



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA**

Evaluación del efecto antinociceptivo de la interacción  
entre N-palmitoiletanolamida con paracetamol

TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO DE QUÍMICO  
FARMACEUTICO BIÓLOGO PRESENTA:

Moisés Alejandro Lugo Vega

Directora: Dra. Myrna Déciga Campos

Asesora: M. en F. Idalia Leticia Flores Gómez



Ciudad de México      2017



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.

Este trabajo se desarrolló bajo la dirección de la Dra. Myrna Déciga Campos, profesora titular B de la Sección de Estudios de Posgrado e Investigación de la Escuela Superior de Medicina del Instituto Politécnico Nacional. Con la asesoría de la M. en F. Idalia Flores Gómez, profesora adscrita a la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza de la Universidad Nacional Autónoma de México

El presente trabajo fue apoyado por la Secretaria de Investigación de Posgrado del IPN  
clave SIP: 20151047.

---

**ÍNDICE GENERAL**

<b>i.</b>	Lista de figuras .....	v
<b>ii.</b>	Lista de tablas .....	vi
<b>iii.</b>	Abreviaturas .....	vii
<b>1</b>	<b>Introducción.....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Fundamento teórico.....</b>	<b>2</b>
2.1	Dolor.....	2
2.1.1	La importancia del dolor.....	3
2.1.2	Estrategias para aliviar el dolor.....	3
2.1.3	El tratamiento del dolor.....	4
2.1.4	Tratamiento del dolor con analgésicos anti-inflamatorios no esteroideos ....	5
2.1.5	Tratamiento del dolor con mezclas de analgésicos.....	6
2.1.6	Modelos del dolor agudo y crónico.....	7
2.2	Nocicepción.....	12
2.2.1	Mecanismos Periféricos.....	13
2.2.1.1	Nociceptores.....	14
2.2.1.2	Activación bioquímica del nociceptor.....	15

---

2.3	Paracetamol.....	18
2.3.1	Mecanismo de Acción del Paracetamol.....	19
2.4	Mecanismos de Acción de los cannabinoides.....	20
2.5	Mecanismos de Actuación de los endocannabinoides.....	23
2.5.1	Síntesis y degradación de los endocannabinoides.....	25
2.6	N-Palmitoiletanolamida.....	27
<b>3</b>	<b>Planteamiento del problema.....</b>	<b>28</b>
<b>4</b>	<b>Objetivo.....</b>	<b>28</b>
4.1	Objetivos Particulares.....	28
<b>5</b>	<b>Hipótesis.....</b>	<b>29</b>
<b>6</b>	<b>Metodología.....</b>	<b>29</b>
6.1	Material.....	29
6.1.1	Material biológico.....	29
6.1.2	Reactivos .....	29
<b>7</b>	<b>Modelo experimental .....</b>	<b>30</b>
7.1	Medición de la respuesta nociceptiva .....	30
7.2	Evaluación del efecto antinociceptivo .....	31
<b>8</b>	<b>Resultados .....</b>	<b>32</b>
<b>9</b>	<b>Análisis de resultados .....</b>	<b>38</b>
<b>10</b>	<b>Conclusiones .....</b>	<b>41</b>
<b>11</b>	<b>Referencias Bibliográficas .....</b>	<b>42</b>

**i. Lista de figuras**

<b>Figura 1.</b> Componentes periféricos del sistema nociceptivo.....	13
<b>Figura 2.</b> Medidores bioquímicos periféricos de la nocicepción.....	18
<b>Figura 3.</b> Diagrama esquemático del metabolismo del ácido araquidónico ..	19
<b>Figura 4.</b> Representación esquemática de los receptores CB1 y CB2.....	25
<b>Figura 5.</b> Curso temporal del efecto antinociceptivo de la administración local de paracetamol y PEA en la prueba de la formalina .....	33
<b>Figura 6.</b> Efecto antinociceptivo de la administración local de paracetamol en la rata .....	34
<b>Figura 7.</b> Efecto antinociceptivo de la administración local de PEA en la rata.....	35
<b>Figura 8.</b> Efecto antinociceptivo de la administración local de PEA en combinación con paracetamol en la rata .....	36
<b>Figura 9.</b> Curva concentración-respuesta de los inhibidores de la COX y del endocannabinoide administrados individualmente y en combinación .....	37
<b>Figura 10.</b> Curso temporal del efecto antinociceptivo de la administración local de paracetamol en combinación con PEA en la prueba de la formalina.....	37

