-AG pueden servir como sustrato de la enzima LOX y el citocromo P-450, lo que conlleva a la formación de ácidos hidroxieicosanotetraico etanolamidas (por ejemplo, 12-S-OH araquidonil etanolamina), ésteres de glicerol de ácidos hidroxieicosatetraico (por ejemplo, 12-S-OH araquidonilglicerol) (Prusakiewicz et al., 2007; Chen et al., 2008). Recientemente se ha observado que la COX-2 convierte el 2-AG a PGE₂-G (Shu-Jung et al., 2008). En la figura 4 se presentan las vías implicadas en la inactivación de los endocannabinoides AEA y 2-AG.

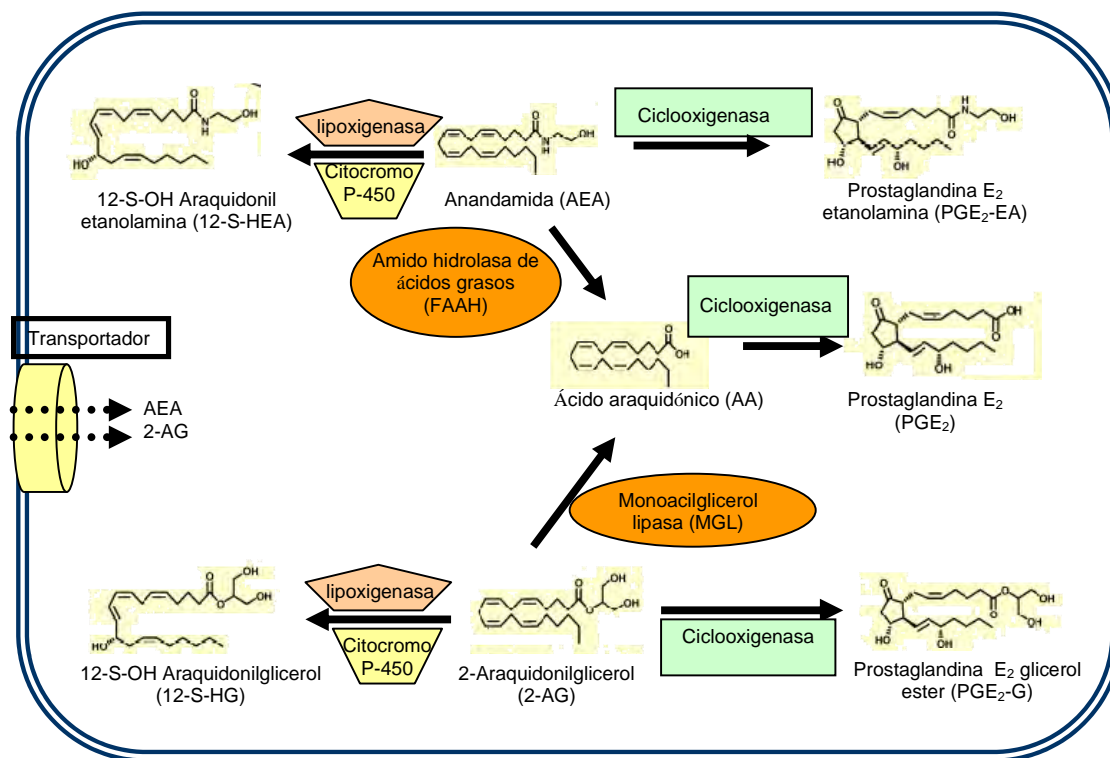


Figura 4. Diagrama de las vías implicadas en la inactivación de los dos principales endocannabinoides (AEA y 2-AG). Modificado de Hwang et al., 2010.

III. 8. *N*-Palmitoiletanolamida

N-palmitoiletanolamida (PEA) es una amida de ácidos grasos endógena conocida desde 1950 como un componente antiinflamatorio de la yema de huevo y comercializado desde 1970 en Europa del Este bajo la marca de Impulsin, para la prevención de infecciones del tracto respiratorio (Masek et al., 1974). PEA, *N*-(2-hidroxietil)hexadecanamida se ha encontrado en cerebro, hígado, corazón, testículo, en plasma y en líquido cefalorraquídeo (Lambert et al., 2002).

III. 9. Biosíntesis y degradación de la palmitoiletanolamida

Se han propuesto dos vías que describen la biosíntesis de PEA. La principal vía es llamada “en actividad reversa” de una enzima que normalmente cataliza la hidrólisis de PEA; en este caso se produce PEA por la condensación de etanolamina y ácido palmítico, a través de ATP y un proceso dependiente de coenzima A (probablemente FAAH actúa de manera reversible). La segunda vía es la hidrólisis de un precursor de fosfolípidos, *N*-palmitoil-fosfatidiletanolamida por la acción de una fosfodiesterasa de tipo D (Lambert et al., 2002). La figura 5 esquematiza la biosíntesis e inactivación del endocannabinoide PEA.

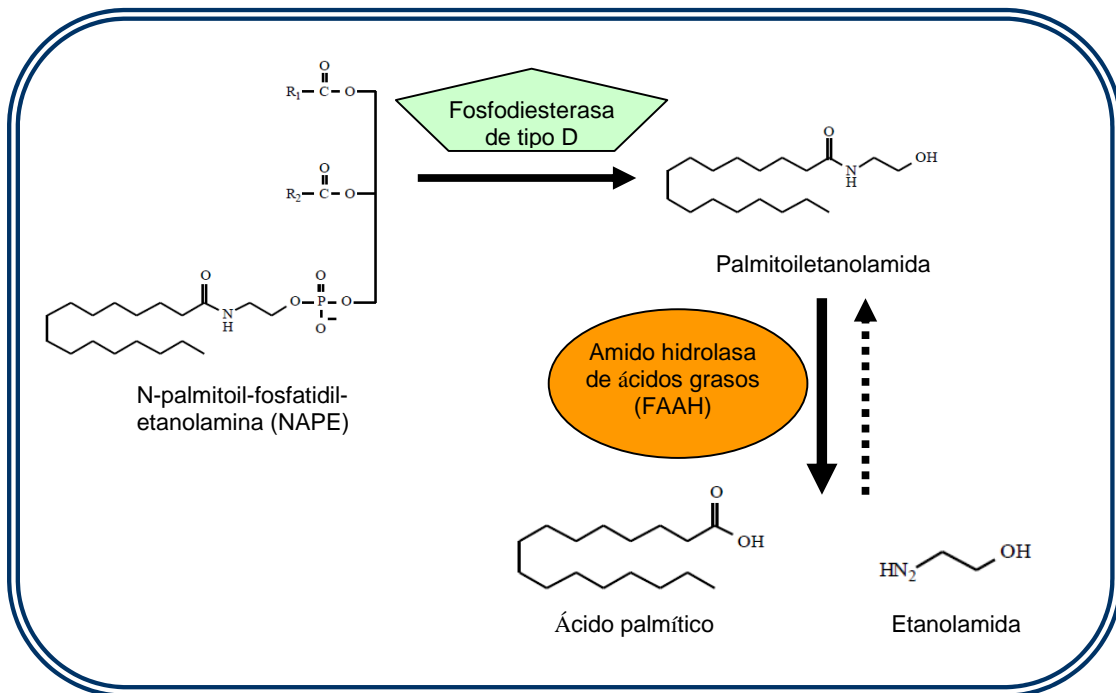


Figura 5. Diagrama de la vía de biosíntesis e inactivación de la palmitoiletanolamida.

III. 10. Efectos farmacológicos de la palmitoiletanolamida

Inflamación

La PEA ha mostrado ser un agente antiinflamatorio efectivo en modelos experimentales de inflamación. PEA disminuye los niveles de citocinas en especial de TNF- α . La administración oral de PEA (0.1-10 mg/kg) es seguida por una disminución de forma dosis-dependiente de la sustancia P en modelos de inducción de edema en animales de laboratorio como el modelo de la carragenina y el de la formalina (Mazzari et al., 1996). En medicina veterinaria, en un estudio piloto con 50 gatos con granulomas eosinofílicos, se demostró que la administración oral de palmidrol (análogo sintético de PEA) (10 mg/kg por día, durante 30 días), resultó en la resolución de los signos clínicos (incluyendo el eritema) en un 65% de los animales tratados (Scarpella et al., 2001).

Dolor

Una de las tantas funciones fisiológicas de los endocannabinoides que se han descrito es la supresión del dolor (Walker et al., 2002). Pretratamientos con PEA en animales de laboratorio muestran una inhibición de hiperalgésia mecánica y térmica tras la administración subplantar de carragenina (Mazzari et al., 1996). Se ha demostrado su efecto antinociceptivo en pruebas como la formalina (Calignano et al., 1998), y en la prueba de estiramiento abdominal (Calignano et al., 2001). Además, la administración intraperitoneal de PEA ha mostrado disminuir significativamente la hiperalgésia en neuropatía inducida por la ligadura del nervio ciático en ratas (Helyes et al., 2003).

Prurito

Los fármacos que aumentan el umbral nociceptivo pueden ser considerados un enfoque novedoso para el tratamiento del prurito. Debido a las evidencias encontradas de que PEA tiene un efecto antinociceptivo, posiblemente este endocannabinoide es capaz de disminuir el prurito, además de que se ha demostrado que es capaz de disminuir el prurito en gatos con granulomas eosinofílicos (Scarpella et al., 2001).

Isquemia

Se ha descubierto que en un proceso isquémico se aumentan los niveles de PEA, quien actúa como neuroprotector (Natarajan et al., 1986) disminuyendo los niveles de

peroxidación lipídica (Parinandi y Schmid, 1988). Este efecto es antagonizado por AEA, por lo que no todos los endocannabinoides son neuroprotectores (Skaper et al., 1996).

Convulsión

Se ha encontrado que los cannabinoides Δ^9 -Tetrahidrocannabinol y el cannabidiol poseen actividad anticonvulsiva, esto ha sido demostrado en modelos de inducción de convulsiones por electroshock y de manera química en ratón (Consroe et al., 1981; 1982). Además, se ha demostrado que el endocannabinoide PEA es efectivo en la protección de células granulares del cerebelo en la excitotoxicidad por glutamato (Skaper et al., 1996). Lo anterior dió lugar al estudio de PEA como agente anticonvulsivante. Estudios realizados en ratones a los cuales se les inducían convulsiones por medios químicos (pentilentetrazol, picrotoxina ó estricnina) y por medio de electroestimulación, mostraron que la PEA es un agente anticonvulsivante (Lambert et al., 2001). Asimismo, se realizaron estudios en los cuales se administró PEA en ratas que presentaban convulsiones inducidas por pentilentetrazol y estimulación eléctrica, los resultados obtenidos indicaron que palmitoiletanolamida era capaz de proteger a los animales de las convulsiones tónicas, pero no de las clónicas (Sheerin et al., 2004).

III. 11. Enzima FAAH

La amidohidrolasa de ácidos grasos (FAAH) es una enzima intracelular que cataliza la hidrólisis de ciertos endocannabinoides, en especial de AEA y PEA. FAAH es una proteína integral de membrana que pertenece a la familia de las amidasas (Mckinney y Cravatt, 2005) y se presenta en muchos tejidos, incluyendo cerebro, intestino, testículos, útero, tejido ocular, bazo e hígado (Desarnaud et al., 1995; Watanabe et al., 1998; Bobrov et al., 2000).

La enzima FAAH tiene tres dominios: un dominio N-terminal transmembranal que dicta la oligomerización de proteínas, un dominio rico en serina y glicina que contiene la secuencia característica de la enzima amidasa y el sitio activo que contiene un dominio rico en prolina, homólogo a un dominio vinculante SH₃ (Mckinney y Cravatt, 2005).

FAAH es una enzima que usa una triada catalítica que hidroliza el sustrato, esta triada esta compuesta por serina-serina-lisina (Ser241-Ser217-Lys142). En base a la

organización estructural de la triada del sitio activo, un mecanismo de concertación de la función catalítica implica la activación del nucleófilo Ser241 por la participación de Lys142 y la reducción de Ser217. La lisina (Lys142) actúa como una base en la activación del nucleófilo Ser241 y como un ácido en la protonación del grupo del sustrato al salir. La activación de Ser217 y Lys142 contribuye a una rápida hidrólisis de las amidas de un modo menos reactivo. En la figura 6 se observa el mecanismo por el cual la triada catalítica de FAAH actúa en la inactivación de AEA. FAAH parece hidrolizar tanto a amidas como a ésteres en igual proporción (Mckinney y Cravatt, 2003).

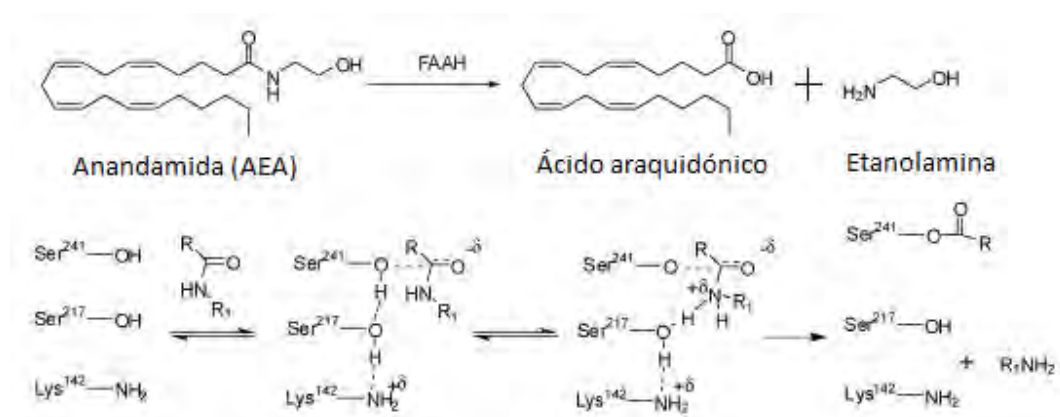


Figura 6. Mecanismo de inactivación de los endocannabinoides que lleva a cabo la enzima FAAH (Pillarsetti et al., 2009).

III. 12. Inhibición de la enzima FAAH

Evidencias preliminares sugieren que la limitación de la actividad farmacológica de la AEA (agonista de los receptores CB₁) puede ser debido a su rápido catabolismo *in vivo*, este endocannabinoide es hidrolizado por la enzima FAAH a AA, un lípido que más tarde es catalizado por la enzima ciclooxigenasa, dando lugar a las prostaglandinas, lípidos con efectos biológicos de variada índole (Willoughby et al., 1997).

Para estudiar los posibles efectos farmacológicos que se obtienen tras la interrupción de la actividad de FAAH, se han creado dos modelos de inhibición de la enzima, los cuales dan a conocer las consecuencias que se obtienen de la inhibición. Un modelo es la creación de ratones transgénicos, los cuales presentan una baja en la expresión de la enzima FAAH (FAAH-knockout (KO) mice) (Cravatt et al., 2001). En estos ratones se

encontró un incremento significativo en los niveles de AEA en tejidos. Los ratones FAAH-KO exhiben ciertas características como hipomotilidad, analgesia, catalepsia e hipotermia. Los efectos en el comportamiento de los ratones FAAH-KO se ven bloqueados con un antagonista de los receptores CB₁ (SR141716A), lo que indica que AEA actúa como un potente y selectivo ligando de los receptores CB₁ en estos animales (Lichtman et al., 2002).

El otro modelo que ha sido utilizado para estudiar los efectos de la inhibición de FAAH es la administración de inhibidores químicos de la enzima. Varios inhibidores de FAAH han sido descritos, algunos de ellos son las trifluorometilcetonas, α -ceto heterociclos, sulfonil fluorados, fluorofosfonatos y carbamatos. Se ha visto que después de la administración de los inhibidores de FAAH URB532 y URB597 hay un aumento en los niveles de AEA, produciendo efectos ansiolíticos y analgésicos dependientes a la unión de AEA al receptor CB₁. Se ha encontrado que los inhibidores de FAAH no inducen catalepsia o hipotermia (Cravatt y Lichtman, 2003).

La inhibición de FAAH ha sido ampliamente estudiada, dado que se busca usar inhibidores químicos de la enzima como agentes terapéuticos. La aplicación de estos compuestos en el tratamiento de varias patologías se ve resumida en la tabla 1.

Tabla 1. Aplicaciones terapéuticas de los inhibidores de FAAH. Modificado de Pillarisetti, et al., 2009.

Indicación	Respuestas encontradas
Analgesia/Nocicepción Dolor neuropático Dolor inflamatorio	Efectivos en los modelos de nocicepción térmica y con fenil-p-quinona. Efectivos en modelos de dolor neuropático, como ligación del nervio espinal. Efectivos en los modelos de dolor inflamatorio de la formalina y carragenina.
Inflamación/Edema Enfermedades inflamatorias del intestino	Inhibe la COX-2 inducida por LPS y la expresión de iNOS y disminuyen los niveles de PGE2. Efectivos en la prueba de la carragenina. Efectivos en la colitis inducida experimentalmente con ácido trinitrobencenosulfónico.
Ansiedad/Depresión Emesis/Nauseas	Efectos del tipo ansiolítico y antidepresivo en ratón y hamster, sin presencia de efectos de tipo cannabinoide (hipotermia, catalepsia, hiperfagia). Previenen los vómitos inducidos por el cisplatino y la nicotina.
Hipertensión Diabetes/Obesidad	Disminuyen los niveles de la presión arterial, también disminuyen la presión ventricular sistólica y la resistencia periférica. Evita el vaciamiento gástrico en ratones alimentados con dieta normal o alta en grasas. Potencia la secreción de GLP-1 en células intestinales.

III. 13. *N*-(4-metoxi-2-nitrofenil)hexadecanamida

Los fármacos analgésicos y antiinflamatorios son ampliamente utilizados como agentes terapéuticos debido a la alta prevalencia de patologías que cursan con dolor e inflamación. De esta forma es importante encontrar fármacos que actúen de forma específica, controlada y segura. Un blanco terapéutico novedoso es el sistema endocannabinoide, puesto que se ha encontrado que este sistema puede fungir como una defensa natural contra el dolor y la inflamación (Kress y Kuner, 2009).

PEA es un endocannabinoide que se ve degradado por la enzima FAAH, inhibiendo por un tiempo el catabolismo de AEA, adicionalmente ejerce un efecto antiinflamatorio; por tanto, esta molécula presenta un potencial para su uso terapéutico, por lo cual al ser modificada químicamente podría crear un compuesto que se una a los receptores cannabinoide y/o a FAAH, con el propósito de inhibir la función de la enzima; de esta manera los niveles de AEA se incrementan y, por tanto, provocarían un efecto biológico favorable para la disminución del dolor o la inflamación. Por lo anterior, se creó un análogo de PEA, denominado *N*-(4-metoxi-2-nitrofenil)hexadecanamida (**HD**), en la figura 7 se observa el grupo funcional que se sustituyó en PEA (ver apéndice 1 que indica la síntesis de **HD**).

Al compuesto sintetizado se le realizó la prueba de inhibición de FAAH, con lo cual se cuantificó si **HD** poseía la capacidad de inhibir a la enzima, el resultado obtenido fue que **HD** tenía la característica de inhibir a la enzima con mayor eficacia que PEA (Datos y procedimiento de la prueba de inhibición de FAAH en apéndice 2).

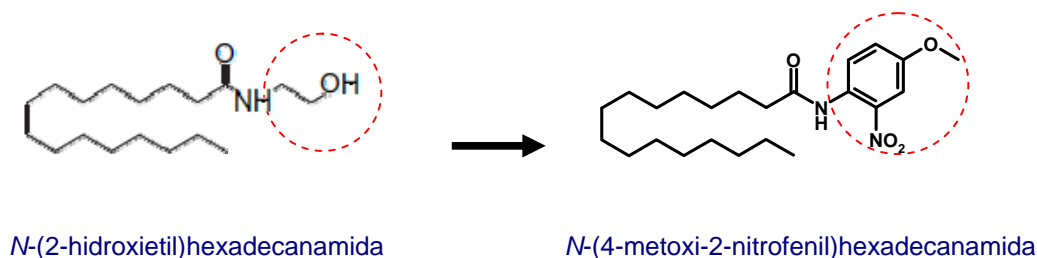


Figura 7. Estructura química de palmitoiletanolamida (*N*-(2-hidroxietil)hexadecanamida), y del compuesto sintetizado *N*-(4-metoxi-2-nitrofenil)hexadecanamida. Se sustituyó el grupo hidroxietil por un grupo metoxinitrofenil.

Se realizaron estudios previos del posible efecto antinociceptivo que podría presentar **HD**, las pruebas que se realizaron para evaluar el efecto farmacológico fueron la prueba de la placa caliente y la prueba de estiramiento abdominal, ambas en ratón. Los resultados obtenidos indican que el compuesto produce un efecto antinociceptivo (10-100 mg/kg, p.o.) en ambas pruebas, con eficacia semejante a la morfina (6 mg/kg, p.o.) en la prueba de la placa caliente y al diclofenaco (30 mg/kg, p.o.) en la prueba de estiramiento abdominal (Déciga-Campos et al., 2007).

IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El dolor es un problema de salud pública que tiene un impacto económico y social importante en México, así como en el resto del mundo. La terapéutica convencional se basa en el empleo de fármacos de tipo AINE y opioide, éstos tienen una eficacia clínica adecuada en dolor inflamatorio, nociceptivo y en ocasiones en dolor neuropático. Sin embargo, la ineficacia analgésica sobre todo en dolor crónico, así como los efectos adversos que presentan ambos grupos de fármacos, ocasiona que para un dolor en particular se requiera el empleo de la escalera analgésica recomendada por la OMS; esto trae como consecuencia que un paciente tenga una rotación analgésica constante de AINE's y opioides. Por otra parte, para el dolor neuropático se ha demostrado que estos grupos de fármacos, administrados de forma individual o en combinación entre ellos y con coadyuvantes, no producen efectos terapéuticos adecuados. Por lo anterior, se buscan nuevas alternativas terapéuticas que sean efectivas y seguras.

