



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

Evaluación de la actividad antinociceptiva de
compuestos análogos de la Palmitoiletanolamida.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

VÍCTOR HUGO GARCÍA HERNÁNDEZ

Asesor: Dra. Myrna Déciga Campos





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Jurado asignado:

Presidente
Vocal
Secretario
1er Suplente
2do Suplente

Profa. Elia Brosla Naranjo Rodríguez
Profa. María Eva González Trujano
Profa. Myrna Déciga Campos
Prof. Atonatiu Edmundo Gómez Martínez
Prof. Alejandro Ortíz Osornio

EL TRABAJO EXPERIMENTAL FUE REALIZADO EN:

La Unidad de Investigación en Farmacología del
Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias
"Ismael Cosío Villegas"
Con apoyo de la Escuela Superior de Medicina
del Instituto Politécnico Nacional
Bajo la tutoría de la Dra. Myrna Déciga Campos.

El Laboratorio de Química Medicinal de la
Facultad de Farmacia de la
Universidad Autónoma del Estado de Morelos
Bajo la asesoría del Dr. Gabriel Navarrete Vázquez.

El Instituto Nacional de Psiquiatría
Ramón de la Fuente Muñiz
Bajo la asesoría de la Dra. Eva González Trujano.

Departamento de Farmacobiología del
Centro de Investigación y Estudios Avanzados Sede-Sur
Bajo la asesoría del Dr. Francisco Javier López Muñoz.

Asesor del tema:

Dra. Myrna Déciga Campos.

Sustentante:

Víctor Hugo García Hernández.

ÍNDICE GENERAL

<i>i. Resumen</i>	1
II. INTRODUCCIÓN	2
III. ANTECEDENTES	3
3.1 Dolor.....	3
3.1.1 Tipos de dolor.....	3
3.2 Nocicepción.....	5
3.2.1 Nociceptores.....	5
3.3 Transmisión del dolor.....	6
3.3.1 Vía ascendente y descendente de la nocicepción	7
3.4 Proceso de sensibilización.....	8
3.5 Inflamación.....	8
3.6. Los cannabinoides.....	10
3.6.1 Tipos de cannabinoides.....	11
3.6.2 Receptores a cannabinoides.....	14
3.6.3 Mecanismo de acción de los cannabinoides.....	15
3.6.4 Los cannabinoides y la nocicepción.....	17
3.6.5 Los cannabinoides y la inflamación.....	18
3.7 Palmitoiletanolamida.....	19
3.7.1 Biosíntesis y degradación de la	
palmitoiletanolamida.....	19
3.7.2 Acciones farmacológicas de la	
palmitoiletanolamida.....	21
3.8 Interacción de los cannabinoides con otros sistemas de	
neurotransmisión.....	22
3.8.1 Interacción de receptores cannabinoides y opioides.....	22
3.8.2 Interacción de receptores cannabinoides y vanilloides.....	25
3.9 Modelos experimentales en animales para evaluar el proceso	
nociceptivo.....	28
3.9.1 Prueba de estiramiento abdominal.....	30
3.9.2 Prueba de la placa caliente.....	30
3.9.3 Prueba de la formalina.....	31
3.9.4 Prueba de la capsaicina.....	32
4.0 Los anticonvulsivantes y la nocicepción.....	33
IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	34
V. HIPÓTESIS	35

VI. OBJETIVOS	36
6.1. Objetivo General.....	36
6.2. Objetivos particulares.....	36
VII. MATERIAL Y MÉTODO	37
7.1. Material biológico.....	37
7.2. Fármacos y reactivos.....	37
7.3. Obtención de los análogos N-aril sustituidos de la palmitoiletanolamida.....	38
7.4. Evaluación de la actividad antinociceptiva.....	40
7.4.1. Prueba de estiramiento abdominal.....	40
7.4.2. Prueba de la placa caliente.....	41
7.4.3. Prueba de la formalina.....	44
7.4.4. Prueba de capsaicina.....	45
7.4.5. Prueba de efecto anticonvulsivo.....	46
7.5. Activación de la vía opioide como posible mecanismo de acción del compuesto N-(4-metoxi-2-nitrofenil)hexadecanamida.....	48
7.6. Análisis de los datos.....	49
VIII. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS	50
8. 1. Evaluación del efecto antinociceptivo de los compuestos 1, 5 y 6; análogos de la palmitoiletanolamida.....	50
8.1.1. Prueba de estiramiento abdominal en ratón.....	51
8.1.2. Prueba de la placa caliente en ratón.....	53
8. 2. Evaluación del efecto antinociceptivo de los compuestos 1, 2, 3 y 4; análogos de la palmitoiletanolamida.....	56
8.3. Efecto antinociceptivo del compuesto 1 en la prueba de la capsaicina.....	59
8.4. Efecto anticonvulsivo del compuesto 1 en la prueba de convulsiones por pentilentetrazol en ratón.....	61
IX. CONCLUSIONES	62
X. PERSPECTIVAS	64

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Tipos primarios de dolor. Modificado de Woolf, 2004.....	4
Figura 2. Sistema de transmisión del dolor.....	7
Figura 3. Estructura química de algunos cannabinoides endógenos.....	13
Figura 4. Estructura química de Δ^9 -tetrahidrocannabinol.....	13
Figura 5. Representación esquemática de los receptores CB ₁ y CB ₂	14
Figura 6. Mecanismo de acción de la activación de receptores CB ₁	16
Figura 7. Mecanismo de acción de la activación de los receptores CB ₂	17
Figura 8. Estructura química de la N-Palmitoiletanolamida (PEA).....	19
Figura 9. Síntesis y degradación de la PEA.....	20
Figura 10. Mecanismo de acción de la anandamida en los receptores a cannabinoides CB ₂	25
Figura 11. Prueba de estiramiento abdominal.....	40
Figura 12. Prueba de la placa caliente.....	42
Figura 13. Prueba de la formalina.....	45
Figura 14. Fotografías en donde se muestra el efecto de las pruebas nociceptivas y anticonvulsivas utilizadas.....	47
Figura 15. Estructura química de los compuestos evaluados en la prueba de estiramiento abdominal y placa caliente.....	50
Figura 16, Figura 17. Efecto antinociceptivo de los compuestos 1, 5 y 6 en la prueba de estiramiento abdominal.....	52
Figura 18, Figura 19. Efecto antinociceptivo de los compuestos 1, 5 y 6 en la prueba de la placa caliente.....	54
Figura 20. Participación de receptores opioides en el efecto antinociceptivo del compuesto 1.....	56
Figura 21. Estructura química de los compuestos evaluados en la prueba de la formalina.....	57
Figura 22, Figura 23. Efecto antinociceptivo de los compuestos 1, 2, 3 y 4 en la prueba de la formalina.....	57
Figura 24. Efecto antinociceptivo del compuesto 1 en la prueba de capsaicina.....	60
Figura 25. Efecto anticonvulsivo del compuesto 1 en la prueba de convulsiones por pentilentetrazol.....	62

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Historia de los cannabinoides.....	11
Tabla 2. Análogos N-aril sustituidos del la palmitoiletanolamida.....	37
Tabla 3. Efecto antinociceptivo de los compuestos 1, 2, 3 y 4 en la prueba de la formalina.....	58

ÍNDICE DE DIAGRAMAS

Diagrama 1. Evaluación del efecto antinociceptivo de los compuestos 1, 5 y 6 en ratón, en la prueba de estiramiento abdominal.....	41
Diagrama 2. Evaluación del efecto antinociceptivo de los compuestos 1, 5 y 6 en ratón, en la prueba de la placa caliente.....	43
Diagrama 3. Evaluación del efecto antinociceptivo de los compuestos 1, 2, 3 y 4 en rata, en la prueba de la formalina.....	44
Diagrama 4. Evaluación del efecto antinociceptivo del compuesto 1 en ratón, en la prueba de la capsaicina.....	46
Diagrama 5. Evaluación del efecto anticonvulsivo del compuesto 1 en ratón.....	48

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Características de algunos modelos nociceptivos.....	29
Cuadro 2. Relación de análogos de PEA con respecto a la inhibición del metabolismo de la anandamida.....	39

NOTACIONES EMPLEADAS

2-AG	2-araquidonil-glicerol
ABC	Área bajo la curva
AC	Adenilciclase
AEA	Anandamida
ALIAmida	Amida antagonista de la inflamación local autacoide
AMP	Adenosina monofosfato
AMPC	Adenosina monofosfato cíclico
ASIC's	Canales iónicos sensibles a ácido
ATP	Adenosina trifosfato
CB ₁	Receptor a cannabinoides 1 (cannabinoid binding 1)
CB ₂	Receptor a cannabinoides 2 (cannabinoid binding 2)
CGRP	(Calcitonin gen related peptid)
COX	Ciclooxigenasa
DG	Diacil glicerol
FAAH	Enzima amidohidrolasa de ácidos grasos (fatty acid amide hidrolase)
GMPc	Guanosin monofosfato cíclico
GPCR	Receptores acoplados a proteína G (G-protein-coupled receptors)
IL-1	Interleucina 1
IL-6	Interleucina 6
LIF	Factor inhibidor de leucemia

NADA	N-araquidonil-dopamina
NGF	Factor de crecimiento neuronal
NLX	Naloxona
NMDA	N-metil-D-ácido aspártico
NPY	Neuropéptido Y
NT	Neurotransmisor
OLDA	N-oleoildopamina
PG	Prostaglandina
PKA	Proteíncinasa
PKC	Proteíncinasa C
PTZ	Pentilentetrazol
SGPA	Sustancia gris periacueductal
SIDA	Síndrome de inmunodeficiencia adquirido
SNC	Sistema nervioso central
SSI	Solución salina isotónica
THC	Tetrahidrocannabinol
TRP	Receptor potencial transitorio
VR	Receptores vanilloides

I. RESUMEN

En el presente trabajo se evaluó la actividad antinociceptiva de 6 análogos N-aril sustituidos de la palmitoiletanolamida: *N*-(4-metoxi-2-nitrofenil)hexadecanamida (**1**), *N*-(2-nitrofenil)hexadecanamida (**2**), *N*-[2-nitro-5-(trifluorometil)fenil]hexadecanamida (**3**), *N*-[(5-cloro-2-nitro)fenil]hexadecanamida (**4**), ácido 4-amino-3-(palmitoilamino)benzoico (**5**) y ácido 2-amino-3-(palmitoilamino)benzoico (**6**), mediante las pruebas experimentales de nocicepción siguientes: estiramiento abdominal, placa caliente, formalina y capsaicina en roedores.

Los compuestos **1**, **5** y **6** produjeron efecto antinociceptivo significativo en la prueba de estiramiento abdominal y la placa caliente en ratones. El compuesto **1** generó la máxima actividad antinociceptiva, este compuesto presenta un sustituyente 2-nitro en el arilo en contraste con los compuestos **5** y **6** que además de ser ácidos presentan un grupo amino en el arilo. El efecto antinociceptivo no se modificó por el cambio de la posición del grupo nitro en el arilo, los compuestos **1**, **2**, **3** y **4** produjeron un efecto antinociceptivo similar en la prueba de la formalina en ratas.

Adicionalmente, el compuesto **1** demostró una tendencia antinociceptiva en ratones evaluados en la prueba de la capsaicina y además previene la generación de convulsiones inducidas con pentilentetrazol (PTZ). Este efecto podría ser mediado por receptores a opioides debido a que su efecto se bloqueó por un pre-tratamiento con naloxona (NLX) antagonista de opioides en la prueba de la placa caliente.

Los datos obtenidos en el presente trabajo permitieron identificar un grupo de compuestos con actividad antinociceptiva que sugiere podrían tener utilidad terapéutica analgésica y antiinflamatoria. El compuesto **1**, por tener propiedades antinociceptivas en la prueba de la capsaicina, podría ser útil para el tratamiento del dolor neurogénico, así como también en el tratamiento de la epilepsia, por sus propiedades anticonvulsivas.

II. INTRODUCCIÓN

La búsqueda de fármacos analgésicos y/o antiinflamatorios con mejor eficacia y/o mayor potencia es una actividad continua en la farmacología. Aún cuando existe una gran variedad de éstos, muchos de ellos presentan efectos secundarios, efectos colaterales y reacciones adversas. La búsqueda es imprescindible para el tratamiento del dolor neurogénico o neuropático, ya que actualmente no se cuenta con una terapéutica adecuada.

El empleo de la planta *Cannabis sativa* como remedio para distintas patologías está documentado desde hace mucho tiempo. Sin duda, el efecto analgésico es históricamente el más documentado tanto en las antiguas civilizaciones asiáticas, como en occidente. Sin embargo, actualmente su utilidad clínica es polémica debido a los efectos psicotrópicos que genera, por lo que es considerada como una sustancia de abuso más que una alternativa terapéutica (Di Marzo, 2006).

Anandamida es un endocannabinoide que actúa en los receptores a cannabinoideos CB₁ y CB₂. Anandamida es hidrolizada por una enzima conocida como FAAH a etanolamida y ácido palmítico. Se ha sugerido que palmitoiletanolamida (PEA) tiene actividad en algunos receptores CB₂ no caracterizados, también en los receptores PPAR γ (Receptores activados por proliferadores de peroxisomas gamma, por sus siglas en inglés), e inhibe la FAAH. (Costa et al., 2008). Se ha demostrado que la inhibición de FAAH trae como consecuencia una acumulación de anandamida (Lambert et al., 2002), la cual participa importantemente en la actividad antiinflamatoria y antinociceptiva tanto *in vivo* como *in vitro*. Se ha propuesto que esto se debe a, entre otros mecanismos de acción, la activación de los receptores CB₁ y CB₂ (Franjo, 2006).

En el presente trabajo se presenta la evaluación preliminar del efecto antinociceptivo de 6 análogos de palmitoiletanolamida. PEA y sus análogos inhiben la hidrólisis de anandamida (Duarte-Fajardo, 2006), por lo que resultó interesante investigar si éstos compuestos tenían propiedades antinociceptivas *in vivo* que pueden ser útiles como alternativa terapéutica.

III. ANTECEDENTES

3.1 Dolor

El dolor es “Una experiencia sensorial y emocional desagradable asociada a daño tisular real o potencial que puede ser descrita en términos de la magnitud del daño” (Merskey, 1979). El cual puede ser *adaptativo* cuando el dolor que contribuye a la supervivencia, protege al organismo o promueve su recuperación cuando el daño ha ocurrido y *no adaptativo* se refiere al dolor que resulta de una operación patológica del sistema nervioso y es considerado como una enfermedad.

3.1.1 Tipos de dolor

- I. ***Dolor nociceptivo***: es el dolor transitorio que se presenta en respuesta a estímulos nocivos. Este tipo de dolor funciona como un sistema de alarma que anuncia la presencia de estímulos potencialmente dañinos y cumple una función protectora porque permite evitar el daño en el tejido (Fig. 1).
- II. ***Dolor inflamatorio***: es un dolor espontáneo e hipersensibilidad que se presenta en respuesta a inflamación y daño tisular. Este tipo de dolor previene el contacto o el movimiento de la región afectada al menos hasta que se reestablece el tejido, favoreciendo así su reparación y la disminución del daño ya ocasionado (Fig. 1).
- III. ***Dolor Patológico***:
 - Neuropático***: se refiere al dolor espontáneo e hipersensibilidad al dolor asociado al daño o lesión del sistema nervioso. El dolor neuropático puede resultar de lesiones ya sea en el sistema nervioso periférico (polineuropatía diabética) o en el sistema nervioso central (lesiones en la médula espinal o esclerosis múltiple) (Fig. 1).

Funcional: se caracteriza por una hipersensibilidad al dolor que resulta de un procesamiento central alterado. El dolor en este caso es debido a una sensibilidad o función anormal del sistema nervioso central (SNC) (por ej. la migraña) (Fig. 1) (Kennedy, 2007; Woolf, 2010).

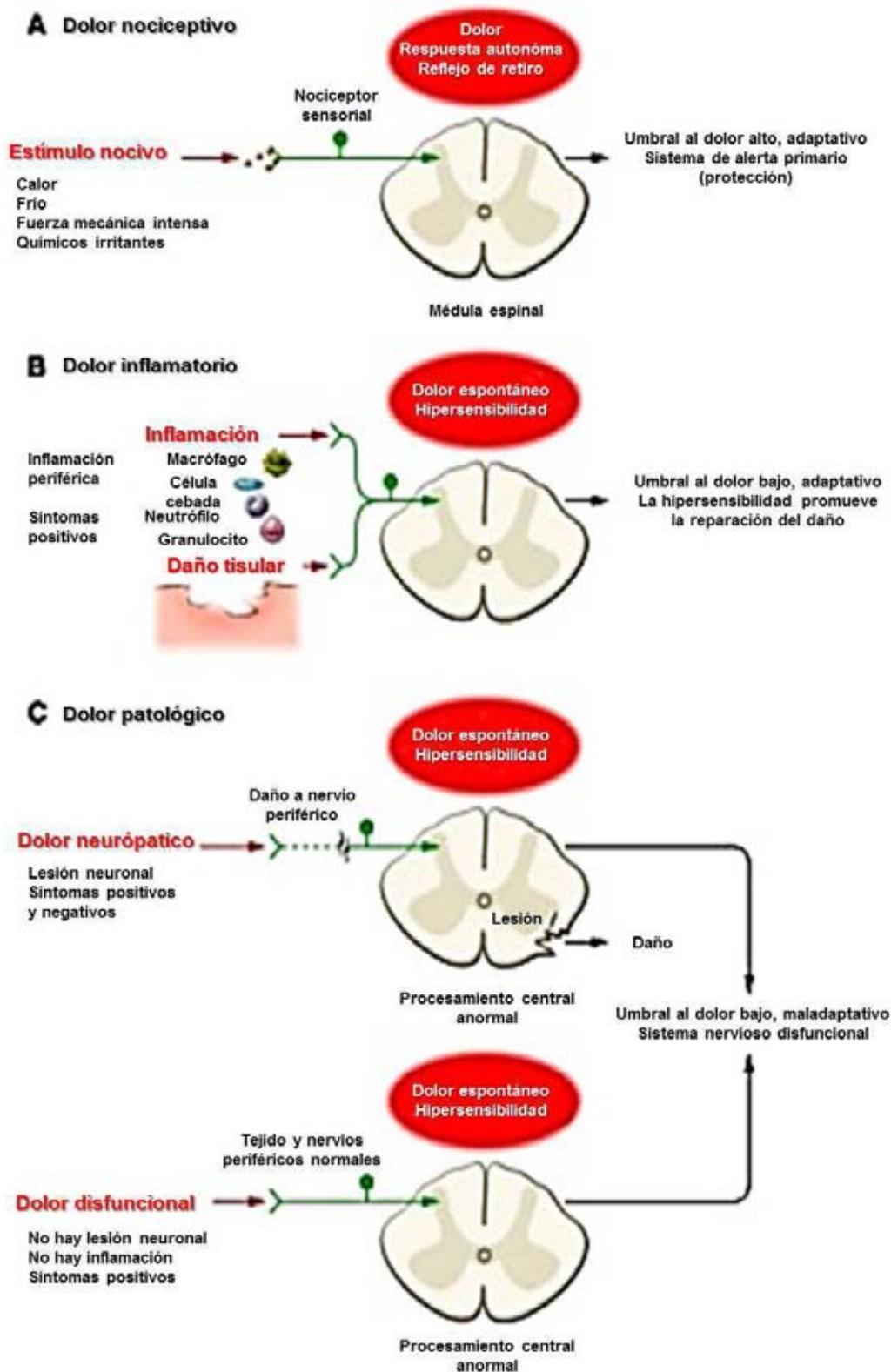


Figura 1. Tipos primarios de dolor. Modificado de Woolf, 2010.

Nocicepción

Al componente sensorial del dolor se le denomina nocicepción. Este es un proceso neurofisiológico que se refiere a los mecanismos neuronales por los cuales se detectan los estímulos nocivos e involucra la transducción de impulsos nerviosos por terminales periféricas o nociceptores (Hyman y Cassen, 1995).

3.1.2 Nociceptores

Los nociceptores son una subpoblación de neuronas sensitivas primarias que se activan por estímulos nocivos. Estas neuronas poseen características de umbral y sensibilidades que las distinguen de otras fibras nerviosas sensoriales (Weidner et al., 1999), además de ser extremadamente heterogéneas, difieren en su contenido de neurotransmisores, en los receptores y canales iónicos que expresan, en su velocidad de conducción y en su capacidad de sensibilización durante la inflamación, daño y enfermedad (Stucky, 2001). Este tipo de neuronas tiene la capacidad de detectar un amplio rango de modalidades de estímulos ya sea de naturaleza física o química (polimodales). Los nociceptores se encuentran distribuidos en todo el cuerpo a diferencia de las neuronas sensitivas no-nociceptoras. Sus cuerpos celulares están localizados en el ganglio de la raíz dorsal de donde se proyectan sus axones hacia la periferia o a la médula espinal (Levine et al., 1993).

Los nociceptores son los únicos que llevan a cabo la regulación de sus propiedades receptoras (Sherrington, 1996). Aunado a esto no solo señalan el dolor agudo, sino también contribuyen a condiciones de dolor persistente como la hiperalgesia y la alodinia (Basbaum y Woolf, 1999; Basbaum y Jessell, 2000). Los nociceptores están localizados principalmente en cuatro zonas del cuerpo: la piel (cutáneos), las estructuras músculo-esqueléticas, el músculo-visceral y las vísceras (Fields y Martín, 1994; Hyman y Cassen, 1995).

Además, pueden contener uno de los distintos tipos de axones, que dependiendo de su diámetro y grado de mielinización se clasifican en cuatro grupos principales que son: fibras A α , A β , A δ y C (Julius y Basbaum, 2001).

- I. **Fibras A α y A β** : Mielinizadas, de diámetro grande, son las encargadas de la propiocepción y tacto ligero, conducen a una velocidad de 30-120 m/s.
- II. **Fibras A δ** : Poco mielinizadas, diámetro medio, encargadas de nocicepción (mecánica, térmica y química) y conducen a una velocidad de 6-30 m/s.
- III. **Fibras C**: Fibras amielínicas de diámetro pequeño, se encargan de nocicepción (mecánica, térmica y química), así como de detectar estímulos inocuos de temperatura y conducen a una velocidad de 0.5-2 m/s (Julius y Basbaum, 2001).

3.2 Transmisión del dolor

El dolor se transmite a través de cuatro procesos fisiológicos los cuales se describen a continuación. Primero el estímulo nocivo activa directamente las terminaciones sensitivas periféricas de los nociceptores aferentes primarios. En la zona de interacción del estímulo nocivo con el nociceptor se lleva a cabo la **transducción** de la señal nociceptiva a potenciales de acción. En este proceso participan la activación de canales iónicos y de receptores de membrana. Posteriormente los potenciales de acción generados se **transmiten** por el nervio periférico a la médula espinal en donde se lleva a cabo un proceso de **modulación**. En el asta dorsal de la médula espinal hacen sinápsis las terminales de las aferentes sensoriales con neuronas de segundo orden que forman parte de las vías ascendentes del dolor, para después llegar a centros superiores como el tálamo y corteza somatosensorial donde se lleva a cabo el proceso de **percepción** (Fig. 2) (Hyman y Cassem, 1995).

Los estímulos nocivos activan a los nociceptores (fibras A δ y C), la señal se traduce y llega al asta dorsal de la médula espinal (primer centro de relevo). Ahí se conectan neuronas aferentes primarias con neuronas cuyas proyecciones axónicas forman las vías ascendentes que se encargan de llevar la señal nociceptiva a centros superiores. Posteriormente, la señal viaja en sentido contrario a través de fibras que forman las vías descendentes. Estas vías tienen como destino la médula espinal (Kandel et al., 2000).