**ii. Lista de tablas**

<b>Tabla 1</b> Características más importantes de los receptores CB1 y CB2 .....	22
--	----

**iii. Abreviaturas**

2-AG	2-araquidonilglicerol
ABC	Área bajo la curva
AEA	Anandamida
AINEs	Analgésico-antinflamatorio no esteroideo
ANADEVA	Análisis de varianza
CB1	Receptor cannabinoide tipo 1
CB2	Receptor cannabinoide tipo 2
CGRP	Péptido relacionado con el gen de la calcitonina (por sus siglas en inglés)
CE <sub>30</sub>	Concentración efectiva 30
CE <sub>50</sub>	Concentración efectiva 50
COX	Enzima ciclooxigenasa
DMSO	Dimetilsulfóxido
EEM	Error estándar medio
FAAH	Amidohidrolasa de ácido grasos (por sus siglas en inglés)
GABA	Ácido $\gamma$ -aminobutírico
GMPC	Guanosín monofosfato cíclico
IASP	Organización Internacional para el Estudio del Dolor (por sus siglas en inglés)
IL	Interleucina
$\mu$ g	Microgramos
mL	Mililitros



NGF	Factor de crecimiento neuronal (por sus siglas en inglés)
PEA	N-palmitoiletanolamida
PGE	Prostaglandina E
PPAR	Receptor activador de la proliferación de peroxisoma
SNC	Sistema Nervioso Central
TNF	Factor de necrosis tumoral (por sus siglas en inglés)
TRP	Receptor de canal de potencial transitorio (por sus siglas en inglés)

## 1. Introducción.

El dolor es una percepción consecuente a la activación del sistema nociceptivo, en el cual tiene por objetivo la protección del organismo, desencadenando reacciones o comportamientos que conllevan a la disminución de posibles daños.

Los fármacos que alivian el dolor se clasifican en tres tipos: Los analgésicos-antiinflamatorios no esteroideos (AINEs o también llamados inhibidores de la COX), los opioides y los adyuvantes. El uso de estos fármacos puede dar alivio al dolor de tipo inflamatorio y nociceptivo, pero presentan ineficacia analgésica en dolor crónico, así mismo, su uso frecuente trae como consecuencia una alta incidencia de efectos adversos como gástricos, renales y cardiovasculares, lo que da como resultado el uso de otros fármacos que contrarresten los efectos no deseados e incluso conlleva a la utilización de servicios de hospitalización y atención médica especializada para restablecer la salud de los pacientes. Entre otras estrategias para mejorar el efecto terapéutico se encuentra el uso combinado de fármacos analgésicos.

En la actualidad se sugiere que la combinación de los inhibidores de la COX y los cannabinoides, puede ser de utilidad clínica, debido a que sus mecanismos de acción posiblemente no convergen y ocasionarían un aumento significativo de la eficacia analgésica, lo cual lograría ser una alternativa factible para el tratamiento del dolor crónico.

El presente proyecto permite demostrar la relación dosis-respuesta del efecto antinociceptivo así como su interacción farmacológica de la combinación del PEA y paracetamol, con la finalidad de tener alternativas terapéuticas para el tratamiento del dolor.