V. JUSTIFICACIÓN

Desde que se descubrió el sistema endocannabinoide (endocannabinoides, receptores, enzimas para la biosíntesis y degradación), se ha tratado de estudiar y entender el funcionamiento de cada uno de los componentes y así obtener algún provecho para la salud. Así mismo, se ha visto que este sistema es importante en la regulación de funciones neurológicas e inmunológicas, por lo que se han creado agonistas y antagonistas de los receptores cannabinoide, e incluso inhibidores de las enzimas de degradación de endocannabinoides (FAAH), esto con el fin de tener un control sobre ciertas funciones en las que participa el sistema endocannabinoide, como el dolor, entre otras. Se ha demostrado que PEA presenta efecto antinociceptivo y antiinflamatorio; por lo tanto *N*-(4-metoxi-2-nitrofenil)hexadecanamida, al ser un análogo de este endocannabinoide, además de tener la propiedad de inhibir a FAAH, podría fungir como un nuevo fármaco antinociceptivo eficaz y seguro.

CAPÍTULO 1

EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTINOCICEPTIVO A NIVEL SISTÉMICO Y LOCAL DE N-(4-METOXI-2-NITROFENIL)HEXADECANAMIDA, ASÍ COMO EL MECANISMO DE ACCIÓN FARMACOLÓGICO INVOLUCRADO

1.1 Antecedentes

1.1.1 Dolor

El dolor tiene una función sumamente importante, dado que obliga al cuerpo a retirarse de estímulos físicos, químicos o mecánicos que ponen en riesgo su integridad (Zeilhofer, 2008). Actualmente, la Organización Internacional para el Estudio del Dolor (IASP, por sus siglas en inglés) define al dolor como “una experiencia sensorial y emocional desagradable asociada a un daño tisular real o potencial que puede ser descrito en términos de la magnitud del daño”.

La clasificación del dolor resulta difícil debido a la gran cantidad de factores anatómicos, fisiológicos y psicológicos involucrados en la integración de esta sensación; sin embargo, una clasificación aceptada es la publicada por Woolf en 2004 quien se basa en el mecanismo neurofisiológico que origina el dolor, y se clasifican en: nociceptivo, inflamatorio, neuropático y funcional. De manera general, el dolor puede dividirse en dolor fisiológico y dolor patológico. El dolor fisiológico (también conocido como dolor agudo) es adaptativo, transitorio y desempeña un papel protector que advierte un daño potencial al tejido. El dolor patológico (también conocido como dolor crónico) es generalmente mal adaptativo, persistente y no tiene una función defensiva u otros efectos útiles (Ji y Wen, 2006).

1.1.2 Mecanismos neurofisiológicos del dolor

Las etapas del proceso neurofisiológico del dolor son transducción, conducción, transmisión y percepción. La transducción es la conversión de los estímulos nocivos en actividad eléctrica en las terminales periféricas de las fibras sensoriales. La conducción es

el pasaje de los potenciales de acción desde las terminales periféricas a lo largo de los axones a los nociceptores de las terminales centrales en el SNC. La transmisión es la transferencia sináptica y la modulación de los impulsos de una neurona a otra (Woolf, 2004).

Las fibras A β sensoriales son grandes neuronas mielinizadas, las cuales son mecanorreceptores de bajo umbral que participan en la percepción táctil. Las fibras C no mielinizadas traducen los estímulos térmicos y nociceptivos. La mayoría de los nociceptores son polimodales, dado que pueden ser activados por una gran variedad de estímulos (Constigan y Woolf, 2000). La activación de los nociceptores (principalmente fibras C) genera potenciales que liberan neuropéptidos como la sustancia P y el péptido relacionado con la calcitonina (CGRP) (Wall y Devor, 1983).

Las señales nocivas se traducen en corrientes de despolarización a través de receptores especializados que se congregan en las terminales de los nociceptores. Los nociceptores expresan varios tipos de canales iónicos tales como canales TRP (TRPV1, TRPA1, TRPM8) (Julius y Basbaum, 2001), el receptor purinérgico P2X3 (Souslova et al., 2000), canales sensibles a ácido (ASIC1) (Álvarez de la Rosa et al., 2002), canales sensibles (Na_v1.1, Na_v1.2, Na_v1.3, Na_v1.6 y Na_v1.7) y resistentes (Na_v1.8, Na_v1.9) a tetrodotoxina (Cummins et al., 2000; Lai et al., 2004), así como varios canales de Ca²⁺ y de K⁺ (Passmore et al., 2003). La hipersensibilidad y la sensibilización de los canales TRPV1 y de los canales de Na⁺ resistentes a tetrodotoxina han sido fuertemente implicados en la sensibilización periférica y en el dolor persistente (Davis et al., 2000; Julius y Basbaum, 2001).

Cuando un tejido ha sido dañado se liberan varios mediadores químicos como el ATP, los protones, serotonina, histamina, metabolitos del AA, citocinas como IL-1, IL-6, TNF- α , NGF, en consecuencia, se activan nociceptores y canales iónicos que causan una generación de potenciales que más tarde se perciben como dolor, en la figura 8 se presenta un diagrama de los mediadores moleculares en el dolor (Boddeke, 2001).

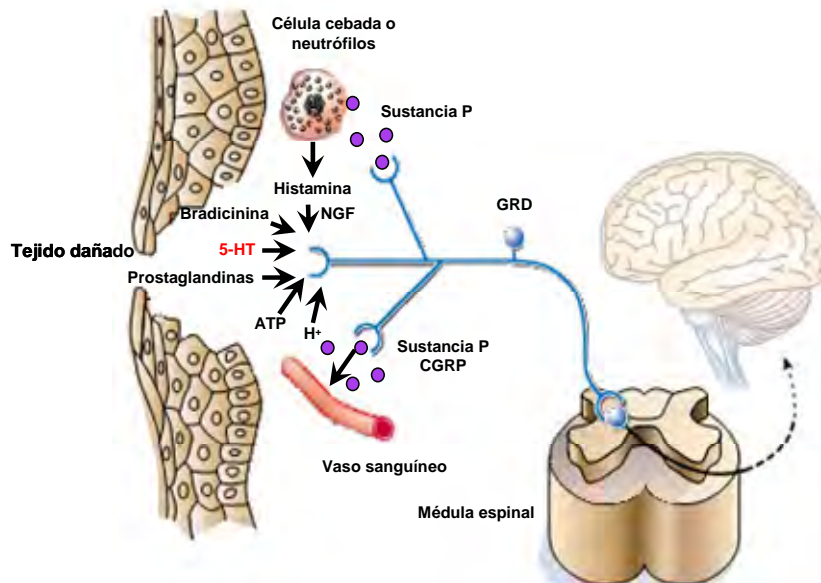


Figura 8. Mediadores moleculares en el mecanismo del dolor. Modificado de Julius y Basbaum, 2001.

Además de los cambios que se generan a nivel periférico, también suceden cambios en la médula espinal y en la terminal central de las neuronas aferentes primarias (Terman y Bonica, 2003). En el sistema nervioso central se amplifica y facilita la transferencia sináptica de la terminal central nociceptiva a neuronas del asta dorsal y para iniciarlo requiere de una breve pero intensa actividad de los nociceptores. Inicia con una cascada de eventos en el asta dorsal de la médula espinal que generan la liberación de los neurotransmisores de la terminal nociceptiva, lo cual incrementa la transmisión del dolor (Woolf y Salter, 2000).

1.1.3 Modelos para el estudio del dolor

Un modelo animal se puede definir como el procedimiento por el cual se valora el comportamiento de un animal ante un estímulo o situación de naturaleza variada. En el caso de los modelos para el estudio de la nocicepción, se estudia el comportamiento que se presenta en un animal al aplicar un estímulo nocivo, en la tabla 2 se pueden observar ejemplos de modelos para el estudio del dolor (Bars et al., 2001; Eaton, 2003).

Los modelos para el estudio de la nocicepción pueden dividirse principalmente en tres grupos, el primero envuelve la aplicación de estímulos nocivos de tipo mecánico y térmico en diferentes partes de la piel. Estos modelos imitan el dolor de tipo nociceptivo. El

segundo grupo implica la inyección local de agentes químicos que causan nocicepción como la capsaicina, la bradicinina, la formalina, el ácido acético, la carragenina, el ácido úrico o el adyuvante completo de Freund, y estos semejan el dolor de tipo inflamatorio. El último grupo implica daños al sistema nervioso por medios mecánicos, metabólicos o químicos. Este último grupo son modelos que reproducen al dolor neuropático que se presenta en humanos (Granados-Soto et al., 2009).

Tabla 2. Características de diversas pruebas experimentales para el estudio de nocicepción. Modificada de Wilson y Mogil, 2001.

Prueba	Ventajas	Desventajas	Comentarios
Estímulo Mecánico			
Presión sobre la pata (Randall-Selito)	Aplicación precisa del estímulo (pata derecha vs pata izquierda)	Requiere entrenamiento del experimentador	El umbral de vocalización puede no reflejar con precisión el umbral nociceptivo
Filamentos de Von Frey	No requiere entrenamiento de los animales	Respuesta inestable, laborioso y requiere mucho tiempo	Los filamentos se deben de calibrar periódicamente. Sensible a la colocación precisa del filamento
Estímulo térmico			
Placa caliente (Hot plate)	Simple	Puede desarrollar hiperalgesia. Se requiere entrenamiento previo del animal	El lamido, levantamiento y sacudida de pata así como el salto son las conductas a observar
Retiro de la pata (Hargreaves method)	No se requiere de entrenamiento. Aplicación precisa del estímulo (pata derecha vs pata izquierda)	Respuesta inestable. Laborioso. Requiere tiempo	Sensible a la temperatura ambiental
Retiro de la cola (Tail flick)	Respuesta estable. Simple	Requiere entrenamiento	Sensible al lugar y temperatura ambiental. La pigmentación de la cola afecta la absorción del calor
Estímulo Químico			
Estiramiento abdominal (writhing)	Sensible a los analgésicos débiles	Sensible (a no analgésicos). Alta variabilidad	Los estiramientos tienen algún grado de subjetividad
Formalina	Sensible a analgésicos opiáceos y no opiáceos	Laborioso y requiere mucho tiempo	Sensibles a la habituación y a la temperatura ambiental

En el presente trabajo se utilizaron dos pruebas de dolor inflamatorio-nociceptivo; la prueba de estiramiento abdominal y la prueba de la formalina las cuales se describen a continuación.

1.1. 3.1 Prueba del estiramiento abdominal

La prueba de estiramiento abdominal (Writhing Test) es una herramienta para evaluar la actividad antinociceptiva de ciertos compuestos, la descripción de esta prueba data desde los años 50`s (Carroll y Lim, 1958; Koster et al. 1959; Seigmund et al, 1957). La prueba de estiramiento abdominal consiste en la administración intraperitoneal de un irritante químico seguido de la subsecuente contabilización de los “estiramientos” (writhes), caracterizados por la contracción del músculo abdominal acompañado por un movimiento extensor de las extremidades posteriores, este comportamiento es considerado como reflejo y una evidencia de dolor visceral. La metodología ha variado con el uso de endotelina, bradicinina, adenosina 5´-trifosfato, acetilcolina, sulfato de magnesio, salina hipertónica; sin embargo, los agentes más comúnmente utilizados han sido la fenilquinona y el ácido acético (Hrabé et al, 2006).

1.1. 3. 2 Prueba de la formalina

La prueba de la formalina se introdujo como un modelo de dolor tónico en 1977, y desde entonces ha sido utilizado tanto en ratas como en ratones. En ratas, la formalina genera una fase inicial de actividad (5-10 minutos, fase 1), una interfase de reposo (5-10 minutos), y una segunda fase de actividad (que dura 60-90 minutos, fase 2), esto se observa con un comportamiento espontáneo, debido a un disparo de las neuronas aferentes, y a la actividad de las neuronas del asta dorsal. En ambas fases participa la actividad neural aferente periférica; la inflamación contribuye a la actividad de la fase 2 y la interfase resulta de los mecanismos de inhibición activa. Las respuestas que se obtienen son dependientes de la concentración. La formalina también ocasiona un edema tisular, y esto es duradero. La respuesta a la formalina de hasta el 2.5% es predominantemente de tipo neurogénico, mientras que a altas concentraciones, la respuesta es predominantemente de tipo inflamatoria. Dentro de la médula espinal, la formalina incrementa la expresión de c-Fos en las neuronas, causando una activación de la microglia, y esto puede contribuir a cambios neuronales a largo plazo. Respuestas

agudas (90 minutos) pueden representar un modelo de dolor agudo involucrado con inflamación y aspectos de sensibilización central, mientras que respuestas a largo plazo (días, semanas) puede representar un modelo patológico de dolor persistente (Jana y Xue, 2003). En la figura 9 se observa el curso temporal de la prueba de la formalina que se obtiene en rata.

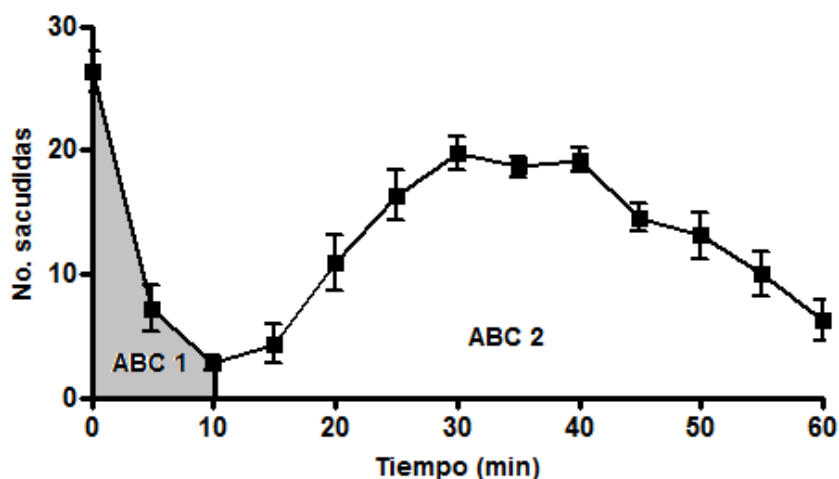


Figura 9. Curso temporal de la prueba de la formalina en rata. La administración de formalina al 1% en el dorso de la pata posterior derecha genera una respuesta nociceptiva característica, la cual se expresa por sacudidas de la pata administrada. La suma de ABC 1 (0-10 min) y ABC 2 (10-60 min) representa el efecto nociceptivo total.

1. 2 Evaluación del efecto antinociceptivo y del mecanismo de acción a nivel sistémico de *N*-(4-metoxi-2-nitrofenil)hexadecanamida en la prueba de estiramiento abdominal en ratón

1. 2. 1 Hipótesis

N-(4-metoxi-2-nitrofenil)hexadecanamida produce un efecto antinociceptivo a nivel sistémico, el cual se debe a la activación de la vía de los opioides, GABAérgica, serotoninérgica y del óxido nítrico.

1. 2. 2 **Objetivos**

1. Evaluar el efecto antinociceptivo de **HD** a nivel sistémico en la prueba de estiramiento abdominal en ratón.
2. Determinar el mecanismo de acción farmacológico involucrado en el efecto antinociceptivo a nivel sistémico de **HD** en la prueba de estiramiento abdominal.

1. 2. 3 **Metodología**

1) Material biológico

Se utilizaron ratones macho ICR (25-30 g, INER). Se mantuvieron a temperatura controlada de $22 \pm 1^\circ \text{C}$, en un ciclo de luz/oscuridad de 12 h, se mantuvieron con libre acceso al alimento y agua. Los animales se trataron de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana sobre el cuidado y manejo de animales (NOM-062-ZOO-1999). Al término de los experimentos los ratones se sacrificaron por dislocación cervical.

2) Fármacos

N-(4-metoxi-2-nitrofenil)hexadecanamida (**HD**), se sintetizó y purificó en la Universidad Autónoma del Estado de Morelos (UAEM). El ácido acético, la paraclorofenilalanina (PCPA), la naltrexona, la bicuculina, el *NG*-nitro-*L*-arginina metilester (L-NAME), el 1H-[1,2,4]oxadiazolo-[4,3-*a*]quinoxalin-1-ona (ODQ) y la glibenclamida se obtuvieron de Sigma-Aldrich.

3) Métodos

a) Efecto antinociceptivo de **HD en la prueba de estiramiento abdominal en ratón**

Cada uno de los ratones se ambientaron de manera individual en una caja de acrílico por un lapso de 30 minutos. Se usaron 5 grupos de 6 ratones cada uno; a uno de los grupos se le administró el vehículo (carboximetilcelulosa, 0.2%), a los demás grupos se les administraron diversas dosis de **HD** (3-100 mg/kg) y 20 minutos después se administró el ácido acético al 0.6% (0.1 ml por cada 10 g de peso corporal del animal). Inmediatamente

se contaron los estiramientos y/o contorsiones abdominales presentados por el ratón en intervalos de 5 minutos, durante 30 minutos. Tanto los fármacos como **HD** y el ácido acético se administraron vía intraperitoneal (Collier et al, 1968). En el diagrama 1 se presenta el diseño experimental de la prueba de estiramiento abdominal.

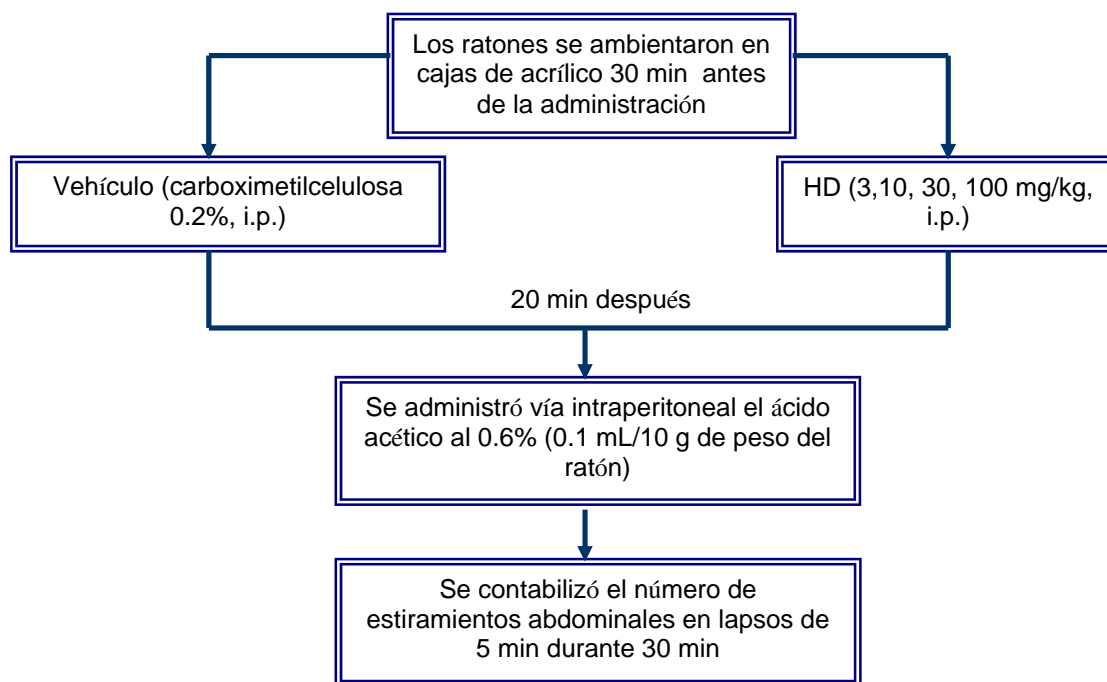


Diagrama 1. Diseño experimental de la evaluación del efecto antinociceptivo de **HD** en la prueba de estiramiento abdominal (Writhing test).

b) Posible mecanismo de acción farmacológico del efecto antinociceptivo a nivel sistémico de **HD en la prueba de estiramiento abdominal en ratón**

Los ratones recibieron pretratamientos con L-NAME (inhibidor de la sintasa de óxido nítrico, 10 mg/kg, s.c.), ODQ (inhibidor de la guanilato ciclasa, 1 mg/kg, s.c.), glibenclamida (bloqueador de los canales de K⁺ sensibles a ATP, 10 mg/kg, s.c.), naltrexona (antagonista opioide, 1 mg/kg, i.p.), PCPA (inhibidor de la síntesis de serotonina, 80 mg/kg, i.p., durante 4 días) y bicuculina (antagonista GABA_A 5 mg/kg, s.c.). Los pretratamientos se realizaron 15 minutos antes de la administración de **HD** (30 mg/kg, i.p.), y 15 minutos después se realizó la administración de ácido acético 0.6%, i.p.;

inmediatamente se contaron los estiramientos y/o contorsiones abdominales presentados por el ratón en intervalos de 5 minutos durante 30 minutos. En el diagrama 2 se muestra el diseño experimental de la evaluación del mecanismo de acción de **HD**.

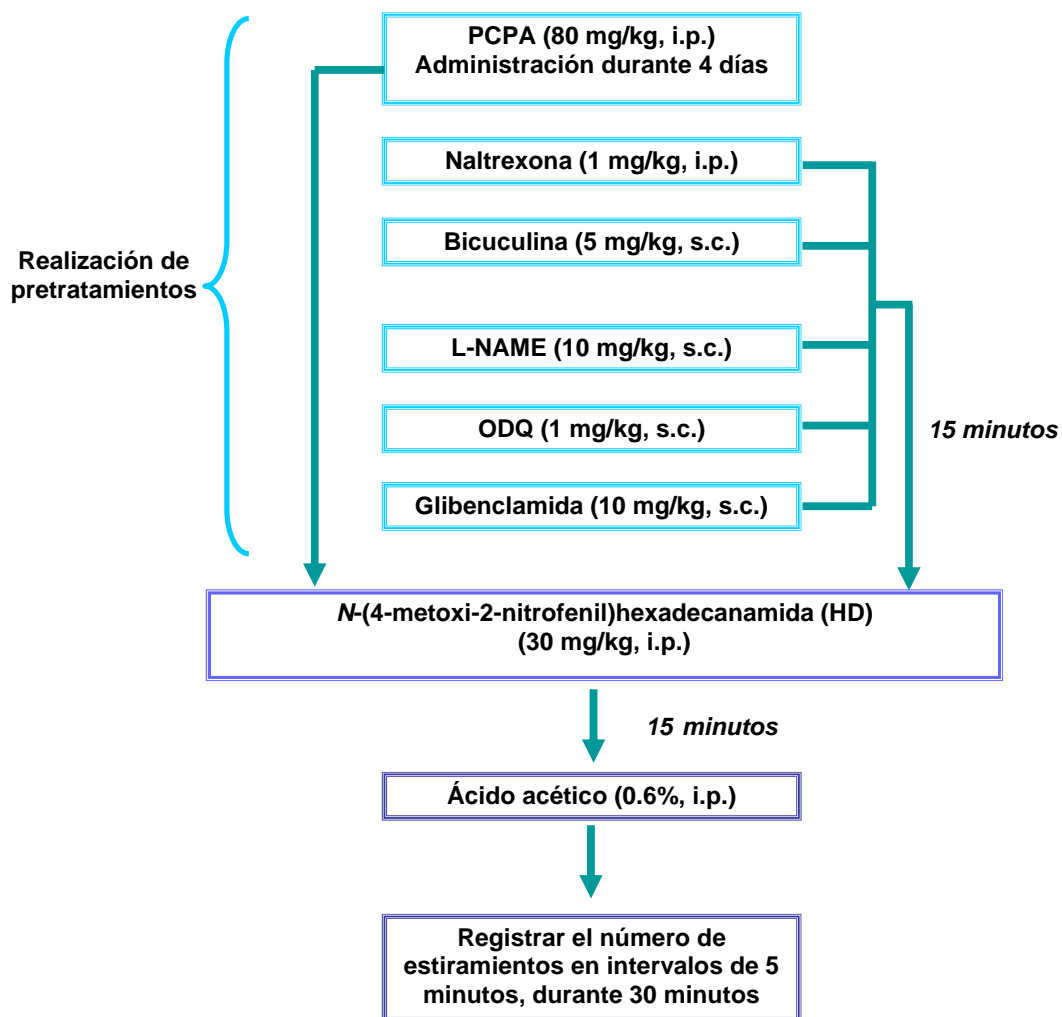


Diagrama 2. Diseño experimental de la evaluación del posible mecanismo de acción del efecto antinociceptivo de **HD** en la prueba de estiramiento abdominal.