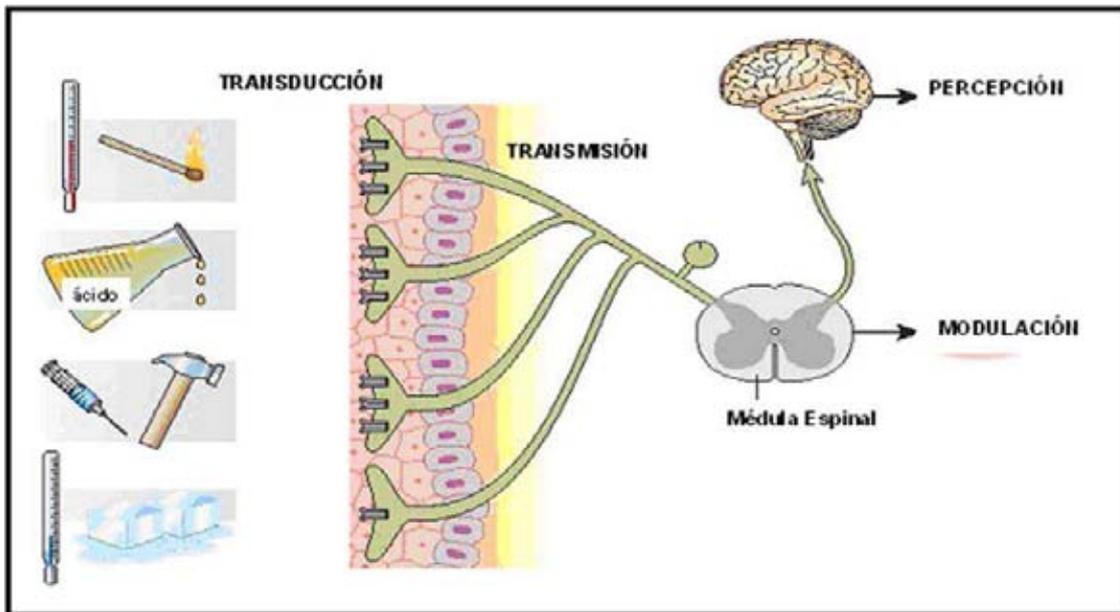


Figura 2. Sistema de transmisión del dolor: Transducción, el estímulo doloroso (término, mecánico o químico) es transformado en potenciales de acción en las terminales de fibras aferentes periféricas; Transmisión, los potenciales de acción viajan a través de la aferente primaria hasta llegar a la médula espinal; Modulación, en la médula espinal se forman sinapsis con neuronas que suben a centros superiores; Percepción, integración de la señal nociceptiva en la corteza somatosensorial (Modificado de Woolf y Salter, 2000).

3.3.1 Vía ascendente y descendente de la nocicepción

Cuando los nociceptores localizados en la periferia reciben un estímulo nocivo este se dirige hacia la médula espinal. La transmisión de la nocicepción hacia centros superiores se origina de diferentes láminas de la médula espinal: tracto espinotalámico, tracto espinoreticular, tracto espinomesencefálico y tracto espinocervical (Kandel et al., 2000).

Una vez que el estímulo llega al cerebro, la nocicepción se modula básicamente por tres componentes:

- I. Las neuronas en el periventricular y sustancia gris periacueductal en el cerebro medio que hacen conexiones excitatorias en la médula rostroventral, una región que incluye el núcleo del rafe magno serotoninérgico y el núcleo adyacente reticularis paragigantocelular.
- II. Neuronas en la médula rostroventral hacen conexiones inhibitorias en la lámina I, II y V del asta dorsal. Estas láminas también son el sitio de terminación de neuronas aferentes nociceptivas. La estimulación de las neuronas rostroventrales

medulares inhiben neuronas del asta dorsal incluyendo neuronas del tracto espinotalámico que responden a estimulación nociva.

- III. Otro sistema de fibras descendentes originado en la médula y puente también terminan en láminas superficiales del asta dorsal y suprimen la actividad en neuronas nociceptivas del asta dorsal y circuitos locales en el asta dorsal median las acciones moduladoras de las vías descendentes (Kandel et al., 2000).

3.4 Proceso de sensibilización

Una estimulación nociva repetida produce incrementos prolongados en la excitabilidad de las neuronas aferentes primarias, a lo que se conoce como *sensibilización* y se manifiesta por un incremento en la actividad espontánea, una disminución del umbral de activación y un incremento y prolongación del disparo originado por estímulos supraumbral (LaMotte et al., 1983). La sensibilización de los nociceptores posterior al daño o inflamación produce liberación de una variedad de mediadores químicos. Estos agentes tienen diferentes orígenes celulares, pero todos ellos actúan disminuyendo el umbral de activación del nociceptor y algunas veces activando otros nociceptores (Levine et al., 1993).

3.5 Inflamación

El proceso inflamatorio se da cuando en respuesta a daño tisular se libera una mezcla compleja de citocinas y otros agentes neuroactivos provenientes de células inflamatorias y no inflamatorias (fibroblastos, células cebadas, plaquetas y neutrófilos) (Bevan, 1999). Estos mediadores son químicamente diversos y actúan sobre receptores específicos y canales iónicos que se encuentran en la terminal periférica de los nociceptores.

Una vez que los receptores se activan, se inician varias cascadas de transducción de señales que resultan en modulación postraducciona inmediata de moléculas efectoras y posteriormente en cambios en la transcripción de genes (Mano y Driscoll,

1999). La inflamación inicia cuando el tejido dañado libera protones y ATP, estos agentes pueden despolarizar directamente la aferente primaria por activación de los receptores ASIC's (canales iónicos sensibles a ácido) o P2X3, respectivamente (Waldmann y Lazdunski, 1998; Burnstock et al., 1996). Los mastocitos liberan aminas como la serotonina e histamina y metabolitos del ácido araquidónico como las prostaglandinas (Dray et al., 1998; Bley et al., 1998). Por su parte, la ciclooxigenasa 2 se induce en el tejido inflamado y las prostaglandinas E2 se liberan de las células dañadas produciendo hiperalgesia y sensibilización de los nociceptores (O' Banion, 1999). Los macrófagos se suman a la sopa inflamatoria con la liberación de citocinas como interleucina 1 (IL-1), interleucina 6 (IL-6), factor de necrosis tumoral (TNF α) y factores de crecimiento como son el factor de crecimiento neuronal (NGF) y el factor inhibidor de leucemia (LIF) (Dray, 1995). Las interleucinas clasificadas como citocinas, estimulan la proliferación y síntesis de proteínas en una variedad de células. Además, se producen por leucocitos y otras células en respuesta a infección, exposición a toxinas bacterianas y mediadores inflamatorios (Dinarello, 1989). La IL-1 β es un potente agente hiperalgésico con un probable sitio de acción periférico (Ferreira et al., 1988).

La bradicinina proveniente de cininógenos es uno de los agentes más activos para producir dolor y se libera de múltiples tipos celulares como los mastocitos, macrófagos e inclusive del propio tejido dañado (Walker et al., 1995). Activa dos tipos de receptores B1 y B2 siendo éste último al que se atribuye la generación de diacilglicerol (DG) y la activación de proteína cinasa C (PKC) para producir un aumento en la conductancia de Na⁺ (Dray, 1988). Además, la bradicinina actúa sobre fibras A δ y C para incrementar la síntesis y liberación de prostaglandinas de células vecinas. Todos los agentes antes mencionados pueden actuar solos o en combinación sobre los nociceptores para sensibilizarlos y facilitar que actúen otros mediadores (Kidd y Urban, 2001).

3.6. Los cannabinoides

El uso de los derivados de *Cannabis sativa* como remedio de diversas dolencias data de más de tres mil años aproximadamente, en esta planta se ha encontrado una gran cantidad de sustancias psicoactivas, que generan diversos efectos como: euforia, percepción alterada, sedación, deterioro de la memoria, analgesia, antihemesis y estimulación del apetito (Ortiz-Mesina, 2005; Chiou L.C, 2013) En la Tabla 1 se resume algunos aspectos históricos importantes sobre la investigación de los cannabinoides.

Uno de los metabolitos activos más importantes que se han identificado en *Cannabis sativa* es el Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC), al cual se le atribuyen muchas de las propiedades terapéuticas y psicoactivas por el consumo de la planta. La utilidad clínica de este metabolito es limitada debido a que no se cuenta con mucha información. La mayor parte de la evidencia acumulada en las últimas décadas procede de historias clínicas o casos particulares, existiendo pocos ensayos controlados con cannabinoides (ya sean extractos de cannabis o derivados aislados) (Moreno-Brea y Micó, 2002).

Actualmente se discute seriamente en varios países la legalización de la planta *Cannabis sativa* para el tratamiento de las náuseas y el vómito en pacientes bajo tratamiento antineoplásico, para prevenir la pérdida de peso en pacientes con SIDA, o para aliviar la espasticidad en pacientes con esclerosis múltiple. Esta utilidad clínica constituye un aliciente para la búsqueda de derivados activos de los ligandos cerebrales de los receptores a cannabinoides. Actualmente, están disponibles el dronabinol y la nabilona como cannabinoides para uso clínico, pero existen pocos estudios acerca de su efectividad real. La idea detrás de los estudios que pretenden desarrollar nuevos fármacos, es disociar los diversos efectos de la molécula original. Por ejemplo, resulta atractivo obtener un fármaco que mantenga el poder antiemético de *Cannabis sativa*, sin producir efectos de tipo psicotrópico (Chiou L.C, 2013).

Tabla 1. Historia de los cannabinoides (Modificado de Di Marzo, 2006).

Año	Suceso histórico	Autor/Año
200	La farmacopea China describe las propiedades terapéuticas del <i>Cannabis</i>	
1838-1840	Se evalúa las propiedades medicinales del cannabis. En 1899 se aísla el cannabinoide de la resina del <i>Cannabis</i>	O'Shaughnessy, 1838–1840
1932	Se elucida parte de la estructura del cannabinoide	Hanus y Mechoulam, 2005
1940	Se elucida y sintetizan el cannabinoide en Estados Unidos	Loewe y Adams., 1947
1964	Se elucida la estructura del Δ^9 -tetrahidrocanabinoide	Jacob y Todd, 1940; Adams et al, 1940
1970-1990	Se investiga la Farmacología de los cannabinoides	Howlett et al., 2004
1988	Se identifican los sitios de unión para el Δ^9 -tetrahidrocannabinoide en el cerebro	Howlett et al., 2004
1990	Se clona el receptor CB ₁	Matsuda et al., 1990
1992	Se identifica a la anandamida como endocannabinoide	Devane et al., 1992
1994	Se sintetiza el primer antagonista del receptor CB ₁	Rinaldi-Carmona et al., 1994
1995	Se identifica otro endocannabinoide, el 2 araquidonil-glicerol (2-AG)	Sugiura et al., 1995
1996	Se clona la enzima que degrada a los endocannabinoides (FAAH)	Cravatt et al., 1996
1998	Se propone la existencia de la relación entre receptores endocannabinoides y vanilloides	Di Marzo et al., 2006
1999-2000	Se demuestra que la anandamida activa receptores vanilloides	Zygmunt et al., 1999
2003	Se clona las enzimas que biosintetizan endocannabinoides	Bisogno et al., 2003
2005	Se aprueba el uso de Sativex ® en Canadá y se regula el uso del rimonabant en Estados Unidos, medicamentos con principios activos de Cannabis. Se descubre un sitio alostérico para el receptor CB ₁	Carai et al., 2005 Price et al., 2005
2006...	Se clonan nuevos receptores a cannabinoides; se identifican otras enzimas que sintetizan endocannabinoides; se clonan transportadores de endocannabinoides y se investigan terapias basadas en endocannabinoides.	

3.6.1 Tipos de cannabinoides

Los cannabinoides fueron considerados al principio como uno de los más típicos compuestos del tipo C-21 presentes en *Cannabis sativa*. La definición actual empleada pone más énfasis en su estructura química y en su farmacología, y engloba otros compuestos con formas parecidas y cualquiera que actúe sobre los receptores a cannabinoides. Esto ha dado lugar a varias subcategorías químicas, según sus distintas estructuras, de compuestos naturales y sintéticos. Existen dos tipos de cannabinoides, los endocannabinoides y los exocannabinoides o también llamados fitocannabinoides, esta clasificación es debido a su naturaleza u origen.

Endocannabinoides. La identificación de sitios específicos de unión para los cannabinoides en la superficie de muchos tipos celulares permitió suponer la existencia de sustancias endógenas. El sistema endocannabinoide está constituido por receptores específicos denominados CB₁ y CB₂. Los endocannabinoides son derivados de ácidos grasos poli-insaturados como el ácido araquidónico, lo que diferencia estructuralmente de los fitocannabinoides (Franjo, 2006). Entre los endocannabinoides identificados hasta el momento se encuentran la anandamida (N-araquidonil-etanolamida, AEA), el 2-araquidonil-glicerol (2-AG), el éter del 2-araquidonil-glicerol (éter de noladín), el O-araquidonil etanolamina (virodhamina), y la N-araquidonil-dopamina (NADA). La anandamida y la NADA no sólo se acoplan a los receptores cannabinoides sino que también comparten la habilidad de activar a receptores vanilloides, en la Figura 3 se muestran las estructuras químicas de estos compuestos.

Exocannabinoides. La marihuana es una mezcla gris verdosa de hojas, tallos, semillas y flores secas y picadas de la planta de cáñamo, *Cannabis sativa*. El cannabis actualmente se encuentra entre las tres drogas más ampliamente utilizadas junto con el alcohol y el tabaco siendo habitual que su consumo se realice a menudo junto con el de otras drogas. La marihuana también se utiliza para hacer una infusión y a veces se mezcla en los alimentos. De esta planta se han aislado cerca de 70 cannabinoides, pero de todos ellos el más importante es el Δ -9-tetrahidrocannabinol (THC) con mayor potencia psicoactiva y por tanto causa los efectos de alteración mental que acompañan la intoxicación con marihuana. La estructura química del THC (Fig. 4) ha servido de referencia para la síntesis de otras sustancias que actúan

en el sistema endocannabinoide. Se consideran también como exocannabinoides a todos los análogos estructurales que pueden unirse al sistema endocannabinoide aún cuando su estructura química no sea la de THC.

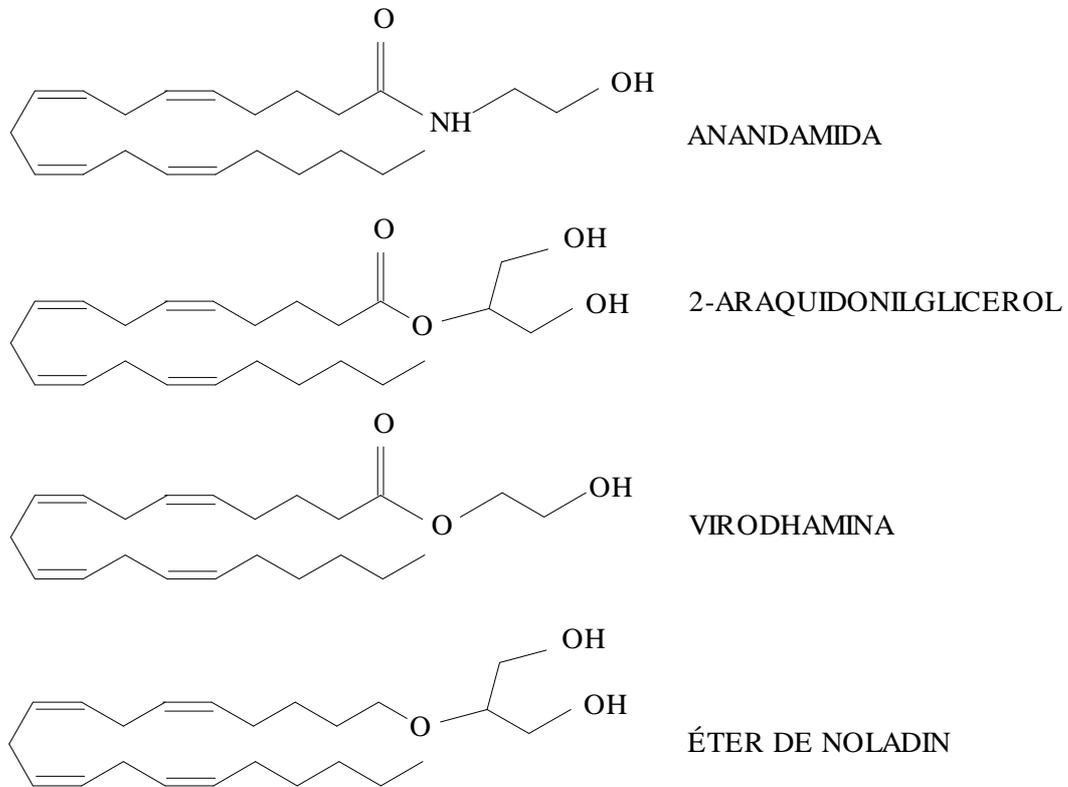


Figura 3. Estructura química de algunos cannabinoides endógenos. Anandamida, 2 araquidonilglicerol, virodhamina y éter de noladin, todos ellos derivados de ácido araquidónico y ligandos endógenos de los receptores CB₁ y CB₂ (Modificado de Freund et al., 2003).

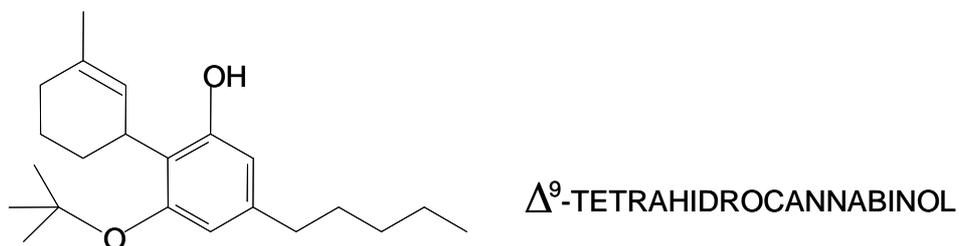


Figura 4. Estructura química de Δ^9 -tetrahydrocannabinol. Cannabinoide exógeno, extraído de la planta *Cannabis sativa* y agonista a los receptores a cannabinoides, principalmente a CB₁ (Modificado de Buxbaum, 1973).

3.6.2 Receptores a cannabinoides

El estudio de los cannabinoides llevó a proponer la existencia de receptores específicos para estas sustancias a nivel de SNC. En 1990 se identificó por clonación el primer receptor a cannabinoides en tejido nervioso, el cual se conoce como CB₁ (*cannabinoid binding 1*). En 1993, otro receptor a cannabinoides, denominado CB₂ fue clonado a partir de células del sistema inmune (Munro et al, 1993). En la figura 5 se muestran las representaciones de los receptores cannabinoides CB₁ y CB₂.

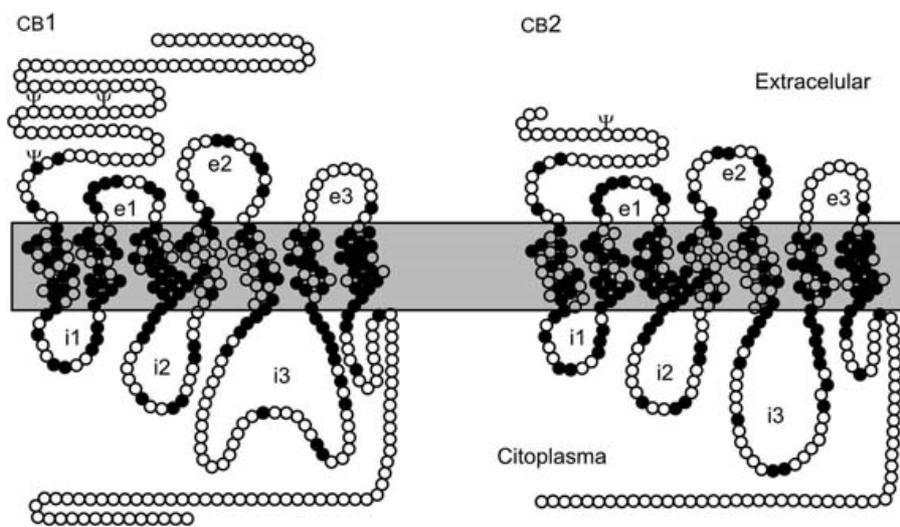


Figura 5. Representación esquemática de los receptores CB₁ y CB₂. Los receptores tienen siete segmentos transmembrana. ● Aminoácidos comunes a los dos receptores; ○ aminoácidos diferentes; Ψ sitios consenso de glicosilación. e1, e2, e3 son asas extracelulares; i1, i2, i3 son asas intracelulares (Rodríguez et al., 2005)

Receptores CB₁. Se localiza principalmente en las neuronas del cerebro y la médula espinal; aunque también están presentes en ciertos órganos y tejidos periféricos, como las glándulas endocrinas, glándulas salivales, leucocitos, bazo, corazón y en determinadas zonas del aparato reproductor, así como en el sistema urinario y gastrointestinal (Franjo, 2006). Se ha demostrado que los receptores CB₁ localizados en las terminaciones nerviosas, tanto centrales como periféricas, inhiben la liberación de otros neurotransmisores. De esta manera, la activación de los receptores CB₁ protege al sistema nervioso contra sobre-activación o sobre-inhibición provocado por otros neurotransmisores. Se ha demostrado que la activación de este subtipo de receptor

ocasiona los efectos psicotrópicos y cardiovasculares por la administración de *Cannabis sativa* (Franjo, 2006).

Receptores CB₂. Se encuentran principalmente en las células inmunitarias, entre ellas los leucocitos, el bazo, la microglía y las amígdalas (Rodríguez y Carrillo, 2005); una de las funciones de estos receptores en el sistema inmunitario es la modulación de la liberación de las citocinas, responsables de la inflamación y la regulación del sistema inmunológico. Puesto que los compuestos agonistas de los receptores CB₂ no están presentes en el SNC, se activan selectivamente sin causar efectos psicológicos, por lo cual, este receptor se está convirtiendo cada vez más en un blanco terapéutico, principalmente como analgésico, antiinflamatorio y antineoplásico (Franjo, 2006).

3.6.3 Mecanismo de acción de los cannabinoides.

Ambos tipos de receptores, CB₁ y CB₂, pertenecen a la extensa familia de receptores acoplados a una proteína G. La unión de los cannabinoides a sus receptores desencadena una cascada de segundos mensajeros. Inicialmente activan una proteína G que a través de la subunidad α , modula la actividad de la adenilato ciclasa (AC), la cual a su vez, regula los niveles de adenosin monofosfato cíclico (AMPc) que modula la actividad de la proteína cinasa A (PKA). Finalmente, la activación de cinasas lleva a la fosforilación de diversas proteínas, incluyendo canales iónicos, proteínas de vesículas sinápticas, proteínas que regulan la transcripción genética y enzimas. Se ha demostrado que los cannabinoides también inhiben canales de calcio dependientes de voltaje tipo N, P, Q y L y que pueden activar o inhibir corrientes de potasio. En la Figura 6 y 7 se esquematiza el mecanismo de cada uno de estos receptores.

La acción de los endocannabinoides termina cuando son removidos hacia el espacio intracelular y ahí son degradados enzimáticamente, principalmente por la enzima FAAH. Actualmente se conocen dos enzimas que tienen la capacidad de metabolizar endocannabinoides, y son la FAAH y monoglicérido lipasa (MGL), quienes degradan preferentemente anandamida y 2-Araquidonilglicerol (2-AG) respectivamente (Jayamanne et al. 2006).

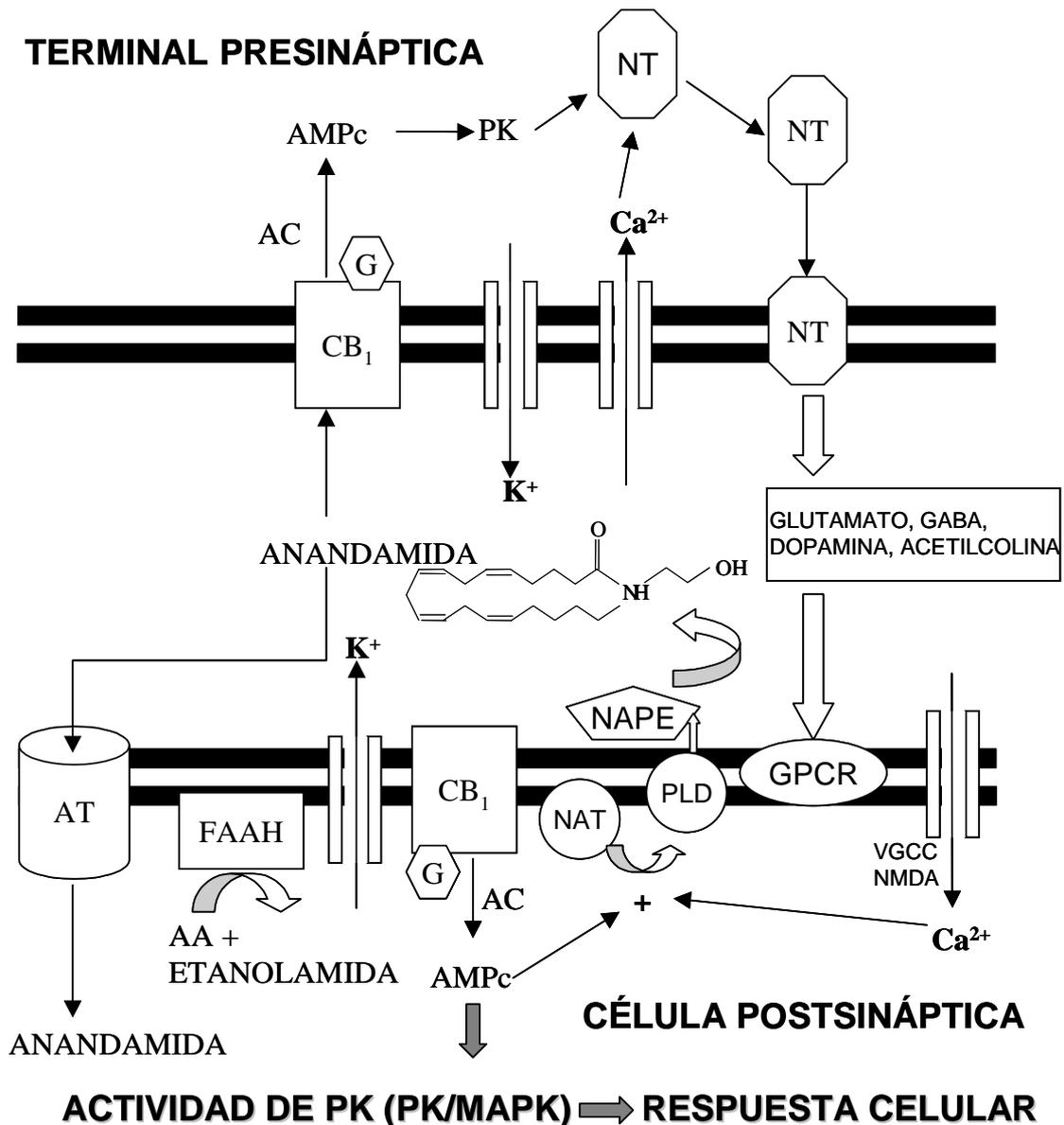


Figura 6. Mecanismo de acción de la activación de receptores CB₁. La figura muestra algunas rutas bioquímicas de síntesis, degradación y actividad celular del endocannabinoide anandamida.