## **2. Fundamentación teórica.**

### **2.1 Dolor**

Cada individuo aprende el significado de la palabra dolor a través de la experiencia personal. El dolor puede tener múltiples causas, así como características anatómicas y fisiopatológicas e interrelaciones con aspectos afectivos y motivacionales heterogéneas. Esto hace que su definición sea difícil y que la terminología usada en relación con él sea fuente permanente de confusiones. Debido a ello la Asociación Internacional para el Estudio del dolor (International Association for the Study of Pain, IASP) después de un consenso definió al dolor como una experiencia sensorial y emocional desagradable asociada con daño tisular real o potencial o descrito en términos de dicho daño. El dolor es una experiencia individual, una sensación que evoca una emoción y ésta puede ser desagradable.

El dolor intenso y prolongado puede desencadenar una serie de respuestas psicológicas y fisiológicas que son potencialmente dañinas en pacientes con problemas cardiovasculares y respiratorios. Puede haber ansiedad, miedo, insomnio y sensación de indefensión. Estos cambios se potencian entre sí y a su vez aumentan el dolor. Al prolongarse, conducen a la ira y al resentimiento. En pacientes ancianos, puede ser una causa de delirio. Además, el dolor crónico puede ser incapacitante por días (cefaleas), por semanas o meses (causalgia) o permanentemente (cáncer, artritis). Muchos pacientes con cáncer terminal viven sus últimos meses de vida con dolor intenso por no recibir el tratamiento adecuado.

#### **2.1.1 La importancia de controlar el dolor.**

El control del dolor en el ser humano tiene varios aspectos. Aparte del aspecto humanitario y ético, el alivio del dolor permite disminuir la incidencia de complicaciones respiratorias, especialmente en pacientes con dolor abdominal o torácico. También facilita la movilización precoz, con la posible disminución de trombosis venosa profunda. Atenúa la respuesta al estrés con menor liberación de catecolaminas y neuropéptidos, con normalización más temprana del consumo de oxígeno, gasto cardíaco y otras alteraciones que pueden ser mal toleradas por pacientes geriátricos. La mejoría de la respuesta metabólica ayuda al proceso de cicatrización de heridas y respuesta inmunológica (Guida G., Fabiani A., Lanaia F.)

### **2.1.2 Estrategias para aliviar el dolor.**

El alivio del dolor se puede lograr mediante diferentes estrategias terapéuticas. Un analgésico es un compuesto que alivia el dolor sin causar pérdida de conocimiento. Dependiendo del tipo de dolor, localización, intensidad, duración y origen, el médico escoge de entre una gama muy amplia el analgésico que permita su mejor control (Dr. S. Ibáñez.). En general se utilizan analgésicos antiinflamatorios no esteroideos (AINE's) para tratar el dolor asociado a inflamación como es el caso del dolor postquirúrgico o de enfermedades como la artritis. Si el dolor no cede, o en casos de dolor intenso por cáncer, se utilizan los analgésicos opioides (tipo morfina). Para el manejo del dolor neuropático que usualmente no cede ante el uso de analgésicos antiinflamatorios u opioides se utilizan diferentes opciones terapéuticas y se conocen como coadyuvantes. Algunos antidepresivos tricíclicos (amitriptilina) y anticonvulsivantes (lamotrigina y gabapentina) son efectivos en este tipo de dolor (Jonathan Brooks, Irene Tracey). La administración de analgésicos permitirá aliviar el dolor y suprimir los cambios metabólicos y conductuales inducidos por

éste en el organismo. Con el conocimiento que se tiene actualmente del dolor se puede tratar éste de manera muy exitosa. Desafortunadamente, la mayoría de los fármacos utilizados para el alivio del dolor presentan una serie de efectos adversos que pueden llegar a ser graves e incluso fatales, por lo que es muy importante que sólo el médico, después de un análisis cuidadoso de la historia clínica del paciente con dolor, sea quien prescriba los medicamentos para aliviarlo y evitar al máximo la posibilidad de efectos adversos graves (Steve Mee, Blynn G. Bunney, Christopher Reist). La automedicación con analgésicos es muy común en todo el mundo y aumenta considerablemente las probabilidades de riesgo de estos efectos adversos