1. 2. 4 Resultados

La prueba de estiramiento abdominal es un modelo experimental, en el cual se simula un dolor de tipo visceral. Esta prueba se seleccionó para la evaluación de **HD** a nivel sistémico. Las ventajas de la prueba son que es de sencilla aplicación, con tiempo de observación reducido, es económica, no es necesario un equipo especial o reactivo de alto costo. Los datos se muestran en cursos temporales y gráficas de barras que representan el número de estiramientos obtenidos en los 30 minutos de evaluación.

En la figura 10 se muestra el curso temporal de la respuesta nociceptiva inducida al administrar ácido acético 0.6% vía intraperitoneal a los ratones. En la misma figura se observa el número de estiramientos a lo largo del tiempo de evaluación con la administración de **HD** a la dosis de 100 mg/kg (77% se reduce la respuesta nociceptiva). Con lo que indica un efecto antinociceptivo.

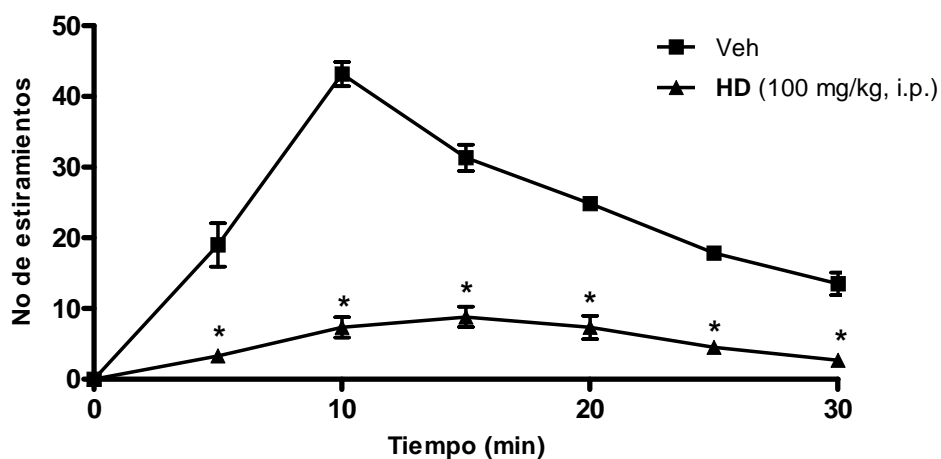


Figura 10. Curso temporal de la prueba de estiramiento abdominal en ratón. Se presenta la conducta nociceptiva descrita por la presencia de estiramientos y/o contorsiones abdominales en presencia del vehículo (carboximetilcelulosa, 0.2%) seguido de la administración de ácido acético 0.6% intraperitoneal, así como la disminución de la conducta nociceptiva después de la administración de **HD** (100 mg/kg). El curso temporal corresponde al promedio de 6 animales \pm EEM. * La diferencia estadística es con respecto al vehículo (Veh), $p \leq 0.05$ determinado por una *t* student.

En la figura 11 se observa el resultado de la evaluación de 3-100 mg/kg del compuesto **HD** en la prueba de estiramiento abdominal, con las cuales se demuestra que hay una disminución dependiente de la dosis del número de estiramientos. Utilizando el modelo lineal-logarítmico se calculó la dosis efectiva 50 ($DE_{50}=15.68$ mg/kg, i.p.). Los datos se expresan como el número de estiramientos en un período de 30 minutos.

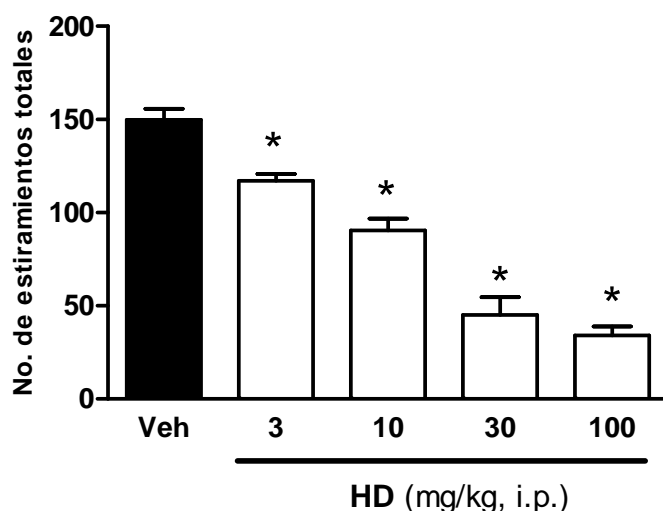


Figura 11. Efecto antinociceptivo de **HD** en la prueba de estiramiento abdominal en ratón. Las barras representan el área bajo la curva del curso temporal promedio de 6 animales \pm E.E.M. El efecto antinociceptivo se representa como la disminución del número de estiramientos totales en un período de 30 minutos. * Estadísticamente diferente con respecto al vehículo (Veh), $p \leq 0.05$ determinado por una ANADEVa de una vía seguido de una prueba post-hoc de Dunnett.

En la búsqueda del posible mecanismo de acción de un fármaco, comúnmente se utilizan antagonistas específicos de algún receptor, bloqueadores de canales iónicos o inhibidores enzimáticos. Estos son herramientas útiles en la evaluación farmacológica, ya que si un fármaco activa cierto receptor, los antagonistas impedirán que se una a su blanco ocasionando que disminuya el efecto biológico.

Utilizando el modelo de estiramiento abdominal y herramientas farmacológicas como antagonistas e inhibidores enzimáticos se determinaron las posibles vías antinociceptivas que pudieran estar involucradas en el efecto antinociceptivo que produce **HD**. Para ello se seleccionó la dosis de 30 mg/kg, la cual produce un 70% de efecto antinociceptivo. Esta dosis permite visualizar un aumento o disminución del efecto antinociceptivo. En la figura 12 se muestra que la administración de naltrexona y PCPA no producen efecto

antinociceptivo por sí solos. Sin embargo, cuando se coadministra naltrexona ó PCPA con **HD** se observa que el efecto antinociceptivo se revierte. Cuando se administra bicuculina sola en presencia del vehículo se observa una disminución del número de estiramientos con respecto al vehículo. El efecto antinociceptivo de **HD** no se revierte cuando se coadministra con bicuculina, este efecto no es diferente con respecto a la administración individual de bicuculina.

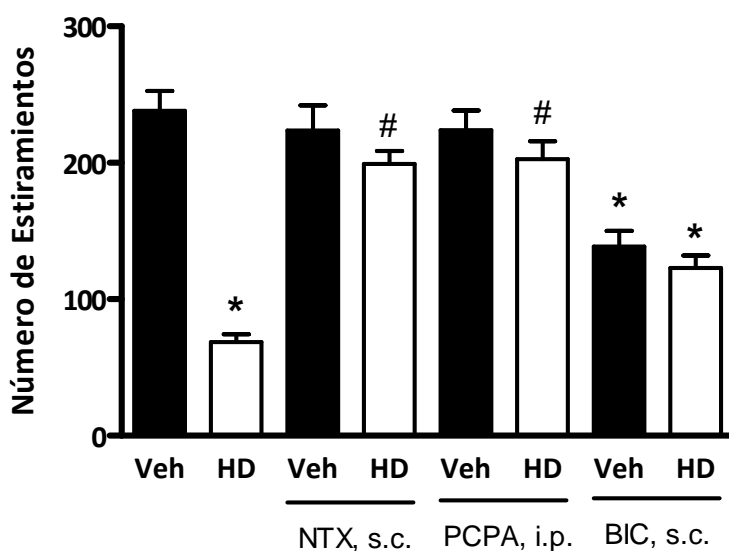


Figura 12. Efecto de la administración de naltrexona (NTX, 1 mg/kg, s.c.), paraclorofenilalanina (PCPA, 80 mg/kg, i.p.) ó bicuculina (BIC, 5 mg/kg, s.c.) en el efecto antinociceptivo de **HD** (30 mg/kg, i.p.) en la prueba de estiramiento abdominal. Las barras representan el promedio de 6 animales \pm E.E.M. * Estadísticamente diferente con respecto al vehículo (Veh), $p \leq 0.05$; # estadísticamente diferentes con respecto a **HD** y + estadísticamente diferente con respecto al vehículo del antagonista evaluado en cada pretratamiento, en los tres casos se utilizó una ANADEVIA de una vía seguido de una prueba post-hoc de Tukey.

Por otra parte, en la figura 13 se presenta el efecto antinociceptivo que se obtuvo al administrar como pretratamiento L-NAME, ODQ y glibenclamida, en este caso el efecto de **HD** no se revierte.

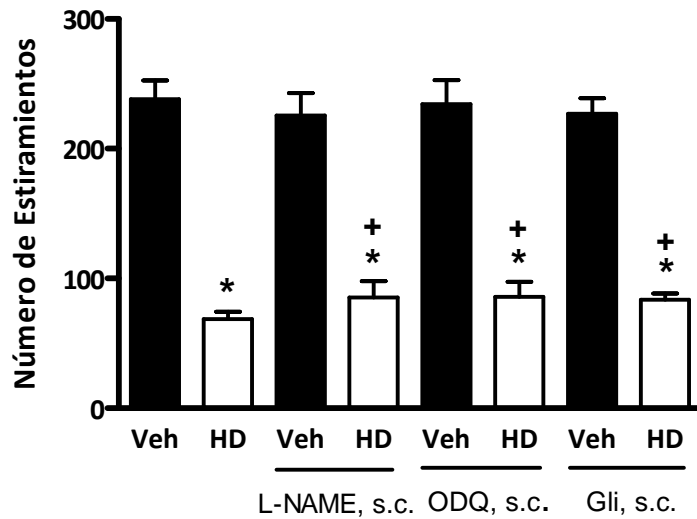


Figura 13. Efecto de la administración de L-NAME (10 mg/kg, s.c.), ODQ (1 mg/kg, s.c.) ó glibenclamida (Gli, 10 mg/kg, i.p.), en el efecto antinociceptivo de **HD** (30 mg/kg, i.p.) en la prueba de estiramiento abdominal. Las barras representan el promedio de 6 animales \pm E.E.M. * Estadísticamente diferente con respecto al vehículo (Veh), + estadísticamente diferente con respecto al vehículo del antagonista evaluado en cada pretratamiento, $p \leq 0.05$ en ambos casos se utilizó una ANADEVIA de una vía seguido de una prueba post-hoc de Tukey.

1. 3 Evaluación del efecto antinociceptivo y mecanismo de acción local de HD en la prueba de la formalina en rata

1. 3. 1 Hipótesis

N-(4-metoxi-2-nitrofenil)hexadecanamida produce un efecto antinociceptivo a nivel local en la prueba de la formalina en rata mediado por los receptores CB₁ y CB₂. Adicionalmente participan las vía serotoninérgica, la vía opioide, la vía gabaérgica y los receptores TRPV1 en la producción del efecto antinociceptivo.

1. 3. 2 Objetivos

1. Determinar la curva dosis respuesta del efecto antinociceptivo a nivel local que produce **HD** en la prueba de la formalina.
2. Determinar el posible mecanismo de acción farmacológico involucrado en el efecto antinociceptivo de **HD** a nivel local en la prueba de la formalina.

1. 3. 3 Metodología

4) Material biológico

Se utilizaron ratas Wistar hembra (180-200 g, CINVESTAV-COAPA). Los animales se mantuvieron en una habitación con temperatura constante ($22 \pm 1^\circ \text{C}$) y en ciclos de luz/oscuridad de 12 h. El alimento y agua se mantuvo de libre acceso. Los experimentos fueron realizados según las guías sobre ética para la investigación experimental de dolor en animales (Zimmermann, 1983) y fueron aprobados por el comité de ética local. Antes de cada experimento los animales a utilizar fueron ambientados de manera individual en cilindros de acrílico transparente por al menos una hora, para una mejor observación del animal se colocaron espejos en la parte trasera del cilindro. Al término de cada experimento los animales se sacrificaron en una cámara de CO_2 .

5) Fármacos

N-(4-metoxi-2-nitrofenil)hexadecanamida (**HD**) se sintetizó y purificó en la Universidad Autónoma del Estado de Morelos (UAEM); el SR144528 se adquirió de Cayman Chemical; mientras que la metiotepina, la naloxona, la capsazepina, el flumazenil y el AM281 provinieron de Sigma-Aldrich .

6) Métodos

a) Efecto antinociceptivo de **HD en la prueba de la formalina en rata**

Para evaluar el efecto antinociceptivo local del compuesto **HD** se administraron las dosis de 10-100 μg /pata, el vehículo utilizado fue dimetilsulfóxido al 20%, 50 μL de cada dosis o del vehículo por pata, se administraron de manera subcutánea en el dorso de la pata posterior derecha (pata ipsilateral) 20 minutos antes a la administración de la formalina (50 μL al 1%). Con la finalidad de evaluar si el efecto antinociceptivo del compuesto fue debido a una acción local o a una acción sistémica, se administró el compuesto **HD** de manera subcutánea en el dorso de la pata posterior izquierda (pata contralateral), 20 minutos después se administró la formalina en la pata ipsilateral. Todos los experimentos se realizaron a una temperatura de $27 \pm 2^\circ \text{C}$. El número de sacudidas que presentó cada

animal se cuantificó durante un minuto cada cinco minutos por un período de una hora. En el diagrama 3 se presenta el diseño experimental para la evaluación del efecto antinociceptivo de **HD**.

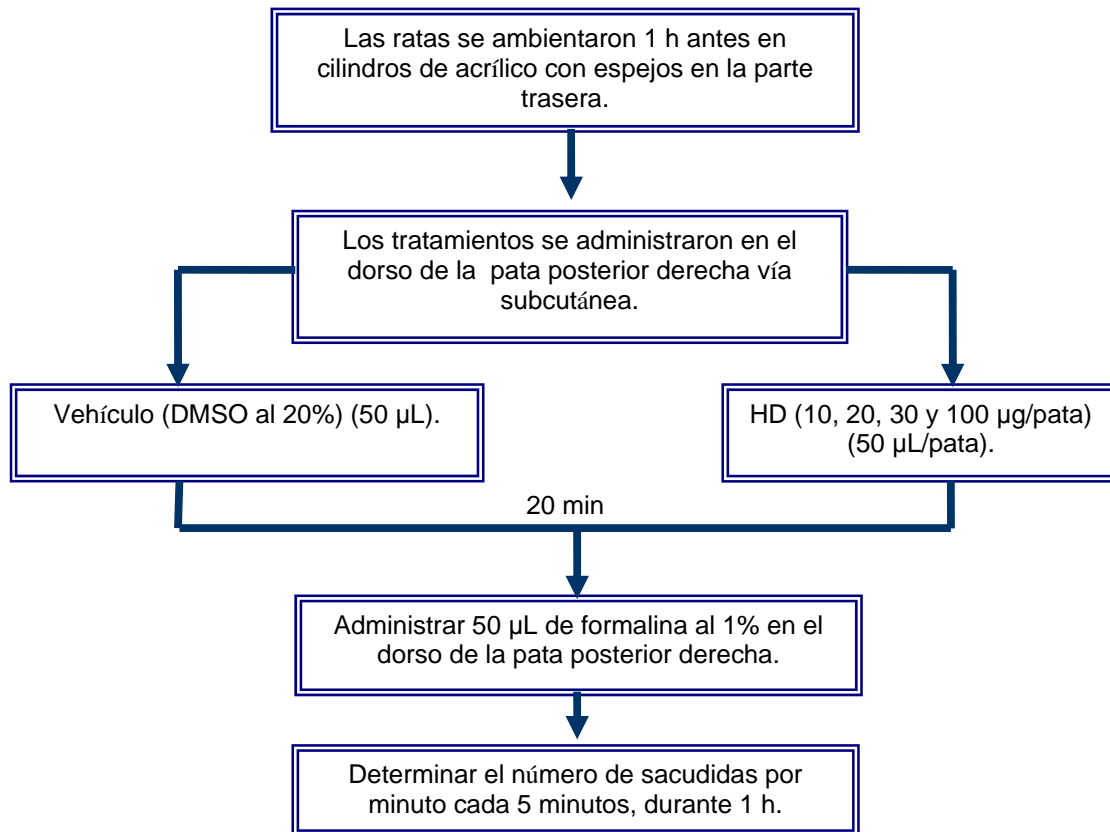


Diagrama 3. Diseño experimental de la evaluación del efecto antinociceptivo de **HD** en la prueba de la formalina en rata.

b) Posible mecanismo de acción farmacológico del efecto antinociceptivo a nivel local de **HD en la prueba de la formalina en rata**

Pretratamientos con AM281 (antagonista de receptores CB₁, 30 y 0.3 µg/pata), SR144528 (antagonista de receptores CB₂, 30 y 0.3 µg/pata), metiotepina (antagonista de receptores serotoninérgicos [5-HT₁, 5-HT₆, 5-HT₇], 0.3 y 0.03 µg/pata), naloxona (antagonista de receptores opioide, 50 y 5 µg/pata), capsazepina (antagonista de los canales TRPV1, 0.05 y 0.5 µg/pata) y flumazenil (antagonista GABA_A, 0.1 y 1 µg/pata), se administraron vía

subcutánea en el dorso de la pata posterior derecha (50 µL/pata), pasados 10 minutos se administró **HD** (100 µg/pata) y 20 minutos después se administró la formalina (50 µL al 1%). El número de sacudidas que presenta cada animal se cuantificó durante una hora. Tanto el **HD** como la formalina se administraron por la misma vía que los pretratamientos. En el diagrama 4 se presenta el diseño experimental para la evaluación del mecanismo de acción de **HD**.

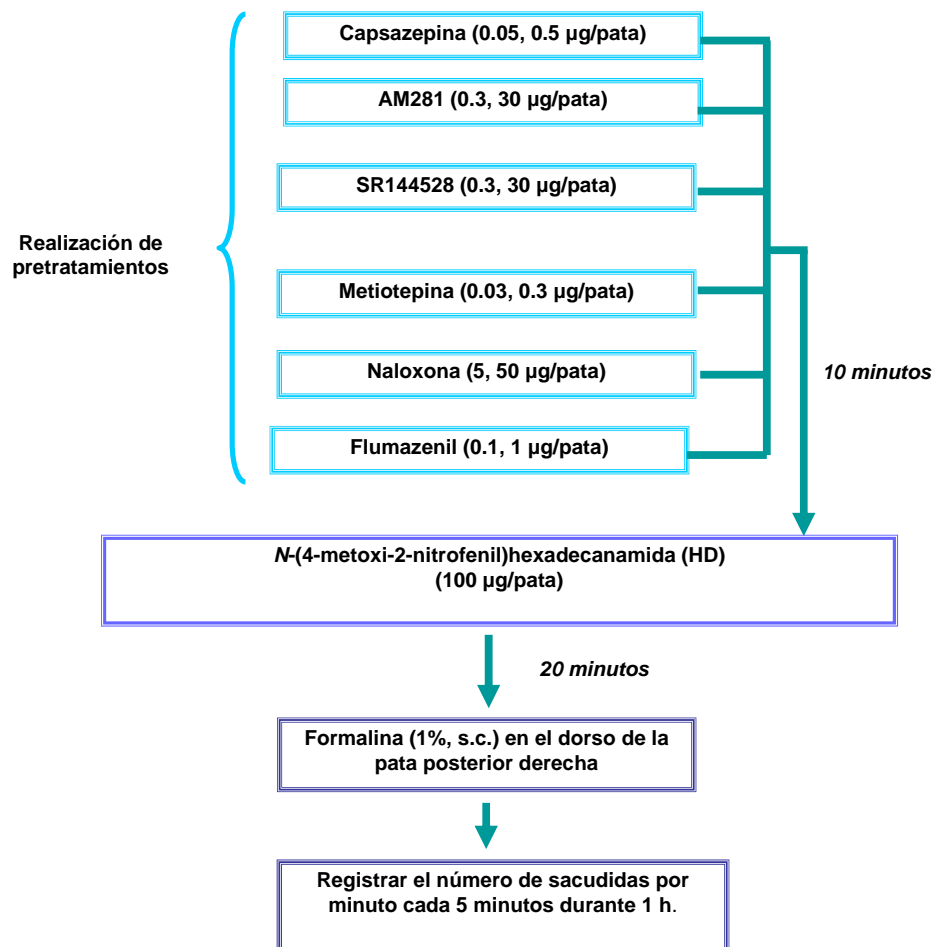


Diagrama 4. Diseño experimental de la evaluación del posible mecanismo de acción farmacológico del efecto antinociceptivo de **HD** en la prueba de la formalina.

1. 3. 4 Resultados

La prueba de la formalina en rata es una de las pruebas más utilizadas para conocer el efecto antinociceptivo que produce un compuesto. Esta prueba es de fácil uso y bajo costo y es un modelo experimental que semeja el dolor de tipo inflamatorio.