1. La anandamida es liberada por un precursor lípidico de membrana (*N*-araquidonil-fosfatidiletanolamina, NAPE) por la acción de una fosfolipasa específica D (PLD), la cual a su vez es activada por la despolarización provocada por la estimulación del receptor acoplado a proteína G (GPCR). La biosíntesis del precursor NAPE es catalizada por una enzima de la membrana, *N*-acetiltransferasa (NAT) activada por el calcio (Ca²⁺) y el AMPc.
2. La anandamida actúa como un mensajero retrogrado en los receptores a cannabinoides CB₁ de la terminal presináptica, donde regula la liberación de los neurotransmisores (NT) a través de un segundo sistema de transducción [principalmente por el calcio que se incorpora a través de canales de calcio (VGCC) o de glutamato NMDA (*N*-metil-*D*-aspartato)].
3. La anandamida también actúa como neuromodulador de NT como dopamina; en la célula postsináptica, donde es regulada la plasticidad de esta área a través de la modulación de los canales de calcio (Ca²⁺), y la regulación del amplio espectro de las proteincinasas (PK), incluyendo la proteincinasa A (PKA) y la proteincinasa activada por mitógeno (MAPK).
4. La acción de la anandamida termina en dos etapas del proceso, la primera es por la entrada a la célula a través de un transportador de anandamida específico (AT), y la segunda es por la degradación vía enzimática por la amidohidrolasa de ácidos grasos (FAAH), degradándola en ácido araquidónico (AA) y etanolamida (Modificado de Howlett et al., 1999; Howlett et al., 2004)

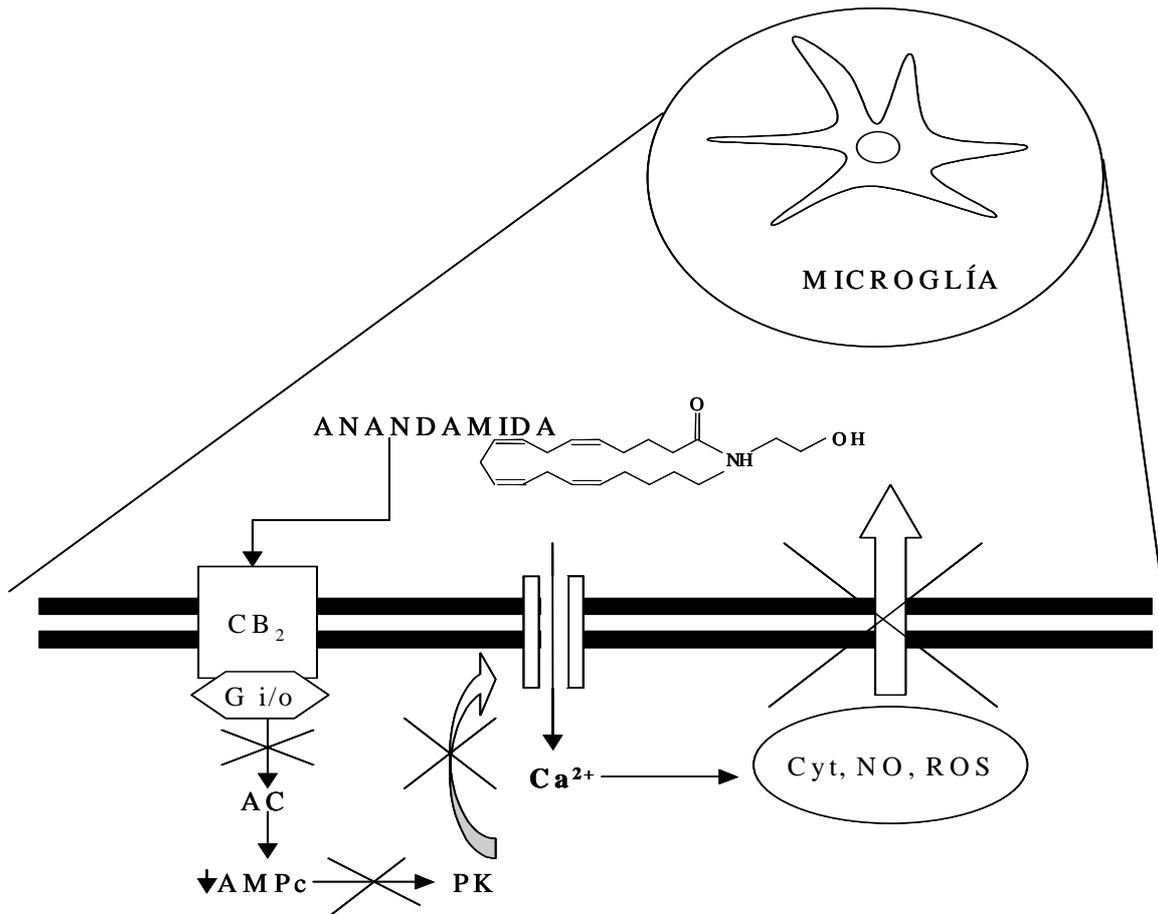


Figura 7. Mecanismo de acción de la activación de los receptores CB₂. La figura muestra la activación celular del endocannabinoide anandamida. Cuando la anandamida ocupa el receptor CB₂ ubicados en la microglía, el cual está acoplado a proteína G i/o, se inhibe la estimulación de adenilciclasa (AC) disminuyendo la cantidad de AMPc, por lo tanto no hay activación de proteincinasas (PK), evitando así la activación de canales de calcio (Ca²⁺), con estas condiciones no se presenta una despolarización en la célula y por ende no se permite la liberación de citocinas (Cyt), óxido nítrico (NO) y especies reactivas de oxígeno (ROS) (Modificado de Howlett et al., 1999; Howlett et al., 2004).

3.6.4 Los cannabinoides y la nocicepción

La nocicepción es el proceso fisiológico del dolor, el cual está constituido por mecanismos periféricos y centrales. Se ha demostrado que la administración de cannabinoides genera antinocicepción (analgesia) en varios modelos experimentales en animales, incluso se ha analizado su posible mecanismo de acción; no solo su interacción con receptores a cannabinoides sino también a vanilloides y opioides (Pertwee, 2001). Debido a los efectos psicotrópicos generados por los agonistas a CB₁, se ha propuesto que la utilidad clínica de los cannabinoides no puede ser práctica para el tratamiento del dolor agudo, por lo que su importancia radica en dolor muy intenso como el neurogénico y el neuropático, ya que en este tipo de dolor no hay una

terapéutica adecuada y los fármacos opioides utilizados para el dolor crónico intenso (dolor asociado a cáncer o SIDA) no funcionan (Reynolds, 2013).

Se ha demostrado a nivel central que los receptores CB₁ tienen una participación muy importante en la modulación de la nocicepción. La administración de agonistas a CB₁ en zonas específicas como la sustancia gris periacueductual y la región Ventromedial Rostral generan antinocicepción. Ambas zonas cerebrales están constituidas por receptores opioides, por lo que se ha sugerido que los cannabinoides y los opioides tienen una estrecha relación en su mecanismo de acción. Por otra parte, a nivel periférico se ha demostrado que agonistas a CB₂ estimulan la liberación de queratinocitos, quienes a su vez liberan β-endorfinas para generar analgesia (Mohab y Porreca, 2007).

Los agonistas cannabinoides CB₁ y CB₂ tienen efectos antinociceptivos en especies animales diferentes (ratón, rata, conejo, gato, perro y mono) (Pertwee, 2001). Estos efectos antinociceptivos de los cannabinoides se han puesto de manifiesto en muchos modelos de comportamiento de nocicepción: los modelos térmicos de la prueba de retirada de cola y de la placa caliente (Buxbaum, 1972), los modelos mecánicos que miden las respuestas motrices (Smith et al., 1998), ácido acético o ácido fórmico (Bicher y Mechoulam, 1968) y los modelos de estimulación eléctrica de la pata.

3.6.5 Los cannabinoides y la inflamación

La inflamación es un proceso complejo en donde intervienen una gran variedad de mediadores, entre los cuales se encuentran la COX, el NO, iones, mediadores inmunológicos, citocinas, mastocitos, entre otros. Se ha demostrado que la administración de palmitoiletanolamida (PEA) reduce el proceso inflamatorio y disminuye el dolor, probablemente por inhibición de la degranulación de mastocitos y por consiguiente la disminución de mediadores pro-inflamatorios como el NO, COX y neutrófilos (Lo Verme et al. 2005).

3.7 Palmitoiletanolamida

La palmitoiletanolamida (PEA) o palmindrol es derivada de ácidos grasos C16:0, su nombre químico es N-(2-hidroxiethyl)hexadecanamida (Fig. 8). PEA fue la primer etanolamida sintetizada por reflujo del ácido palmítico, generando cristales blancos con punto de fusión de 98-99°C.

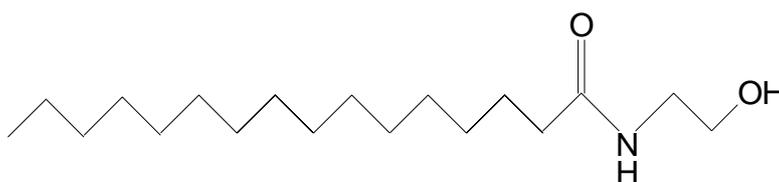


Figura 8. Estructura química de la N-Palmitoiletanolamida (PEA).

La palmitoiletanolamida es un compuesto de origen natural, aislado de la lecitina de soya, yema de huevo y crema de cacahuate, también se encuentra en el cerebro, hígado y músculo esquelético de mamíferos. Se ha encontrado en extractos de corazón canino, en tejido degenerado, pequeñas cantidades en plasma de rata, en fluido cerebroespinal de humano y se ha documentado que los niveles de PEA incrementan en pacientes con esquizofrenia (Lambert et al., 2002). Además de los mamíferos la PEA se ha encontrado en especies Marinas como los moluscos: *Mytilus galloprovincialis*, *Venus verrucosa*, *Tapes decussatus*, *Callista chione*, *Crassostrea* (Sepe et al., 1998).

3.7.1 Biosíntesis y degradación de la palmitoiletanolamida

PEA es producida por condensación de etanolamida y ácido palmítico a través de ATP y un proceso independiente de acetil coenzima A (probablemente la FAAH actúa de manera inversa). Otra ruta análoga es la hidrólisis del precursor fosfolípido, N-palmitoil-fosfatidiletanolamina por una fosfodiesterasa de tipo D (Fig. 9).

PEA al igual que anandamida son de vida corta debido a que su metabolismo es muy rápido. Ambos compuestos normalmente son recapturados inmediatamente

después de la hidrólisis catalizada por la FAAH. Sin embargo, el proceso de recaptura para ambas amidas es diferente. Anandamida es recapturada por células que poseen mecanismos independientes de energía, la eliminación de FAAH puede ocasionar la acumulación de anandamida. Al contrario, al menos el 50% de PEA intracelular es recapturada por un proceso de difusión pasiva que puede ser inhibido por la anandamida y el 2-araquidonilglicerol entre otros compuestos relacionados, la inhibición de la recaptura de PEA puede ser una estrategia farmacológica, para la acción de este compuesto. Así, la inhibición de FAAH puede potenciar el efecto farmacológico de PEA y así elevar la concentración de anandamida (Di Marzo et al., 1994; Costa et al., 2008).

Se ha demostrado que PEA es un agonista endógeno de los receptores a cannabinoides CB₂. La anandamida además de ser agonista a los receptores a cannabinoides también actúa en receptores vanilloides y en canales de K sensibles a anestésicos y ácidos (TASK-1) que se encuentran en el cerebro. Anandamida tiene baja afinidad al sitio de unión de dihidropiridinas y a canales de calcio tipo L. A diferencia de anandamida, PEA no tiene efecto en corrientes de TASK-1 o canales de calcio tipo L, pero si tiene actividad en receptores vanilloides VR1 (Lambert et al., 2002; Ho et al., 2008).

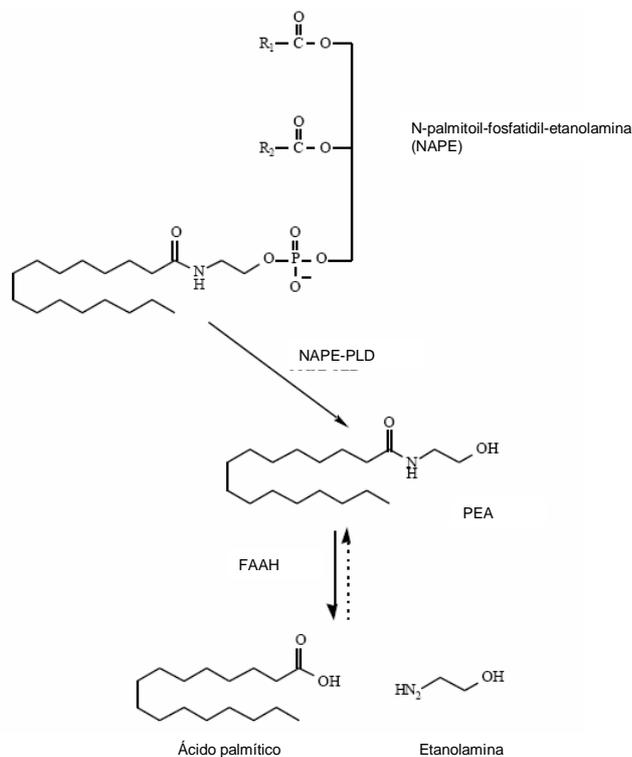


Figura 9. Síntesis y degradación de PEA.

3.7.2 Acciones farmacológicas de la palmitoiletanolamida

Inflamación. Se ha demostrado que PEA disminuye la degranulación y activación de células mastocito así como la extravasación plasmática, producida por la administración local de la sustancia P. Los metabolitos de su hidrólisis (ácido palmítico y etanolamida) no tienen efecto antiinflamatorio, por lo cual, se ha sugerido que PEA actúa como una “ALIAMida” (Amida antagonista de la inflamación local autacoide) (Mazzari et al., 1996). PEA como la anandamida tiene propiedades antiinflamatorias a nivel pulmonar, en donde se ha inducido inflamación por lipopolisacáridos. PEA también disminuye los niveles de citocinas TN- α (Berdyshev et al., 1998) y la liberación de NO en macrófagos que responden a lipopolisacáridos (Ross et al., 2000).

Inflamación y nocicepción. PEA disminuye la hiperalgesia inducida por carragenina, así como el edema inducido por carragenina-formalina y dextrán (Mazzari et al., 1996). La administración local de PEA disminuye la Fase I y II de la prueba de la formalina, este efecto es revertido por antagonistas de los receptores CB₂, por lo cual, se sugiere la participación de éstos receptores en la generación de antinocicepción en esta prueba. Contrariamente, la administración local de anandamida solo disminuye la Fase 1 de la prueba de la formalina y el efecto fue revertido por antagonistas CB₁. Cuando se coadministran PEA y anandamida se genera un efecto antinociceptivo de potenciación (Calignano et al., 1998).

Se ha sugerido que PEA tiene propiedades analgésicas solo cuando el dolor está establecido. Calignano (1998) investigó el efecto de PEA y la anandamida en la prueba de la placa caliente y encontró que solo la administración intracerebroventricular de la anandamida generó antinocicepción 20 y 30 min después de la administración, en tanto que PEA no tuvo efecto, por lo que ésta última no interactúa con receptores CB₁ a nivel central y su efecto es periférico.

Isquemia. En un proceso isquémico los receptores CB₁ son activados, se ha demostrado que los agonistas a CB₁ tienen efectos neuroprotectores en modelos *in vivo* de isquemia. En cultivos primarios de células granulosas de cerebro, el tratamiento con PEA disminuyó los efectos neurotóxicos en un periodo corto de incubación con glutamato. Así, la producción de PEA en el cerebro después de proceso isquémico puede actuar como agente neuroprotector. Interesantemente, la anandamida no funciona como agente

neuroprotector y además antagoniza la neuroprotección inducida por PEA (Skaper et al., 1996). Este dato es contradictorio porque otros autores han informado que ni anandamida ni PEA tienen efectos neuroprotectores *in vitro* (Andersson et al., 2000). Por otra parte, se ha informado que las oiletanolamidas a concentraciones altas pueden disminuir los niveles de peroxidación lípida producida por el tratamiento con FeSO₄ o FeCl₃/ADP en mitocondrias aisladas de corazón de rata (Parinandi y Schmid, 1988).

3.8 Interacción de los cannabinoides con otros sistemas de neurotransmisión

3.8.1 Interacción de receptores cannabinoides y opioides

Existe una estrecha relación entre el sistema cannabinoide y opioide. Se sabe que ambos sistemas comparten algunas propiedades farmacológicas como la hipotermia, la sedación, la hipotensión, la inhibición de la motilidad intestinal y la depresión motora. Sin embargo, una de sus interacciones más importantes es el efecto antinociceptivo.

Existen evidencias que soportan el hecho de que la administración de naloxona puede bloquear el efecto antinociceptivo de los cannabinoides. Se ha determinado que bajas dosis de naloxona (1-5 mg/Kg) parcialmente antagonizan el efecto del Δ^9 -THC y altas dosis (10 mg/Kg) bloquean el efecto de Δ^9 -THC (Mansour et al., 1998). Por otra parte, la administración de agonistas a cannabinoides en conjunto con agonistas opioides mu o kappa potencian el efecto antinociceptivo (Rowen et al., 1998). A continuación se muestran algunas evidencias que demuestran la interacción de los receptores cannabinoides con los opioides:

- I. Los cannabinoides generan antinocicepción a través de múltiples mecanismos espinales y supraespinales en el SNC, esto representa diferentes vías antinociceptivas y blancos terapéuticos para el tratamiento del dolor (Martín et al., 1995).
- II. Se ha propuesto que los cannabinoides actúan a través de receptores CB₂ y regulan el dolor en el sitio del daño como los opioides lo hacen a nivel periférico, este efecto periférico podría ser un nuevo sitio de acción terapéutica para evitar efectos centrales de los opioides (Nakamura y Ferreira, 1988).

- III. Se ha demostrado que existe una subpoblación de receptores a cannabinoides localizada en la medula espinal lumbar en la rata, por lo que se cree que el efecto espinal antinociceptivo es mediado por receptores opioides kappa (Hohmann y Herkenham, 1998), esto esta correlacionado con el hecho de que ligandos de opioides endógenos kappa pueden actuar a nivel espinal vía otros mecanismos no opioides (Lu et al., 1997).
- IV. Se ha demostrado la existencia de un circuito en el tallo cerebral activado por cannabinoides para disminuir el dolor en la medula ventromedial rostral, este efecto es independiente al efecto motor-depresor de los cannabinoides (Martín et al., 1995; Meng et al., 1998). También se ha reportado que la sustancia gris periacueductal (SGPA) tiene una participación muy importante en la regulación de antinocicepción por los cannabinoides (Martín et al., 1995; Litchman et al., 1996), aunque los receptores a cannabinoides no son abundantes en este sitio la administración de un agonista a cannabinoides como CP55940 ocasionó un efecto antinociceptivo (Herkenham et al., 1991).
- V. La combinación de anandamida (quien actúa en CB₁ y CB₂) en conjunto con palmitoiletanolamida (que se une mayoritariamente a CB₂) fue 100 veces más efectiva en disminuir el daño del tejido que la administración individual de ambos (Calignano et al., 1998).
- VI. Los antagonistas de CB₁ y CB₂ (SR141716A y SR144528, respectivamente) prolongan el proceso nociceptivo (Calignano et al., 1998).
- VII. Se ha reportado el efecto antinhiperalgésico de la palmitoiletanolamida indicando la participación de los receptores CB₂. (Jaggat et al. 1998).

Hasta el momento no se sabe como puede ser la interacción entre estos dos sistemas de señalización, se supone que deben converger en el mismo mecanismo. Se han generado dos hipótesis que pueden explicar la interacción. Ambos tipos de receptores están acoplados de manera intracelular a la disminución de AMPc a través de la activación de PGI. Se ha demostrado que la exposición crónica de morfina genera cambios adaptativos en la AC acoplada a proteínas G, afectando la eficiencia de otros receptores que también están acoplados a Gi o Go como los cannabinoides (Nestler, 1992), para que esto suceda ambos deben estar co-localizados en las mismas neuronas, desafortunadamente no existen evidencias de radioligando dada la reciente preparación de los anticuerpos para CB₁.

Existen varias estructuras como el caudado-putamen, el hipocampo dorsal y la sustancia negra que son ricos en ambos tipos de receptores (Mansour et al., 1988; Herkenham et al., 1991). Otras estructuras como la SGPA y el hipotálamo medio basal contienen niveles más moderados de cannabinoides y sitios de unión a opioides, pero juegan un papel importante en que los cannabinoides medían antinocicepción y efectos neuroendocrinos de los cannabinoides respectivamente (Romero et al., 1998). Esta hipótesis puede servir para explicar porque la administración de naloxona atenúa el efecto de Δ^9 -THC en animales dependientes de morfina (Bhargava, 1976).

Por otra parte, los cannabinoides pueden inducir la síntesis de opioides endógenos. La administración espinal de agonistas a cannabinoides CP55940 produce la liberación de la dinorfina β correlacionado con la generación de antinocicepción (Pugh et al., 1996). La activación de CB₂ por anandamida ocasiona la activación de PGs lo cual aumenta la actividad de AC y los niveles de AMPc y consecuentemente la activación de PK. Esto ocasiona que se fosforilen los canales de calcio, aumentando las concentraciones de calcio intracelular ocasionando una despolarización celular y permitiendo la liberación de β endorfinas (Fig. 10) (Mohab y Porreca, 2007).