### **2.1.3 El tratamiento del dolor.**

Afortunadamente, en la actualidad existe una gran cantidad de fármacos que pueden activar diversos mecanismos de acción para aliviar el dolor. Algunos analgésicos imitan la acción de algunas sustancias endógenas que ayudan normalmente a controlarlo, mientras que otros bloquean la función de sustancias que transmiten la información nociva. Además, muchos analgésicos pueden actuar a diversos niveles ya sea periférico, espinal y supra espinal, o en todos estos sitios simultáneamente, y de esta manera se permite tener la posibilidad de brindar un mejor alivio en la mayoría de los casos. Como es de esperar, el uso de los analgésicos tiene ventajas y desventajas que van a depender de las dosis empleadas, de los esquemas de dosificación, de las características químicas y farmacológicas propias de cada sustancia y de los pacientes o sujetos que reciban tales compuestos (Dario Siniscalco).

### **2.1.4 Tratamiento del dolor con analgésico anti-inflamatorios no esteroideos.**

Los AINE's son fármacos muy eficientes para tratar el dolor, sobre todo de tipo inflamatorio o agudo. Son conocidos como analgésicos, antiinflamatorios y antipiréticos. La inflamación que acompaña el dolor es un proceso normal, una respuesta protectora del tejido dañado y es activada por la liberación de sustancias o mediadores químicos de los tejidos dañados y de células migrantes. Los mediadores químicos específicos varían de acuerdo al tipo de proceso inflamatorio e incluyen sustancias como histamina, serotonina, prostaglandinas, bradicinina e interleucinas, entre otras. Algunas sustancias analgésicas útiles en el dolor de tipo inflamatorio son el ácido acetil salicílico, acetaminofén, indometacina, paracetamol, ibuprofeno y ketorolaco. Los analgésicos tipo ácido acetil salicílico son compuestos con una diversidad química muy grande, en la que el ácido acetil salicílico es el agente prototipo con el que todos los otros compuestos de la familia son comparados en cuanto a eficacia antiinflamatoria y analgésica. Esto a pesar de que actualmente existen otros fármacos que pueden resultar más útiles debido a que generan menos efectos adversos, como irritación local, irritación gástrica, náusea, vómito, alteración de los procesos de coagulación sanguínea, y perturbaciones metabólicas diversas, además de daño renal y depresión respiratoria. Sin embargo, haciendo una buena selección del analgésico es posible tener un alivio adecuado del dolor y minimizar los efectos adversos. También existen algunos casos en los que no es recomendable emplear estos fármacos, por ejemplo, en el caso de hipersensibilidad ante estos compuestos, pacientes con úlcera péptica, hemofilia, insuficiencia renal, cirrosis hepática y en caso de estar en tratamiento con anticoagulantes. Aunque los AINE's pueden presentar diferentes mecanismos de acción, todos comparten uno en particular: la inhibición de la enzima ciclooxigenasa (COX) que participa en la biosíntesis de prostaglandinas (Loredana Mariani). Con el descubrimiento de las isoformas (COX-1 y

COX-2) de esta enzima se propuso que la COX-1 participaba principalmente en funciones fisiológicas como protección gástrica y regulación del flujo renal, en tanto que la COX-2 contribuía principalmente a la generación de dolor e inflamación. Con base en esta premisa se desarrollaron fármacos selectivos para inhibir a la COX-2 sin afectar a la COX-1. Así surgió un nuevo grupo de fármacos con la misma eficacia analgésica y antiinflamatoria que los no selectivos, pero con menos efectos adversos a nivel del tracto gastrointestinal. A medida que estos nuevos fármacos (rofecoxib, celecoxib, valdecoxib, etc.) se utilizan en la clínica, se ha descubierto que también presentan efectos adversos importantes como daño renal y problemas cardiovasculares, principalmente. El lugar de este tipo de compuestos dentro de la terapéutica del dolor se irá conociendo poco a poco en la medida que el uso y los estudios correspondientes se vayan realizando. Entre los mecanismos adicionales que contribuyen a generar el efecto deseado de los analgésicos anti-inflamatorios no esteroideos está la participación de vías opioides, serotoninérgicas, adrenérgicas y del óxido nítrico-GMPc- canales de potasio, tanto a nivel periférico como central.