En la figura 14 se observa el curso temporal característico que se presenta al administrar formaldehído al 1% (formalina), además se puede notar como al administrar **HD**, el número de sacudidas disminuye a lo largo del curso temporal, esto es indicativo del efecto antinociceptivo que produce éste compuesto a nivel local.

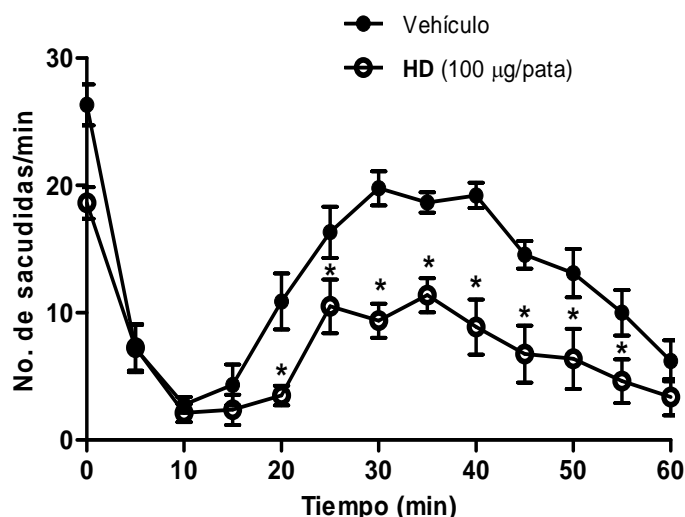


Figura 14. Efecto antinociceptivo que produce **HD** en las ratas en la prueba de la formalina. Las ratas fueron tratadas con el vehículo (DMSO al 20%) o el compuesto **HD** (100 µg/pata) 20 minutos antes de la administración de la formalina. El curso temporal representa el número de sacudidas por minuto a lo largo de 60 minutos. Cada valor representa el promedio de al menos 6 animales \pm E.E.M. * Estadísticamente diferente con respecto al vehículo, $p \leq 0.05$ determinado por una t student.

Para observar el efecto antinociceptivo de **HD**, los datos se expresan en relación al área bajo la curva (ABC) del curso temporal. Se presentan el ABC total, es decir, la respuesta que presentó durante los 60 minutos, ABC de la fase 1 (la respuesta que presentó de 0-10 minutos) y ABC de la fase 2 (la respuesta que presentó de 10-60 minutos). En el caso de la curva dosis respuesta, además de evaluar el efecto que produce **HD** en el lugar de la

aplicación de la formalina (ipsilateral), se realizó la administración contralateral (en la pata contraria a la aplicación de formalina), ésto con el propósito de analizar si el efecto antinociceptivo es solo local o si estan involucrados otros agentes a nivel sistémico. Se realizaron cálculos para conocer la DE_{50} del efecto antinociceptivo a nivel local; sin embargo, el efecto de la dosis máxima es apenas del 45%, por tal motivo se calculó la DE_{30} (21.5 $\mu\text{g/pata}$).

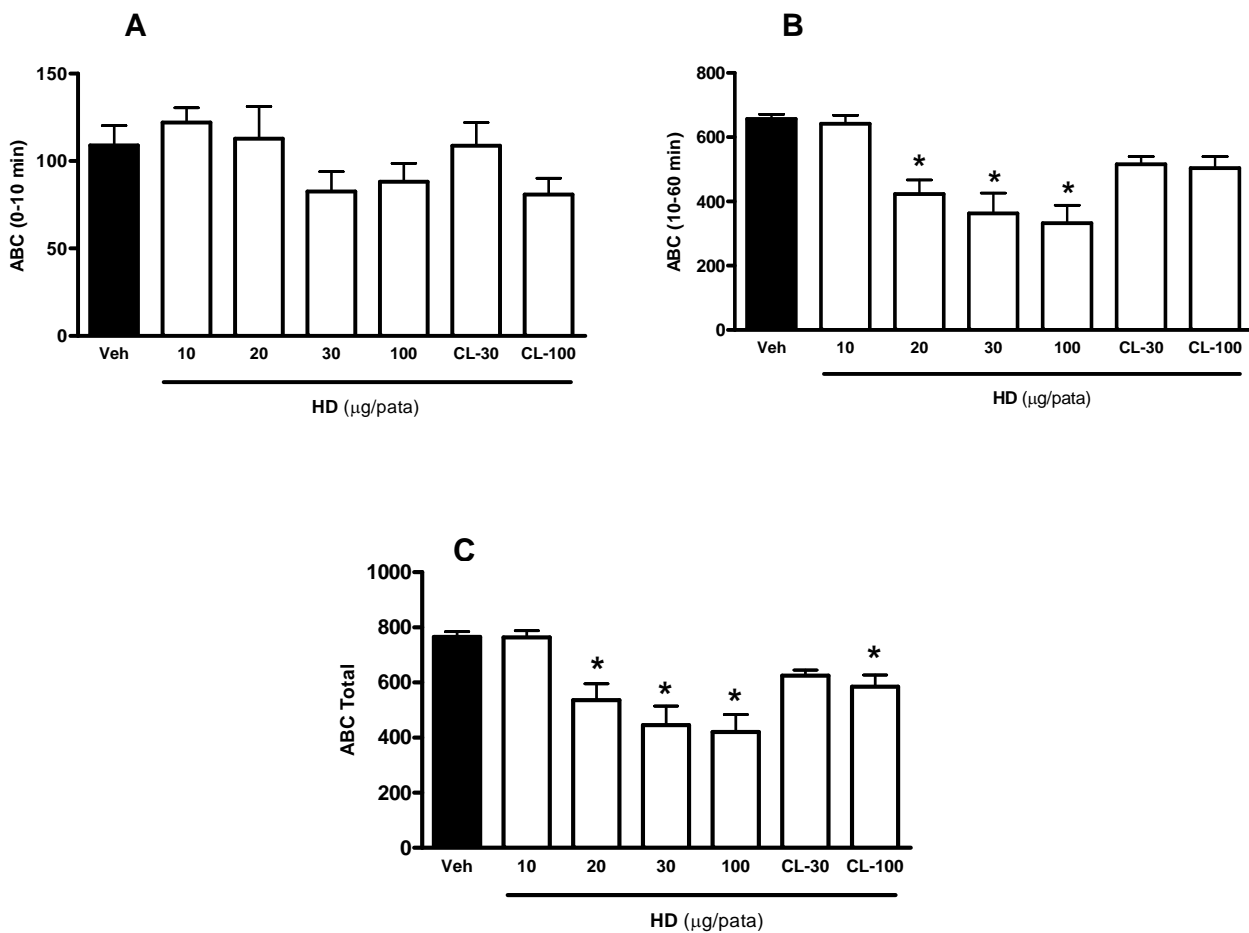


Figura 15. Efecto antinociceptivo que se presenta al administrar diferentes concentraciones de **HD** (CL, pata contralateral). En el panel **A** se observa el área bajo la curva en la primera fase de la formalina. En el panel **B** se observa el área abajo la curva de la segunda fase de la prueba de la formalina. En el panel **C** se observa el área bajo la curva total de la prueba. * Estadísticamente diferente con respecto al vehículo (Veh), $p \leq 0.05$ determinado por una ANADEVa de una vía seguido de una prueba post-hoc de Dunnett.

La figura 16 muestra el efecto que se obtiene con la administración de antagonistas de los receptores a cannabinoides. Los resultados indican un bloqueo del efecto antinociceptivo producido por **HD**, lo que sugiere que los receptores a cannabinoides están involucrados

en el efecto antinociceptivo de **HD**. Para elucidar el mecanismo de acción del efecto antinociceptivo a nivel local de **HD** se utilizó la dosis de 100 µg/pata, debido a que es la dosis donde se encontró el mayor efecto, la cual permitirá observar un efecto mayor o menor cuando se evalúa en presencia de los pretratamientos. Se administraron dos dosis de los antagonistas con la finalidad de observar si el efecto antinociceptivo de **HD** en conjunto con los pretratamientos es dependiente de la dosis.

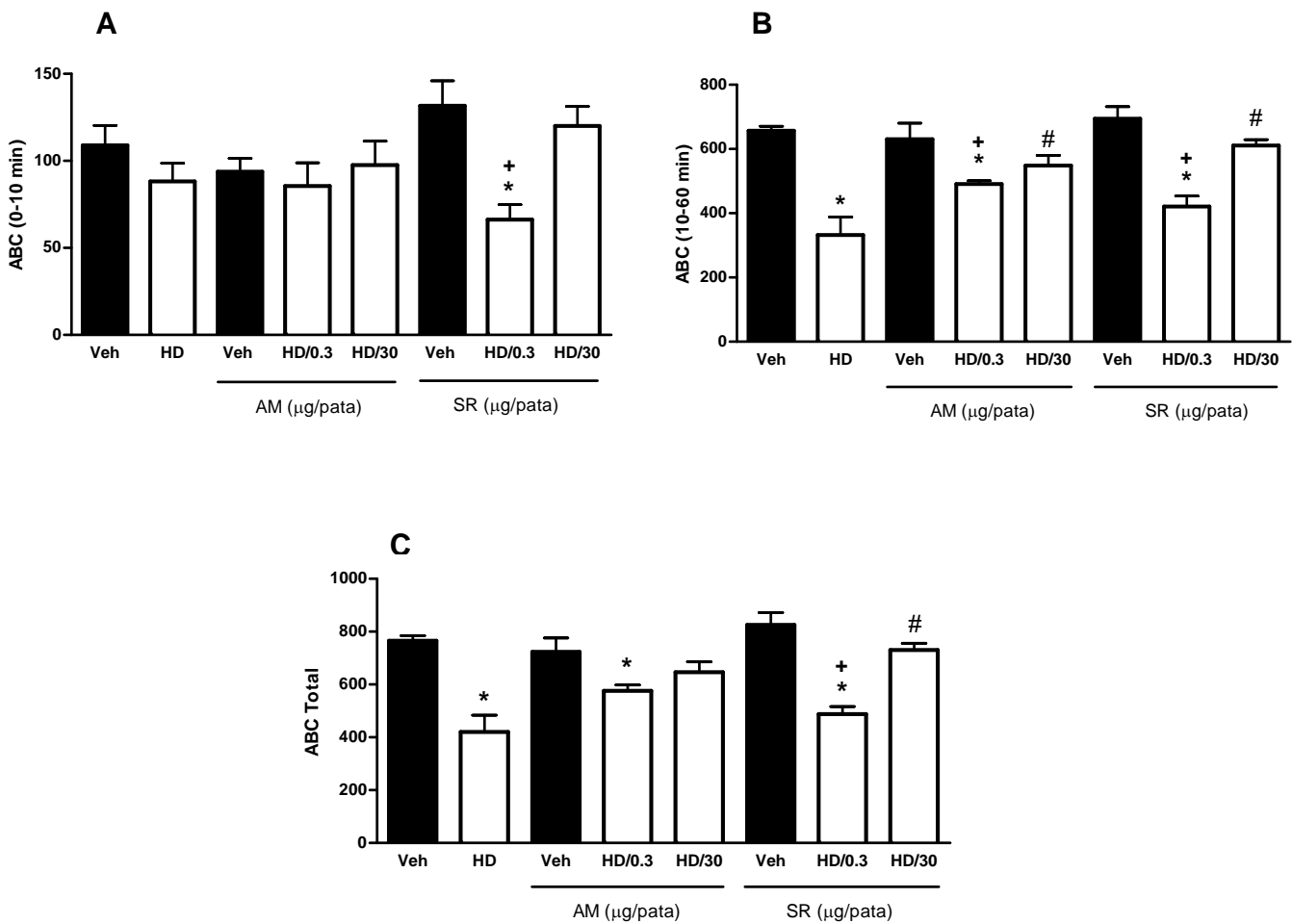


Figura 16. Efecto de la administración de AM281 (AM) (0.3, 30 µg/pata) y SR144528 (SR) (0.3, 30 µg/pata) en el efecto antinociceptivo local de **HD** (100 µg/pata) en la prueba de la formalina en rata. En el panel **A** se muestra el efecto en la fase 1. En el panel **B** se observa el efecto en la fase 2. En el panel **C** se observa el efecto total en la prueba de la formalina. Las barras representan el promedio de 6 animales \pm EEM. * Estadísticamente diferente con respecto al vehículo (Veh), $p \leq 0.05$, # estadísticamente diferentes con respecto a **HD** y + estadísticamente diferente con respecto al vehículo del antagonista evaluado en cada pretratamiento, en los tres casos se utilizó una ANADEVIA de una vía seguido de una prueba post-hoc de Tukey.

En la figura 17 se muestra el efecto que se obtiene con la administración de un antagonista de receptores serotoninérgicos, así como de un antagonista de receptores opioides. Se observa que el efecto de **HD** es antagonizado, sugiriendo que tanto la vía de serotonina como la vía opioide están involucrados en la acción antinociceptiva de **HD**.

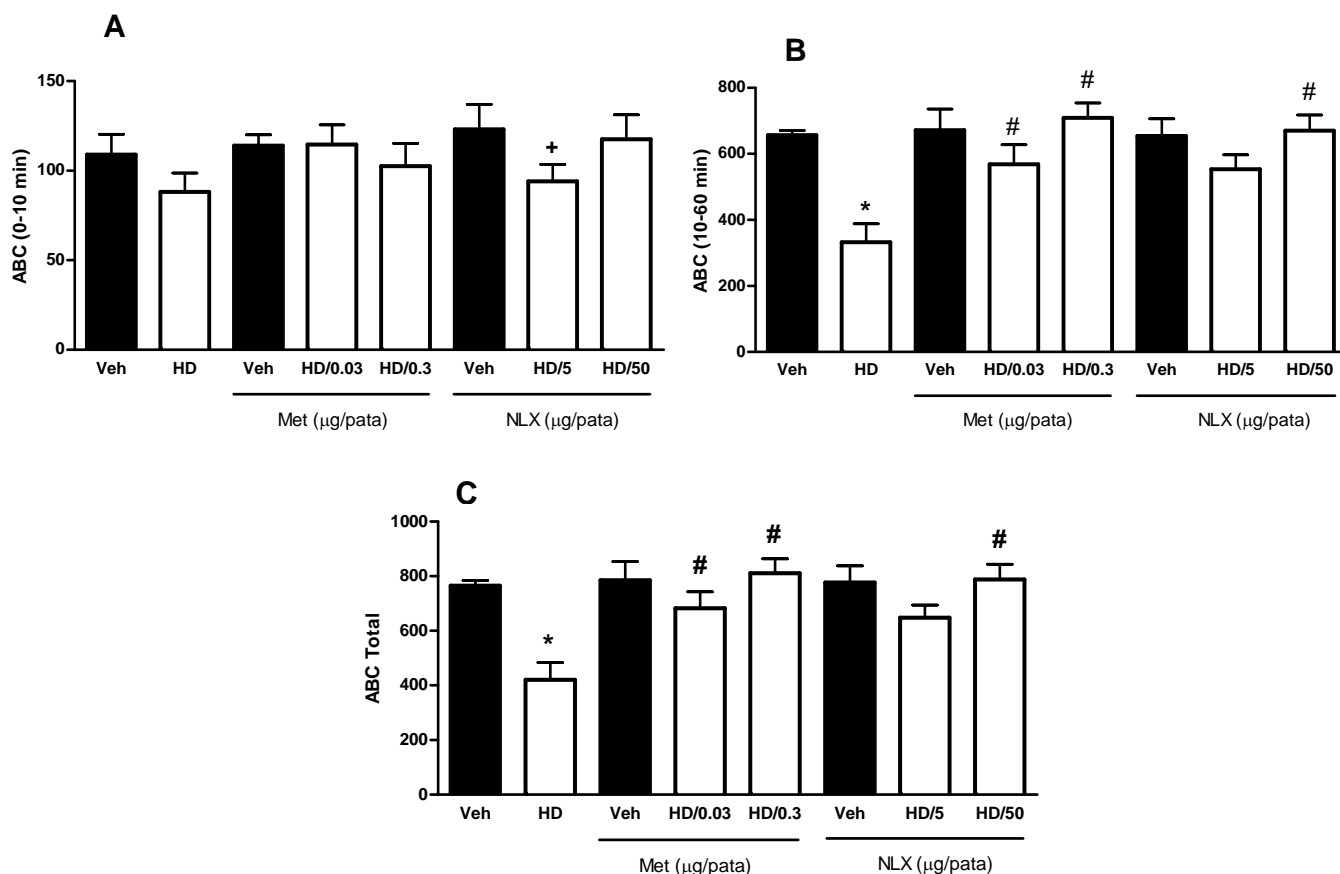


Figura 17. Efecto de la administración de Metiotepina (Met) (0.03, 0.3 µg/pata) y Naloxona (NLX) (5, 50 µg/pata) en el efecto antinociceptivo local de **HD** (100 µg/pata) en la prueba de la formalina en rata. En el panel **A** se muestra el efecto en la fase 1. En el panel **B** se observa el efecto en la fase 2. En el panel **C** se observa el efecto total en la prueba de la formalina. Las barras representan el promedio de 6 animales \pm EEM. * Estadísticamente diferente con respecto al vehículo (Veh), $p \leq 0.05$, # estadísticamente diferente con respecto a **HD** y + estadísticamente diferente con respecto al vehículo del antagonista evaluado en cada pretratamiento, en los tres casos se utilizó una ANADEVIA de una vía seguido de una prueba post-hoc de Tukey.

La figura 18 muestra que la administración de un antagonista TRPV1 (capzacepina) previamente a la administración de **HD**, modifica el efecto antinociceptivo de **HD**, sobre todo en la fase II de la prueba de la formalina. Por otra parte, la administración previa de un antagonista GABA_A (flumazenil) a **HD**, no modifica el efecto antinociceptivo de éste.

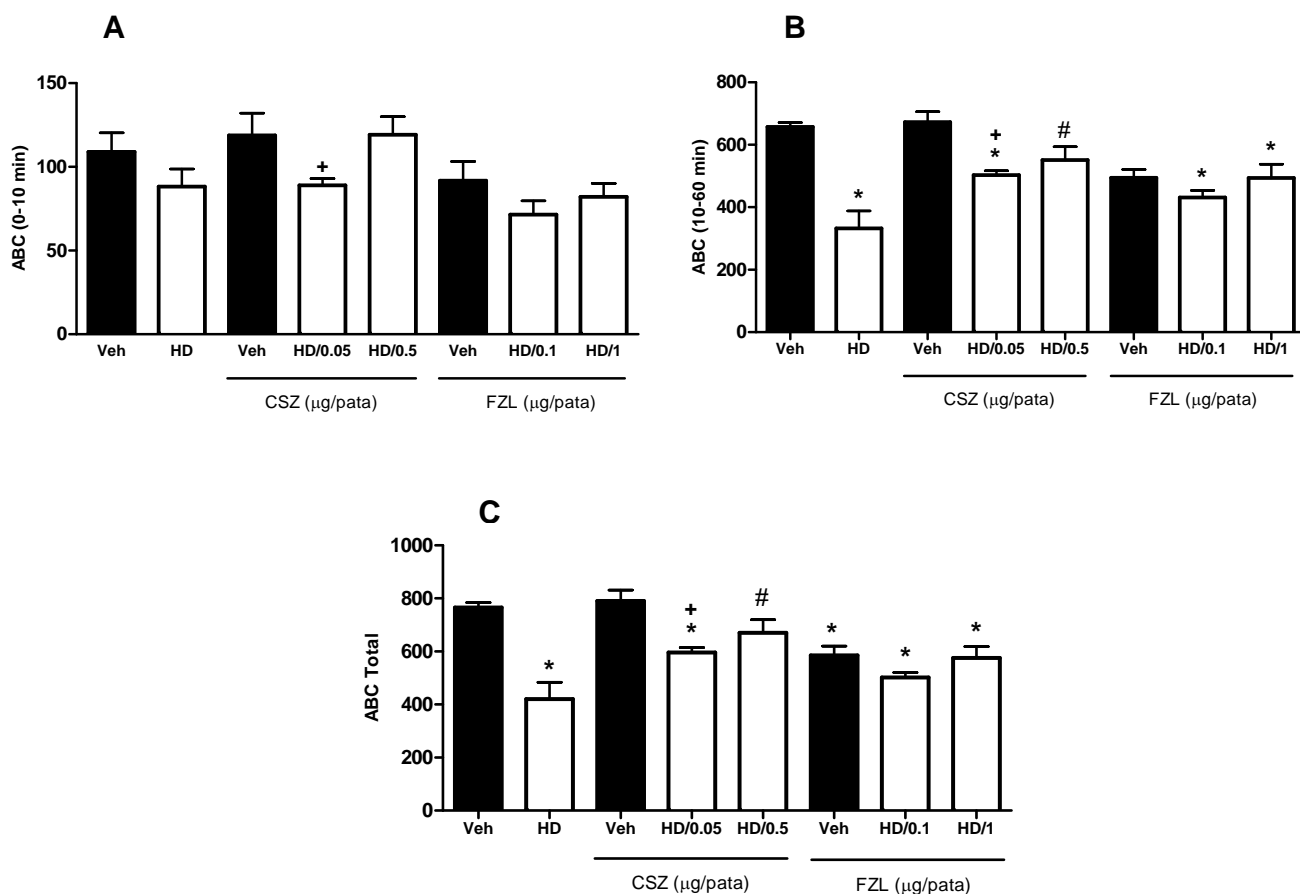


Figura 18. Efecto de la administración de Capsazepina (CSZ) (0.05, 0.5 µg/pata) y Flumazenil (FZL) (0.1, 1 µg/pata) en el efecto antinociceptivo local de **HD** (100 µg/pata) en la prueba de la formalina en rata. En el panel **A** se muestra el efecto en la fase 1. En el panel **B** se observa el efecto en la fase 2. En el panel **C** se observa el efecto total en la prueba de la formalina. Las barras representan el promedio de 6 animales \pm EEM. * Estadísticamente diferente con respecto al vehículo (Veh), $p \leq 0.05$, # estadísticamente diferente con respecto a **HD** y + estadísticamente diferente con respecto al vehículo del antagonista evaluado en cada pretratamiento, en los tres casos se utilizó una ANADEVIA de una vía seguido de una prueba post-hoc de Tukey.

1. 4 Discusión

N-(4-metoxi-2-nitrofenil)hexadecanamida (**HD**) es un análogo del endocannabinoide PEA, debido a esto se pensó que posiblemente **HD** posee propiedades terapéuticas similares a éste, tal como la analgesia.