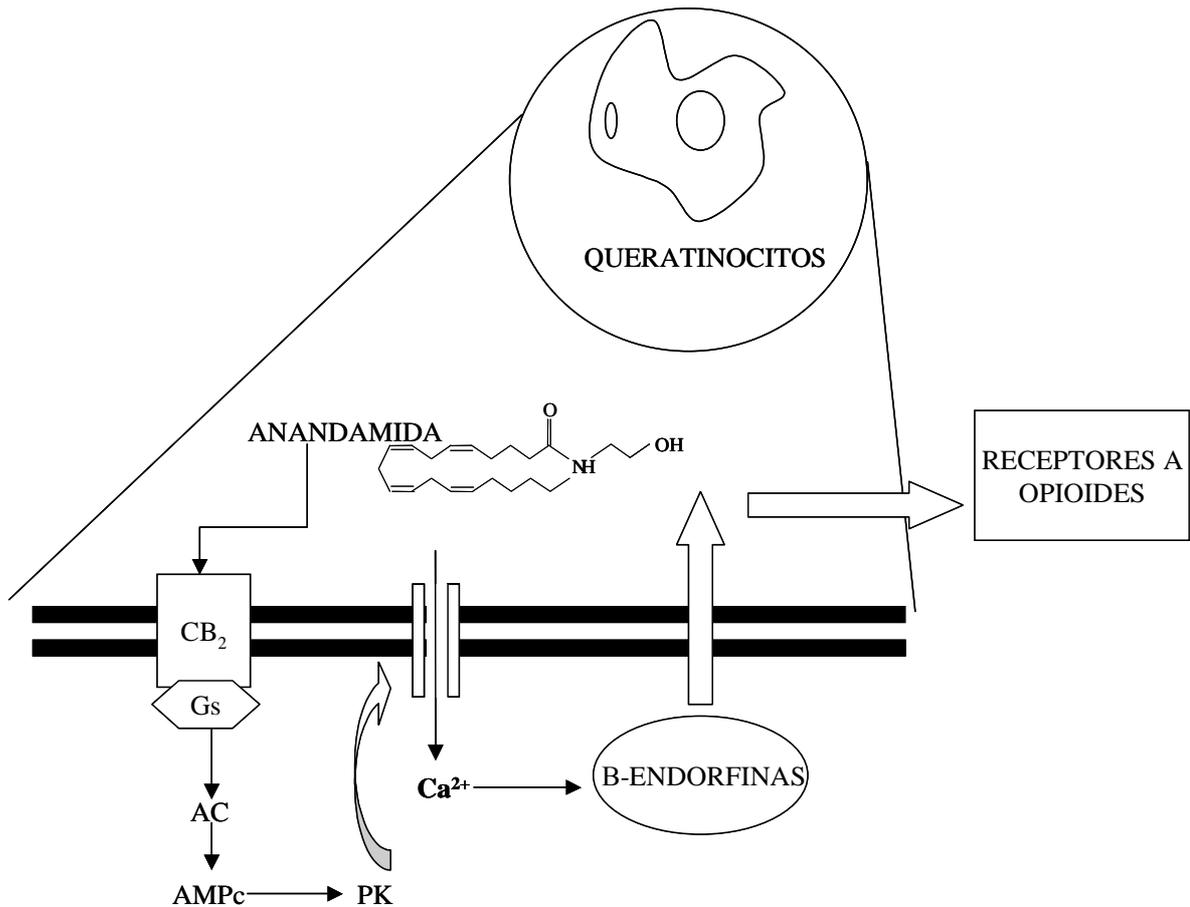


Figura 10. Mecanismo de acción de la anandamida en los receptores a cannabinoides CB₂ y producción de b-endorfinas. La anandamida llega al receptor a cannabinoide CB₂, el cual está acoplado a una proteína G_s, por lo cual, estimula la actividad de la adenilciclasa (AC) incrementando la cantidad de AMPc, por lo tanto hay activación de proteincinasas (PK), provocando la interacción con los canales de calcio (Ca²⁺), dando como consecuencia una despolarización en la célula y por ende la liberación de β endorfinas que una vez fuera de la célula encontrará su ruta mediante receptores opioides (Modificado de Howlett et al., 1999; Howlett et al., 2004).

3.8.2 Interacción de receptores cannabinoides y vanilloides

Los receptores TRP, se han caracterizado por al menos 20 canales que participan en varias funciones fisiológicas como la vasorelajación, la fertilidad y funciones sensoriales. En los mamíferos los canales TRP pueden ser divididos en TRPC, TRPV, TRPM, TRPML, TRPP y TRPA, a su vez estos tienen sus subfamilias.

El receptor TRPA1 es el único subtipo de los TRPA y se conoce también como ANKTM1 y p120, se expresa en neuronas sensoriales de los ganglios de la raíz dorsal, ganglios del trigémino (Bautista et al., 2005). Estos receptores están colocalizados con

receptores TRPV1, CGRP y la bradicinina. Estos receptores son activados por estímulos fríos a un umbral de 17°C de temperatura. (Story et al., 2003).

Se ha demostrado que en ratones que carecen de este receptor la respuesta hiperalgésica mecánica y la hipersensibilidad inducida por bradicinina disminuye (Bautista et al., 2006). Por otra parte, la administración intratecal de antisentidos específicos para TRPA1 previenen y revierten la hiperalgesia inducida en modelos de daño nervioso (Katsura et al., 2006). Además del estímulo frío estos receptores pueden ser activados por irritantes como la acroleína, 2-pentenal y varios productos naturales como el aceite de mostaza (alil isotiocianato o ITC), aceite de canela (cinamaldehído), ajo (alicina), aceite de clavo (eugenol), aceite verde invernol (salicilato de metilo), jengibre (gingerol), y orégano (carvacrol) (Bautista et al., 2005; Jordt et al., 2004; Macpherson et al., 2005; Xu et al., 2006). En general estas sustancias no son las mejores herramientas farmacológicas; Por ejemplo, el ITC, el cinamaldehído, la alicina y la acroleína activan TRPA1 a través de una modificación covalente de residuos de cisteína dentro de la cadena N-terminal (Hinman et al., 2006). Pero también activan otras proteínas. Por otra parte, el eugenol y el gingerol, pueden activar varios otros canales TRP y no son tan potentes en los receptores TRPA1.

El 3'-carbamoilbifenil-3-yl ciclohexilcarbamato (URB597) activa los receptores TRPA1. Se ha descrito previamente que este compuesto es un inhibidor de la FAAH, la cual degrada a la anandamida endógena, sin embargo, tiene efecto antagónico sobre TRPM8, no así en los TRPV1 o TRPV4.

URB597 inhibidor de FAAH, induce el influjo de calcio a través de la activación de receptores TRPA1 en ganglios de la raíz dorsal, a diferencia de otros inhibidores de FAAH que no activan TRPA1 (URB532) (Niforatos et al., 2007). En modelos animales este compuesto tiene efectos ansiolíticos, antidepresivos y antiinflamatorios (Gobbi et al., 2005). También disminuye la alodinia mecánica e hiperalgesia térmica en dolor neuropático e inflamatorio (Jayamanne et al., 2006). El efecto ansiolítico y antinociceptivo ha sido atribuido a la inhibición de FAAH ya que aumenta el nivel de anandamida.

La capsaicina sirve para caracterizar un dolor quemante, TRPV1 es un canal catiónico no selectivo con alta permeabilidad al calcio (Caterina et al., 1997) y forma

parte de una familia de supercanales catiónicos conocidos como canales potenciales de receptores transientes o TRPs (Clapham et al., 2001). Este receptor también puede ser activado por temperaturas mayores a 42°C o bien con protones (pH=5). Por su similitud estructural a la capsaicina varios ligandos endógenos pueden unirse a estos receptores como la anandamina, el ácido 12-hidroperoxi-5,8,10,14-eicosatetraenoico, N-araquidonil dopamina (NADA), N-oleoildopamina (OLDA), y productos de la lipooxigenasa (Chu et al., 2003). TRPV1 es regulado a la alta durante procesos de inflamación (Ji et al., 2002), y la actividad del canal es modulada por la acción de mediadores inflamatorios como las prostaglandinas y la bradicinina. Se cree que estos mediadores actúan vía PKC o PKA mediante la fosforilación de TRPV1 (Cortright y Szallasi, 2004). La interrupción de genes de TRPV1 en ratones, disminuye la nocicepción térmica y reduce la inflamación inducida por hiperalgesia. Este receptor participa importantemente en los procesos de dolor y puede ser un blanco terapéutico importante.

Se han realizado estudios de relación estructura actividad de antagonistas de capsaicina exógenos, como la capsazepina, quien bloquea la actividad de este receptor (Savidge et al., 2002) y genera efectos antihiperálgicos en modelos inflamatorios y en daño a nervios. Un análogo yodado de la resinferatoxina (I-RTX) (Seabrook et al., 2002) y capsaicina también son antagonistas de TRPV1 (6-iodo-nordihidrocapsaicin). Otras moléculas también han sido reportadas que previenen la activación de los canales heterólogos de TRPV1 conocidos como activadores (Szallasi y Appendino, 2004). Estos incluyen N-(3-aciloxi-2-benzilpropil)-Nβ-[4-(metilsulfonilamino)benzil], análogos de tiourea (Lee et al., 2003), BCTC (Valenzano et al., 2003), y SB-366791 (Gunthorpe et al., 2004). La eficacia en modelos de dolor ha sido investigada solo en algunos de ellos como antagonistas a TRPV1 como BCTC, I-RTX, y dos análogos de tiourea BCTC quienes producen efectos antihiperálgicos en modelos de dolor inflamatorio y dolor neuropático (Pomonis et al., 2003), mientras que el tratamiento con I-RTX inhibe las respuestas inducidas con capsaicina (Wahl et al., 2002). Dos de los análogos de tiourea inhiben las contorsiones en el modelo de estiramiento abdominal N-(3-acyloxy-2-benzylpropyl)-N-[4-(methylsulfonylamino)-benzyl] (Lee et al., 2003).

Se ha reportado la caracterización *in vitro* e *in vivo* de un potente antagonista a receptores TRPV1, el AMG 9810, que inhibe la recaptura de calcio en ligandos

endógenos inducidos por capsaicina, protones y calor en células que expresan TRPV1. Además AMG 9810 bloquea la liberación de CGRP y la despolarización generada por capsaicina en neuronas de la raíz dorsal. Este compuesto cianamida previene la conducta generada por capsaicina en ratón y revierte la hiperalgesia de modelos inflamatorios como la hiperalgesia térmica y mecánica (Narender et al., 2005).

3.9 Modelos experimentales en animales para evaluar el proceso nociceptivo

El género humano puede distinguir y verbalizar gran cantidad de sensaciones dolorosas, debido a que en la integración de las sensaciones se ven involucrados factores psicológicos, culturales y sociales entre otros. Los animales solo presentan respuestas neurofisiológicas, en donde solo se ven involucrados los neurotransmisores que participan en la percepción de las sensaciones y se excluye el componente afectivo. En la valoración de la acción analgésica se suelen medir respuestas somatomotoras, bien de tipo monosináptico, como la retirada de la cola o polisináptico, como la vocalización, el salto y la contractura de la musculatura abdominal; éstos últimos implican un alto nivel de coordinación entre las vías de la sensibilidad y las motoras.

Al momento de realizar las pruebas nociceptivas se puede observar un amplio espectro de reacciones. En las pruebas de dolor físico, las reacciones son evocadas por estímulos térmicos (*tail-flick* y *hot-plate*), mecánico o eléctrico (pruebas de vocalización y *flinch-jump*). La prueba del dolor tónico con la utilización de inyecciones de agentes algogénicos intradérmicos (prueba de formalina) o intraperitoneal (estiramiento abdominal). En el cuadro 1 se puede observar las características particulares, ventajas y desventajas de algunos de los modelos nociceptivos.

Cuadro 1. Características de algunos modelos de nocicepción (Wilson y Mogil, 2001).

Modelo	Ventajas	Desventajas	Comentarios
Térmico			
<i>Placa caliente</i>	No se requiere entrenamiento	Puede desarrollar hiperalgesia. Conductas que dependen de otras.	El lamido o levantamiento de la pata son conductas propias. El salto ocurre después de otras conductas válidas. El contacto de la pata con la orina puede confundir al animal. Sensible a la temperatura ambiental.
<i>Retiro de la pata (Hargreaves)</i>	No se requiere entrenamiento. Aplicación precisa del estímulo (pata derecha vs pata izquierda).	Respuesta inestable. Laborioso Consume tiempo.	Sensible al lugar. Sensible a la temperatura del equipo. Locomoción incompatible con la prueba.
<i>Retiro de la cola (calor radiante)</i>	Simplicidad Respuesta estable.	Requiere entrenamiento.	Sensible al lugar. Sensible a la temperatura ambiental. La pigmentación de la cola afecta la absorción del calor.
Mecánico			
<i>Presión sobre la pata (Randall y Selito)</i>	Aplicación precisa del estímulo (pata derecha vs pata izquierda).	Requiere entrenamiento	El umbral de vocalización puede no reflejar con precisión el umbral nociceptivo.
<i>Filamentos de von Frey</i>	No se requiere entrenamiento	Respuesta inestable. Laborioso Consume tiempo.	Los filamentos se deben calibrar periódicamente. Sensible a la colocación precisa del filamento.
Químico			
<i>Contorsión abdominal</i>	Sensible a los analgésicos débiles.	Sensible a no analgésicos	Las contracciones tienen algún grado de subjetividad.
<i>Formalina</i>	Sensible a analgésicos opiáceos y no opiáceos. Curso temporal bifásico.	Laborioso Consume tiempo.	Sensible a la habituación. Sensible a la temperatura ambiental.

3.9.1 Prueba de estiramiento abdominal

Esta prueba permite establecer un proceso nociceptivo debido a la administración de una sustancia algésica (ácido acético 0.6% i.p.) en la cavidad abdominal, generando una respuesta que para el humano sería un dolor de tipo visceral. La nocicepción visceral es causada por la activación de los nervios aferentes sensoriales que inervan los órganos internos tales como el estómago, el riñón, la vejiga, los intestinos, y otros. Este tipo de afecciones incluyen una distensión por lesiones o tumores, isquemias, inflamación, etcétera (Al-Chaer y Traub, 2002).

La administración de ácido acético en ratón ocasiona la sensibilización periférica de fibras delgadas A δ y fibras C. Los mediadores químicos involucrados son canales de sodio resistentes a tetrodotoxina, que incrementan sus corrientes iónicas cuando hay inflamación de los tejidos (Sanger y Hicks, 2002), la sustancia P, las prostaglandinas, las citocinas, los neutrofilos, la histamina, la serotonina, el péptido relacionado con el gen de la calcitonina, la somatostatina, el péptido intestinal vasoactivo y la bradicidina (Al-Chaer y Traub, 2002).

De acuerdo a los mediadores involucrados, se ha demostrado que fármacos que inhiben la síntesis o liberación de éstos ocasionan una disminución de la conducta nociceptiva y en el proceso inflamatorio. Así los fármacos analgésicos anti-inflamatorios no esteroideos (AINE's) son los que mejor funcionan en esta prueba nociceptiva. Por lo anterior, la administración de metamizol, un fármaco que tiene como principal mecanismo de acción la inhibición de la enzima COX, responsable de la síntesis de prostaglandinas así como la activación de la vía del óxido nítrico-GMPc, es un fármaco prototipo para esta prueba de nocicepción.

3.9.2 Prueba de la placa caliente

Se ha demostrado que cuando se coloca un ratón en una superficie caliente se activan fibras nociceptivas y termosensitivas, así como fibras polimodales que son sensibles tanto a la temperatura como a un estímulo mecánico. El calor es uno de los estímulos más selectivos, la excitación de las fibras periféricas desencadenan un

estímulo directo a la médula espinal. Es así como los fármacos que tienen la capacidad de atravesar la barrera hematoencefálica pueden ejercer su efecto antinociceptivo a nivel central.

En la nocicepción inducida por un estímulo térmico se ha identificado la activación de receptores periféricos opioides, NMDA, TRP y canales de sodio. Recientemente se ha establecido que los receptores denominados vanilloides (VR1), mismos que son activados también por capsaicina, participan en la generación de nocicepción ante un estímulo térmico. Particularmente si la temperatura incrementa a más de 52°C se activa el receptor VR-1 (Caterina y Julius 2001). Otro de los neurotransmisores que participa en esta prueba de nocicepción es el neuropéptido Y (NPY), se han identificado al menos dos subtipos NPY₁ y NPY₅ tanto a nivel periférico como a nivel central (Taiwo y Taylor 2002).

3.9.3 Prueba de la formalina

La prueba de la formalina se ha utilizado como un modelo de dolor persistente en donde la respuesta nociceptiva depende de la sensibilización periférica y central. La conducta nociceptiva inducida por la inyección de formalina se evalúa registrando la frecuencia de sacudidas/contracción, el tiempo de lamida y mordida de la pata inyectada (Tjolsen et al., 1992).

La prueba de la formalina presenta un patrón bifásico compuesto por un primer periodo agudo (Fase I o fásica) comprendida del min 0 al min 10. Esta Fase se atribuye al efecto directo del algógeno sobre los nociceptores, debido a los disparos rápidos de las neuronas aferentes primarias tipo C. Seguido de un periodo sostenido (Fase II o tónica) que se caracteriza por una respuesta inflamatoria, la cual se considera del min 10 al 60. Entre las dos fases existe un periodo denominado Q o quiescente, dicha fase se caracteriza por una disminución de la conducta dolorosa y no muestra una conducta sugestiva de nocicepción, la cual se relaciona con la actividad de las neuronas que convergen en el asta dorsal. Dichas neuronas retornan su actividad cerca de los niveles basales 5 a 10 min, lo que origina una disminución de la actividad de la fibra aferente primaria (Malmberg y Yasks, 1995).

Las evidencias farmacológicas, bioquímicas y electrofisiológicas sugieren que la Fase I se caracteriza por la liberación de sustancias pro-inflamatorias que activan a las fibras aferentes primarias y al aumento en la liberación de aminoácidos excitatorios. Mientras que la Fase II se relaciona con el desarrollo de la inflamación, lo que conduce a una actividad intensa de las aferentes nociceptivas en la médula espinal, aumento en la excitabilidad de las neuronas y proporción de la sensibilización central. Además de la liberación de sustancia P, glutamato, Ca^{2+} y prostaglandinas (Puig y Sorkin, 1996).

3.9.4 Prueba de la capsaicina

La capsaicina es el principal metabolito de la familia *Capsicum*, este fármaco tiene gran importancia en la investigación del proceso nociceptivo debido a que genera un daño a los nervios, caracterizando a un dolor de tipo neurogénico. Se ha demostrado que la administración de capsacina activa receptores vanilloides (canal V1 o TRPV1) y otros canales iónicos (Caterina et al., 1997) así como las taquicininas, la sustancia P y a la neurocinina A. mediadores altamente expresados en fibras aferentes primarias que ascienden a las terminaciones nerviosas de la médula espinal (Duggan et al., 1988).

La capsaicina es una herramienta farmacológica de interés terapéutico ya que la administración de esta genera un proceso nociceptivo, pero la administración continúa ocasiona antinocicepción, probablemente por la participación de los receptores TRPV1 que median el influjo de calcio desensibilizando a las neuronas nociceptivas (Sawynok, 2003).

4.0 Los anticonvulsivantes y la nocicepción

Los fármacos adyuvantes se utilizan para el tratamiento del dolor que no disminuye ante la administración de AAIINE's y opioides, incluso con la combinación de ellos. Uno de los tipos de dolor más difícil de tratar es el dolor neuropático, en donde ni los opioides fuertes como la morfina presentan eficacia terapéutica. En este tipo de padecimientos entre otros como el dolor crónico debido a enfermedades neurodegenerativas y el dolor asociado a cáncer, así como dolor de la musculatura como dolor bajo de espalda, se utilizan fármacos para la ansiedad, la depresión y los anticonvulsivantes, como la gabapentina o la carbamazepina, también son utilizados para el manejo del dolor neuropático, cuando el dolor es de tipo lancinante o quemadura, estos fármacos suprimen la descarga neuronal espontánea (Backonja, 2000). Compuestos análogos a la gabapentina poseen baja eficacia contra el dolor agudo, pero cuando se utilizan en combinación con opioides permiten una reducción en la dosis de estos fármacos y mejoran los efectos analgésicos (Buvanendran y Kroin, 2007). También se ha demostrado el efecto analgésico de los anticonvulsivantes para aliviar el dolor en pacientes con neuropatía; En dos estudios se mostró que la gabapentina, pero no el placebo, reduce de manera significativa y dosis dependiente (1800 mg/día, 2400 mg/día y 3600 mg/día) el dolor neuropático (Rice y Maton, 2001). En los 2 estudios se observaron mejoras en los parámetros de calidad de vida como interferencia con el sueño, estado de ánimo, depresión, coraje, fatiga, confusión, vitalidad y salud mental.

IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Se tiene evidencia que la anandamida y la palmitoiletanolamida como parte del sistema endocannabinoide participan en el efecto antinociceptivo y antiinflamatorio. Estas sustancias interactúan en receptores CB₁ y CB₂, disminuyen la nocicepción y la inflamación tanto a nivel central como a nivel periférico. Desafortunadamente, la ocupación de receptores CB₁ por agonistas exógenos trae como consecuencia efectos psicotrópicos y cardiovasculares importantes para el organismo.

Por lo anterior, agonistas a CB₁ no serían los fármacos más adecuados para disminuir la nocicepción. Resulta muy interesante contar con compuestos que pudieran ser agonistas a receptores CB₂, quienes actuarían a nivel periférico, evitando los efectos centrales de los cannabinoides. O bien con compuestos que inhiban a la enzima FAAH (la cual se encarga de degradar a la anandamida). La PEA es un inhibidor de FAAH y actúa en receptores CB₂ a nivel periférico, por lo que análogos estructurales con actividad antinociceptiva pueden ser una alternativa terapéutica para el tratamiento del dolor.

El presente trabajo tiene como finalidad evaluar la actividad antinociceptiva de 6 compuestos análogos estructurales de la PEA N-aril sustituidos.

V. HIPÓTESIS

Los compuestos análogos estructurales de la PEA N-aril sustituidos, tales como: *N*-(4-metoxi-2-nitrofenil)hexadecanamida (**1**), *N*-(2-nitrofenil)hexadecanamida (**2**), *N*-[2-nitro-5-(trifluorometil)fenil]hexadecanamida (**3**), *N*-[(5-cloro-2-nitro)fenil]hexadecanamida (**4**), 4-amino-3-(palmitoilamino)ácido benzóico (**5**) y 2-amino-3-(palmitoilamino)ácido benzóico (**6**) tienen actividad antinociceptiva en las pruebas experimentales de nocicepción siguientes: estiramiento abdominal, placa caliente, formalina y capsaicina en roedores.

VI. OBJETIVOS

6.1. Objetivo General

Evaluar el efecto antinociceptivo de los compuestos *N*-(4-metoxi-2-nitrofenil)hexadecanamida (**1**), *N*-(2-nitrofenil)hexadecanamida (**2**), *N*-[2-nitro-5-(trifluorometil)fenil]hexadecanamida (**3**), *N*-[(5-cloro-2-nitro)fenil]hexadecanamida (**4**), 4-amino-3-(palmitoilamino)ácido benzóico (**5**) y 2-amino-3-(palmitoilamino)ácido benzóico (**6**) en las pruebas de nocicepción siguientes: estiramiento abdominal, placa caliente, formalina y capsaicina en roedores.

6.2. Objetivos particulares

1.- Evaluar el efecto antinociceptivo producido por la inhibición de la enzima FAAH por tres análogos *N*-aril sustituidos: (*N*-(4-metoxi-2-nitrofenil)hexadecanamida (**1**), 4-amino-3-(palmitoilamino)ácido benzóico (**5**) y 2-amino-3-(palmitoilamino)ácido benzóico (**6**); en dos pruebas nociceptivas, una térmica (placa caliente) y una química (estiramiento abdominal) en ratón.

2.- Evaluar el efecto antinociceptivo de cuatro análogos *N*-aril sustituidos: (*N*-(4-metoxi-2-nitrofenil)hexadecanamida (**1**), *N*-(2-nitrofenil)hexadecanamida (**2**), *N*-[2-nitro-5-(trifluorometil)fenil]hexadecanamida (**3**) y *N*-[(5-cloro-2-nitro)fenil]hexadecanamida (**4**) en la prueba de formalina y valorar la influencia de la posición del grupo nitro en su estructura sobre dicho efecto antinociceptivo.

3.- Evaluar el efecto antinociceptivo de (*N*-(4-metoxi-2-nitrofenil)hexadecanamida (**1**) en la prueba de nocicepción con capsaicina.

4.- Evaluar el efecto anticonvulsivo de (*N*-(4-metoxi-2-nitrofenil)hexadecanamida (**1**) en una prueba de convulsiones inducidas con pentilentetrazol.

VII. MATERIAL Y MÉTODO

7.1. Material biológico

En los experimentos se utilizaron ratones *Swiss webster* hembras con un peso de 25-30 g y ratas *Wistar* macho con un peso entre 170 y 200 g. Los animales permanecieron al menos 5 días en el área de experimentación con la finalidad de que se ambientaran a las condiciones del laboratorio (25-26°C y periodos de luz/oscuridad 12/12 h). Doce horas antes de cada experimento se les retiró el alimento a los animales, permaneciendo sólo con libre acceso al agua. Todos los experimentos se realizaron de acuerdo a las guías sobre aspectos éticos para la investigación del dolor experimental en animales (Covino et al., 1980). Los experimentos se realizaron entre las 7:00 h y 14:00 h. Los animales fueron utilizados solo una vez y se sacrificaron en una cámara de CO₂ al finalizar el experimento.

7.2. Fármacos y reactivos

Morfina se adquirió de Laboratorios PISA (México) y metamizol de laboratorios Adventis (México). Diclofenaco, pentilentetrazol, naloxona, capsaicina, ácido acético y formalina se adquirieron de Sigma-Aldrich.

Capsaicina se disolvió en 10% de etanol, 10% de Tween 80 y 80% de solución salina isotónica (SSI). Ácido acético (0.6%) y formalina (1%) se diluyeron en agua destilada. Diclofenaco, metamizol y morfina se disolvieron en SSI al 0.9%. Los análogos del ácido palmítico se suspendieron en Tween 80 (0.2%) y SSI al 0.9%.