### **2.1.5 Tratamiento de dolor con mezclas de analgésicos.**

Una alternativa más para aliviar el dolor es la utilización de las combinaciones de analgésicos. Generalmente se trata de evitar la administración simultánea de fármacos debido a las posibles interacciones que pudieran presentarse ya que algunas han resultado peligrosas. En el caso particular de los analgésicos, los diversos grupos de fármacos actúan en diferentes sitios y por mecanismos alternativos, por lo que la administración combinada de analgésicos cuyos mecanismos de acción no sean iguales y en dosis adecuadas puede ser un camino para obtener una buena eficacia con un mínimo de efectos adversos. En la práctica clínica es

frecuente el uso de mezclas de analgésicos, pero existe poca evidencia experimental que permita conocer la bondad de los resultados de las mezclas en comparación con el uso individual, tanto en el hombre como en animales de laboratorio. Sólo algunas combinaciones, entre ellas la del ácido acetil salicílico con fenacetina y cafeína, habían sido sometidas a varios ensayos analgésicos clínicos y de laboratorio. Sin embargo, los resultados obtenidos eran contradictorios, y en algunos estudios se encontraba que el efecto de la combinación no era mejor que el de la administración de ácido acetil salicílico solo, mientras que en otras referencias se indicaba potenciación.

En muchos de los modelos experimentales a nivel preclínico, el compuesto es administrado antes de que exista algún tipo de dolor y el estímulo nocivo que se establece para producir dolor es de tipo agudo, ya sea calor, eléctrico, presión mecánica o de tipo químico, y pueden ser muy diferentes a las alteraciones que sufre un paciente y que lo llevan a buscar ayuda médica. En estos modelos lo que se interpreta como analgesia es la prolongación de un tiempo de reacción o la supresión de una conducta dada y es frecuente que se generen respuestas de aprendizaje y condicionamiento si se aplica el estímulo más de una vez sobre el mismo sujeto experimental (Francesco Rossi).

#### **2.1.6 Modelos de dolor agudo y crónico.**

La utilización de los modelos de dolor se justifica para el ensayo de nuevos tratamientos farmacológicos para el alivio del mismo. Bajo el título de modelos de dolor agudo se encuentra fundamentalmente a los que utilizan un estímulo físico o químico que tienen como objetivo determinar una latencia de respuesta por parte del animal ante dicho estímulo y tienen un desarrollo temporal breve. Entre ellos está la prueba de la placa caliente, el de



retirada de la cola y el de inmersión de la cola en agua caliente que usan un estímulo térmico; la prueba de presión de la pata o de la cola en la rata que usan un estímulo mecánico; la prueba de estimulación eléctrica de la cola que usa un estímulo; la prueba del ácido acético y la formalina (valoración primera fase) que usan un estímulo químico. Es una forma de determinar el umbral nociceptivo del animal, de manera que los parámetros determinados responden al esquema clásico del dolor como reflejo dentro de un marco fisiológico (A. Ortega, A. Roca).

Cuando se usan en el animal sano, es indudable que estos modelos detectan el efecto analgésico de los fármacos pero eso no significa que ese fármaco vaya a ser efectivo en diferentes situaciones experimentales e incluso a nivel clínico. Por ello se siguen utilizando para el *screening* de analgésicos, aunque en la actualidad el interés por fármacos eficaces en situaciones de dolor crónico hace que haya que demostrar la eficacia analgésica de las nuevas sustancias en otro tipo de modelos que valoran otro tipo de respuestas.

Le Bars y cols 2001. Realizaron una revisión profunda y exhaustiva de los modelos de dolor agudo. Determinaron que las fuentes de estímulos térmicos radiantes usadas habitualmente tienen un bajo umbral térmico, lo que produce una lenta velocidad de calentamiento de la piel que hace que las neuronas no se activen de forma sincrónica y no se produzca una respuesta nociceptiva adecuada.