Estudios previos muestran que **HD** tiene propiedades antinociceptivas en la prueba de estiramiento abdominal y la placa caliente en ratón (Déciga-Campos et al., 2007). En el presente trabajo se comprobó el efecto antinociceptivo de **HD** en la prueba de estiramiento abdominal y adicionalmente, se observó el efecto antinociceptivo que produce este compuesto a nivel local. En ambos casos (sistémico y local) se exploró el posible mecanismo de acción por el cual **HD** genera un efecto antinociceptivo.

Los sistemas de neurotransmisión que se propusieron investigar en este trabajo para elucidar el mecanismo de acción involucrado en el efecto antinociceptivo sistémico fueron la vía del óxido nítrico, la vía serotoninérgica, la vía GABAérgica y la vía de los opioides. Ello se debió a que se ha documentado que estas vías están relacionadas con el sistema endocannabinoide y con la producción de antinocicepción (Demuth y Molleman, 2006; Jhaveri et al., 2007; Kress y Kuner, 2009; Pillarisetti et al., 2009; Seyrek et al., 2010). A nivel local se exploró la participación de los receptores a cannabinoides CB₁ y CB₂, así como la vía gabaérgica, la opioide, la serotoninérgica y los receptores TRPV1. A continuación se explica como el compuesto **HD** podría estar ejerciendo su efecto antinociceptivo.

HD y el sistema endocannabinoide

Se ha reportado que en situaciones de inflamación se provoca una extravasación de linfocitos y la llegada de macrófagos al sitio del daño. En respuesta a la inflamación, se sintetizan a demanda cannabinoides endógenos, como la PEA, que se unen a receptores CB₂ localizados en la membrana de los mastocitos, impidiendo la liberación de sustancias proinflamatorias y pronociceptivas. Asimismo, estos cannabinoides endógenos pueden actuar sobre receptores CB₂ localizados en los queratinocitos. Esta señal provoca la liberación de β -endorfinas que, a su vez, se unen a los receptores opioide localizados en los nociceptores, impidiendo la transmisión de la señal nerviosa desde la periferia hacia los centros superiores del sistema nervioso central (Goicoechea-García y Martín-Fontelles, 2009; Ibrahim et al., 2005). **HD**, al ser un análogo de PEA, podría activar a los receptores CB₂ en los queratinocitos, provocando una liberación de opioides endógenos que actúan en sus receptores, y originan una respuesta antinociceptiva. Este efecto es atribuido por el hecho de que la administración previa de naloxona (antagonista de los receptores opioide μ , κ , δ) a **HD** revierte el efecto antinociceptivo.

A nivel local se administraron antagonistas específicos de los receptores a cannabinoides, esto con el objetivo de conocer si la activación de estos receptores estaban implicados en el efecto antinociceptivo de **HD**. Los antagonistas provados fueron AM281 (antagonista de CB₁) y SR144528 (antagonista CB₂), se encontró que el efecto de **HD** es inhibido por los dos antagonistas, sugiriendo la participación de los receptores CB₁ y CB₂. Se sabe que la administración periférica de agonistas CB₁ y CB₂ atenúa la nocicepción en una variedad de modelos de dolor agudo y crónico (Guerrero et al., 2008). Básicamente la antinocicepción se debe a la activación de los receptores cannabinoides, sobre todo de CB₁. Aunque los receptores CB₂, relacionados clásicamente con la modulación de la respuesta inmunológica, también se encuentran implicados en la antinocicepción modulando la liberación de factores pro e inflamatorios de células no neuronales localizadas en las proximidades de las neuronas sensoriales (Malan et al., 2001).

En el presente trabajo se determinó que **HD** actúa sobre receptores CB₁ y CB₂. Esta información no coincide con datos previamente reportados para PEA, ya que se ha demostrado que el efecto antinociceptivo de PEA se debe a la activación de receptores CB₂ pero no CB₁ (Calignano, 1998).

Al activarse los receptores CB₁ se activa a las proteínas G, en especial la proteína de tipo Gi, la cual inhibe la adenilato ciclasa reduciendo las concentraciones intracelulares de AMPc, cerrando los canales de Ca²⁺ y abriendo los canales de K⁺. Esto causa en las neuronas sensoriales una hiperpolarización, dando como resultado que se vean disminuídos los potenciales de acción que causan una excitabilidad neuronal y por consiguiente antinocicepción (Demuth Molleman, 2006; Turu y Hunyady, 2010). Se ha encontrado que una vía de señalización de los receptores cannabinoide es la activación de la proteína cinasa activada por mitógeno (MAPK). Esta vía de señalización es la que juega un papel importante en la regulación de la diferenciación y el crecimiento celular, al igual regula la transcripción de factores nucleares (Kress y Kuner, 2009). Se ha visto que los cannabinoides inhiben las corrientes postsinápticas excitadoras glutamatérgicas, probablemente vía los receptores CB₁, puesto que su activación resulta en la reducción de la liberación de glutamato y en consecuencia la modulación de la transmisión excitadora espinal, de esta manera se produce un efecto de antinocicepción (Kress y Kuner, 2009).

HD y receptores TRPV1

Los receptores de potencial transitorio (TRP's, por sus siglas en inglés) son canales iónicos que generan un flujo de cationes. La evidencia experimental indica que los cannabinoides interactúan directamente con al menos cinco distintos tipos de estos receptores, de entre los cuales el receptor TRPV1 es el mejor caracterizado y estudiado. TRPV1 es activado por estímulos nocivos que inducen el calor, los iones H⁺ y la capsaicina. El receptor puede encontrarse en neuronas sensoriales, donde la apertura del canal causa un flujo de Ca²⁺ y la liberación de neurotransmisores (De Petrocellis y Di Marzo, 2009). Se ha reportado que AEA se une al sitio de unión de capsaicina en el canal TRPV1 (De Petrocellis et al., 2001(b)). En este trabajo se estudió el papel que tienen los receptores TRPV1 en el efecto antinociceptivo de **HD**, con lo que se encontró que TRPV1 es un participante en la actividad de **HD**, puesto que al administrar capsazepina (antagonista de los receptores TRPV1), el efecto antinociceptivo se revierte. **HD** inhibe a FAAH, con lo cual aumenta las concentraciones de AEA; se ha documentado que a concentraciones altas de AEA el receptor TRPV1 puede mostrar una desensibilización y posterior efecto antinociceptivo (Costa et al., 2008). Otra teoría es que **HD** actúa directamente en el receptor TRPV1 provocando un bloqueo del flujo de Ca²⁺ o Na⁺ ó incluso **HD** podría desensibilizar al receptor.

HD y sistema serotoninérgico

Con la finalidad de conocer la posible participación del sistema serotoninérgico como parte del mecanismo de acción del efecto antinociceptivo de **HD** se utilizó PCPA, éste es un compuesto que inhibe a la enzima limitante de la biosíntesis de serotonina. Cuando se administró sistémicamente PCPA previamente a la administración sistémica de **HD** se observó una pérdida del efecto antinociceptivo del compuesto, lo cual es indicativo de que la serotonina esta participando en la producción de la antinocicepción de **HD**.

Para conocer la participación de la vía serotoninérgica a nivel local, se administró metiotepina (antagonista no selectivo de receptores 5-HT₁, 5-HT₆, 5-HT₇) previamente a la administración de **HD**, lo cual ocasionó que el efecto antinociceptivo de **HD** se revirtiera. Existen evidencias científicas que demuestran que la administración sistémica de cannabinoides genera antinocicepción a través de la activación de receptores CB₁, los

cuales se cree podrían activar la vía descendente serotoninérgica, particularmente a nivel espinal sobre receptores 5-HT_{2A} y 5-HT₇ (Seyrek et al., 2010). Estos datos coinciden con el hecho de que anandamida puede interactuar *in vitro* parcialmente con receptores serotoninérgicos, específicamente 5-HT₃ y 5-HT₂ (Kimura et al, 1998).

HD y sistema GABAérgico

Con la finalidad de determinar la posible interacción de **HD** con el receptor GABA se administró a nivel sistémico (prueba de estiramiento abdominal en ratón) y a nivel local (prueba de formalina en rata) el antagonista de receptores GABA_A, (bicuculina y flumazenil respectivamente). La administración de bicuculina y flumazenil presentaron efecto antinociceptivo *per se*, sin embargo, la administración previa de estos compuestos a **HD** ocasiona que el efecto antinociceptivo de **HD** no se modifique con respecto al efecto antinociceptivo que presentaron los controles de bicuculina y flumazenil. Por lo que no existe una interacción con el receptor GABA_A. Sin embargo, se ha reportado que GABA es un neurotransmisor de tipo inhibitorio, el cual juega un papel importante en la modulación del efecto nociceptivo y antinociceptivo (Enna y Mc Carson, 2006). Se ha propuesto que la vía GABAérgica interactúa con el sistema endocannabinoide y que también está relacionado con ambos el sistema serotoninérgico, se ha documentado que existe una co-expresión de receptores 5-HT₃ y CB₁ en sitios ricos de GABA como es el hipocampo y en el giro dentado (Morales y Bäckman, 2002). Esto hallazgos sugieren una posible interacción entre los sistemas endocannabinoide, serotoninérgico y gabaérgico, así mismo se conoce que la activación del receptor 5-HT₃ puede causar la liberación de GABA (Morales y Bäckman, 2002). Existen hallazgos contradictorios con respecto a la activación de receptores CB₁ localizados a nivel presináptico en terminaciones gabaérgicas; por una parte, se ha documentado que los endocannabinoides inhiben los canales de Ca²⁺ de tipo N ocasionando una reducción de la liberación de GABA (Demuth y Molleman, 2006) y, por otra parte, las terminales de las neuronas estriato-eferentes que contienen GABA presentan receptores CB₁ de manera presináptica y cuando los cannabinoides activan esta zona vía los receptores CB₁ se produce una inhibición de la recaptura de GABA, aumentando el tono GABAérgico (Maneuf et al., 1996; Romero et al., 1998(a)).

HD y la vía del óxido nítrico.

Se ha documentado que el sistema endocannabinoide está relacionado con la actividad del óxido nítrico para generar antinocicepción. AEA incrementa significativamente la actividad de la sintasa de óxido nítrico (enzima limitante en la producción de óxido nítrico), lo que se da como consecuencia la liberación de óxido nítrico (Mombouli et al., 1999; Howlett et al., 2002), y su subsecuente acción antinociceptiva por la activación de la guanilato ciclasa y la apertura de los canales de K⁺ debido al GMPc, ocasionando una hiperpolarización (Duarte et al., 1992; Franco-Bourland y Guízar-Sahagún, 1995). Se ha demostrado que PEA al igual que oleoiletanolamida (OEA) potencian los efectos de AEA, mediante un efecto conocido en inglés como “entourage effect” (Ho et al., 2008), el cual se refiere a que AEA puede aumentar su actividad a los receptores canabinoide y/o a la competencia que tienen los tres endocannabinoides por la unión a la enzima FAAH para llevar a cabo su posterior degradación. PEA y OEA al unirse a FAAH impiden la degradación de AEA ocasionando una alta en su concentración y provocando que ejerza efectos biológicos propios del endocannabinoide (Mechoulam et al., 1998; Lambert y Di Marzo, 1999). Así, **HD** al ser un inhibidor de FAAH, podría limitar la degradación de AEA, dando como resultado que las concentraciones de éste aumenten. De esta forma se pensó que la vía del óxido nítrico era una de las causantes del efecto biológico de **HD**. La aplicación de L-NAME (inhibidor de la sintasa de óxido nítrico), ODQ (inhibidor de la guanilato cilasa) y glibenclamida (bloqueador de canales de K⁺ sensibles a ATP) no revierte el efecto antinociceptivo de **HD**, indicando la nula intervención de la vía del óxido nítrico en la producción de antinocicepción. Estos datos encontrados son controversiales, puesto que se ha informado que AEA es capaz de inducir la producción de óxido nítrico (Demuth y Molleman, 2006). Probablemente **HD** no es capaz de elevar las concentraciones de AEA hasta un rango donde sea posible de activar a la sintasa de óxido nítrico.

Los datos obtenidos permiten establecer que el efecto antinociceptivo de **HD** se debe a la participación de varios mediadores que incluso podrían estar interactuando entre ellos.

1. 5 Conclusión

En este trabajo se logro demostrar que *N*-(4-metoxi-2-nitrofenil)hexadecanamida produce un efecto antinociceptivo, tanto a nivel sistémico en la prueba de estiramiento abdominal en ratón, como a nivel local en la prueba de la formalina en rata. Se encontró que a nivel sistémico el efecto es mediado por la vía serotoninérgica y la opioide. En el caso del efecto antinociceptivo a nivel local se encontró que está involucrada la participación de los receptores cannabinoide, así como la vía serotoninérgica, opioide y los receptores TRPV1.

CAPÍTULO 2

EVALUACIÓN DEL EFECTO TOXICOLÓGICO DE N-(4-METOXI-2-NITROFENIL)HEXADECANAMIDA

2. 1 Antecedentes

2. 1. 1 Fundamentos de los estudios toxicológicos

La toxicología estudia las interacciones dañinas entre sustancias químicas y sistemas biológicos. El estudio de los efectos bioquímicos, fisiológicos y patológicos de agentes químicos o físicos constituyen el campo de los toxicólogos (Timbrell, 1989).

Los estudios de toxicidad constituyen hoy en día una parte muy importante dentro de la evaluación biológica de un nuevo fármaco. El objetivo de los estudios de toxicidad es “evaluar el riesgo o peligro potencial que un agente químico o físico puede ocasionar sobre la salud humana cuando es objeto de exposiciones agudas o crónicas”.

El organismo humano es un complejo sistema biológico que está organizado en diversos niveles, desde el molecular-celular hasta el de los tejidos y órganos. Cuando una molécula tóxica penetra un sistema biológico, perturba de manera reversible o irreversible los procesos bioquímicos normales de la célula, o incluso puede producir lesiones y muerte celular.

El proceso de penetración de un xenobiótico hasta su llegada a los lugares donde va a producir un efecto tóxico puede dividirse en tres fases:

1. La fase de exposición que comprende el riesgo, la frecuencia y dosis de exposición del xenobiótico.
2. La fase toxicocinética que comprende la absorción de los tóxicos en el organismo, procesos de transporte de fluidos, distribución y acumulación en tejidos y órganos, biotransformación y eliminación de los tóxicos y/o metabolitos.
3. La fase toxicodinámica que se refiere a la interacción de los tóxicos con lugares de acción específicos en las células (receptores), con un resultado último de un efecto tóxico (Ariens, 1981).

La introducción en el mercado de un gran número de nuevos compuestos ha tenido una doble consecuencia en nuestro entorno. Aunque muchos de estos compuestos han contribuido a mejorar la calidad de vida, otros están relacionados con determinados riesgos por su toxicidad; así por ejemplo, la talidomida fue introducida por primera vez en 1957, como un medicamento sedante e inductor del sueño, el cual fue prescrito a mujeres embarazadas; sin embargo, al nacer los hijos de estas mujeres presentaban problemas congénitos, como ceguera, malformación de extremidades e incluso nacían muertos (Moghe et al., 2008).

La legislación actual exige que, previamente al registro y comercialización, se evalúe la seguridad de fármacos, aditivos alimentarios, excipientes, cosméticos, entre otros; por lo que resulta imprescindible utilizar ensayos de toxicidad predictivos, con el fin de anular o minimizar el uso de compuestos en los que la relación riesgo/beneficio los declare indeseables para la sociedad (Mortelmans y Rupa, 2004). La realización de los estudios preclínicos de seguridad durante la fase de desarrollo de un compuesto terapéutico, actualmente, su realización viene regulada por las denominadas directrices ICH (International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use; Conferencia Internacional de Armonización de Requerimientos Técnicos para el Registro de Productos Farmacéuticos para Uso Humano). La elaboración de estas directrices ha supuesto la armonización de los requerimientos para el registro de nuevos productos farmacéuticos establecidos por las autoridades reguladoras de Europa (EMA; European Medicine Agency), Estados Unidos (FDA; Food and Drug Administration) y Japón (MHW; Ministry of Health and Welfare). Destaca la directriz M3, en la que se establecen las diferentes áreas experimentales mediante las que se ha de valorar el potencial tóxico de un fármaco, así como el momento de su realización en relación con los ensayos clínicos propuestos y la indicación perseguida (ICH M3 (R1), 2000).

En México, la Ley General de Salud establece las normas oficiales a que deberá sujetarse el proceso y las especificaciones de medicamentos e insumos para la salud; así mismo, indica que la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM) establece las características que debe cumplir un nuevo fármaco para obtener el registro sanitario y pueda ser utilizado como agente terapéutico. En el primer suplemento de la FEUM, en el apartado de medicamentos nuevos, se dan a conocer la información técnica y científica

de los estudios preclínicos, los cuales deben incluir los estudios de toxicidad y seguridad, estos estudios se dividen en: toxicidad a dosis única, toxicidad a dosis múltiples, genotoxicidad y mutagenicidad, carcinogenicidad, toxicidad sobre la reproducción y el desarrollo, tolerancia local y otros estudios complementarios que se lleguen a requerir (FEUM, 2004).

2. 1. 2 Clasificación de los agentes tóxicos

Existen varias formas de clasificar a los agentes tóxicos, según la línea de investigación y las necesidades de los especialistas relacionados con la toxicología (Williams et al., 1985). Los tres criterios frecuentemente utilizados son aquellos que consideran a la dosis letal media (DL_{50}) de las sustancias, al mecanismo de acción y al órgano blanco sobre el cual actúan los xenobióticos (toda sustancia extraña al ser viviente, incluyendo sustancias benignas o dañinas). En el caso de la DL_{50} se utiliza un rango de valores que constituyen los rubros de clasificación, en la tabla 2 se presenta este rango de valores para la clasificación de xenobióticos (Timbrell, 1989; Manahan, 1989; Ariens et al., 1981).

Tabla 3. Clasificación de los xenobióticos según la dosis letal media en humanos.

Término	DL_{50} (humanos)
prácticamente no tóxico	>15 g/kg de peso corporal
ligeramente tóxico	5-15 g/kg de peso corporal
moderadamente tóxico	0.5-5 g/kg de peso corporal
muy tóxico	50-500 mg/kg de peso corporal
extremadamente tóxico	5-50 mg/kg de peso corporal
súper tóxico	<5 mg/kg de peso corporal

La exposición a los xenobióticos puede presentarse en forma aguda, es decir, en un solo episodio, cuando ingresan al organismo cantidades elevadas de algún compuesto extraño al organismo. Puede darse en forma crónica, si existe exposición continua a dosis bajas, que suele ir acompañada de su acumulación en el organismo, produciéndose la respuesta tóxica después de mucho tiempo (Rodríguez, 1994).

2. 1. 3 Pruebas toxicológicas para el estudio de la seguridad de HD

Los estudios de toxicidad son de gran importancia en el desarrollo y evaluación de una nueva molécula que en un futuro podría convertirse en un fármaco. A pesar de la creciente utilización de modelos *in vitro* para investigar los efectos tóxicos de un compuesto se requiere de la utilización de modelos *in vivo*, dado que estos pueden aportar un mayor valor predictivo frente a posibles efectos tóxicos en humanos. Son varias las pruebas toxicológicas que se pueden utilizar; sin embargo, se busca que los estudios a realizar sean fáciles, económicos, reproducibles y con el uso de pocos recursos materiales.

A continuación se presentan tres pruebas toxicológicas que permiten establecer el posible efecto toxicológico que puede exhibir un compuesto a evaluar. Estas pruebas solo dan ciertos datos que son útiles para catalogar al compuesto en tóxico, ligeramente tóxico ó muy tóxico; además las tres pruebas son un preliminar para después realizar más estudios toxicológicos y así poder verificar el potencial nocivo que tiene y decidir si es apto para su posterior comercialización.

2. 1. 3. 1 Prueba toxicológica en *Artemia salina* L.

Estudios publicados con anterioridad, sugieren que un primer rastreo toxicológico pudiera llevarse a cabo con pruebas de toxicidad aguda empleando invertebrados, lo cual es de utilidad como un estudio preliminar en la evaluación de la toxicidad de nuevos compuestos en mamíferos. Por lo tanto, es recomendable considerar el uso de invertebrados como la *Artemia salina* en pruebas preliminares de toxicidad (Kazuko et al., 2005).

Las artemias spp. son crustáceos minúsculos de cuerpo blando, de color carmelita y transparente a la luz; pertenecen al phylum *Arthropoda*, clase *Crustaceae*, subclase *Branchiopoda*. Se conoce con el nombre común de Artemia o Brine shrimp en inglés. El género *Artemia* está compuesto por varias especies, entre ellas una de las más utilizadas para bioensayos toxicológicos es la *Artemia salina* Leach (Pino y Jorge, 2010).

La *Artemia salina* L. es ampliamente utilizada debido a que es un organismo de obtención y manutención de bajo costo; los bioensayos (prueba que involucra organismos vivos y mide la respuesta biológica que produce una sustancia o material), principalmente los toxicológicos, en esta especie son a corto plazo debido a su rápido crecimiento; además es fácil la obtención de poblaciones homogénea en diferentes estadios del desarrollo (Barahona y Sánchez-Fortún, 1999).

La prueba toxicológica en *Artemia salina* L., es un bioensayo que se basa en observar el efecto de letalidad que tiene un cierto agente químico en el organismo vivo al tener contacto con él en su medio (agua salina).

2. 1. 3. 2 Prueba de toxicidad aguda en ratón

El objetivo de evaluar la toxicidad aguda es definir el daño intrínseco de los agentes químicos, predecir el peligro a una especie específica, identificar los órganos blancos, proveer información acerca del riesgo de exponerse de manera aguda al compuesto, proveer información para el diseño y selección de las dosis. Los estudios de la toxicidad aguda son considerados como el primer paso en la obtención de datos para estudios toxicológicos a largo plazo. Uno de los parámetros que comúnmente se obtiene en las pruebas de toxicidad aguda es la dosis letal media (DL_{50}) definida como la dosis a la cual el 50% de la población presenta muerte (Zbinden y Flury-Roversi, 1981).

Las pruebas para la determinación de la DL_{50} se desarrollaron en 1927 para la estandarización biológica de fármacos peligrosos. Entonces estas pruebas se incorporaron al protocolo de rutinas toxicológicas de compuestos químicos, ahora forman parte de prácticamente todas las directrices gubernamentales que regulan las pruebas toxicológicas de los productos químicos. Por razones científicas, económicas y éticas es necesario volver a evaluar periódicamente todos los procedimientos toxicológicos (CCOHS, 2005). Hay que tener en cuenta que el valor de la DL_{50} se ve influida por muchos factores, tales como la especie del animal, el estrés, la edad, el género, la dieta, la temperatura, los procedimientos experimentales, entre otros; por lo tanto, el valor de DL_{50} no puede considerarse como una constante biológica (Timbrell, 1989).