Los compuestos se administraron por vía intraperitoneal (i.p) o vía intragástrica (i.g.), ajustando las concentraciones de manera que por cada 10g de peso corporal se administraron 0.1 mL de la solución del fármaco o suspensión de los compuestos. El vehículo utilizado en todos los experimentos fue Tween 80 al 0.2% en SSI al 0.9%.

7.3. Obtención de los análogos N-aril sustituidos de la palmitoiletanolamida (PEA).

Los análogos N-aril sustituidos de palmitoiletanolamida fueron sintetizados en el Laboratorio de Química Medicinal de la Facultad de Farmacia de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos por el Dr. Juan Gabriel Navarrete Vázquez. Para la identificación de todas las reacciones fueron seguidas por cromatografía en capa fina, los compuestos fueron purificados y posteriormente caracterizados por métodos espectrométricos y espectroscópicos.

Los compuestos se sintetizaron a partir de N-palmitoiletanolamida tomando como base la estructura del ácido palmítico y su amida derivada. En la Tabla 2 se muestran los análogos estructurales de la palmitoiletanolamida.

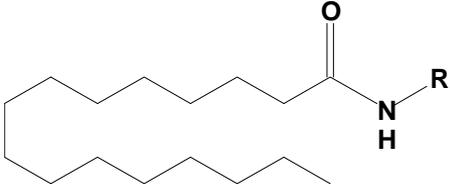
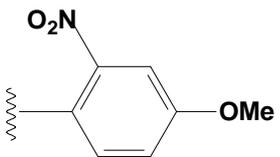
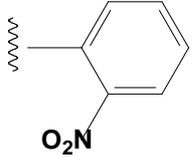
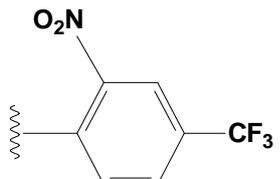
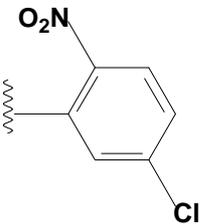
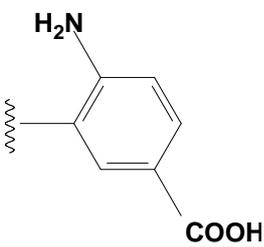
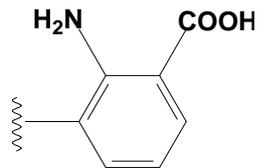
A todos los análogos se les determinó la capacidad de inhibir el metabolismo de la anandamida, lo que se representó como el % de inhibición de la enzima FAAH. La potencia de PEA se utilizó como control positivo. En el cuadro 2 se muestran los resultados obtenidos (Duarte-Fajardo, 2007).

Cuadro 2. Inhibición del metabolismo de anandamida presentada por análogos de palmitoiletanolamida.

Compuesto	% inhibición del metabolismo de la anandamida	Potencia con respecto a PEA
PEA	78 ± 7.23	1
1	79.47 ± 6.45	1.1
2	58.11 ± 6.06	0.5
3	83.82 ± 1.28	1.1
4	53.22 ± 4.06	0.45
5	95.14 ± 1.79	2.5
6	No determinado	

PEA es el control positivo, las demás estructuras se representan como la amida derivada de PEA (Duarte-Fajardo, 2007).

Tabla 2 .Análogos N-aril sustituidos del la palmitoiletanolamida (Duarte-Fajardo, 2007).

 N-palmitoiletanolamida y su amida sustituida		
Compuesto	R (sustitución)	Nombre
1		<i>N</i> -(4-metoxi-2-nitrofenil)hexadecanamida
2		<i>N</i> -(2-nitrofenil)hexadecanamida
3		<i>N</i> -[2-nitro-5-(trifluorometil)fenil]hexadecanamida
4		<i>N</i> -[(5-cloro-2-nitro)fenil]hexadecanamida
5		Acido 6-amino-3-(palmitoilamino) benzóico
6		Acido 2-amino-3-(palmitoilamino) benzóico

7.4. Evaluación de la actividad antinociceptiva.

Primero se seleccionaron tres compuestos **1**, **5** y **6** para determinar si éstos presentaban efecto antinociceptivo en la prueba de estiramiento abdominal, placa caliente y capsaicina, posteriormente se evaluaron los compuestos.

7.4.1. Prueba de estiramiento abdominal

Esta prueba nociceptiva consiste en proporcionar un valor numérico a los estiramientos y/o contorsiones abdominales (Fig. 11) presentadas por el ratón que ha sido administrado con una sustancia algésica como ácido acético al 0.6% i.p. (Koster et al., 1959).



Figura 11. Fotografías de la prueba de estiramiento abdominal, aquí se muestran los estiramientos y/o contorsiones generados después de la administración de ácido acético (0.6% i.p.) (Koster et al., 1959).

Los ratones utilizados fueron tratados con vehículo y los compuestos **1**, **5** y **6** (10, 30 y 100 mg/Kg i.g.). Posteriormente, se ambientaron de manera individual en una caja de acrílico por un lapso de 40 min. Después del periodo de ambientación se administró el ácido acético (0.1mL/10g i.p.) e inmediatamente se contaron los estiramientos y/o contorsiones abdominales presentadas por el ratón por intervalos de 5 min, hasta llegar a 30 min. Como control positivo, se utilizó el fármaco metamizol (10, 30 y 100 mg/Kg p.o.), éste fue administrado 15 min antes del ácido acético (pero los ratones tuvieron un periodo de ambientación de 40 min). El tiempo de administración se decidió una vez que, en pruebas preliminares se determinó que a los 15, 20 y 30 min no se observó una disminución del número de estiramientos con la dosis de 100 mg/Kg (i.g.). Sin embargo, a los 40 min si se observó una disminución del efecto nociceptivo. En el Diagrama 1 se muestra el procedimiento para la evaluación de la actividad antinociceptiva de los análogos **1**, **5** y **6** de PEA. Con los datos obtenidos se construyó

un curso temporal (tiempo vs número de estiramientos). Cada valor se expresó como el promedio de 6 animales \pm el error estándar (e.e.).

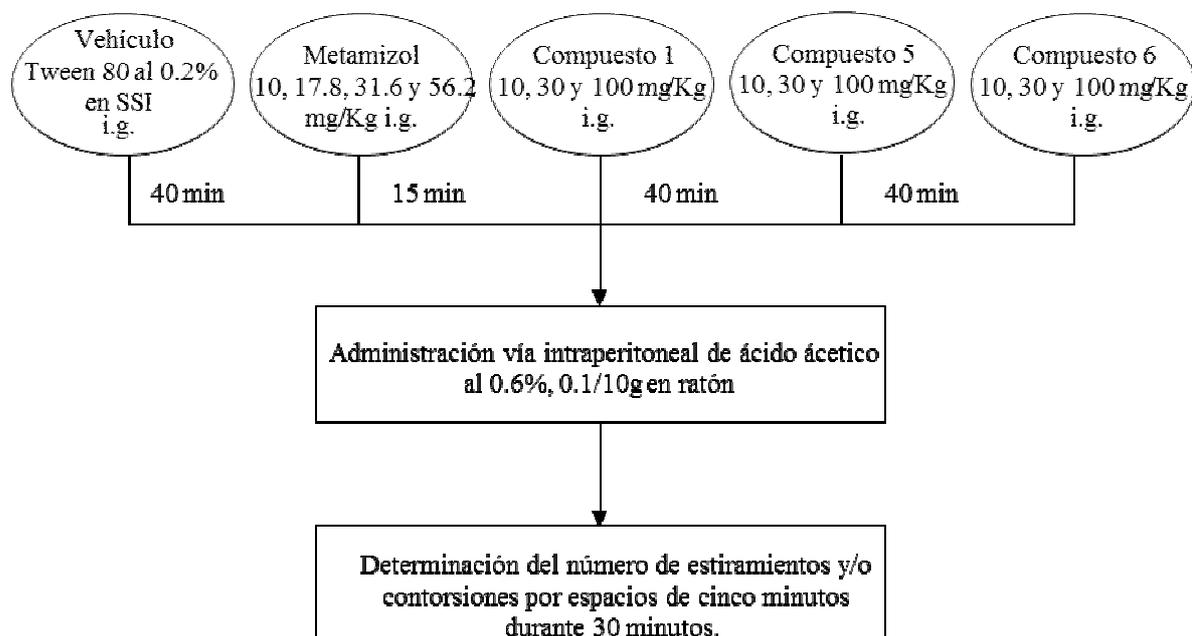


Diagrama 1. Diseño de experimentos para la evaluación del efecto antinociceptivo de los compuestos 1, 5 y 6 en la prueba de estiramiento abdominal en ratón.

7.4.2. Prueba de la placa caliente

La prueba de la placa caliente permite el establecimiento de una condición dolorosa en el animal de experimentación (rata o ratón), mediante un estímulo térmico. El estímulo térmico ocasiona la activación de los termo-nociceptores, lo que se traduce en una respuesta nociceptiva que va hacia el SNC (Woolfe y MacDonald, 1944; Eddy y Leimbach, 1953).

Se utilizó una placa caliente (Modelo 7250, Ugo Basile, Italia) que se mantuvo a una temperatura constante de $55.3 \pm 0.1^\circ\text{C}$, sobre la placa hay un cilindro de acrílico dentro del cual se colocó al ratón para observar la latencia de respuesta al estímulo térmico (Fig. 12). Esta respuesta se manifiesta a través de un salto, por el levantamiento de las extremidades traseras o la presencia de orina. La administración de una sustancia antinociceptiva previa al estímulo térmico ocasiona que la latencia de respuesta se

incremente. El tiempo máximo de exposición en la placa caliente fue de 30 s, éste tiempo de corte fue determinado con una sustancia de referencia como la morfina y se refiere a la máxima latencia que se presenta en el ratón con una dosis alta de morfina (6 mg/Kg p.o.). Posterior a este tiempo, el animal presenta daño inflamatorio en la pata así como pérdida de sensibilidad. Los compuestos **1**, **5**, **6** (10, 30 y 100 mg/Kg p.o.) y el vehículo se administraron a los ratones 40 min antes de introducirlos al cilindro sobre la placa. El fármaco de referencia que se utilizó fue la morfina (1.5, 3.0 y 6.0 mg/Kg p.o.), la cual se administró 15 min antes del inicio de la prueba. En todos los experimentos se determinó la latencia de respuesta a los 30, 60, 90 y 120 min como se muestra en el diagrama 2.

En la prueba de la placa caliente los datos se presentan como área bajo la curva (ABC), en unidades de área (ua), la cual se obtuvo a partir de un curso temporal (tiempo vs latencia de respuesta). El ABC de este curso temporal se determinó por el método de los trapecios y representa el efecto antinociceptivo total generado por los compuestos evaluados. Cada valor se expresa como el promedio de 6 animales \pm el e.e.m.



Figura 12. Fotografía de la prueba en la placa caliente (estímulo nociceptivo 55.5 °C) (Woolfe y MacDonald, 1944; Eddy y Leimbach, 1953).

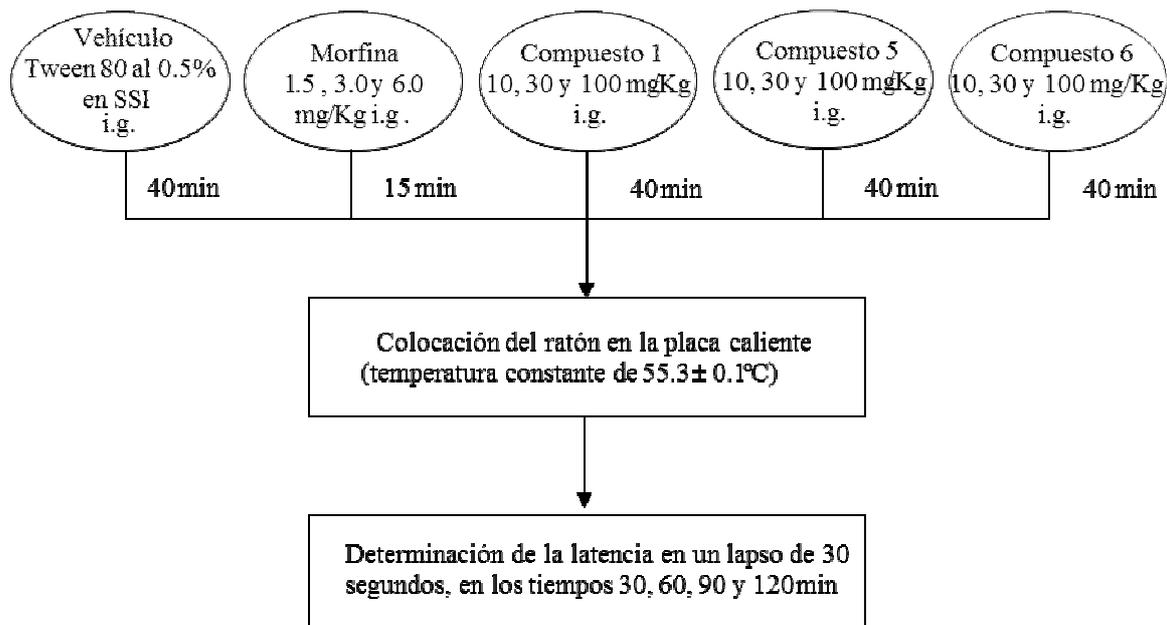


Diagrama 2. Diseño de experimentos para la evaluación del efecto antinociceptivo de los compuestos 1, 5 y 6 en la prueba de la placa caliente en ratón.

7.4.3. Prueba de capsaicina

La capsaicina es una sustancia que actúa por contacto, provocando una depleción de los neurotransmisores y neuromoduladores contenidos en las fibras A δ y C, ésta se genera por una activación continua de los canales de sodio continua produciendo como consecuencia un dolor de tipo neurogénico caracterizado por un aumento en la lamida de patas y cuerpo (Sándora y Zsuzsanna, 2007).

En esta prueba se colocó al ratón en un cilindro de acrílico de 30 cm con dos espejos en la parte trasera del mismo, para facilitar la observación a diferentes ángulos. Los ratones tuvieron un periodo de adaptación de 15 minutos antes de la administración de la sustancia algésica. Posteriormente, se administró capsaicina s.c. (1.6 μ g/pata en un volumen de 20 μ L) en la superficie dorsal de la pata inferior derecha del ratón. La conducta nociceptiva se caracterizó por un aumento de sacudidas y lamidas de la pata y dorso. En esta prueba se determinó el tiempo acumulado en el cual el ratón presentó la conducta nociceptiva durante un periodo de 5 min. El compuesto 1 (3, 10, 30, 100 y

150, mg/Kg p.o.) el vehículo se administraron 40 min antes de la inyección de capsaicina por vía subcutánea como se muestra en el diagrama 3.

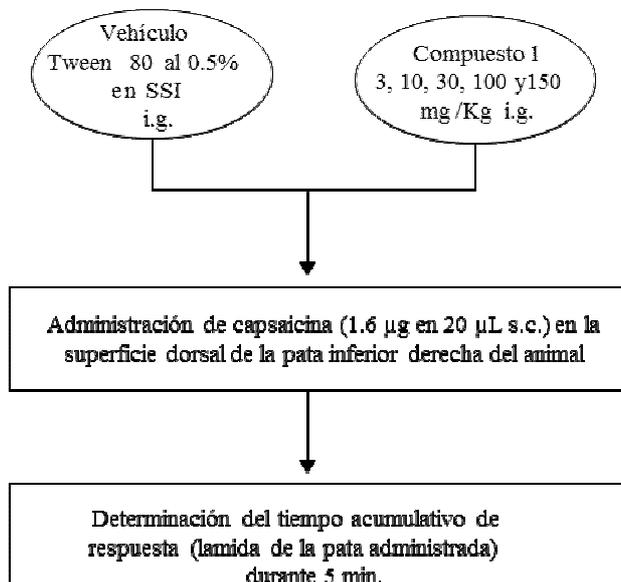


Diagrama 3. Diseño de experimentos para la evaluación del efecto antinociceptivo del compuesto 1 en la prueba de la capsaicina en ratón.

7.4.4. Prueba de la Formalina

Esta prueba consiste en proporcionar un valor numérico a la conducta nociceptiva producida por la administración de una sustancia algésica como la formalina. La conducta nociceptiva se traduce en sacudidas de la pata inferior derecha (Fig. 13) en la cual formalina (50 µL al 1%) es inyectada por vía subcutánea en la superficie dorsal de la pata (Tjølsen et al., 1992).



Figura 13. Fotografía de la prueba de formalina (1% en la superficie dorsal de la pata inferior derecha) (Tjölsen et al., 1992).

En esta prueba las ratas se colocaron en un cilindro de acrílico de 30 cm de diámetro, en la parte posterior se colocaron espejos que permitieron la adecuada observación de la conducta de los animales desde diferentes ángulos. Las ratas se ambientaron durante 60 min en el cilindro antes de la administración de formalina.

Los compuestos **1** (1,3, 10 y 30 mg/Kg i.p.), **2, 3, 4** (10 y 30 mg/Kg i.p.) y el vehículo se administraron 15 min antes de la administración de formalina a nivel local (50 μ L al 1% s.c.) en la superficie dorsal de la pata inferior derecha. Inmediatamente después de la administración de formalina, las ratas se colocaron nuevamente en los cilindros de acrílico y se cuantificó el número de sacudidas de la pata inyectada con formalina en intervalos de 1 min cada 5 min por 60 min. Todos los experimentos se realizaron con una temperatura de $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$. En esta prueba de nocicepción se utilizó como fármaco de referencia al diclofenaco (1, 10, 30 y 56.2 mg/Kg, i.p.). En el diagrama 4 se muestra el diseño experimental utilizado en este modelo de nocicepción. En la prueba de la formalina, la respuesta al estímulo nociceptivo se presenta en dos fases; la primera de ellas se presenta entre 0 y 10 min, ello se debe a un efecto directo quimio-nociceptivo de la formalina, mientras que la segunda fase se presenta entre los 10 y 60 min, y es mediada principalmente por reacciones inflamatorias. En esta prueba el ABC de la Fase I y la Fase II representan el efecto antinociceptivo total.

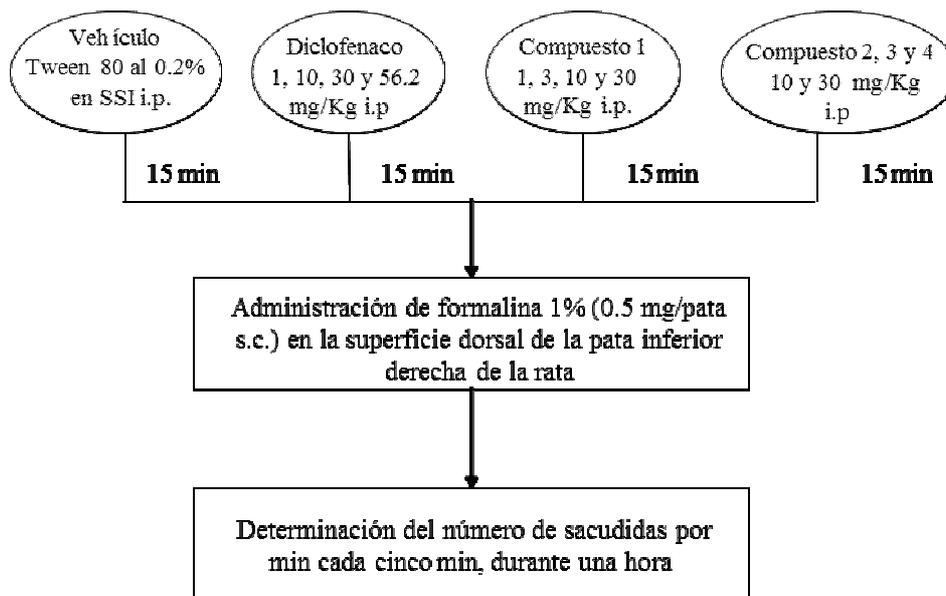


Diagrama 4. Evaluación del efecto antinociceptivo de los compuestos 1, 2 y 3 en rata, en la prueba de la formalina.

7.5. Evaluación de la actividad anticonvulsiva.

7.5.1 Prueba de efecto anticonvulsivo.

Debido a que algunos fármacos anticonvulsivantes pueden actuar como coadyuvantes analgésicos, principalmente bajo condiciones de dolor intenso, gabapentina y carbamazepina se utilizan ampliamente en la clínica para el tratamiento del dolor neurogénico y neuropático. Ambos fármacos incluso se han combinado con AAINÉ's o vitaminas para potenciar el efecto antinociceptivo. Desafortunadamente en el dolor neurogénico y neuropático no existen alternativas que ayuden a eliminar el estímulo nociceptivo y tan solo sirven como paliativos del dolor.

El efecto anticonvulsivo se determinó por medio de una prueba en donde se inducen convulsiones clónico-tónicas en ratón por medio de la administración de 90 mg/Kg vía i.p. de PTZ. El compuesto 1 se administró 40 min antes de la administración de PTZ (Diagrama 5). La conducta registrada se manifestó por cambios de comportamiento y se registró la latencia a la presencia de crisis, las cuales se divide en cuatro fases (Fig.14).

Fase I. Mioclonias caracterizadas por los movimientos espontáneos como la retracción de las orejas o saltos.

Fase II. Crisis generalizada, que se caracteriza por la pérdida de la postura del ratón.

Fase III. Crisis tónica, es una convulsión que involucra un solo tono muscular, el ratón queda paralizado de cuerpo completo.

Fase IV. Muerte.

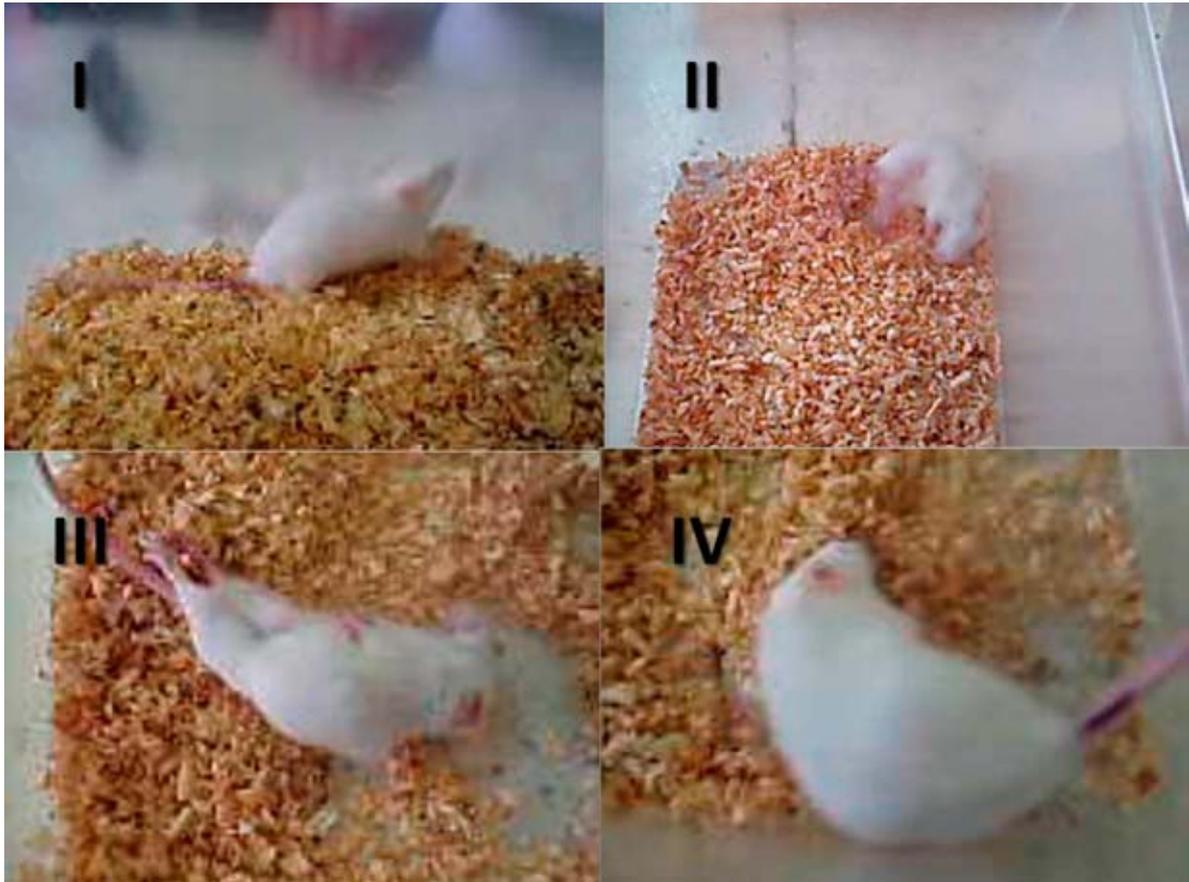


Figura 14. Fotografías del efecto convulsivo de pentilentetrazol en sus diferentes fases (Swinyard et al., 1989).