Es por eso que los sistemas que concentran la energía y producen un estímulo localizado en una pequeña zona de la piel consiguen unas respuestas más homogéneas en los grupos de animales. También se ha propuesto que una baja temperatura de la piel sobre la que se aplica el estímulo puede ser un factor de confusión ya que se necesitará un mayor tiempo de exposición para poder desencadenar la respuesta nociceptiva, sin embargo si se utilizan

estímulos fríos. La estimulación mecánica puede producir diferentes respuestas en función de la intensidad y duración. Además, con la utilización de estímulos mecánicos nocivos se pueden producir lesiones que van a cambiar las circunstancias en que se realiza la valoración del umbral nociceptivo. Dependiendo de la intensidad, los estímulos eléctricos también pueden desencadenar un amplio repertorio de respuestas que van desde reflejos espinales, pasando por vocalizaciones y llegando a respuestas complejas como escape o agresión. También hay que tener en cuenta que la conducción del estímulo eléctrico depende del grosor de las fibras por lo que hay que esperar que el estímulo aplicado a la piel comience estimulando las fibras más gruesas para acabar estimulando las fibras más finas que son las responsables de la transmisión nociceptiva hacia la médula espinal (Le Bars y cols 2001). La estimulación química también puede variar en intensidad pero va a producir una estimulación lenta que va a tener una característica especial, que el animal no va a poder evitar dicho estímulo como sucede en los modelos anteriormente referidos. Este hecho hace que estos animales tengan que ser sacrificados inmediatamente tras la realización de la prueba con lo cual se necesitará un mayor número de animales al no poder repetir las determinaciones en los mismos animales como sucede en los que usan los otros tipos de estímulos (Beth A. Winkelstein, 2011).

Los modelos de dolor crónico necesitan ser algo más que una prolongación del dolor agudo en el tiempo, para ello es necesario inducir una lesión bien inflamatoria o bien neural que dé lugar a la aparición de una situación patológica que ofrezca la posibilidad de que el dolor en el animal sea objetivo (Beth A. Winkelstein, 2011). La lesión inflamatoria localizada en articulaciones puede ofrecer un modelo intermedio entre agudo y crónico, mientras que la inducción de artritis generalizada con adyuvante de Freund es un modelo crónico. Pero estos

modelos, tienen el inconveniente de que no ofrecen ningún signo valorable que ofrezca información sobre la estimulación nociceptiva que genera la lesión y que pueda ser modificado por la acción de los analgésicos. Sin embargo, entre los modelos de inflamación localizada tenemos la prueba de la formalina que está entre los modelos agudos y los crónicos. En este, la primera fase del mismo reflejaría un dolor nociceptivo debido a la irritación química de la formalina subcutánea y su segunda fase refleja un dolor de origen inflamatorio. Tiene la ventaja de que en este modelo se producen una serie de conductas que se pueden contar y son una medida del dolor que puede ser aliviado por la acción de los analgésicos. Esto se puede valorar como un parámetro que comprende diferentes posiciones de la extremidad afecta, pasando por un trabajo activo para aliviarlo como puede ser el lamido de la zona afectada o un parámetro reflejo como son las sacudidas de la extremidad. Uno de los inconvenientes técnicos de este modelo es que tiene un periodo de observación de una hora por cada animal y requiere una gran concentración y paciencia por parte del investigador. Por ello se han realizado intentos de mecanizar esta tarea mediante una valoración computarizada, bien midiendo el grado de agitación global durante el periodo de observación o realizando un análisis de los comportamientos nociceptivos y de la actividad motriz mediante el procesamiento de las imágenes registradas por una cámara de video.

En otros modelos inflamatorios es necesario utilizar los modelos agudos, sobre todo térmicos y mecánicos, para tener una respuesta clara las alteraciones del umbral nociceptivo que se producen en las zonas inflamadas (Le Bars y cols 2001).