Uno de los métodos que se utilizan para evaluar la toxicidad aguda en ratones es el denominado “método de Lorke”. Este método se basa en la administración de un intervalo de dosis diferentes del agente químico a 3 animales de experimentación, estas dosis son 10, 100 y 1000 mg/kg, esta fase de la prueba se considera como un preliminar, ya que los resultados que se obtengan indican si una agente químico es muy tóxico, tóxico o ligeramente tóxico. Este resultado se utiliza como base para la selección de dosis subsecuentes a evaluar. En una segunda fase las dosis subsecuentes a evaluar se sugieren en una tabla de Lorke, donde la DL₅₀ de 1 mg/kg resulta ser muy tóxica, y si los valores de DL₅₀ son superiores a 5000 mg/kg, el compuesto no se considera tóxico; una cifra aproximada para la DL₅₀ es suficiente para estimar el riesgo de una toxicidad aguda. Con base en estas consideraciones y experiencias prácticas el intervalo de las dosis evaluadas se eligió de acuerdo a la Tabla 3 (Lorke, 1983).

Tabla 4. Dosis evaluadas en la fase 1 y 2 de la determinación de la toxicidad aguda (Lorke, 1983).

Dosis (mg/kg)						
Resultados de la fase 1			Dosis elegidas para la segunda fase de evaluación			
10	100	1000				
0/3*	0/3	0/3		1600	2900	5000
0/3	0/3	1/3	600	1000	1600	2900
0/3	0/3	2/3	200	400	800	1600
0/3	0/3	3/3	140	225	370	600
0/3	1/3	3/3	50	100	200	400
0/3	2/3	3/3	20	40	80	160
0/3	3/3	3/3	15	25	40	60
1/3	3/3	3/3	5	10	20	40
2/3	3/3	3/3	2	4	8	16
3/3	3/3	3/3	1	2	4	8

* Número de animales muertos / Número de animales usados.

2. 1. 3. 3 Ensayo de los micronúcleos en médula ósea de ratón

La genética toxicológica tiene sus inicios en el año 1927, cuando Mueller demuestra la capacidad de los rayos X para inducir mutaciones en *Drosophila melanogaster*. Años más tarde en 1949, Auebach descubre las propiedades mutagénicas del gas mostaza, descubrimiento que permitió incrementar el concepto de mutagénesis (Arencibia y Rosario, 2003).

Es importante señalar la diferencia entre dos términos que con frecuencia suelen utilizarse como sinónimos: mutagenicidad y genotoxicidad. La mutagenicidad es la capacidad de un xenobiótico para causar alteraciones en el material genético que lleguen a ser transmisible a la progenie celular. La genotoxicidad implica un término más amplio, ya que incluye alteraciones al material genético, tales como intercambio de cromátidas hermanas o rupturas de hebras de ADN, que no necesariamente son transmitidas a la descendencia (Klaassen, 2001).

Muchos agentes químicos han mostrado ser genotóxicos; por supuesto, en algunos casos el empleo de agentes terapéuticos establece el dilema riesgo-beneficio. El problema se presenta cuando un agente ha mostrado ser mutagénico, pero su empleo en la medicina es importante para curar o mejorar la salud. Por ejemplo, el metronidazol, que se emplea para combatir la amibiasis, es mutagénico en casi todos los organismos de prueba. A pesar de ello, en países como el nuestro, en los que las diarreas son una de las cinco causas más importantes de muerte en los infantes, el agente terapéutico se emplea por periodos cortos de tiempo, con el propósito de restablecer la salud (Rodríguez, 1994).

El ensayo de micronúcleos *in vivo* es un método creado para la detección de productos químicos con acción genotóxica (efecto de ruptura de cromosomas). El método se basa en el principio de que los fragmentos cromosómicos o cromosomas enteros, quedan retrasados en la anafase del ciclo celular. Estos cromosomas o fragmentos que permanecen en las células hijas se transforman en uno o varios núcleos secundarios, que están, por regla general, mucho más pequeños que el núcleo principal y por ello son llamados micronúcleos (Schmid, 1975). La capacidad del compuesto en estudio de inducir la formación de micronúcleos en los eritroblastos (células precursoras de los eritrocitos) de la médula ósea, es de utilidad, puesto que son células en constante proliferación y, por tanto, ideal para valorar la inducción de daño genotóxico.

2. 1. 4 *N*-(4-metoxi-2-nitrofenil)hexadecanamida y su potencial terapéutico

Debido al potencial terapéutico que presenta la molécula, es de importancia saber si este nuevo compuesto puede causar algún efecto nocivo en humanos. Es por esta razón que se decidió realizar tres pruebas toxicológicas que nos dan un marco general del

comportamiento de la exposición de **HD** de manera aguda y en dosis supraterapéuticas en animales de experimentación.

2. 2 Hipótesis

N-(4-metoxi-2-nitrofenil)hexadecanamida no es un compuesto tóxico en *Artemia salina* y en ratón.

2. 3 Objetivos

1. Obtener la CL₅₀ de **HD** a partir del bioensayo de toxicidad en *Artemia salina* L.
2. Determinar la DL₅₀ de **HD** a partir de la prueba de toxicidad aguda en ratón, utilizando el método de Lorke.
3. Evaluar el efecto genotóxico de dosis supraterapéuticas de **HD** en la prueba de micronúcleos en médula ósea de ratón.

2. 4 Metodología

1) Material biológico

- *Artemia salina* Leach adulta, la cual se cultivó y proporcionó por el M.V.Z. Alfredo Hidalgo.
- Se utilizaron ratones macho ICR (25-30 g, INER). Éstos se mantuvieron en condiciones de temperatura constante (22 ± 1° C) y en ciclos de luz/oscuridad de 12 h. El alimento y el agua fueron de libre acceso. Los experimentos se realizaron de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana sobre el cuidado y manejo de animales (NOM-062-ZOO-1999).

2) Fármacos

El dimetilsulfóxido (DMSO), la carboximetilcelulosa (CMC) y la ciclofosfamida se adquirieron de Sigma-Aldrich, el colorante de Giemsa (modificación de Wolbach) se obtuvo de Hycel S. A. de C. V.

3) Métodos

a) Prueba toxicológica en *Artemia salina* L.

Las *Artemias* (10 por vial) se transfirieron a un vial que contiene **HD** y una solución salina en un volumen total de 5 mL. **HD** se evaluó en concentraciones de 100, 300, 1000 y 3000 $\mu\text{g/mL}$. Se realizaron 9 replicas por cada concentración. Después de 24 h el número de *Artemias* que sobrevivieron se contó, se obtuvo el porcentaje de muertes con el cual se calculó la CL_{50} mediante el análisis Probit (Matusiewicz, 2005). En el diagrama 5 se presenta el diseño experimental de la prueba.

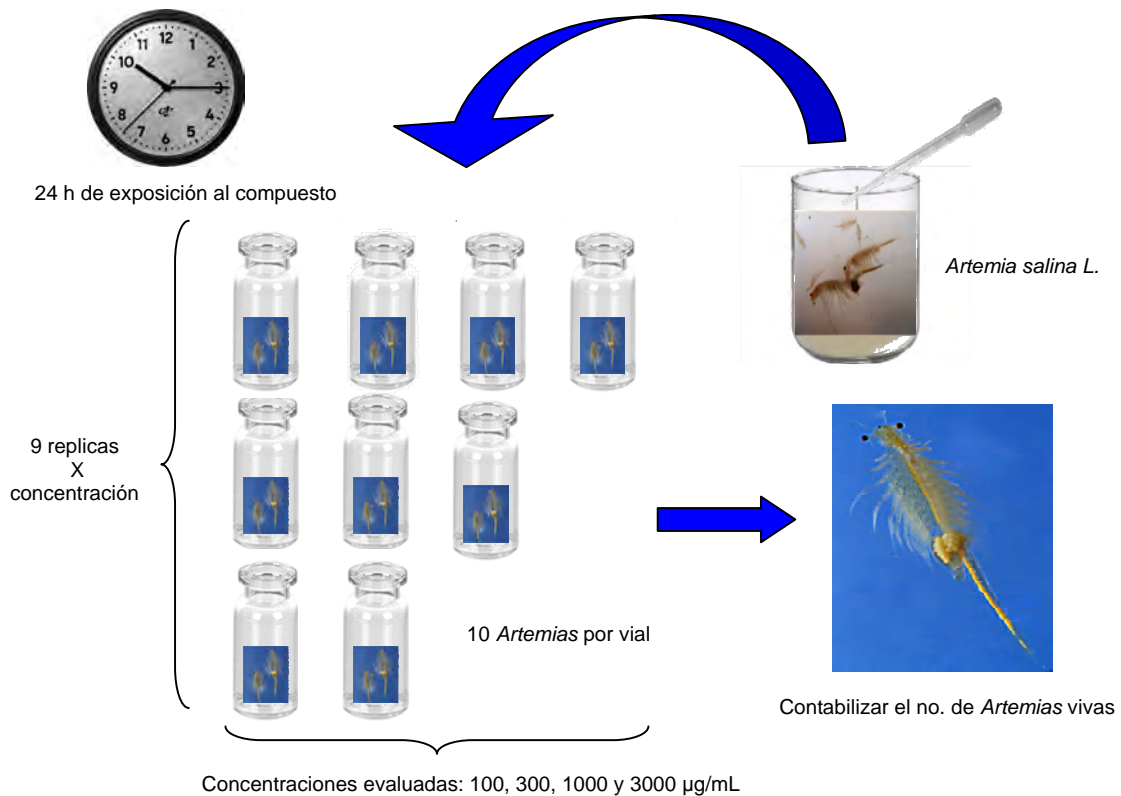


Diagrama 5. Diseño experimental de la prueba toxicológica en *Artemia salina* L. La prueba permite a través del método de Probit calcular la CL_{50} .

b) Toxicidad aguda en ratón

Se hicieron grupos de 3 ratones cada uno, estos se trataron con **HD** en dos fases; en la primera se administraron vía intraperitoneal las dosis de 10, 100 y 1000 mg/kg. En la segunda fase, las dosis administradas se eligieron de acuerdo a la tabla 2. En ambas fases los ratones se observaron diariamente por un período de 14 días, se cuantificaron los animales muertos por grupo a lo largo del período de experimentación. Además los tejidos de los ratones se diseccionaron y se evaluaron macroscópicamente para comparar la morfología de la mayoría de los órganos con respecto a la morfología de un ratón administrado con el vehículo. En el diagrama 6 se observa el diseño experimental utilizado para el método de Lorke.

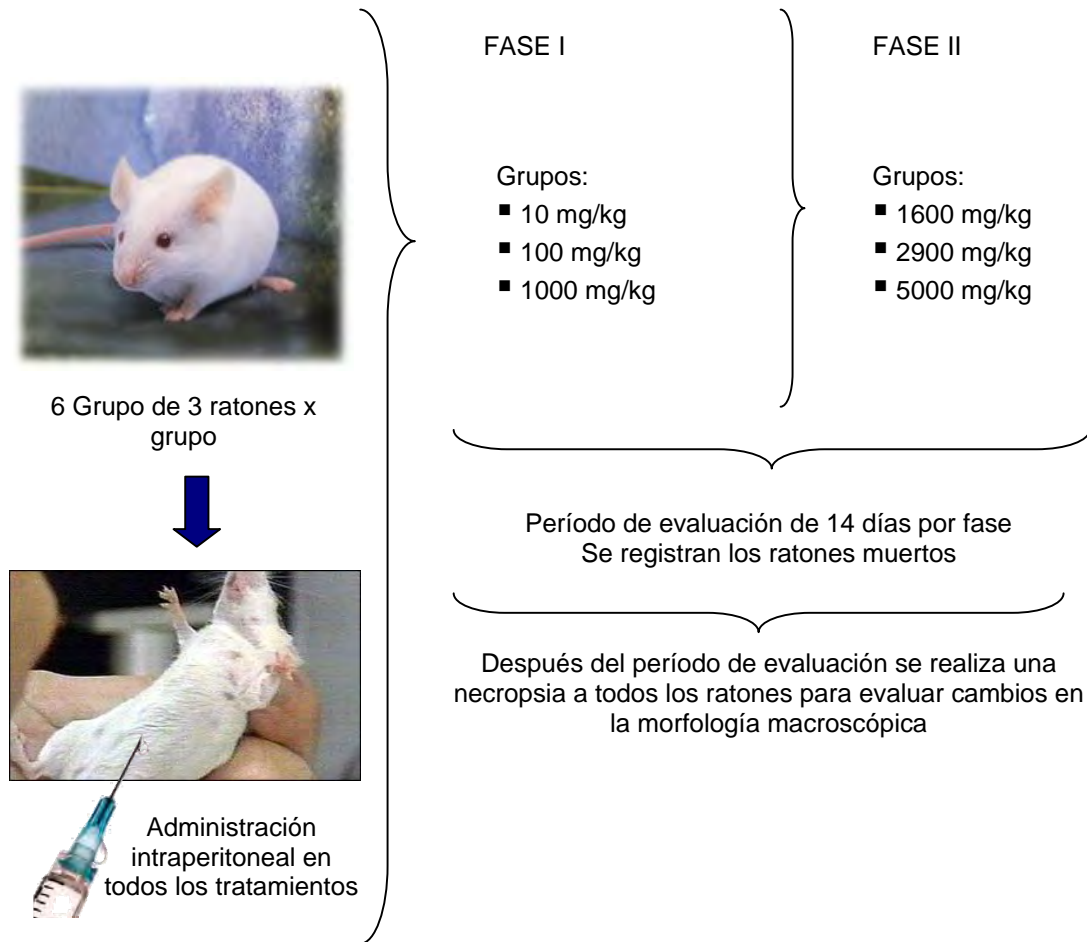


Diagrama 6. Diseño experimental de la prueba de toxicidad aguda en ratón utilizando el método de Lorke, con el cual se obtiene utilizando la media geométrica la DL_{50} .

c) Ensayo de los micronúcleos en médula ósea de ratón

Los ratones se dividieron en 8 grupos de 5 ratones cada grupo. Se administraron los tratamientos vía intraperitoneal. Estos recibieron la administración del vehículo (carboximetilcelulosa al 0.2%), de un control positivo (ciclofosfamida, 40 mg/kg), y de **HD** (30, 100, 300, 562, 718 y 1000 mg/kg). Cuarenta y ocho horas después de la administración de los tratamientos, los ratones se sacrificaron por dislocación cervical, se extrajo el fémur con su integridad estructural, se prosedió a cortar los dos extremos del fémur (las dos epífisis), e inmediatamente con una jeringa se lavó por flujo la cavidad medular del hueso con 3 mL de solución salina isotónica (SSI). El flujo de SSI se recolectó en un tubo eppendorf, se centrifugó a 3000 rpm durante 5 minutos, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el botón en 0.2 mL de SSI. Los frotis se realizaron de la suspensión del botón celular en portaobjetos. Después de montar las láminas, se dejaron a temperatura ambiente para su secado. Más tarde se fijaron en metanol absoluto por 5 minutos. Para la tinción se empleó una solución de colorante de Giemsa al 15%, se colocaron unas cuantas gotas y se espero por 15 minutos, se enjuago con agua desionizada para la eliminación del exceso de colorante. Los frotis se sumergieron en un buffer de fosfatos (pH=6.8) por 10 minutos, después se enjuagó con agua desionizada y se procedió a dejar secar el frotis a temperatura ambiente. En un microscopio con objetivo de 100X, se contaron 2000 células por animal y estas se clasificaron en eritrocitos policromáticos (EPC), eritrocitos normocromáticos (ENC) y eritrocitos policromáticos micronucleados (EPCMN). Se cuantificó el número de EPCMN por cada 1000 EPC contados (Krishna y Hayashi, 2000). En el diagrama 7 se muestra el procedimiento experimental de la técnica.

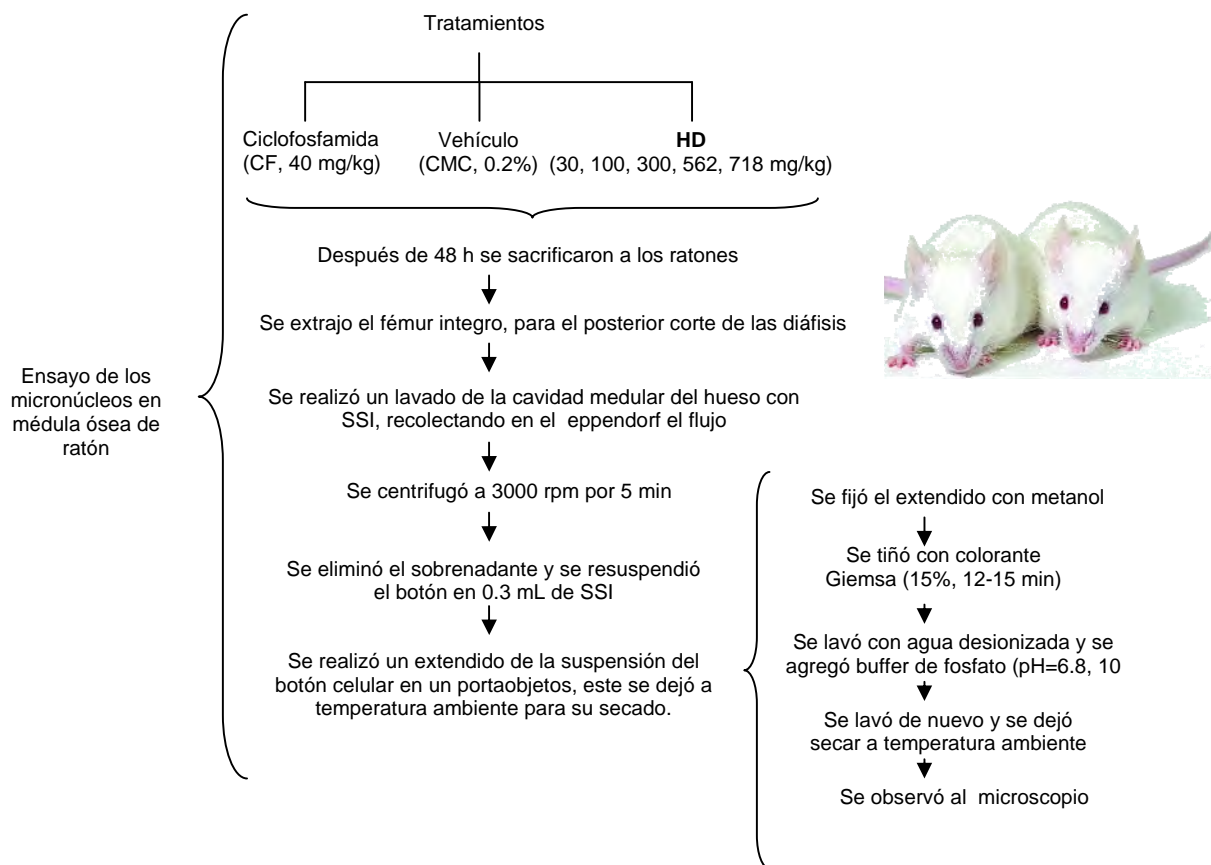


Diagrama 7. Procedimiento experimental del ensayo de los micronúcleos en médula ósea de ratón. El ensayo se divide en tres etapas esenciales; la administración de los tratamientos, la extracción y preparación del frotis de la médula ósea de ratón y por último la tinción del frotis.

2. 5 Resultados

La CL_{50} de **HD** se determinó en base al método de Probit, esta resultó mayor a 1000 $\mu\text{g/mL}$. En cuanto a la toxicidad aguda en ratón en la tabla 5 se muestran las dosis utilizadas de **HD**, así como el número de animales muertos por cada dosis, con lo cual se encontró que la dosis de 5000 mg/kg es tóxica en un 100% de los animales administrados, mientras que en 2900 mg/kg no hay muerte. La DL_{50} (3807 mg/kg) se determinó por medio de una media geométrica a partir de las dosis probadas en la segunda fase (1600, 2900 y 5000 mg/kg). En la tabla 3 se muestran los resultados obtenidos tanto en el método de Lorke, así como en la prueba de toxicidad en *Artemia salina* L.

Tabla 5. Efectos tóxicos potenciales de **HD** en el método de Lorke en ratón y la prueba de toxicidad en *Artemia salina* L.

Fármaco	Fase I dosis (mg/kg) en ratón			*DL ₅₀ (mg/kg) en ratón	**Letalidad en <i>Artemia salina</i> L. CL ₅₀ (µg/ml)
	10	100	1000		
	0/3	0/3	0/3		
HD				3807	>1000
	Fase II dosis (mg/kg) en ratón				
	1600	2900	5000		
	0/3	0/3	3/3		

*En el método de Lorke (número de animales muertos/número de animales usados) la DL₅₀ se determinó mediante la media geométrica. ** Se calculó la CL₅₀ por medio del método de Probit.

El ensayo de los micronúcleos en médula ósea de ratón se seleccionó como otra prueba de toxicidad (Schmid, 1975). Esta se realizó para conocer el posible potencial genotóxico de **HD**. Los resultados se compararon con el control positivo (ciclofosfamida), dado que se conoce que el control positivo usado provoca un 100% de genotoxicidad en organismos vivos (Mcfee y Tice, 1990). En la figura 19 se observa el porcentaje de genotoxicidad que se obtuvo de cada dosis evaluada de **HD**, de ciclofosfamida y el vehículo.