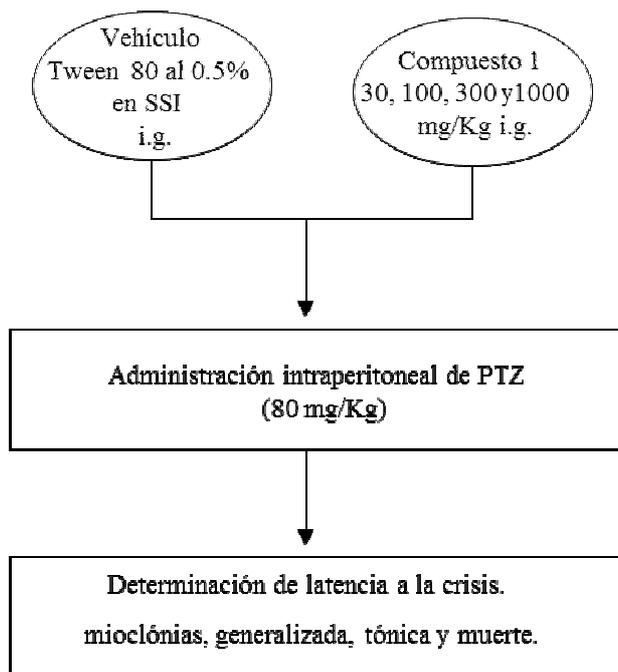


Diagrama 5. Diseño de experimentos para la evaluación del efecto anticonvulsivo del compuesto **1** en ratón.

7.6. Activación de la vía opioide como posible mecanismo de acción del compuesto N-(4-metoxi-2-nitrofenil)hexadecanamida.

Para evaluar la posible participación de los receptores a opioides en el efecto antinociceptivo generado por el análogo de la palmitoiletanolamida, el compuesto **1**, se utilizó 1 antagonista de los receptores opioides como la naloxona (NLX) en la prueba de la placa caliente. NLX (1 mg/Kg i.p.) se administró a dos grupos de 6 ratones; 15 min después se administró morfina (6 mg/Kg) a un grupo y el compuesto **1** al segundo grupo a la dosis de 30 mg/Kg (i.g.) 40 min antes de la prueba, que es la dosis que produce el 95% de respuesta antinociceptiva.

En esta prueba se consideró como efecto máximo (100 %) el efecto antinociceptivo de la dosis más alta de morfina (6 mg/Kg i.g.) equivalente a 2918.33 ua.

7.6. Análisis de los datos

Se construyeron cursos temporales para los resultados de las pruebas de estiramiento abdominal, placa caliente y formalina, colocando en el eje de las abscisas el tiempo de evaluación y en el eje de las ordenadas el efecto antinociceptivo, expresado como número de estiramientos, latencia de respuesta y número de sacudidas respectivamente.

Para la prueba de formalina y placa caliente se determinó el área bajo la curva (ABC) utilizando la regla de los trapezoides, método que permite aproximar una integral definida, los datos se expresan como unidades de área (ua). La disminución del área bajo la curva de cada tratamiento en comparación con el vehículo representa el efecto antinociceptivo de los fármacos y compuestos evaluados.

Cada dato en las gráficas representa el promedio \pm e.e. de 6 animales por grupo. En el caso de la prueba de capsaicina los resultados se expresan como tiempo acumulado de respuesta nociceptiva y el efecto anticonvulsivo como latencia a la presencia de crisis convulsiva. Para el análisis de los datos se utilizó una prueba t de Student para comparar dos grupos y para comparar más de dos grupos se utilizó un análisis de varianza de una vía (ANDEVA). Cuando se encontró diferencia estadística en el ANDEVA se utilizaron dos pruebas post-hoc; una prueba de Dunnet cuando se comparó con respecto al vehículo y una de Tukey cuando se compararon todos los grupos. La diferencia estadística se determinó con una $p < 0.05$ (*) y $p < 0.01$ (**). Todas las pruebas estadísticas fueron hechas con el programa SigmaStat versión 3.5 para PC.

VIII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8. 1. Evaluación del efecto antinociceptivo de los compuestos 1, 5 y 6; análogos de palmitoiletanolamida en ratones.

En el presente trabajo se realizó la evaluación preliminar de los efectos antinociceptivos generados por una serie de análogos estructurales de la palmitoiletanolamida. Para lo cual, se utilizaron 4 diferentes pruebas nociceptivas en roedores. Estas pruebas permiten establecer el proceso neurofisiológico de nocicepción generado por la presencia de un estímulo, ya sea de naturaleza química o térmica (Wilson y Mogil, 2001).

Los compuestos 1, 5 y 6 se evaluaron en la prueba de estiramiento abdominal que sirve para identificar compuestos que pudieran tener actividad inhibitoria sobre la enzima COX, debido a que principalmente se liberan prostaglandinas en el proceso nociceptivo inflamatorio que se genera. Por otra parte, la prueba de la placa caliente se utiliza en general para identificar compuestos que puedan atravesar la barrera hematoencefálica con actividad opioide (Eddy y Leimbach, 1953).

En la Figura 15 se muestran los compuestos seleccionados, en donde uno de ellos posee un grupo sustituyente nitro y los otros dos son ácidos con un sustituyente amino.

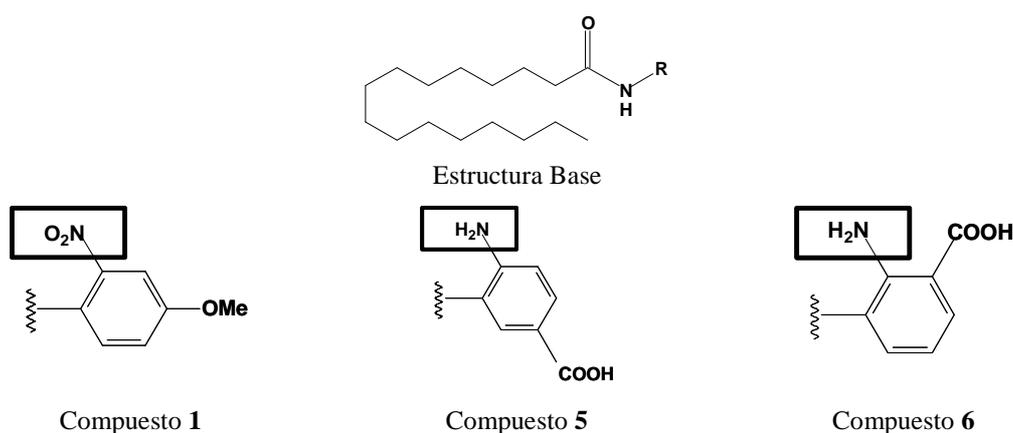


Figura 15. Estructura química de los compuestos 1, 5 y 6 evaluados en la prueba de estiramiento abdominal y placa caliente (Duarte-Fajardo, 2007).

8.1.1. Prueba de estiramiento abdominal en ratón.

En la Figura 16 se muestra el curso temporal del grupo control que fue administrado por vía intragástrica con el vehículo (SSI), se observa que los estiramientos y/o contorsiones se incrementan al máximo entre los 15 y 20 min, los cuales van disminuyendo gradualmente.

En la Figura 17 se observa que tanto el compuesto **1** como el **5** disminuyen el número de estiramientos con respecto al grupo control (administrado con vehículo); por otro lado, el compuesto **6** no mostró una disminución del efecto nociceptivo (estiramiento) inducido por la administración de ácido acético. A la dosis de 100 mg/Kg, el compuesto **1** generó un efecto antinociceptivo de 42.58% con respecto al grupo control (0% de efecto antinociceptivo) y el compuesto **5** produjo un efecto antinociceptivo de 24%. Cabe señalar que, buscando un efecto antinociceptivo mayor, se administró una dosis más alta del compuesto **1** (300 mg/Kg, p.o.) y se observó nuevamente una reducción de la conducta nociceptiva siguiendo una relación dosis-dependiente. Por lo anterior, podemos sugerir que el compuesto **1** es el más eficaz de la serie de compuestos evaluados en este modelo. Podemos sugerir también que probablemente este compuesto interfiere de manera más significativa con la vía de las prostaglandinas, mecanismo principal de mediación del dolor en esta prueba.

Metamizol fue seleccionado como control positivo por ser un analgésico tipo AINE que inhibe a la COX y por consiguiente la generación de prostaglandinas como su principal mecanismo de acción, el cual disminuyó de manera dependiente de la dosis el número de estiramientos (Figura 17).

Además de los mecanismos involucrados con la actividad de prostaglandinas, los compuestos **1** y **5** podrían interactuar con otros mecanismos que contribuyen al proceso nociceptivo-inflamatorio en el dolor visceral, tales como la interacción con receptores opioides kappa (Su et al., 2002), NMDA y NK (Laird et al., 2000) ya que se ha demostrado que éstos participan en el proceso nociceptivo visceral.

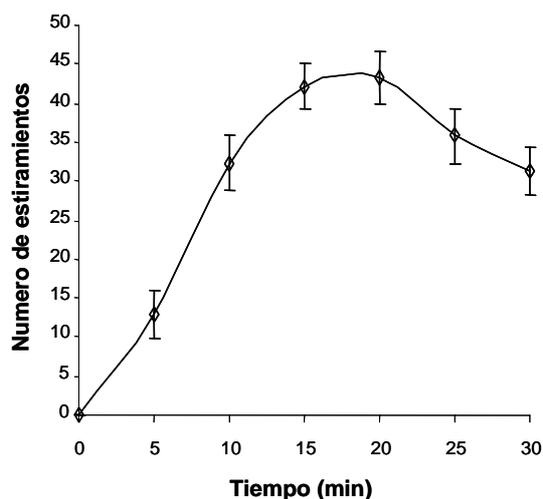


Figura 16. Prueba de estiramiento abdominal. La administración de ácido acético (i.p.) en ratones que recibieron vehículo (Tween 80 al 0.2% en solución salina p.o.) genera una conducta nociceptiva caracterizada por estiramientos y/o contorsiones abdominales. El curso temporal corresponde al promedio de 6 animales \pm e.e. El número total de estiramientos durante los 30 min representa el efecto nociceptivo total generado por el ácido acético.

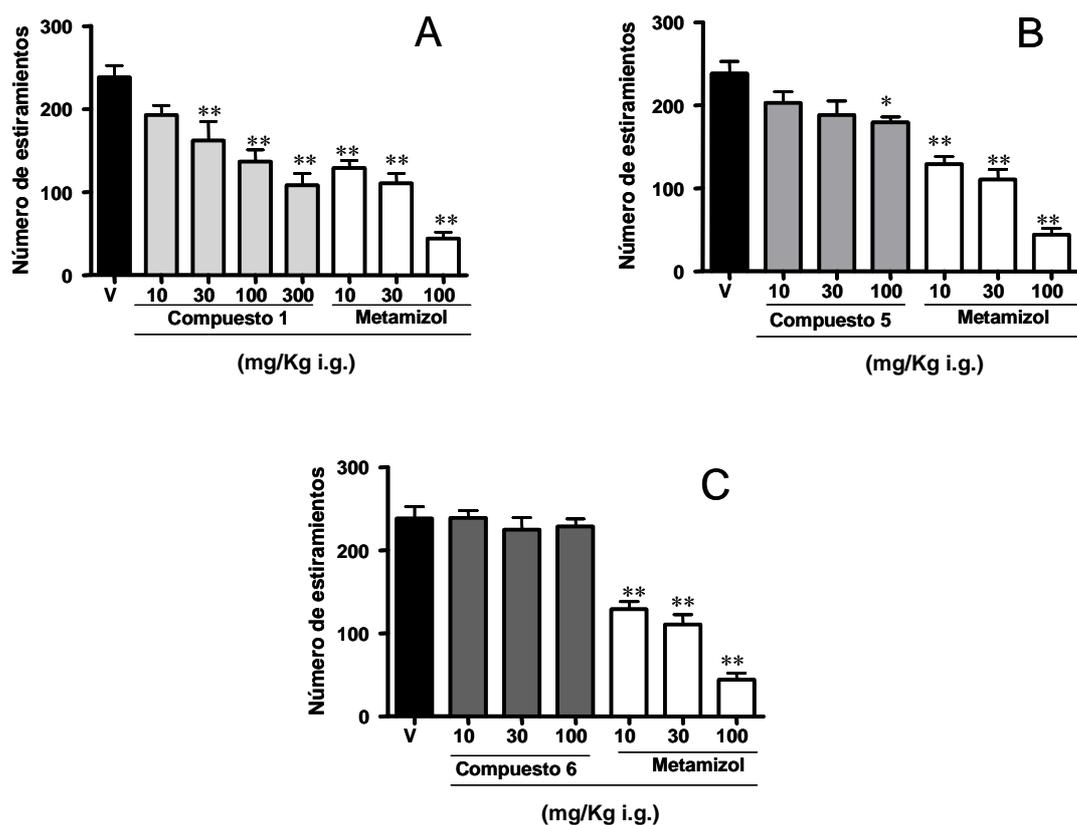


Figura 17. Efecto antinociceptivo de los compuestos 1 (panel A), 5 (panel B) y 6 (panel C) en la prueba de estiramiento abdominal. Los compuestos 1, 5, 6 y el vehículo (V=SSI) fueron administrados 40 min antes de la administración del ácido acético (0.6% i.p.). Se muestra también el efecto antinociceptivo de la administración de metamizol (administrado 15 min antes del estímulo algésico). Cada barra representa el promedio de 6 animales \pm e.e del número total de estiramientos generados durante un periodo de 30 min. La diferencia estadística es con respecto al vehículo, ** ($P < 0.01$), determinada por un ANDEVA, seguido de prueba de Dunnet.

8.1.2. Prueba de la placa caliente en ratón.

En esta prueba la conducta nociceptiva a evaluar está caracterizada por un salto, lamida de patas traseras o presencia de orina. En la figura 18 se muestra el curso temporal del grupo tratado únicamente con el vehículo (SSI). Los compuestos **1**, **5** y **6** fueron administrados (10, 30 y 100 mg/Kg i.g.) 40 min antes de colocar a los ratones en una superficie caliente ($55.3 \pm 0.1^{\circ}\text{C}$). El calor activa fibras nociceptivas termosensitivas y polimodales, este estímulo es selectivo y se dirige directamente hacia la médula espinal. En la prueba de la placa caliente no todos los fármacos analgésicos que tienen actividad en una prueba periférica como la de estiramiento abdominal presentan efecto antinociceptivo ya que es necesario que atraviesen la barrera hematoencefálica para generar antinocicepción a nivel espinal. Generalmente los fármacos de tipo opioide son los que tienen efecto en esta prueba de nocicepción, es por ello que se seleccionó como fármaco de referencia a morfina (1.5, 3 y 6 mg/Kg p.o., 15 min antes del estímulo térmico), un fármaco que actúa a nivel espinal no solo en receptores opioides de tipo mu sino también en receptores kappa.

En la Figura 19 se observa que el compuesto **6** muestra una ligera tendencia a incrementar la latencia a la respuesta nociceptiva conforme aumenta la dosis; sin embargo, este efecto no fue estadísticamente significativo con respecto al grupo control. Morfina y los compuestos **1** y **5** aumentaron la latencia de respuesta de manera dependiente de la dosis. También se observa que el compuesto **1** a las dosis de 10, 30 y 100 mg/Kg genera 102, 95 y 82 % de antinocicepción con respecto al 100% de antinocicepción generado por la administración de morfina. El compuesto **5** generó 84, 78 y 71 % de antinocicepción a las dosis de 10, 30 y 100 mg/Kg. Así, el compuesto **1** generó mayor efecto antinociceptivo con respecto al compuesto **5**.

En esta prueba se consideró como efecto máximo (100%) el efecto antinociceptivo de la dosis más alta de morfina (6 mg/Kg p.o.) que es equivalente a 2918.33 ua. La latencia de corte (30 s) fue determinada con esta dosis, esta latencia se tomó como referencia para retirar de la placa a aquellos animales que llegaron a este tiempo, esto permitió que no se generara daño al tejido.

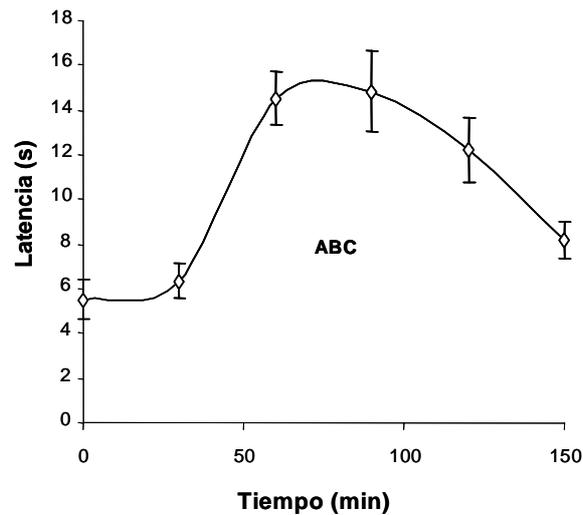


Figura 18. Prueba de la placa caliente. Curso temporal que muestra la latencia de respuesta (conducta nociceptiva caracterizada por un salto, lamida de patas traseras o presencia de orina) de un grupo de ratones que recibieron el vehículo (Tween 80 al 0.2% en SSI) y que fueron colocados 40 min después en una superficie caliente ($55.3 \pm 0.1^\circ\text{C}$). Cada punto corresponde al promedio de 6 animales \pm e.e. El ABC en ua representa el 100% de nocicepción.

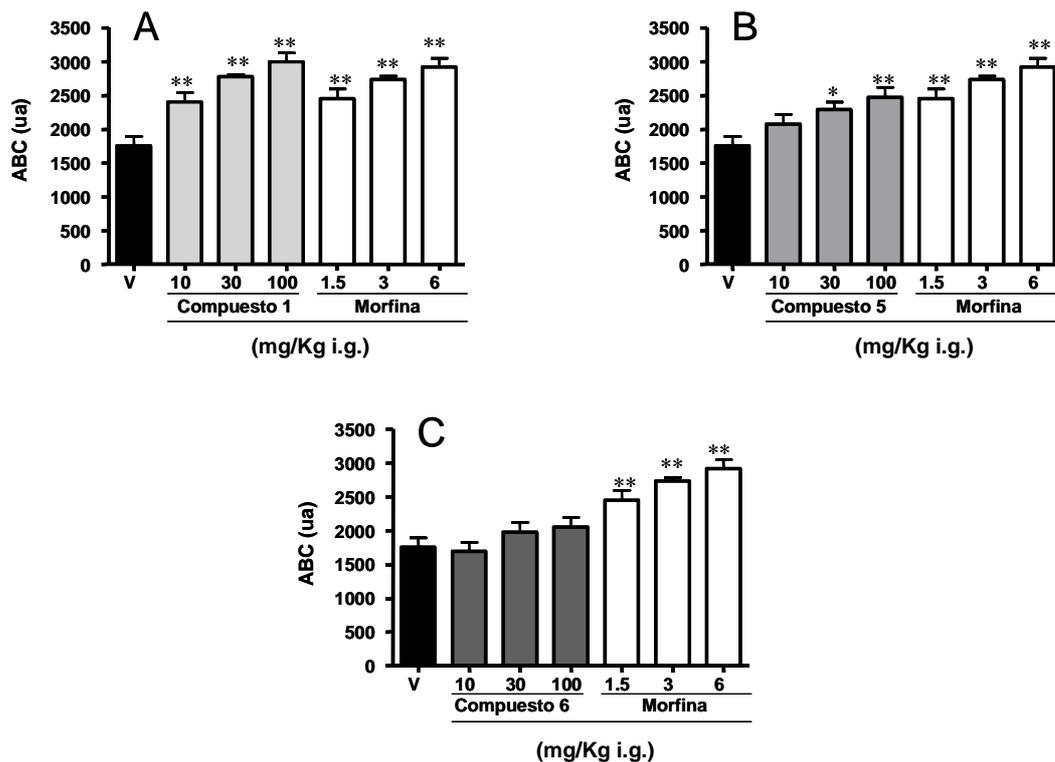


Figura 19. Efecto antinociceptivo de los compuestos 1 (panel A), 5 (panel B) y 6 (panel C) en la prueba de la placa caliente. Los compuestos y el vehículo (V=SSI) fueron administrados por vía intragástrica 40 min antes de colocar a los ratones sobre la superficie caliente ($55.3 \pm 0.1^\circ\text{C}$). Se muestra también el efecto antinociceptivo de la administración intragástrica de morfina (15 min antes del estímulo térmico algésico). Cada barra representa el promedio de 6 animales \pm e.e, expresado en ua del ABC de la latencia de respuesta. Diferencia estadística con respecto al grupo control, * ($P < 0.05$) y ** ($P < 0.01$), determinada por un ANDEVA de una vía, seguido de una prueba de Dunnet.

De los tres análogos N-aril sustituidos de la palmitoiletanolamida (compuestos **1**, **5** y **6**) evaluados en las pruebas nociceptivas de estiramiento abdominal y la placa caliente se determinó que el compuesto **1** presentó mayor efecto antinociceptivo en ambas pruebas de nocicepción. Este compuesto presenta un grupo metoxilo y un nitro en el arilo, en tanto que los compuestos **5** y **6** son ácidos con un sustituyente amino en la posición 2 y 4, respectivamente (Fig. 15).

Dada la actividad antinociceptiva presentada por el compuesto **1**, se decidió evaluar la posible participación de los receptores opioides como uno de los mecanismos por los cuales dicho compuesto produce su efecto antinociceptivo. Se seleccionó un fármaco antagonista de los receptores opioides como naloxona (NLX) y se seleccionó la dosis de 30 mg/Kg del compuesto **1** dado que genera un 95% de antinocicepción, a pesar de que la dosis de 100 mg/Kg generó el 100% de antinocicepción, lo cual obedece a que no se contó con suficiente compuesto.

Los ratones administrados con el compuesto **1** (30 mg/Kg, i.g.) y morfina (6 mg/Kg p.o.) fueron pretratados 15 minutos antes con naloxona (1 mg/Kg i.p.). La evaluación se realizó 40 min después de la administración del compuesto **1** y 15 min después de la administración de morfina. En la Figura 20 se observa que la administración de NLX no modificó la latencia de respuesta de los animales lo que indica que fue capaz de revertir el efecto antinociceptivo tanto de morfina como del compuesto **1**. Los resultados sugieren que el efecto del compuesto **1**, al igual que el de morfina, es mediado por la activación de los receptores opioides.

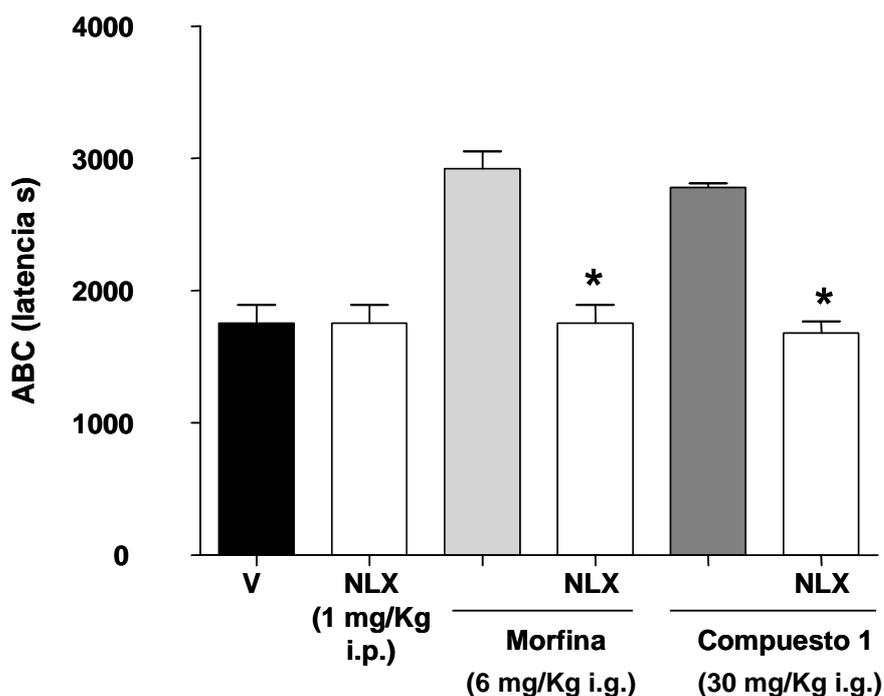


Figura 20. Participación de receptores opioides en el efecto antinociceptivo del compuesto **1** en la prueba de la placa caliente. Naloxona (NLX). Cada barra representa el promedio de 6 animales \pm e.e, expresado como ABC de la latencia de respuesta obtenida de un curso temporal de 150 min de evaluación. La diferencia estadística es con respecto a la administración individual ya sea el compuesto **1** o morfina (es decir sin pretratamiento con naloxona), * ($P < 0.05$), determinada por una prueba t' Student (Grupos comparados: morfina vs morfina + naloxona y compuesto **1** vs compuesto **1** + naloxona).