Así, se utilizan los modelos térmicos para detectar la presencia de hiperalgesia, sólo cambiando la intensidad del estímulo de carácter nocivo en la primera e inocuo en la segunda. Lo mismo ocurre con la hiperalgesia y la alodinia mecánica. La primera se caracteriza por

una respuesta nociceptiva exagerada ante un estímulo nocivo y la segunda por una respuesta nociceptiva ante un estímulo inocuo (Rutkowski MD, Winkelstein BA, et al., 2002).

En el caso de la lesión nerviosa, hace algunos años se utilizaban modelos basados en la sección del nervio como la rizotomía posterior a nivel cervical o la sección del ciático. En estos modelos se objetiva el dolor midiendo la autotomía o conducta de automutilación de la extremidad afecta por la sección nerviosa.

Fundamentalmente se utilizan modelos con estímulo de tipo mecánico o térmico.

Estos signos *clínicos* de difícil valoración por el experimentador podrían ser monitorizados mediante análisis automatizado. Entre estos se puede encontrar signos posturales como la inmovilidad, la protección del área afectada o posturas anormales; modificaciones motoras como cambios en la actividad espontánea, la retirada de miembros, el salto o la flacidez, rigidez o debilidad muscular, que podrían ser analizados mediante cuantificación del movimiento o reconocimiento de forma a través de imagen de video.

Las modificaciones vegetativas como taquicardia, cambios en la presión arterial y modificaciones de la temperatura corporal podrían ser determinadas mediante telemetría. El aumento de la automatización de las pruebas utilizadas supondría una mejora de la objetividad de la medición, disminución de las interacciones entre el animal y el experimentador que inducen cambios en el comportamiento del animal, acoplamiento de la medida de tanto los comportamientos relacionados con el dolor como de otros comportamientos entre otras ventajas.

A la hora de utilizar los modelos de dolor y en función del objetivo principal se puede concluir que, al valorar los resultados, es necesario tener claro en qué circunstancias (fisiológicas o patológicas) se ha realizado el modelo, si éste es el adecuado para estudiar el

efecto buscado, si se ha realizado la técnica de forma adecuada y si se han seguido las guías éticas que recomienda la Asociación Internacional para el estudio del Dolor por sus siglas en inglés IASP.