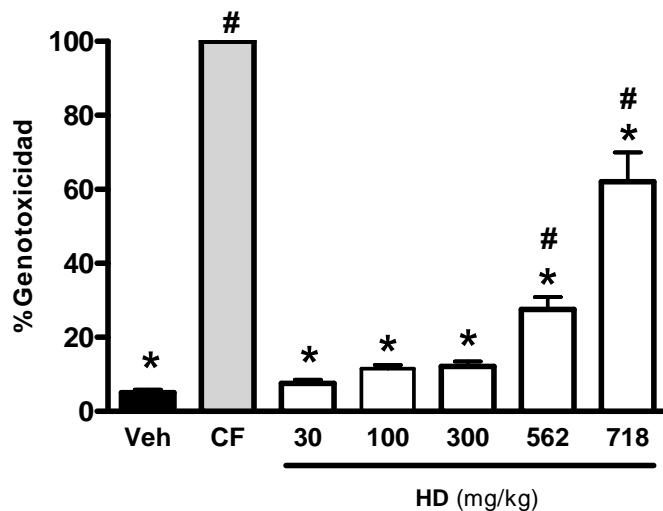


Figura 19. Ensayo de los micronúcleos en la médula ósea de ratón. El porcentaje de genotoxicidad 48 h después de la exposición a **HD** (30, 100, 300, 562, 718 mg/kg i.p.), ciclofosfamida (CF, 40 mg/kg i.p.) y el vehículo (veh, carboximetilcelulosa, 0.2% i.p.). Ciclofosfamida se consideró como control positivo por lo tanto su genotoxicidad fue del 100%. Las barras representan el promedio de 5 animales \pm E.E.M. * Estadísticamente diferentes con respecto al control positivo, $p < 0.05$ y # estadísticamente diferente con respecto al vehículo (Veh), en ambos casos se utilizó una ANADEVVA de una vía seguido de una prueba post-hoc de Tukey.

2. 6 Discusión

La prueba de toxicidad con *Artemia salina* L. se realizó con el fin de determinar si al ponerse en contacto este crustáceo con **HD**, hay muerte; la concentración en el que el 50% de los organismos mueren se analizó por el método estadístico de Probit. Se estableció que la CL_{50} es mayor a 1000 $\mu\text{g/mL}$. La letalidad que se presenta en *Artemia salina* se debe a efectos farmacológicos que se presentan al absorberse el compuesto.

El método de Lorke permitió determinar la DL_{50} de **HD**, este es un parámetro que se utiliza frecuentemente para clasificar el grado de seguridad de un compuesto. En esta prueba se encontró que en las dosis de la primera fase del método (10, 100 y 1000 mg/kg), no hubo ratones muertos; sin embargo, en la segunda fase, se encontró una letalidad del 100% en la dosis de 5000 mg/kg, la muerte de los animales se presentó de 2 a 3 días después de la administración del compuesto. Tanto en las dosis de la fase I y de la fase II, se observó que 30 minutos después de administrar **HD**, los animales presentaban un comportamiento

de aletargamiento, es decir, sus movimientos eran más lentos a dosis altas (2900 y 5000 mg/kg) donde se presentaba inmovilidad en los animales. En dosis de 2900 y 5000 mg/kg se observó piloerección y sequedad en los ojos seguida de una secreción amarillenta en la comisura de los párpados. Otra conducta que se observó fue el de estiramiento abdominal 5 minutos después de que el compuesto se administró, esto podría deberse a un posible efecto irritante en el peritoneo.

Ciclofosfamida es un fármaco antineoplásico con propiedades inmunosupresoras, pertenece a la familia de los fármacos alquilantes de ADN, este es usado comúnmente en enfermedades como la leucemia linfocítica aguda, carcinoma de mama, cáncer de ovario y otros tipos de cáncer (PLM, 2008). Este fármaco es un agente clastogénico, es decir, provoca fragmentación de los cromosomas, con lo cual los fragmentos de los mismos se retrasan en la división celular y causan la creación de los micronúcleos en diferentes líneas celulares; por lo tanto, éste es un agente genotóxico por excelencia, siendo útil como control positivo en un estudio de genotoxicidad (Mcfee y Tice, 1990).

Se demostró con el ensayo de micronúcleos en la médula ósea de ratón, que las dosis evaluadas del compuesto **HD** no produce un efecto genotóxico; sin embargo, el porcentaje de genotoxicidad en la dosis de 718 mg/kg de **HD** esta por arriba del 50% indicando la posibilidad de un efecto genotóxico a ésta dosis o mayor. De forma similar se observó que el porcentaje de genotoxicidad es dosis dependiente, es decir, al aumentar la dosis aumentaba la presencia de EPCMN, por tanto aumentaba el porcentaje de genotoxicidad.

Cabe mencionar que la cantidad de micronúcleos no siempre refleja el porcentaje de genotoxicidad real del compuesto que se evaluó, dado que se ha encontrado que posiblemente factores independientes a la metodología son posibles causantes de una variabilidad en la cantidad de EPCMN encontrados en las muestras. Los factores que se han encontrado como inductores de la cantidad de EPCMN son la anemia e hipoxia (Suzuki et al., 2006), procesos que desencadenan una proliferación de forma rápida de células eritroides, que al producirse tan rápido, la división celular no se realiza de forma adecuada, provocando una producción a la alza de micronúcleos en las células precursoras eritroides (Steinheider et al., 1985). Otro factor que afecta a esta prueba es el cambio en la temperatura corporal, ya sea provocado por la administración de sustancias

químicas o por exposición a agentes ambientales (Guzmán, 2008). Aún así, se considera en los estudios de genotoxicidad que el error que pudieran causar los factores antes mencionados en las prueba de micronúcleos es mínimo.

2. 7 Conclusión

En el presente trabajo se realizó la evaluación toxicológica de *N*-(4-metoxi-2-nitrofenil)hexadecanamida, una nueva molécula con actividad antinociceptiva. Se demostró que este compuesto produce una baja toxicidad en *Artemia salina* L. y en ratón, además presenta baja actividad genotóxica. Con la finalidad de completar los estudios de toxicidad se sugiere realizar evaluaciones a largo plazo.

VI. PERSPECTIVAS

Para continuar el estudio del compuesto *N*-(4-metoxi-2-nitrofenil)hexadecanamida, se mencionan algunas propuestas, las cuales podrían mejorar el conocimiento de la molécula, para posteriormente usarla en la terapéutica del dolor.

- Determinar si la molécula produce efectos antiproliferativos en modelos *in vitro* e *in vivo* de cáncer.
- Determinar si un mecanismo de acción del efecto antinociceptivo de **HD** involucra la activación de PPAR- α , γ y/o δ .
- Evaluar si **HD** produce efecto anticonvulsivo, neuroprotector, ansiolítico y/o antidepresivo.
- Determinar los parámetros farmacocinéticos de la molécula en animales de laboratorio.
- Determinar el efecto antinociceptivo de **HD** en modelos de dolor neuropático en animales de laboratorio.

VII. REFERENCIAS

1. Ahn K., McKinney M.K., Cravatt B.F. Enzymatic pathways that regulate endocannabinoid signaling in the nervous system. *Chemical Reviews* 2008; 108: 1687-1707.
2. Álvarez de la Rosa D., Zhang P., Shao D., White F., Canessa C.M. Functional implications of the localization and activity of acid-sensitive channels in rat peripheral nervous system. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 2326-2331.
3. Akerstrom B., Flower D.R., Salier J.P. Lipocalins: unity in Diversity. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1482: 1-8.
4. Arencibia Arrebola D.F., Rosarios Fernández L.A. Actualización sobre el ensayo cometa y de micronúcleos *in vitro*. *Rev Toxicol en línea* 2003: 24-41.
5. Ariens E.J., Lehman P.A., Simonis, A.M. *Introducción a la Toxicología General*. Diana. México. 1981.
6. Barahona M.V., Sánchez-Fortún S. Toxicity of carbamatos to the brine shrimp *Artemia salina* and the effect of atropine, BW284c51, iso-OMPA and 2-PAM on carbaryl toxicity. *Environ Pollu* 1999; 104: 469-476.
7. Bars D.L., Gozariu M., Cadden S.W. Animal models of nociception. *Pharmacol Rev* 2001; 53: 597-652.
8. Bobrov M.Y., Shevchenko V.P., Yudushkin I.A., Rogov S.I., Remov M.N., Fomina-Ageeva E.V., Gretskaya N.M., Bezuglov V.V. Hydrolysis of anandamide and eicosapentanoic acid ethanolamide in mouse splenocytes. *Biochemistry (Mosc.)* 2000; 65: 615-619.
9. Boddeke E.W. Involvement of chemokines in pain. *Eur J Pharmacol* 2001; 429: 115-119.

10. Burstein S.H., Zurier R.B. Cannabinoids, Endocannabinoids, and Related Analogs in Inflammation. *The AAPS Journal* 2009; 11 (1): 109-119.
11. Cadas H, di Tomaso E., Piomelli D. Occurrence and biosynthesis of endogenous cannabinoid precursor, N-arachidonoyl phosphatidylethanolamine, in rat brain. *Journal of Neuroscience* 1997; 17: 1226-1242.
12. Calignano A., La Rana G., Giuffrida A., Piomelli D. Control of pain initiation by endogenous cannabinoids. *Nature* 1998; 394: 277-281.
13. Calignano A., La Rana G., Piomelli D., Antinociceptive activity of the endogenous fatty acid amide, palmitylethanolamide. *Eur J Pharmacol* 2001; 419: 191-198.
14. Canadian Centre for Occupational Health and Safety. What is an LD50 and LC50. Canadá, 2010. www.ccohs.ca
15. Carroll M.N. Jr., Lim R.K.S. The mechanism of phenylquinone writhing. *Fed Proc* 1958; 17: 357.
16. Chen J.K., Chen J., Iming J.D., Wei S., Hachey D.L., Guthi J.S., Falck J.R., Capdevila J.H., Harris R.C. Identification of novel endogenous cytochrome p450 arachidonate metabolites with high affinity for cannabinoid receptors. *J Biol Chem* 2008; 283: 24514-24524.
17. Collier H.O.J., Dinneen L.C., Johnson C.A. and Schneider C. The abdominal constriction response and its suppression by analgesic drugs in the mouse. *Br J Pharmacol Chemother* 1968; 32: 295.
18. Consroe P., Benedito M.A., Leite J.R. Effects of cannabidiol on behavioural seizures caused by convulsant drugs or current in mice. *Eur J Pharmacol* 1982; 21: 7-13.
19. Consroe P., Martin A., Singh V. Antiepileptic potential of cannabidiol analogs. *J Clin Pharmacol* 1981; 21: 428S-436S.

20. Constigan M., Woolf C.J. Pain: molecular mechanisms. *The Journal of Pain* 2000; 1 (3): 35-44.
21. Costa B., Comelli F., Bettoni I., Conelli M., Giagnoni G. The endogenous fatty acid amide, palmitoylethanolamide, has anti-allodynic and anti-hyperalgesic effects in a murine model of neuropathic pain: involvement of CB₁, TRPV1 and PPAR γ . *Pain* 2008; 139: 541-550.
22. Cravatt B.F., Demarest K., Patricelli M.P., Bracey M.H., Giang D.K., Martin B.R., Litchman A.H. Supersensitivity to anandamide and enhanced endogenous cannabinoid signaling in mice lacking fatty acid amide hydrolase. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 9371-9376.
23. Cravatt B.F., Lerner R.A., Boger D.L. Structure determination of an endogenous sleep-inducing-lipid, cis-9-octadecanamide (oleamide): a synthetic approach to the chemical analysis of trace quantities of a natural product. *J Am Chem Soc* 1996; 118 (3): 580-590.
24. Cravatt B.F., Lichtman A.H. Fatty acid hydrolase: an emerging therapeutic target in the endocannabinoid system. *Current Opinion in Chemical Biology* 2003; 7: 469-475.
25. Cummins T.R., Dib-Hajj S.D., Black J.A., Waxman S.G. Sodium channels and the molecular pathophysiology of pain. *Prog Brain Res* 2000; 129: 3-19.
26. Davis J.B., Gray J., Gunthorpe M.J., Hatcher J.P., Davey P.T., Overend P., Harries M.H., Latcham J., Clapham C., Atkinson K., Hughes S.A., Rance K., Grau E., Harper A.J., Pugh P.L., Rogers D.C., Bingham S., Randall A., Sheardown S.A. Vanilloid receptor-1 is essential for inflammatory thermal hyperalgesia. *Nature* 2000; 405: 183-187.
27. Déciga-Campos M., Montiel-Ruiz R.M., Navarrete-Vázquez G., López Muñoz F.J. Palmitic acid analogues exhibiting antinociceptive activity in mice. *Proc West Pharmacol Soc* 2007; 50: 75-77.

28. Demuth D. G., Molleman A. Cannabinoid signalling. *Life Sci* 2006; 78: 549-563.
29. De Petrocellis L., Bisogno T., Maccarrone M., Davis J.B., Finazzi-Agro A., Di Marzo V. The activity of anandamide at vanilloid VR1 receptors requires facilitated transport across the cell membrane and is limited by intracellular metabolism. *J Biol Chem* 2001(b); 276:12856–12863.
30. De Petrocellis L., Di Marzo V. Role of endocannabinoids and endovanilloids in Ca²⁺ signaling. *Cell Calcium* 2009; 45: 611-624.
31. Desarnaud F., Cadas H., Piomelli D. Anandamide amidohydrolase activity in rat brain microsomas. *J Biol Chem* 1995; 270 (11): 6030-6035.
32. Devane W.A., Hanus L., Breuer A., Pertwee E.G., Stevenson L.A., Griffin G., Gibson D., Mandelbaum A., Etinger A., Mechoulam R. Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science* 1992; 258: 1946-1949.
33. Dewey W.L. Cannabinoid Pharmacology. *Pharmacol Rev* 1986; 38: 151-178.
34. Di Marzo V. Endocannabinoids: synthesis and degradation. *Rev Physiol, Biochem Pharmacol* 2008; 160: 1-24.
35. Dong X.D., Svensson P., Cairns B.E. The analgesic action of topical diclofenac may be mediated through peripheral NMDA receptor antagonism. *Pain* 2009; 147 (1-3): 36-45.
36. Duarte I.D.G., dos Santos I.R., Lorenzetti B.B., Ferreira S.H. Analgesia by direct antagonismo of nociceptor sensitization involves the arginine-nitric oxide-cGMP pathway. *Eur J Pharmacol* 1992; 217: 225-227.
37. Eaton M. Common animal models for spasticity and pain. *Journal of Rehabilitation Research and Development* 2003; 40 (4): 41-54.
38. Enna S. J., Mc Carson K.E. The role of GABA in the mediation an perception of pain. *Adv Pharmacol* 2006; 54: 1-27.

39. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. Primer suplemento. 8ª Edición. México, 2004. pp. 2351-2366.
40. Franco-Bourland R. E., Guízar-Sahagún G. Oxido nítrico en la nocicepción. *Rev Mex Anest* 1995; 18: 71-74.
41. Fredriksson R., Höglund P.J., Gloriam D.E., Langerström M.C., Schiöth H.B. Seven evolutionarily conserved human rhodopsin G protein-coupled receptors lacking close relatives. *FEBS Letts* 2003; 554: 381-388.
42. Freund T.F., Katona I., Piomelli D. Role of endogenous cannabinoids in synaptic signaling. *Physiol Rev* 2003; 83: 1017-1066.
43. Galiegue S., Mary S., Marchand J., Dussossoy D., Carrier D., Carayon P., Bouaboula M., Shire D., Le Fur G., Casellas P. Expression of central and peripheral cannabinoid receptors in human immune tissues and leukocyte subpopulation. *Eur J Pharmacol* 1995; 232: 54-61.
44. Gaoni Y., Mechoulam R. Isolation structure and partial synthesis of active constituents of hashish. *J Am Chem Soc* 1964; 86: 1646-1647.
45. Giuffrida A., Parsons L.H., Kerr T.M., Rodriguez de Fonseca F., Navarro M., Piomelli D. Dopamine activation of endogenous cannabinoid signalling in dorsal striatum. *Nat Neurosci* 1999; 2: 358-363.
46. Glass M., Dragunow M., Faull R.L.M. Cannabinoid receptors in the human brain: a detailed anatomical and quantitative autoradiographic study in the fetal, neonatal and adult human brain. *Neuroscience* 1997; 77: 299-318.
47. Goicoechea-García C., Martín-Fontelles M.I. Sistema cannabinoide y opioide en los mecanismos y el control del dolor. *Reumatol Clin* 2009; 5 (S2): 5-8.

48. Goparaju S.K., Udea N., Yamaguchi H., Yamamoto S. Anandamide amidohydrolase reacting with 2-arachidonoylglycerol, another cannabinoid receptor ligand. *FEBS Letters* 1998; 422: 69-73.
49. Granados-Soto V., Amaya-Castellanos E., Ambriz-Tututi M., Castañeda-Corral G., Rocha-González H.I. Methodological aspects of pain models. *Models of Neuropharmacology* 2009: 99-118.
50. Grotenhermen F. Los cannabinoides y el sistema endocannabinoide. *Cannabinoids* 2006; 1 (1): 10-14.
51. Guerrero A.V., Quang P., Dekker N., Jordan R.C.K., Schmidt B.L. Peripheral cannabinoids attenuate carcinoma-induced nociception in mice. *Neurosci Lett* 2008; 433: 77-81.
52. Guzmán Cano A. Estudio del potencial genotóxico del E-5842, un fármaco experimental antipsicótico con afinidad por el receptor sigma, y del mecanismo de inducción de eritrocitos micronucleados en ratón mediante hipotermia. Tesis doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona, Facultad de Biociencias. Diciembre, 2008.
53. Hanus L., Abu-Lafi S., Breuer A., Vogel Z., Shalev D.E., Kustanovich I., Mechoulam R. 2-Arachidonyl glyceryl ether, an endogenous agonist of the cannabinoid CB₁ receptor. *PNAS* 2001; 98 (7): 3662-3665.
54. Harrington, C. R. Lowry Protein Assay Containing Sodium Dodecyl Sulfate in Microtiter Plates for Protein Determinations on Fractions From Brain Tissue. *Anal. Biochem.* 1990; 186: 285-287.
55. Helyes Z., Nemeth J., Than M., Bolcskei K., Pinter E., Szolcsanyi J. Inhibitory effect of anandamide on resiniferatoxin-induced sensory neuropeptide release in vivo and neuropathic hyperalgesia in the rat. *Life Sci* 2003; 73: 2345-2353.

56. Herkenham M., Lynn A.B., de Costa B.R., Richfield E.K. Neuronal localization of cannabinoid receptors in the basal ganglia of the rat brain. *Brain Res* 1991(b); 547:267-274.
57. Herkenham M., Lynn A.B., Little M.D., Johnson M.R., Melvin L.S., De Costa B.R., Rice K.C. Cannabinoid receptor localisation in brain. *Proc of the Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 1932-1936.
58. Hrabé de Angelis M., Champon P., Brown S.D.M. *Standards of mouse model phenotyping*. Wiley-VCH. Germany, 2006. pp. 228.
59. Ho W-SV., Barrett D.A., Randall M.D., "Entorage" effects of N-palmitoylethanolamide and N-oleoylethanolamide on vasorelaxation to anadamide occur through TRPV1 receptors. *Br J Pharmacol* 2008; 155 (6): 837-846.
60. Howlett A.C., Barth F., Bonner T.I., Cabrai G., Casellas P., Devane W.A., Felder C.C., Herkenham M., Mackie K., Martin B.R., Mechoulam R., Pertwee R.G. International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. *Pharmacol Rev* 2002; 54 (2): 161-202.
61. Huang S.M., Bisogno T., Trevisani M., Al-Hayani A., De Petrocellis L., Fezza F., Tognetto M., Petros T.J., Krey J.F., Chu C.J., Miller J.D., Davies S.N., Geppetti P., Walker J.M., Di Marzo V. An endogenous capsaicin-like substance with high potency at recombinant and native vanilloid VR1 receptors. *PNAS* 2002; 99 (12): 8400-8405.
62. Hwang J., Adamson C., Butler D., Janero D.R., Makriyannis A., Bahr B.A. Enhancement of endocannabinoid signalling by fatty acid amide hydrolase inhibition: A neuroprotective therapeutic modality. *Life Sci* 2010; 86: 615-623.
63. Ibrahim M.M., Porreca F., Lai J., Albrecht P.J., Rice F.L., Khodorova A., Davar G., Makriyannis A., Vanderah T.W., Mata H.P., Malan P.Jr. CB₂ cannabinoid receptor activation produces antinociception by stimulating peripherals release of endogenous opioids. *PNAS* 2005; 2 (8): 3093-3098.

64. ICH, Topic M3 (R1), Non-clinical safety Studies for the conduct of human clinical trials for pharmaceuticals, International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. November, 2000.
65. Jana S., Xue Jun L. The formalin test: characteristics and usefulness of the model. *Reviews in analgesia* 2003; 7 (2): 145-163.
66. Jhaveri M.D., Richardson D., Chapman V. Endocannabinoid metabolism and uptake: novel targets for neuropathic and inflammatory pain. *Br J Pharmacol* 2007; 152: 624-632.
67. Ji R.R., Wen Y.R. Neuronal-gliainteraction in the spinal cord for the development and maintenance of nerve injury-induced neuropathic pain. *Drug Development Res.* 67:331-338.
68. Julius D., Basbaum A.I. Molecular mechanisms of nociception. *Nature* 2001; 413: 203-210.
69. Jung K.M., Mangieri R., Stapleton C., Fegley D., Wallace M., Mackie K., Piomelli D. Stimulation of endocannabinoid formation in brain slice cultures through activation of group 1 metabotropic glutamate receptors. *Molecular Pharmacology* 2005; 68: 1196-1202.
70. Kazuko M., Encarnación-Dimayuga R., Cortés A. Evaluación toxicológica de productos naturales usando microtécnicas. *Rev Mex de Ciencias Farm* 2005; 36 (1): 11-17.
71. Khanapure S.P., Garvey D.S., Janero D.R., Letts L.G. Eicosanoids in inflammation: Biosynthesis, pharmacology and therapeutic frontiers. *Current Topic in Medicinal Chemistry* 2007; 7: 311-340.
72. Kimura T., Ohta T., Watanabe K., Yoshimura H., Yamamoto I. Anandamide, an endogenous cannabinoid receptors ligand, also interacts with 5-hydroxytryptamine (5-HT) receptor. *Biol. Pharm. Bull* 1998; 21: 224-226.