8. 2. Evaluación del efecto antinociceptivo de los compuestos análogos de la palmitoiletanolamida (1, 2, 3 y 4)

Una vez que se determinó que el compuesto **1** tenía mayor actividad antinociceptiva, se decidió determinar si la presencia del grupo nitro en el anillo de la palmitoiletanolamida es importante para la actividad biológica. Para ello se sintetizaron otros análogos que tuvieran un sustituyente nitro, los cuales se muestran en la Figura 21.

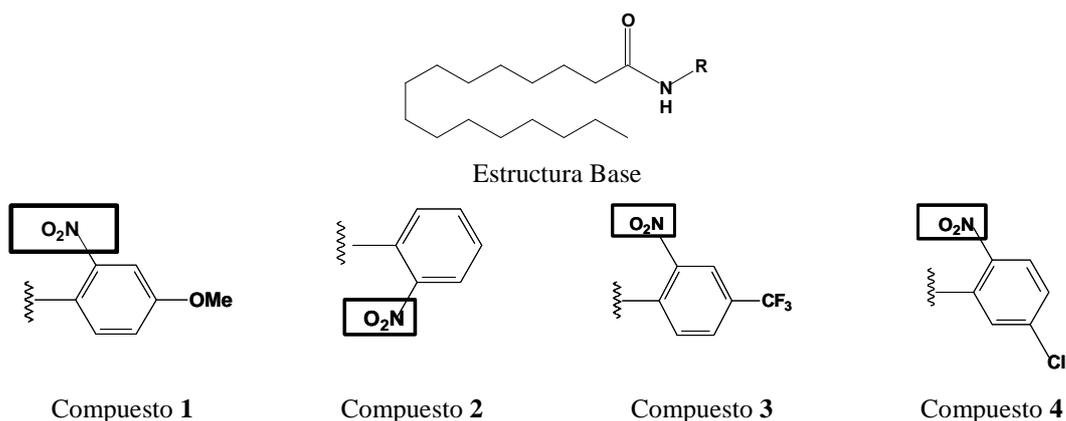


Figura 21. Estructura química de los compuestos 1, 2, 3 y 4 evaluados en la prueba de la formalina.

Lo compuestos **1**, **2**, **3** y **4** fueron evaluados en la prueba de la formalina, una de las pruebas de daño tisular e inflamación más utilizados, debido a que es la más sensible para detectar los efectos antinociceptivos con respecto a aquellas pruebas en donde se utiliza un estímulo fásico como es el térmico (placa caliente) o mecánico. En la Figura 22 se muestra el curso temporal del efecto nociceptivo producido por formalina al 1% en ratas a las cuales se les administró el vehículo (Tween 80 al 0.2% en SSI) por vía intraperitoneal.

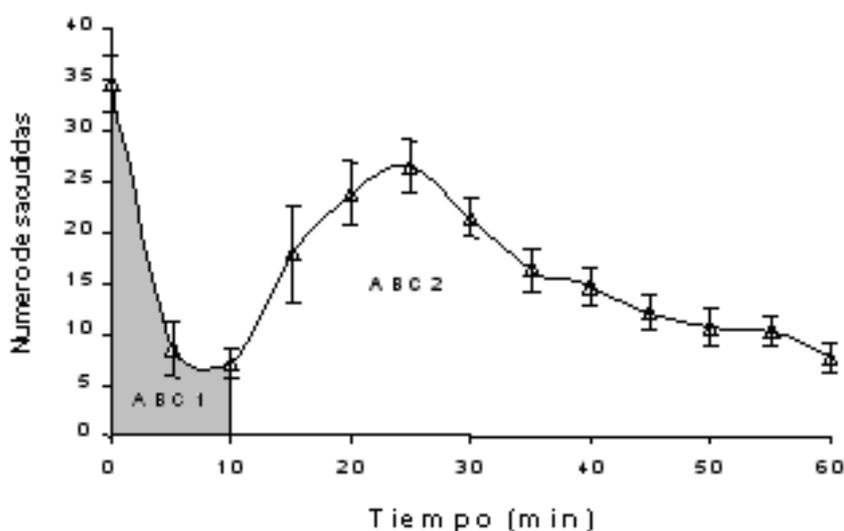


Figura 22. Prueba de la formalina. La administración de formalina al 1%, en la superficie dorsal de la pata inferior derecha, en ratas que recibieron vehículo (Tween 80 al 0.2% en SSI) generó una conducta nociceptiva caracterizada por sacudidas. Cada valor corresponde al promedio de 6 animales \pm e.e. La suma del ABC-1 (0-10 min, fase 1) y ABC-2 (10-60 min, fase 2) representa el efecto nociceptivo total.

Se decidió evaluar cuatro dosis del compuesto **1** (1, 3, 10 y 30 mg/Kg, i.p.) con la finalidad de determinar en que dosis se observaba una respuesta adecuada para evaluar los compuestos **2**, **3** y **4**. Debido a que se cambió de especie (de ratón a rata) se decidieron hacer algunos cambios en la metodología realizada para ratones, se cambió la vía de administración (de i.g. a i.p.) y el tiempo de evaluación (de 40 a 15 min después de la administración) con la finalidad de determinar otras condiciones experimentales que pudieran servir más adelante en la evaluación de la actividad antinociceptiva de esta serie de compuestos. En la Tabla 3 se observa que la administración del compuesto **1** genera una disminución del número de sacudidas; 30, 34, 30 y 41% de antinocicepción con respecto al vehículo a las dosis de 1, 3, 10 y 30 mg/Kg, respectivamente. Debido a que se determinó que no hay diferencia estadísticamente significativa (ANDEVA y post-hoc de Tukey) entre estos cuatro grupos, se evaluaron las dosis más altas la de 10 y 30 mg/Kg para los compuestos **2**, **3** y **4** con la finalidad de observar algún efecto mayor si es que se presentaba. En la Tabla 3 se observa que los compuestos **1**, **2**, **3** y **4** presentaron un efecto antinociceptivo muy similar, no existe diferencia estadística entre los grupos evaluados (ANDEVA y post-hoc de Tukey), por lo anterior se concluye que el grupo nitro es importante para la actividad antinociceptiva pero su posición no es importante para que se modifique la eficacia antinociceptiva.

Tabla 3. Efecto antinociceptivo de los compuestos **1**, **2**, **3** y **4** en la prueba de la formalina.

	Compuesto 1		Compuesto 2		Compuesto 3		Compuesto 4	
Dosis (mg/Kg i.p.)	10	30	10	30	10	30	10	30
% efecto antinociceptivo	30	41	34	41	42	43	38	42

El % de efecto antinociceptivo fue determinado con respecto al vehículo que representa el 100% de dolor y que corresponde a 956.25 ua del ABC del curso temporal de la Fase I y la Fase II.

En la evaluación del efecto antinociceptivo en la prueba de la formalina se utilizó como fármaco de referencia un analgésico de tipo AINE como el diclofenaco, se ha demostrado que este fármaco genera un efecto dependiente de la dosis en esta prueba de nocicepción. El diclofenaco fue administrado (1, 10, 30 y 56.2 mg/Kg, i.p.)

15 min antes de la administración de formalina. Los resultados muestran un efecto antinociceptivo dependiente de la dosis (Fig. 23).

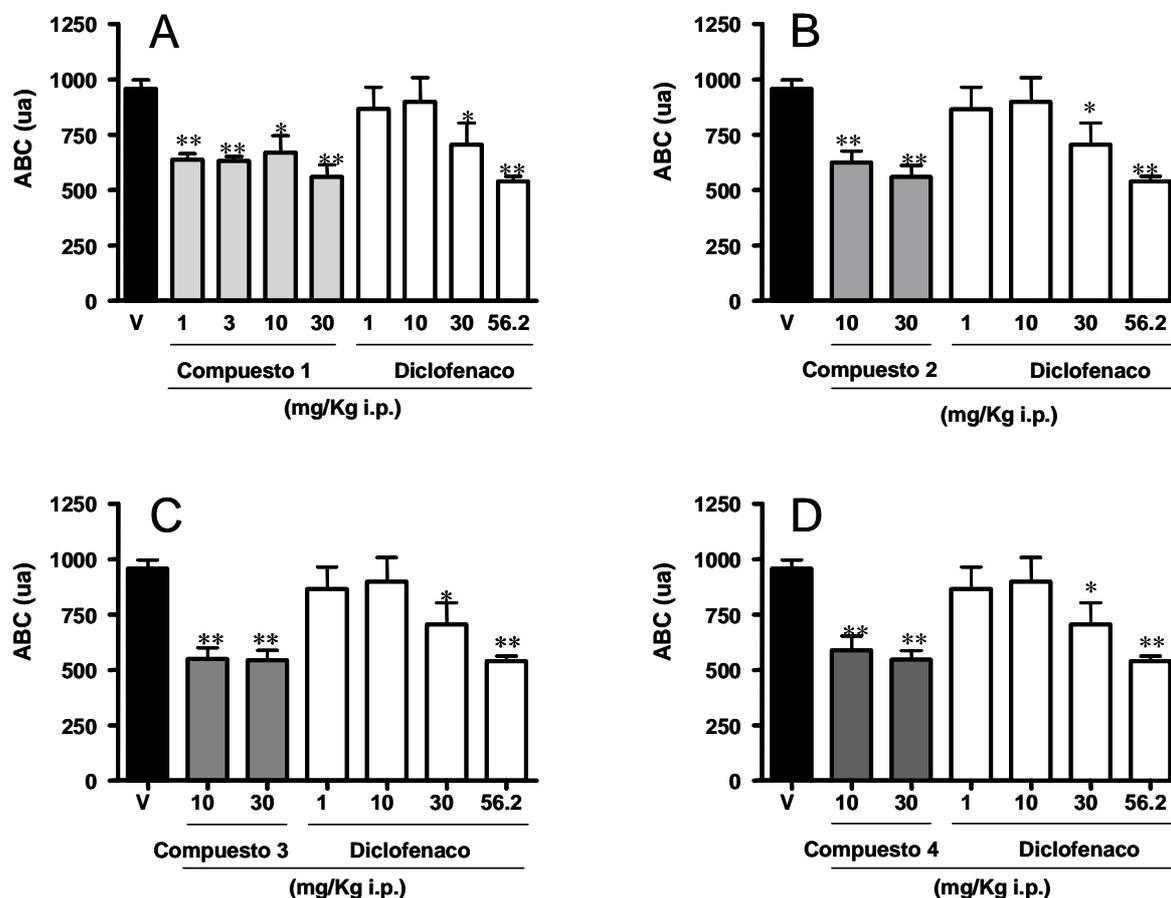


Figura 23. Efecto antinociceptivo de los compuestos 1 (panel A), 2 (panel B), 3 (panel C) y 4 (panel D) en la prueba de la formalina. Los compuestos 1, 2, 3, 4, diclofenaco y el vehículo (V) fueron administrados 15 min antes de la administración de formalina en la superficie plantar de las ratas. Cada barra representa el promedio de 6 animales \pm e.e, expresado como ABC del curso temporal del número de sacudidas obtenidas en un periodo de 60 min de evaluación. La diferencia estadística es con respecto al vehículo, * ($P < 0.05$) y ** ($P < 0.01$), determinada por un ANDEVA de una vía, seguido de una prueba de Dunnet.

8.3. Efecto antinociceptivo del compuesto 1 en la prueba de capsaicina.

Una vez que se demostró que los análogos de palmitoiletanolamida produjeron un efecto antinociceptivo en tres modelos diferentes, se decidió evaluar al compuesto 1 en un modelo de nocicepción de tipo neurogénico. En la prueba de capsaicina se produce una degeneración neuronal de las terminales nerviosas por lo que se conoce

como un modelo de nocicepción neurogénica. Este compuesto siguió en la evaluación con la intención de contar con un compuesto que pudiera tener un efecto sobre un dolor muy intenso de este tipo.

El vehículo o el compuesto **1** (3, 10, 30 100 y 150 mg/Kg i.g.) se administraron 40 min antes de la administración de capsaicina en la superficie plantar de la para inferior derecha (1.6 μ g/pata, s.c.) en el ratón. En la Figura 24 se observa que la administración del compuesto **1** generó una tendencia a disminuir la latencia de respuesta (caracterizada por lamida de la pata) con respecto a la administración del vehículo. Sin embargo, cuando las dosis se incrementaron a 100 y 150 mg/Kg se revirtió esta tendencia. Dado que no existe una diferencia estadísticamente significativa podría sugerirse o bien que el compuesto **1** presenta una tendencia dual en este modelo de nocicepción (antinocicepción y pronocicepción) o que la dosis necesita aumentarse aún más para buscar un efecto significativo (Fig. 24)

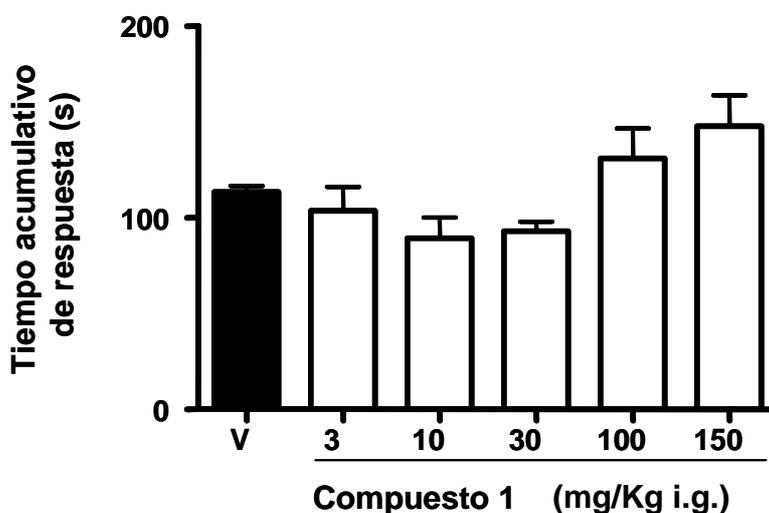


Figura 24. Efecto antinociceptivo del compuesto **1** en la prueba de capsaicina. Cada barra representa el promedio de 6 animales \pm e.e, expresado como el promedio de la latencia a la respuesta (lamida de pata) en un periodo de 5 min de evaluación. Después de realizar una prueba estadística (ANDEVA seguida de post-hoc de Dunnet) no se encontró una diferencia estadística con respecto al vehículo.

8.4. Efecto anticonvulsivo del compuesto 1 en la prueba de convulsiones inducidas por pentilentetrazol en ratón

Se decidió evaluar de manera preliminar el posible efecto anticonvulsivo del compuesto **1**, con la finalidad de conocer su potencial utilidad en el tratamiento de la epilepsia ya que diversos fármacos anticonvulsivantes son empleados en el tratamiento de diversas enfermedades en las que se presenta un dolor de tipo neuropático. En la Figura 24 se observa que la administración del compuesto **1** (30, 100, 300 y 1000 mg/Kg i.p.) 40 min antes de la administración de pentilentetrazol (PTZ) aumenta la latencia a la crisis convulsiva.

El compuesto **1** presentó un efecto protector en la generación de convulsiones además de retardar la presencia de muerte. El pentilentetrazol (PTZ) es un antagonista no específico de GABA (Macdonald y Barker, 1978), por lo que probablemente este compuesto esté involucrado con mecanismos GABAérgicos para ejercer su efecto farmacológico.

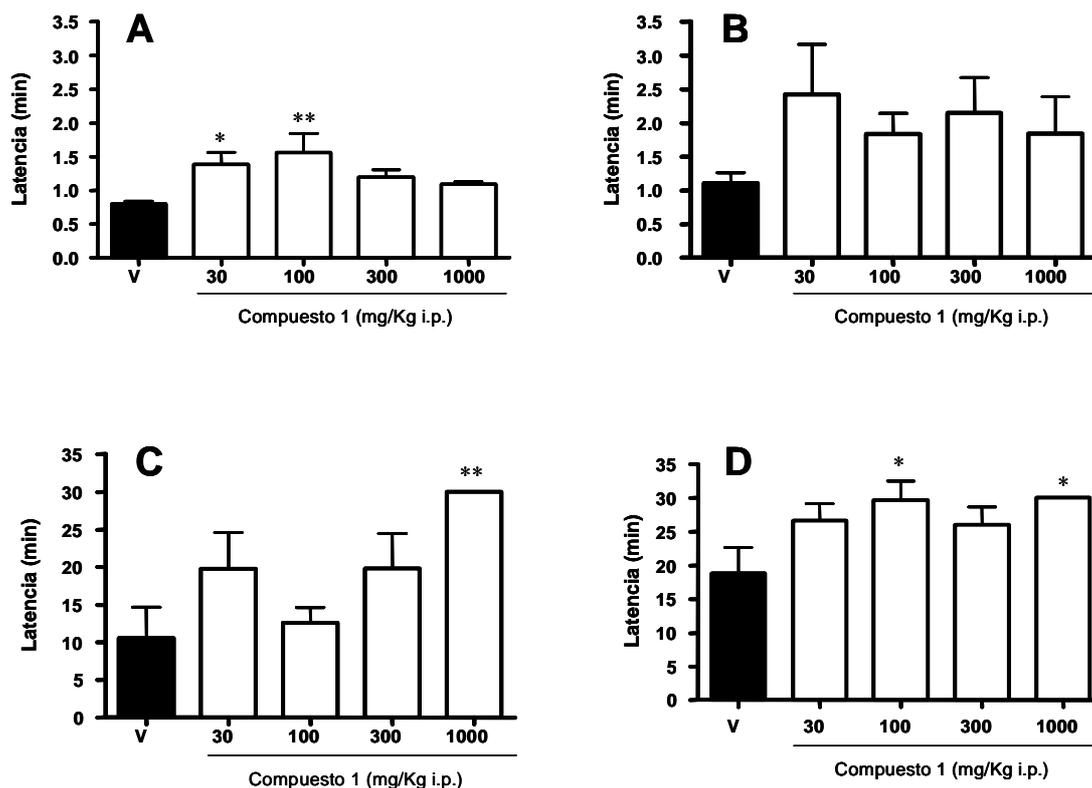


Figura 25. Efecto anticonvulsivo del compuesto **1** en la prueba de convulsiones por pentilentetrazol. El compuesto **1** y el vehículo (V) fueron administrados 30 minutos antes de la administración de pentilentetrazol (i.p.). Cada barra representa el promedio de 6 animales \pm e.e, expresado como el promedio de la latencia a la respuesta (panel **A**; Mioclónias, panel **B**; Crisis generalizada, panel **C**; convulsiones tónicas, y panel **D** Muerte). La diferencia estadística es con respecto al vehículo, * ($P < 0.05$) y ** ($P < 0.01$), determinada por un ANDEVA, seguido de una prueba de Dunnet.

IX. CONCLUSIONES

El presente trabajo permitió determinar de manera preliminar que 6 análogos N-aril sustituidos de la palmitoiletanolamida tienen potencial para el tratamiento del dolor debido a los efectos antinociceptivos que producen en diversos modelos de dolor en roedores.

Este tipo de compuestos produjeron un efecto antinociceptivo significativo en las pruebas de estiramiento abdominal y formalina, lo cual los convierte en probable elección terapéutica para el dolor de tipo visceral y de tipo inflamatorio

Por otra parte, se demostró que el efecto antinociceptivo de uno de los compuestos, el *N*-(4-metoxi-2-nitrofenil)hexadecanamida, es revertido por naloxona (antagonista de receptores opioides). Esto sugiere que el sistema opioide está involucrado en el efecto antinociceptivo de este compuesto. Dado que existe una

estrecha relación entre el sistema cannabinoide y el sistema opioide y que, estos compuestos provocan la inhibición de la enzima FAAH. resulta interesante seguir con la evaluación de los mecanismos de acción de este tipo de compuestos.

Finalmente, el compuesto *N*-(4-metoxi-2-nitrofenil)hexadecanamida produjo un efecto anticonvulsivo, lo que sugiere que este tipo de compuestos podrían ser de utilidad terapéutica en padecimientos como la epilepsia.

X. PERSPECTIVAS.

A continuación se mencionan algunas propuestas para continuar con la evaluación del efecto antinociceptivo de los análogos de palmitoiletanolamida.

- I. Evaluar los 6 análogos en la prueba de estiramiento abdominal, placa caliente, la prueba de la formalina y la prueba de capsaicina. Con la finalidad de hacer una CDR con al menos 5 dosis y poder determinar su DE₅₀, su eficacia y su potencia.
- II. Determinar el efecto antinociceptivo de los 6 análogos en otros modelos de tipo inflamatorio, para determinar el espectro de actividad.
- III. Realizar pruebas de toxicidad para determinar la seguridad de este tipo de compuestos.
- IV. Determinar en todos los análogos el posible efecto anticonvulsivo.
- V. Evaluar los 6 análogos en una prueba de dolor neuropático por ligadura del nervio L4 y L5, con la finalidad de corroborar su utilidad en este tipo de dolor.
- VI. Seleccionar un modelo experimental para determinar el posible mecanismo de acción de este tipo de compuestos:
 - Determinar la participación del sistema gabaérgico utilizando antagonistas de los receptores GABA como bicuculina.
 - Determinar la participación del sistema opioide más específico utilizando otros antagonistas de los receptores opioides como DAMGO y naltrexona.
 - Determinar la participación del sistema vanilloide, utilizando antagonistas de los receptores vanilloides como la capzacepina.

XII. REFERENCIAS

- Al-Chaer ED, Traub RJ. Biological basis of visceral pain: recent developments. *Pain*. 2002; 96: 221-225.
- Andersson M, Jacobsson SO, Jonsson KO, Tiger G, Fowler CJ. Neurotoxicity of glutamate in chick telencephalon neurons: reduction of toxicity by preincubation with carbachol, but not by the endogenous fatty acid amides anandamide and palmitoylethanolamide. *Arch. Toxicol*. 2000; 74: 161-164.
- Backonja MM. Anticonvulsants (antineuropathics) for neuropathic pain syndromes. *Clin J Pain*. 2000;16(2 Suppl):S67-72.
- Basbaum, AI, Jessell TM. Principles of neuroscience. 2000. McGraw-Hill. New York; p.p. 472-491.
- Basbaum AI, Woolf CJ. Pain. *Curr Biol*. 1999;9(12):R429-31.
- Bautista DM, Jordt SE, Nikai T, Tsuruda PR, Read AJ, Poblete J, Yamoah EN, Basbaum AI., Julius D. TRPA1 Mediates the Inflammatory Actions of Environmental Irritants and Proalgesic Agents. *Cell*. 2006; 124: 1269-1282.
- Bautista, DM, Movahed P, Hinman A, Axelsson HE, Sterner O, Hogestatt ED, Julius D, Jordt SE, and Zygmunt PM. Pungent products from garlic activate the sensory ion channel TRPA1. *Proc Natl Acad Sci*. 2005; 102: 12248-12252.
- Berdyshev EI, Boichot E, Corbel M, Germain N, Lagente V. Effects of cannabinoid receptor ligands on LPS-induced pulmonary inflammation in mice. *Life Sci*. 1998;63(8):PL125-9.
- Bevan S. Inflammation. *Textbook of Pain*. 1999. (eds) Wall PD y Melzack R. Churchill Livingstone; p.p. 85-103.
- Bhargava HN. Inhibition of naloxone-induced withdrawal in morphine dependent mice by 1-trans-delta9-tetrahydrocannabinol. *Eur J Pharmacol*. 1976; 36: 259-262.
- Bicher HI, Mechoulam R. Pharmacological effects of two active constituents of marijuana. *Arch Int Pharmacodyn*. 1968; 172: 24-31.
- Bisogno T1, Howell F, Williams G, Minassi A, Cascio MG, Ligresti A, Matias I, Schiano-Moriello A, Paul P, Williams EJ, Gangadharan U, Hobbs C, Di Marzo V, Doherty P. Cloning of the first sn1-DAG lipases points to the spatial and temporal regulation of endocannabinoid signaling in the brain. *J Cell Biol*. 2003;163(3):463-8.
- Bley KR, Hunter JC, Eglen RM, Smith JA. The role of IP prostanoid receptors in inflammatory pain. *Trends Pharmacol Sci*. 1998;19(4):141-7.
- Burnstock G, Wood JN. Purinergic receptors: their role in nociception and primary afferent neurotransmission. *Curr Opin Neurobiol*. 1996;6(4):526-32.
- Buvanendran A., Kroin J.S. Useful adjuvants for postoperative pain management. *Best Prac Res Clin Anaesthesiol*. 2007; 21: 31-49.
- Buxbaum DM. Analgesic activity of 9 -tetrahydrocannabinol in the rat and mouse. *Psychopharmacologia*. 1972;25(3):275-80.
- Calignano A, La Rana G, Giuffrida A, Piomelli D. Control of pain initiation by endogenous cannabinoids. *Nature*. 1998;394(6690):277-81.
- Carai MA, Colombo G, Gessa GL. Rimobant: the first therapeutically relevant cannabinoid antagonist. *Life Sci*. 2005;77(19):2339-50.