73. Klaassen C.D. Cassarett and Doull's Toxicology. The basic science of poison. 6^a edición. Mc Graw Hill. EUA. 2001.
74. Koster R., Anderson M., De Beer E.J. Acetic acid for analgesic screening. Fed Proc 1959; 18: 412.
75. Kress M., Kuner R. Mode of action of cannabinoids on nociceptive nerve endings. Exp. Brain Res. 2009; 196: 79-88.
76. Krishna G., Hayashi M. In vivo rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation. Mutation Research 2000; 455: 155-166.
77. Kuehl F.A., Jacob T.A., Ganley O.H., Ormond R.E., Meisinger M.A.P. The identification of N-(2-hydroxyethyl)-palmitamide as a naturally occurring anti-inflammatory agent. J. Am. Chem. Soc. 1957; 79 (20): 5577-5578.
78. Lai J., Porreca F., Hunter J.C., Gold M.S. Voltage-gated sodium channels and hyperalgesia. Annu Rev Pharmacol Toxicol 2004; 44: 371-397.
79. Lambert D.M., Di Marzo V. The palmitoylethanolamide and oleamide enigmas: are these two fatty acid amides cannabimimetic. Curr Med Chem 1999; 6: 757-773.
80. Lambert D.M., Vandervoort S., Diependaele G., Govaerts S.J., Robert A.R. Anticonvulsant activity of N-palmitoylethanolamide, a putative endocannabinoid, in mice. Epilepsia 2001; 42 (3): 321-327.
81. Lambert D.M., Vandervoort S., Jonsson K.O., Fowler C.J. The palmitoylethanolamide family: a new class of anti-inflammatory agents? Current Medicinal Chemistry 2002; 9: 663-674.
82. Lauckner J.E., Hille B., Mackie K. The cannabinoid agonist WIN55, 212-2 increases intracellular calcium via CB₁ receptor coupling to Gq/11 G proteins. Proc Natl Acad Sci USA 2005; 102: 19144-19149.

83. Lichtman A.H., Martin B.R. Spinal and supraspinal components of cannabinoid-induced antinociception. *J Pharmacol Exp Ther* 1991; 258: 517-523.
84. Lichtman A.H., Hawkins E.G., Griffin G., Cravatt B.F. Pharmacological activity of fatty acid amides is regulated, but not mediated by fatty acid amide hydrolase *in vivo*. *J Pharmacol Exp Ther* 2002; 302: 73-79.
85. Lorke D. A new Approach to practical acute toxicity testing. *Arch Toxicol* 1983; 54: 275-287.
86. Lo Verme J., Fu J., Astarita G., La Rana G., Russo R., Calignano A., Piomelli D. The nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor- α mediates the anti-inflammatory actions of palmitoylethanolamide. *Mol Pharmacol* 2005; 67: 15-19.
87. Lovinger D.M., Presynaptic modulation by endocannabinoids. *Handbook of experimental Pharmacology* 2008; 184: 435-477.
88. Mackinney M.K., Cravatt B.F. Evidence for distinct roles in catalysis for residues of the serine-serine-lysine catalytic triad of fatty acid amide hydrolase. *J Biol Chem* 2003; 278: 37393-37399.
89. MacKinney M.K., Cravatt B.F. Structure and function of fatty acid amide hydrolase *Annu Rev Biochem* 2005; 74: 411-432.
90. Malan T.P., Ibrahim M.M., Deng H., Liu Q., Mata H.P., Vanderah T., Porreca F., Makriyannis A. CB₂ cannabinoid receptor-mediated peripheral antinociception. *Pain* 2001; 93: 239-245.
91. Manahan, S. *Toxicological Chemistry*. Lewis Publishers. USA. 1989.
92. Maneuf Y.P., Crossman A.R., Brotchie J. Modulation of GABAergic transmission in the globus pallidus by the synthetic cannabinoid WIN 55,212-2. *Synapse* 1996; 22:382-385.

93. Masek K., Perlík F., Klíma J., Kahlich R. Prophylactic efficacy of N-2hydroxyethyl palmitamide (impulsin) in acute respiratory tract infections. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 1974; 7: 415-419.
94. Matsuda L.A., Lolait S.J., Brownstein M.J., Young A.C., Bonner T.I. Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature* 1990; 346: 561-564.
95. Matusiewicz M, Krzystek-Korpacka M, Dabrowski K. Characterization of arylsulfatase activity in brine shrimp, *Artemia salina*. *J Exp Mar Biol Ecol*, 2005; 317: 175-187.
96. Mazzari S., Canella R., Petrelli L., Marcolongo G., Leon A. N-(2-hydroxyethyl)hexadecanamide is orally active in reducing edema formation and inflammatory hyperalgesia by down-modulating mast cell activation. *European Journal of Pharmacology* 1996; 300: 227-236.
97. McFee A. F., Tice R. R. Influence of treatment to sacrifice time and the presence of BrdUrd on chemically-induced aberration rates in mouse marrow cells. *Mutation Research* 1990; 241: 95-108.
98. Mechoulam R., Ben-Shabat S., Hanus L., Ligumsky M., Kaminski N.E., Schatz A.R., Gopher A., Almong S., Martin B.R., Compton D.R., Pertwee R.G., Griffin G., Bayewitch M., Barg J., Vogel Z. Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem. Pharmacol.* 1995; 50: 83-90.
99. Mechoulam R., Fride E., Di Marzo V. Endocannabinoids. *Eur J Pharmacol* 1998; 359: 1-18.
100. Moghe V. V, Kulkarni U and Parmar U.I. Thalidomide. *Bombay Hospital Journal* 2008; 50 (3): 472-476.
101. Mombouli J-V., Schaeffer G., Holzmann S., Kostner G.M., Graier W. Anandamide-induced mobilisation of cytosolic Ca²⁺ in endothelial cells. *Br J Pharmacol* 1999; 126: 1593-1600.

102. Morales M., Bäckman C. Coexistence of serotonin 3 (5-HT₃) and CB₁ cannabinoid receptors in interneurons of hippocampus and dentate gyrus. *Hippocampus* 2002; 12: 756-764.
103. Mortelmans K, Rupa D. Current Issues in genetic toxicology testing for microbiologist. *Adv appli microbiol* 2004; 56:379-397.
104. Munro S., Thomas K.L., Abu-Shaar M. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature* 1993; 365: 61-65.
105. Natarajan V., Schmid P.C., Reddy P.V., Zuzarte-Augustin M.L., Schmid H.H. Biosynthesis of N-acylethanolamine phospholipids by dog brain preparations. *Journal of Neurochemistry* 1983; 41: 1303-1312.
106. Natarajan V., Schmid P.C., Schmid H.H.O. N-acylethanolamine phospholipids metabolism in normal and ischemic rat brain. *Biochimica et Biophysica Acta* 1986; 878: 32-41.
107. Nunez E., Benito C., Pazos M.R., Barbachano A., Fajardo O., Gonzalez S., Tolon R.M., Romero J. Cannabinoid CB₂ receptor are expressed by perivascular microglial cells in the human brain: a immunohistochemical study. *Synapse* 2004; 15: 208-213.
108. O'Sullivan S.E. Cannabinoids go nuclear: evidence for activation of peroxisome proliferator-activated receptors. *Br J Pharmacol* 2007; 152: 576-582.
109. Parinandi N.L., Schmid H.H.O. Effects of long-chain N-acylethanolamines on lipid peroxidation in cardiac mitochondria. *FEBS Letters* 1988; 237 (1-2): 49-52.
110. Passmore G.M., Selyanko A.A., Mistry M., Al-Qatari M., Marsh S.J., Matthews E.A., Dickenson A.H., Brown T.A., Burbidge S.A., Main M., Brown D.A. KCNQ/M currents in sensory neurons: significance for pain therapy. *J Neurosci* 2003; 23: 7227-7236.

111. Pertwee R.G. The therapeutic potential of drugs that target cannabinoid receptors or modulate the tissue levels or actions of endocannabinoids. *The AAPS Journal* 2005; 7 (3): E625-E654.
112. Pillariseti S., Alexander C.W., Khanna I. Pain and beyond: fatty acid amides and fatty acid amide hydrolase inhibitors in cardiovascular and metabolic diseases. *Drug Discovery Today* 2009; 14 (23/24): 1098-1110.
113. Pino O., Jorge F. Ensayo de Artemia: Útil herramienta de trabajo para ecotoxicólogos y químicos de productos naturales. *Rev. Protección Veg.* 2010; 22 (1): 34-43.
114. PLM. Diccionario de especialidades farmacéuticas. 54^a Edición. Thomson Health Care. México, 2008.
115. Porter A.C., Sauer J-M., Knierman M.D., Becker G.W., Berna M.J., Bao J., Nomikos G.G., Carter P., Bymaster F.P., Baker Leese A., Felder C.C. Characterization of a novel endocannabinoid, virodhamine, with antagonist activity at the CB₁ receptor. *JPET* 2002; 301: 1020-1024.
116. Prusakiewicz J.J., Turman M.V., Vila A., Ball H.L., Al-Mestarihi A.H., Di Marzo V., Mernett L.J. Oxidative metabolism of lipoamino acids and vanilloids by lipoxygenases and cyclooxygenases. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 2007; 464: 260-268.
117. Rockwell C.E. Kamiski N.E. A cyclooxygenase metabolite of anandamide causes inhibition of interleukin-2 secretion in murine splenocytes. *J Pharmacol Exp Ther* 2004; 311: 683-690.
118. Rodríguez Arnaiz Rosario. Las toxinas ambientales y sus efectos genéticos. *La Ciencia para Todos*. Fondo de Cultura Económica. México, D.F., 1994.
119. Rodríguez U., Carrillo E., Soto E. Canabinoides: Neurobiología y usos médicos. *Elementos* 2005; 60: 3-9.

120. Rodríguez de Fonseca F., Navarro M., Gómez R., Escudero L., Nava F., Fu J., Murillo-Rodríguez E., Giuffrida A., LoVerme J., Gaetani S., Kathuria S., Gall C., Piomelli D. An anorexic lípido mediator regulated by feeding. *Nature* 2001; 414: 209-212.
121. Romero J., de Miguel R., Ramos J.A., Fernández- Ruiz J.J. The activation of cannabinoid receptors in striatonigral GABAergic neurons inhibited GABA uptake. *Life Sci* 1998(a) 62:351-363.
122. Ryberg E., Larsson N., Sjögren S., Hjorth S. Hermansson N.O. Leonova J., Elebring T., Nilsson K., Drmota T., Greasley P.J. The orphan receptor GPR55 is a novel cannabinoid receptor. *Br J Pharmacol* 2007; 152: 1092-1101.
123. Scarpella F., Abramo F., Noli C. Clinical and histological evaluation of an analogue of palmitoylethanolamide, PLR 120 in cats with eosinophilic granuloma and eosinophilic plaque: a pilot study. *Veterinary Dermatology* 2001; 12: 29-39.
124. Schatz A.R., Lee M., Condie R.B., Pulaski J.T., Kaminski N.E. Cannabinoid receptors CB₁ and CB₂: a characterization of expression and adenylate cyclase modulation within the immune system. *Toxicological Applications in Pharmacology* 1997; 142: 278-287.
125. Seigmund E.A., Cadmus R.A., Lu G. A method for evaluating both non-narcotic and narcotic analgesics. *Proc Soc Exp Biol Med NY* 1957; 95: 729-731.
126. Seyrek M., Kahraman S., Deveci M. S., Yesilyurt O., Dogrul A. Systemic cannabinoids produce CB₁-mediated antinociception by activation of descending serotonergic pathways that act upon spinal 5-HT₇ and 5-HT_{2A} receptors. *Eur J Pharmacol* 2010; 649: 183-194.
127. Sheerin A.H., Zhang X., Saucier D.M., Corcoran M.E. Selective antiepileptic effects of N-palmitoylethanolamide, a putative endocannabinoid. *Epilepsia* 2004; 45 (10): 1184-1188.

128. Shire D, Carillon C., Kaghad M., Calandra B., Rinaldi-Carmona M., Le Fur G., Caput D., Ferrara P. An amino-terminal variante of the central cannabinoid receptor resulting from alternative splicing. *J. Biol. Chem.* 1995; 270: 3726-3731.
129. Schmid W. The micronucleus test. *Mutation Research* 1975; 31: 9-15.
130. Shu-Jung S., Bradshaw H.B., Chen J.S., Tan B., Walker J.M., Prostaglandin E₂ glycerol ester, an endogenous COX-2 metabolite of 2-arachidonoylglycerol, induces hyperalgesia and modulates NFκB activity. *Br J Pharmacol* 2008; 153: 1538-1549.
131. Skaper S.D., Buriani A., Dal Toso R. Petrelili L., Romanello S., Facci L., León A. The ALIAmide palmitoylethanolamide and cannabinoids, but not anandamide, are protective in a delayed postglutamate paradigm of excitotoxic death in cerebellar granule neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 3984-3989.
132. Souslova V., Cesare P., Ding Y., Akopian A.N., Stanfa L., Suzuki R., Carpenter K., Dickenson A., Boyce S., Hill R., Nebunius-Oosthuizen D., Smith A.J., Kidd E.J., Wood J.N. Warm-coding deficits and aberrant inflammatory pain in mice lacking P2X₃ receptors. *Nature* 2000; 407 (6807): 951-952.
133. Steinheider G., Neth R., Marquardt H. Evaluation of nongenotoxic and genotoxic factors modulating the frequency of micronucleated erythrocytes in the peripheral blood of mice. *Cell Biol Toxicol* 1985; 1: 197-211.
134. Stella N., Piomelli D. Receptor-dependent formation of endogenous cannabinoids in cortical neurons. *Eur J Pharmacol* 2001; 425: 189-196.
135. Stella N, Schweitzer P., Piomelli D. A second endogenous cannabinoid that modulates long-term potentiation. *Nature* 1997; 388: 773-778.
136. Suzuki M., Ohneda K., Hosoya-Ohnura S., Tsukamoto S., Ohneda O., Philipsen S., Yamamoto M. Real-time monitoring of stress erythropoiesis in vivo using Gata 1 and beta-globin LCR luciferase transgenic mice. *Blood* 2006; 108: 726-733.

137. Terman G.W., Bonica J.J. Mecanismos medulares y su modulación. Terapéutica del dolor. Eds. John D. Loeser. Vol 1. 3era Ed. 2003. 86-184.
138. Timbrell, J.A. Introduction to Toxicology. Taylor and Francis. Great Britain. 1989.
139. Tsuboi K., Takezaki N., Ueda N. The N-acyl ethanolamine-hydrolyzing acid amidase (NAAA). Chemistry and Biodiversity 2007 b; 4: 1914-1925.
140. Tsuboi K., Zhao L.Y., Okamoto Y., Araki N., Ueno M., Sakamoto H., Ueda N., Predominant expresión of lysosomal N-acyl ethanolamine-hydrolyzing acid amidase in macrophages revealed by immunochemical studies. Biochimica et Biophysica Acta 2007 a; 1771: 623-632.
141. Turu G., Hunyady L. Signal transduction of the CB₁ cannabinoid receptor. Journal of Molecular Endocrinology 2010; 44: 75-85.
142. Vandevorde S., Lambert D.M. The multiple pathways of endocannabinoid metabolism: A zoom out. Chem Biodiv 2007; 4: 1858-1881.
143. Walker J.M., Krey J.F., Chu C.J., Huang S.M. Endocannabinoids and related fatty acid derivatives in pain modulation. Chemistry and Physics of Lipids 2002; 121: 159-172.
144. Wall P.D., Devor M. Sensory afferent impulses originate from dorsal root ganglia as well as from the periphery in normal and nerve injured rats. Pain 1983; 17: 321-339.
145. Watanabe K., Ogi H., Nakamura S., Kayano Y., Matsunaga T., Yoshimura H., Yamamoto I. Distribution and characterization of anandamide amidohydrolase in Mouse brain and liver. Life Sci 1998; 62: 1223-1239.
146. Wilson S. G., Mogil J. S. Measuring pain in the (knockout) mouse: big challenges in a small mammal. Behavioural Brain Research 2001; 125: 65-73.

147. Williams, P.PI, Berson, L.J. Industrial Toxicology. Van Nostrand Reihold, New York. 1985.
148. Willoughby K.A., Moore S.F., Martin B.R., Ellis E.F. The biodisposition and metabolism of anandamide in mice. J Pharmacol Exp Ther 1997; 282: 243-247.
149. Woodward D.F., Liang Y., Krauss A.H. Prostaglandin-ethanolamides and their pharmacology. Br J Pharmacol 2008; 153: 410-419.
150. Woolf C. J. Pain: Moving symptom control toward mechanism-specific pharmacologic management. Ann Int Medic 2004; 140 (6): 441-451.
151. Woolf C.J., Salter M.W. Neuronal plasticity: increasing the gain in pain. Science 2000; 288 (5472): 1765-1769.
152. Zbinden G., Flury-Roversi M. Significance of the LD₅₀-test for the toxicological evaluation of chemical substances. Arch Toxicol 1981; 47: 77-99
153. Zeilhofer H.U. Loss of glycinergic and GABAergic inhibition in chronic pain-contributions of inflammation and microglia. Int Immunopharmacol 2008. 8:182-187
154. Zimmermann M. 1983. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. Pain 1983. 16:109-1

APENDICE 1

(Parte experimental realizada por el Dr. Gabriel Navarrete Vázquez)

Procedimiento para la síntesis de *N*-(4-metoxi-2-nitrofenil)hexadecanamida

El diseño de la molécula esta basado en el compuesto natural palmitoiletanolamida. El compuesto se diseño tomando como base la estructura del ácido palmítico.

La síntesis del compuesto partió de cloruro de palmitoilo, el cual se hizo reaccionar con 4-metoxi-2-nitroanilina.

El procedimiento experimental que se siguió para la obtención de *N*-(4-metoxi-2-nitrofenil)hexadecanamida fue el siguiente:

0.5 g de 4-metoxi-2-nitroanilina se disolvieron en diclorometano y trietilamina, y se adicionó 1 g de cloruro de palmitoilo previamente disuelto en diclorometano.

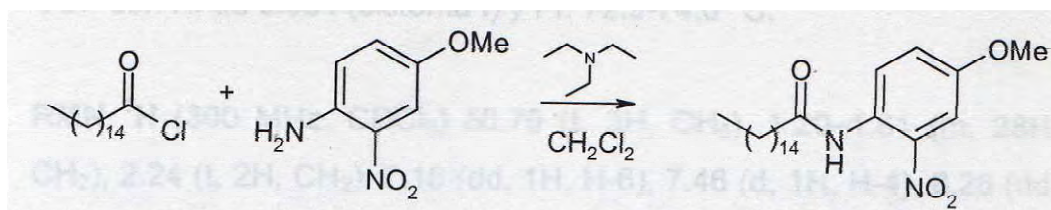


Tabla 1. Constantes fisicoquímicas y rendimiento de HD

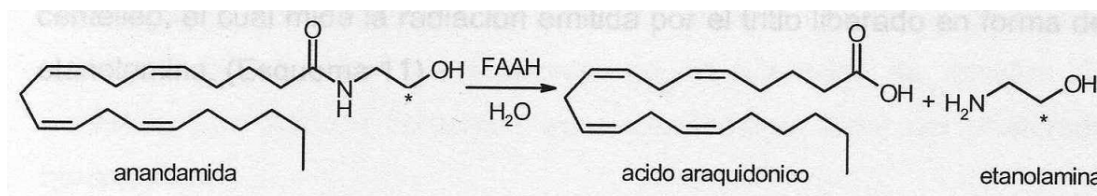
Fórmula	Rendimiento (%)	Estado físico	pF (° C)	Rf	Cristal.	PM (g/mol)
C ₂₃ H ₃₈ N ₂ O ₄	75	Sólido cristalino amarillo	77.5-78.9	0.147	Metanol	406

APENDICE 2

(Parte experimental realizada por el Dr. Christopher Fowler)

Determinación de la de la capacidad inhibitoria de *N*-(4-metoxi-2-nitrofenil)hexadecanamida sobre la enzima FAAH

Para la determinación de la capacidad de inhibir a la enzima por parte de *N*-(4-metoxi-2-nitrofenil)hexadecanamida se realizó el ensayo de FAAH, el cual consiste en medir la hidrólisis de AEA en ácido araquidónico y etanolamina debido a la acción de la enzima FAAH.



Desarrollo experimental. Para la obtención de la enzima FAAH se extrajeron cerebros de ratas adultas, se homogenizaron en buffer HEPES 20 mM a pH 7.0 con MgCl₂ 1 nM, a 4° C. Después se centrifugaron 2 veces a 36000G por 20 min a 4° C, el precipitado se resuspendió en el buffer e incubó a 37° C durante 15 min. Se centrifugó las membranas 2 veces a 36000G por 2 min a 4° C, y se resuspendieron en buffer Tris-HCl 50nM, pH 7.4, conteniendo EDTA 1 mM y MgCl₂ 3 mM. Las proteínas de la membrana se determinaron de acuerdo al método de Harrington (1990) usando como estándar albúmina de suero bovino.

Para la determinación de la inhibición de FAAH, se utilizó [³H]-AEA como sustrato de la enzima. La membrana y *N*-(4-metoxi-2-nitrofenil)hexadecanamida contenidos en 10 µL de etanol (el análisis del compuesto a evaluar se realizó a diferentes concentraciones utilizando 0.01, 0.1, 1, 10, 100 y 1000 µM), [³H]-AEA 2 mM (concentración final), y el buffer (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, 1% BSA pH 7.6), se incubaron a 37° C por 10 min, la reacción se detuvo al colocar los tubos en un baño de hielo y al agregar 400 µL de una mezcla de cloroformo:metanol (1:1), seguido de una agitación en vortex. Se centrifugaron y separaron las fases, posteriormente, se tomó una alícuota de 200 µL de la fase

metanol:buffer, la cual se analizó en un contador de centelleo de líquidos. Los blancos utilizados contenían agua destilada. Durante esta bioevaluación se utilizó a PEA como control positivo, puesto que este es el inhibidor clásico de la enzima FAAH.

Resultados

En la tabla 1 se observan los datos obtenidos a partir del ensayo de FAAH.

Compuesto	CI ₅₀ (µM)	pl ₅₀	% inhib. de metab. AEA	Potencia
PEA	33	4,48	78 ± 7,23	1
HD	30 ± 2,71	4,52	79,47 ± 6,45	1,1

Tabla 1. Relación del compuesto **HD** con respecto a la inhibición del metabolismo de AEA. Durante la bioevaluación se utilizó PEA como control positivo, dado que este es el inhibidor clásico de FAAH. Se muestra la concentración inhibitoria media (CI₅₀)-concentración a la cual el 50% de la enzima se encuentra inhibida-. También se muestra el pl₅₀ (pl₅₀= -log CI₅₀), el porcentaje de inhibición de metabolismo de AEA alcanzado por **HD**. Se observa la potencia mostrada por el compuesto **HD** con respecto al control (PEA). Para este análisis se utilizó un valor máximo fijo (es decir, 100% del control).