- Caterina MJ, Leffler A, Malmberg AB, Martin WJ, Trafton J, Petersen-Zeit KR, Koltzenburg M, Basbaum AI, Julius D. Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. *Science*. 2000; 288: 306–313.
- Caterina MJ, Julius D. The vanilloid receptor: a molecular gateway to the pain pathway. *Annu Rev Neurosci*. 2001; 24: 487–517.
- Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature*. 1997; 389: 816–824.
- Chiou LC, Hu SS, Ho YC. Targeting the cannabinoid system for pain relief? *Acta Anaesthesiol Taiwan*. 2013;51(4):161-70.
- Chu CJ1, Huang SM, De Petrocellis L, Bisogno T, Ewing SA, Miller JD, Zipkin RE, Daddario N, Appendino G, Di Marzo V, Walker JM. N-oleoyldopamine, a novel endogenous capsaicin-like lipid that produces hyperalgesia. *J Biol Chem*. 2003;278(16):13633-9.
- Clapham DE, Runnels LW, Strubing C. The TRP ion channel family. *Nat Rev Neurosci*. 2001; 6:387–396.
- Cortright DN, Szallasi A. Biochemical pharmacology of the vanilloid receptor TRPV1. An update. *Eur J Biochem*. 2004; 271:1814–1819.
- Costa B, Comelli F, Bettoni I, Colleoni 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 CB(1), TRPV1 and PPARgamma receptors and neurotrophic factors. *Pain*. 2008;139(3):541-50.
- Covino BG, Dubner R, Gybels J, Kosterlitz HW, Liebeskind JC, Sternbach RA, Vyclicky L, Yamamura H, Zimmermann M. Ethical standards for investigations of experimental pain in animals. *Pain*. 1980; 9: 141-143.
- Cravatt BF, Giang DK, Mayfield SP, Boger DL, Lerner RA, Gilula NB. Molecular characterization of an enzyme that degrades neuromodulatory fatty-acid amides. *Nature*. 1996; 384(6604):83-7.
- Devane WA, Hanus L, Breuer A, Pertwee RG, Stevenson LA, 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.
- Di Marzo V. A brief history of cannabinoid and endocannabinoid pharmacology as inspired by the work of British scientists. *Trends Pharmacol Sci*. 2006;27(3):134-40.
- Di Marzo VI, Fontana A, Cadas H, Schinelli S, Cimino G, Schwartz JC, Piomelli D. Formation and inactivation of endogenous cannabinoid anandamide in central neurons. *Nature*. 1994;372(6507):686-91.
- Dinarello CA. Interleukin 1 and other growth factors. 1989. *Text book of rheumatology*. Kelley.Eds. New York; p.p. 285-299.
- Dray A. Inflammatory mediators of pain. *Br J Anaesth*. 1995;75(2):125-31.
- Dray A, Bettaney J, Forster P, Perkins MN. Bradykinin-induced stimulation of afferent fibres is mediated through protein kinase C. *Neurosci Lett*. 1988;91(3):301-7.
- Duarte-Fajardo Z.V. Diseño y síntesis de palmitoilamidas N-aril sustituidas como potenciales inhibidores de la enzima amidohidrolasa de ácidos grasos (FAAH). 2006. Universidad Autónoma del estado de Morelos, Facultad de Farmacia; p.p. 58-66.

- Duggan AW, Hendry IA, Morton CR, Hutchison WD, Zhao Z-Q. Cutaneous stimuli releasing substance P in the dorsal horn of the cat. *Brain Res.* 1988; 451:261-273.
- Eddy D, Leimbach D. Synthetic analgesic.II. Dithienylbutenyl and Dithienylbutylamines. *J Pharmacol Exp Ther.* 1953; 107: 385-393.
- Ferreira SH, Lorenzetti BB, Bristow AF, Poole S. Interleukin-1 beta as a potent hyperalgesic agent antagonized by a tripeptide analogue. *Nature.* 1988;334(6184):698-700.
- Fields HL, Martin JB. Manifestaciones de la enfermedad. 1994. Dolor. Ed. Harrison. Principios de Medicina Interna. Isselbacher, Braunwald, Wilson, Martin, Fauci y Kasper editores. Madrid: Interamericana McGraw-Hill; 1: p.p. 57-63.
- Franjo G. Los cannabinoides y el sistema endocannabinoide, Mini revisión Cannabinoids. 2006; Vol.1, No1.
- Freund TF, Katona I, Piomelli D. Role of endogenous cannabinoids in synaptic signaling. *Physiol Rev.* 2003; 83(3):1017-66.
- Gunthorpe MJ, Rami HK, Jerman JC, Smart D, Gill CH, Soffin EM, Luis Hannan S, Lappin SC, Egerton J, Smith GD, et al. Identification and characterisation of SB-366791, a potent and selective vanilloid receptor (VR1/TRPV1) antagonist. *Neuropharmacology.* 2004; 46: 133–149.
- Gobbi G, Bambico FR, Mangieri R, Bortolato M, Campolongo P, Solinas M, Cassano T, Morgese MG, Debonnel G, Duranti A, et al. Antidepressant like activity and modulation of brain monoaminergic transmission by blockade of anandamide hydrolysis. *Proc Natl Acad Sci.* 2005; 102: 18620-18625.
- Herkenham M, Lynn AB, Johnson MR, Melvin LS, de Costa BR, Rice KC. Characterization and localization of cannabinoid receptors in rat brain: a quantitative in vitro autoradiographic study. *J Neurosci.* 1991; 11: 563-583.
- Ho WS, Barrett DA, Randall MD. 'Entourage' effects of N-palmitoylethanolamide and N-oleoylethanolamide on vasorelaxation to anandamide occur through TRPV1 receptors. *Br J Pharmacol.* 2008;155(6):837-46.
- Hohmann AG, Herkenham M. Regulation of cannabinoid and mu opioid receptors in rat lumbar spinal cord following neonatal capsaicin treatment. *Neurosci Lett.* 1998; 252: 13-16.
- Howlett AC, Breivogel CS, Childers SR, Deadwyler SA, Hampson RE, Porrino LJ. Cannabinoid physiology and pharmacology: 30 years of progress. *Neuropharmacology.* 2004;47 Suppl 1:345-58.
- Howlett AC, Mukhopadhyay S, Shim JY, Welsh WJ. Signal transduction of eicosanoid CB1 receptor ligands. *Life Sci.* 1999;65(6-7):617-25.
- Hyman SE, Cassem NH. Dolor. En: *Neurología.* 1995. Ed. Científica Médica Latinoamericana; p.p. 1-20.
- Jacob A, Todd, AR. Cannabis indica. Part II. Isolation of cannabidiol from Egyptian hashish. Observations on the structure of cannabinol. *J. Chem. Soc.* 1940; 649–653.
- Jaggari SI, Hasnie FS, Sellaturay S, Rice AS. The anti-hyperalgesic actions of the cannabinoid anandamide and the putative CB2 receptor agonist palmitoylethanolamide in visceral and somatic inflammatory pain. *Pain.* 1998; 76: 189-99.
- Jayamanne A, Greenwood R, Mitchell VA, Aslan S, Piomelli D, Vaughan CW. Actions of the FAAH inhibitor URB597 in neuropathic and inflammatory chronic pain models. *Br J Pharmacol.* 2006;147(3):281-8.

- Ji RR, Samad TA, Jin SX, Schmoll R, Woolf CJ. p38 MAPK activation by NGF in primary sensory neurons after inflammation increases TRPV1 levels and maintains heat hyperalgesia. *Neuron*. 2002; 36:57–68.
- Jordt SE., Bautista DM, Chuang HH., McKemy DD., Zygmunt PM.,Hogestatt ED, Meng ID, Julius D. Mustard oils and cannabinoids excite sensory nerve fibres through the TRP channel ANKTM1. *Nature*. 2004; 427: 260-265.
- Julius D, Basbaum AI. Molecular mechanisms of nociception. *Nature*. 2001 Sep 13;413(6852):203-10.
- Kandel E, Schwartz J, Jesell T. Principles of Neural Science. 2000. Ed. McGraw-Hill. España; p.p. 1515-1520.
- Katsura H, Obata K, Mizushima T, Yamanaka H, Kobayashi K, Dai Y, Fukuoka T, Tokunaga A, Sakagami M, Noguchi K. Antisense knock down of TRPA1, but not TRPM8, alleviates cold hyperalgesia after spinal nerve ligation in rats. *Exp Neurol*. 2006; 200: 112-23.
- Kennedy JD. Neuropathic pain: molecular complexity underlies continuing unmet medical need. *J Med Chem*. 2007;50(11):2547-56.
- Kidd BL, Urban LA. Mechanisms of inflammatory pain. *Br J Anaesth*. 2001;87(1):3-11.
- Koster R, Anderson M, De Beer EJ. Acetic acid for analgesic screening. *Federation Proceedings*. 1959 ; 18: 412.
- Laird JM, Olivar T, Roza C, De Felipe C, Hunt SP, Cervero F. Deficits in visceral pain and hyperalgesia of mice with a disruption of the tachykinin NK1 receptor gene. *Neuro*. 2000; 98: 345-352.
- Lambert DM, Vandevoorde S, Jonsson KO, Fowler CJ. The palmitoylethanolamide family: a new class of anti-inflammatory agents? *Curr Med Chem*. 2002;9(6):663-74.
- LaMotte RH, Thalhammer JG, Torebjörk HE, Robinson CJ. Peripheral neural mechanisms of cutaneous hyperalgesia following mild injury by heat. *J Neurosci*. 1982;2(6):765-81.
- Lee J, Lee J, Kang M, Shin M, Kim JM, Kang SU, Lim JO, Choi HK, Suh YG, Park HG, et al. N-(3-Acyloxy-2-benzylpropyl)-N-[4-(methylsulfonylamino)benzyl] thiourea analogues: novel potent and high affinity antagonists and partial antagonists of the vanilloid receptor. *J Med Chem*. 2003; 46:3116–3126.
- Levine JD, Fields HL, Basbaum AI. Peptides and the primary afferent nociceptor. *J Neurosci*. 1993 Jun;13(6):2273-86.
- Litchman AH, Martin BR. Cannabinoid-induced antinociception is mediated by a spinal alpha 2-noradrenergic mechanism. *Pharmacol Exp Ther*. 1991; 258:5 17-555.
- Loewe R, Adams R. Structure-activity relationship (SAR) and pharmacological peculiarities of new synthetic congeners of tetrahydrocannabinol. *Fed Proc*. 1947;6(1):352.
- 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 antiinflammatory actions of palmitoylethanolamide. *Neuro*. 2005; 67: 15-9.
- Lu Y, Pirec V, Yeomans DC. Differential antinociceptive effects of spinal opioids on foot withdrawal responses evoked by C fiber or A delta nociceptor activation. *Br J Pharmacol*. 1997; 121: 1210-1216.
- Macdonald RL, Barker JL. Different actions of anticonvulsant and anesthetic barbiturates revealed by use of cultured mammalian neurons. *Science*. 1978; 200(4343):775-7.

- Macpherson LJ, Geierstanger BH, Viswanath V, Bandell M, Eid SR, Hwang S, Patapoutian A. The pungency of garlic: activation of TRPA1 and TRPV1 in response to allicin. *Curr Biol.* 2005; 15: 929-934.
- Malmberg AB, Yaksh TL. The effect of morphine on formalin-evoked behaviour and spinal release of excitatory amino acids and prostaglandin E2 using microdialysis in conscious rats. *Br J Pharmacol.* 1995; 114: 1069-1075.
- Mano I, Driscoll M. DEG/ENaC channels: a touchy superfamily that watches its salt. *Bioessays.* 1999;21(7):568-78.
- Mansour A, Khachaturian H, Lewis ME, Akil H, Watson SJ. Anatomy of CNS opioid receptors. *Trends Neurosci.* 1988; 11: 308-314.
- Martin WJ, Patrick SL, Coffin PO, Tsou K, Walker JM. An examination of the central sites of action of cannabinoid-induced antinociception in the rat. *Life Sci.* 1995; 56: 2103-2109
- Matsuda LA, Lolait SJ, Brownstein MJ, Young AC, Bonner TI. Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature.* 1990;346(6284):561-4.
- 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. *Eur J Pharmacol.* 1996;300(3):227-36.
- Meng ID, Manning BH, Martin WJ, Fields HL. An analgesia circuit activated by cannabinoids. *Nature.* 1998; 395(6700):381-3.
- Merskey H. Pain terms: a list with definitions and notes on usage recommended by the IASP subcommittee on taxonomy. *Pain.* 1979; 6: 249.
- Mohab MI, Porreca F. CB2 cannabinoid receptor activation produces antinociception by stimulating peripheral release of endogenous opioids, *The National Academy of Sciences.* 2007; 102: 3093–3098.
- Moreno-Brea M, Micó J. ¿Tienen algún papel los cannabinoides en el tratamiento del dolor?. *Rev Soc Esp del Dolor.* 2002; 9: 351,352.
- Munro S, Thomas KL, Abu-Shaar M. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature.* 1993; 365(6441):61-5.
- Nakamura M, Ferreira SH. Peripheral analgesic action of clonidine: mediation by release of endogenous enkephalin-like substances. *Eur J Pharmacol.* 1988; 146: 223-8.
- Narender R, Gavva, Rami Tamir, Yusheng Qu, Lana Klionsky, T. J. Zhang, David Immke, Judy Wang, Dawn Zhu, Todd W. Vanderah, Frank Porreca, Elizabeth M. Doherty, Mark H. Norman, Kenneth D. Wild, Anthony W. Bannon, Jean-Claude Louis, James J. S. Treanor. AMG 9810 [(E)-3-(4-*t*-Butylphenyl)-N-(2,3-dihydrobenzo[*b*][1,4]dioxin-6-yl)acrylamide], a Novel Vanilloid Receptor 1 (TRPV1) Antagonist with Antihyperalgesic Properties. *The journal of pharmacology and experimental therapeutics.* 2005; 313: 474-484.
- Nestler EJ. Molecular mechanisms of drug addiction. *J Neurosci.* 1992; 12(7):2439-50.
- Niforatos W, Zhang, Lake M, Walter K, Neelands T, Holzman TF, Scott VE, Faltynek CR, Moreland B y Chen J. Activation of TRPA1 Channels by the Fatty Acid Amide Hydrolase Inhibitor. *Mol Pharmacol.* 2007; 71: 1209-1216.
- O'Banion MK. Cyclooxygenase-2: Molecular biology pharmacology and neurobiology. *Crit Rev. Neurobiol.* 1999; 13: 45-82.

- O'Shaughnessy, W.B. (1838–1840) On the preparations of the Indian hemp (*Cannabis indica*); their effects on the animal system in health, and their utility in the treatment of tetanus and other convulsive diseases. *Transactions of the Medical and Physical Society, Bengal* 71-102, 421–426.
- Ortiz-Mesina M. Efectos de los cannabinoides sobre el músculo esquelético. 2005. Universidad de Colima. p.p. 12-26.
- Parinandi NL, Schmid HH. Effects of long-chain N-acylethanolamines on lipid peroxidation in cardiac mitochondria. *FEBS Lett*; 237: 49-52.
- Pertwee RG. Cannabinoid receptors and pain. *Prog Neurobiol*. 2001;63(5):569-611
- Price MR, Baillie GL, Thomas A, Stevenson LA, Easson M, Goodwin R, McLean A, McIntosh L, Goodwin G, Walker G, Westwood P, Marrs J, Thomson F, Cowley P, Christopoulos A, Pertwee RG, Ross RA. Allosteric modulation of the cannabinoid CB1 receptor. *Mol Pharmacol*. 2005;68(5):1484-95.
- Pomonis JD, Harrison JE, Mark L, Bristol DR, Valenzano KJ, Walker K. BCTC (N-(4-tertiarybutylphenyl)-4-(3-cholorpyridin-2-yl) tetrahydropyrazine-1(2H)-carbox-amide), a novel, orally effective vanilloid receptor 1 antagonist with analgesic properties: II. In vivo characterization in rat models of inflammatory and neuropathic pain. *J Pharmacol Exp Ther*. 2003; 306:387–393.
- Pugh G Jr, Mason DJ Jr, Combs V, Welch SP. Involvement of dynorphin B in the antinociceptive effects of the cannabinoid CP55, 940 in the spinal cord. *J Pharmacol Exp Ther*. 1997; 281: 730-7.
- Puig S, Sorkin LS. Formalin-evoked activity in identified primary afferent fibers: systemic lidocaine suppresses phase-2 activity. *Pain*. 1996; 64:345-355.
- Reynolds TD, Osborn HL. The use of cannabinoids in chronic pain. *BMJ Case Rep*. 2013 Jul 26;2013.
- Rice AS, Maton S. Gabapentin in postherpetic neuralgia: a randomised, double blind, placebo controlled study. *Pain*. 2001; 94: 215-224.
- Rinaldi-Carmona M, Barth F, Héaulme M, Shire D, Calandra B, Congy C, Martinez S, Maruani J, Néliat G, Caput D, et al. SR141716A, a potent and selective antagonist of the brain cannabinoid receptor. *FEBS Lett*. 1994;350(2-3):240-4.
- Rodríguez U, Carrillo E, Soto E. Cannabinoides: neurobiología y usos médicos. *Elementos* No. 60, Vol. 12, Octubre - Diciembre, 2005, Página 3.
- Romero J, Wenger T, de Miguel R, Ramos JA, Fernández-Ruiz JJ. Cannabinoid receptor binding did not vary in several hypothalamic nuclei after hypothalamic deafferentation. *Life Sci*. 1998; 63:351-6.
- Ross RA, Brockie HC, Pertwee RG. Inhibition of nitric oxide production in RAW264.7 macrophages by cannabinoids and palmitoylethanolamide. *Eur J Pharmacol*. 2000;401(2):121-30.
- Rowen DW, Embrey JP, Moore CH, Welch SP. Antisense oligodeoxynucleotides to the kappa1 receptor enhance delta9-THC-induced antinociceptive tolerance. *Pharmacol Biochem Behav*. 1998; 59:399-404.
- Sándor K, Helyes Z, Gyires K, Szolcsányi J, László J. Static magnetic field-induced anti-nociceptive effect and the involvement of capsaicin-sensitive sensory nerves in this mechanism. *Life Sci*. 2007;81(2):97-102.
- Sanger GJ, Hicks GA. Drugs targeting functional bowel disorders: insights from animal studies. *Cur Opin Pharmacol*. 2002; 2: 678-683.

- Savidge J, Davis C, Shah K, Colley S, Phillips E, Ranasinghe S, Winter J, Kotsonis P, Rang H, McIntyre P. Cloning and functional characterization of the guinea pig vanilloid receptor 1. *Neuropharmacology*. 2002; 43:450–456.
- Sawynok J. Topical and peripherally acting analgesics. *Pharmacol Rev*. 2003; 55:1–20.
- Seabrook GR, Sutton KG, Jarolimek W, Hollingworth GJ, Teague S, Webb J, Clark N, Boyce S, Kerby J, Ali Z, et al. Functional properties of the high-affinity TRPV1 (VR1) vanilloid receptor antagonist (4-hydroxy-5-iodo-3-methoxyphenylacetate ester)iodo-resiniferatoxin. *J Pharmacol Exp Ther*. 2002; 303:1052–1060.
- Sepe N, De Petrocellis L, Montanaro F, Cimino G, Di Marzo V. Bioactive long chain N-acylethanolamines in five species of edible bivalve molluscs. Possible implications for mollusc physiology and sea food industry. *Biochim Biophys Acta* 1998; 1389:101-11.
- Sherrington CS. *The Integrative Action of the Nervous System*. Scribner 1996, New York; p.p. 200-203.
- Skaper SD, Buriani A, Petrelli L, Romanello S, Facci L y Leon A. The ALIAMide palmitoylethanolamide and cannabinoids, but not anandamide, are protective in a delayed postglutamate paradigm of excitotoxic death in cerebellar granule neurons (N-methyl-D-aspartate/neurotoxicity/N-acylethanolamides/neuroprotection/receptor). *Proc. Natl. Acad. Sci*. 1996. USA; p.p. 3984-3989.
- Smith FL, Fujimori K, Lowe J, Welch SP. Characterization of delta 9-tetrahydrocannabinol and anandamide antinociception in non arthritic and arthritic rats, *Pharmacol Biochem Behav* 1988; 60: 183-191.
- Story GM, Peier AM, Reeve AJ, Eid SR, Mosbacher J, Hricik TR, Earley TJ, Hergarden AC, Andersson DA, Hwang SW, et al. ANKTM1, a TRP-like channel expressed in nociceptive neurons, is activated by cold temperatures. *Cell*. 2003; 112: 819-829.
- Stucky Ch. L. *Mechanisms of Pain*. PNAS 2001; 21: 11845-11846.
- Su X., Joshi S.K., Kardos S., Gebhart G.F. Sodium channel blocking actions of the kappa-opioid receptor agonist U50,488 contribute to its visceral antinociceptive effects. *J Neurophysiol*. 2002; 127:1-1279.
- Sugiura T, Waku K. 2-Arachidonoylglycerol and the cannabinoid receptors. *Chem Phys Lipids*. 2000; 108(1-2):89-106.
- Swinyard, E.A., Woodhead, J.H., White, H.S., Franklin, M.R. Experimental selection, quantification and evaluation of anticonvulsants. 1989. In: Levy, R., Mattson, R., Meldrum, B.S., Penry, J.K., Dreifuss, F.E. (Eds.), *Antiepileptic Drugs*, 3rd ed. Raven Press, New York, pp. 85–102.
- Szallasi A y Appendino G. Vanilloid receptor TRPV1 antagonists as the next AMG 9810, a TRPV1 Antagonist with Antihyperalgesic Properties 483 generation of painkillers. Are we putting the cart before the horse? *J Med Chem*. 2004 ; 47:2717–2723.
- Taiwo OB y Taylor BK. Antihyperalgesic effects of intrathecal neuropeptide Y during inflammation are mediated by Y1 receptors. *Pain*. 2002; 96: 353–363.
- Tjølsen A, Berge OG, Hunskaar S, Rosland JH, Hole K. The formalin test: an evaluation of the method. *Pain*. 1992;51(1):5-17.
- Valenzano KJ, Grant ER, Wu G, Hachicha M, Schmid L, Tafesse L, Sun Q, Rotshteyn Y, Francis J, Limberis JT, et al. BCTC (N-(4-tertiarybutylphenyl)-4-(3-chloropyridin-2-yl) tetrahydropyrazine-1(2H)-carbox-amide), a novel, orally effective vanilloid receptor 1 antagonist with analgesic properties: I. In vitro characterization and pharmacokinetic properties. *J Pharmacol Exp Ther*. 2003; 306:377-386.

- Wahl P, Foged C, Tullin S, Thomsen C. Iodo-resiniferatoxin, a new potent vanilloid receptor antagonist. *Mol Pharmacol*. 2002; 59:9–15.
- Waldmann R, Lazdunski M. H(+)-gated cation channels: neuronal acid sensors in the NaC/DEG family of ion channels. *Curr Opin Neurobiol*. 1998; 8(3):418-24.
- Walker K, Perkins M, Dray A. Kinins and kinin receptors in the nervous system. *Neurochem Int*. 1995; 26(1):1-16; discussion 17-26.
- Weidner C, Schmelz M, Schmidt R, Hansson B, Handwerker HO, Torebjörk HE. Functional attributes discriminating mechano-insensitive and mechano-responsive C nociceptors in human skin. *J Neurosci*. 1999; 19(22):10184-90.
- Wilson SG, Mogil JS. Measuring pain in the (knockout) mouse: big challenges in a small mammal. *Behav Brain Res*. 2001;125(1-2):65-73.
- Woolf CJ. What is this thing called pain? *J Clin Invest*. 2010;120(11):3742-4.
- Woolf CJ, Salter MW. Neuronal plasticity: increasing the gain in pain. *Science*. 2000; 288(5472):1765-9.
- Woolfe G, MacDonald D. The evaluation of the analgesic action of pethidine hydrochloride (DEMEROL). *J Pharmacol Exp Ther*. 1994; 80: 300-307.
- Xu H, Delling M, Jun JC, Clapham DE. Oregano, thyme and clove derived flavors and skin sensitizers activate specific TRP channels. *Nat Neurosci*. 2006; 9, 628-635.
- Zygmunt PM, Petersson J, Andersson DA, Chuang H, Sjørgård M, Di Marzo V, Julius D, Högestätt ED. Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide. *Nature*. 1999; 400(6743):452-7.