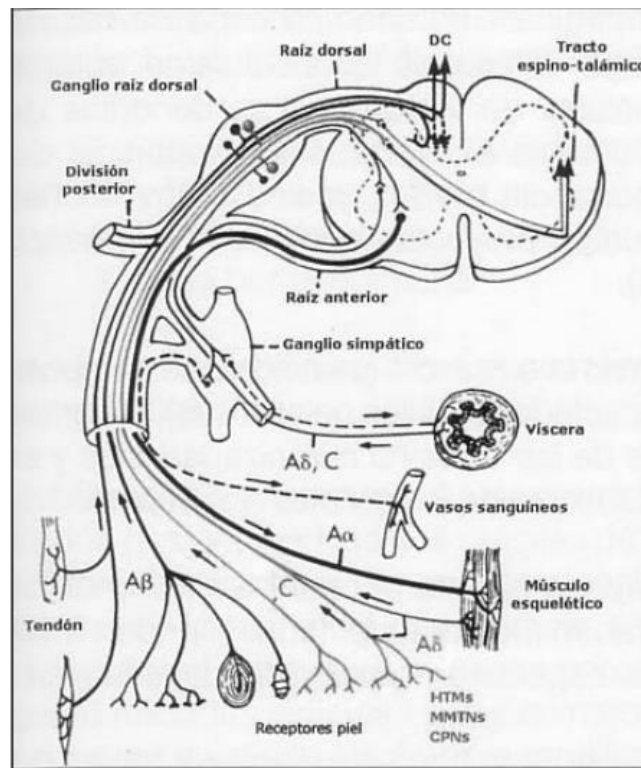
## **2.2 Nocicepción.**

El sistema nociceptivo es el encargado de detectar y procesar la sensación dolorosa. La percepción del dolor y los mecanismos que esta pone en marcha deben ser entendidos dentro del sistema general de defensa del individuo frente a las agresiones del medio. Una adecuada respuesta por parte del sistema nociceptivo a un estímulo potencialmente lesivo permite evitar graves daños sobre al individuo y por tanto ser algo positivo cara a la supervivencia. Ejemplos en este sentido lo encontramos en el reflejo de retirada cuando asimos un objeto quemante, ya que gracias a ello evitamos la progresión de la quemadura, o el conjunto de respuestas que un individuo desarrolla cuando percibe un dolor abdominal que en última instancia lo conducirán hacía un médico en busca de curación. Cuando la nocicepción cumple estas funciones, el dolor que percibimos, debemos entenderlo como una señal de alerta beneficiosa que permitirá poner en marcha respuestas protectoras.

### **2.2.1 Mecanismos periféricos.**

La porción periférica de la nocicepción está integrada por los elementos que intervienen en la transmisión del dolor desde el lugar en el que la señal es generada y transducida (piel, vísceras) hasta el momento en que esta entra en las astas posteriores de médula espinal. La parte periférica del sistema nociceptivo está compuesta por los siguientes elementos: una

neurona monopolar (es decir aquella que está conformada por un cuerpo y un axón). El axón de la neurona monopolar tiene la peculiaridad de emitir una proyección periférica y otra central. La porción periférica constituye el receptor periférico (en el caso del sistema nociceptivo se denomina nociceptor) y su rama central penetra en las astas posteriores medulares estableciendo la primera sinapsis. El conjunto de cuerpos celulares de esta neuronas monopolares conforman el ganglio posterior o ganglio de la raíz dorsal (GRD) (Figura 1).



**Figura 1.** Componentes periféricos del sistema nociceptivo. (Juan Cabrera Valencia)

### 2.2.1.1 Nociceptores.

Los nociceptores son básicamente terminaciones nerviosas libres de las fibras aferentes tipo A $\delta$ , con escasa cantidad de mielina, y las fibras C amielínicas. Se encuentran localizadas en diferentes tejidos corporales (piel, músculos, articulaciones, fascias, vísceras etc.). Estas terminaciones tienen campos receptores, que se solapan entre ellos, de tal forma que cada

punto de la piel se puede encontrar representado por 2-4 terminaciones diferentes. Las fibras C representan el 60-90% de las aferencias periféricas cutáneas que conforman un nervio periférico. Se cree en general que los receptores A $\delta$  transmiten la sensación de “primer dolor” o “dolor rápido” (tarda unos 300 mseg.) mediando la primera respuesta adaptativa al dolor (retirada). Es un dolor bien delimitado, es epicrítico (perfectamente localizado en la piel) y se siente como un pinchazo (Juan Cabrera Valencia).

Los nociceptores C de transmisión más lenta, serían aquellos transmisores del “segundo dolor” (tarda unos 0,7-1,2 seg.), mal localizado y protopático, desencadenando acciones de protección y descanso. Las fibras C pueden clasificarse bajo el punto de vista neuroquímico en: 1. Peptidérgicas o sensibles a la capsaicina: sintetizan sustancia P y el péptido relacionado con el gen de la calcitonina. Son sensibles al factor de crecimiento nervioso. Son las causantes de la inflamación neurógena. 2. No peptidérgicas: presentan el protooncogén tirosincinasa (TRK) RET, un receptor para el factor de crecimiento nervioso derivado de la glía y el receptor purinérgico P2X3 (Watkins L. et al.).

Existen varios tipos de nociceptores, pero los más conocidos son:

1. A $\delta$  mecanoreceptores de alto umbral: se activan por estímulos mecánicos aversivos. Solo se localizan en la piel.
2. Nociceptores polimodales C: se activan por estímulos mecánicos, térmicos y químicos aversivos. Representan la mayor parte de los nociceptores en la piel con vello en la especie humana. Poseen campos receptores amplios. Son muy sensibles al fenómeno de la sensibilización.
3. Receptores 2-3: se encuentran en los músculos. Su función es semejante a los receptores A $\delta$  cutáneos y son parte de los mecanismos de acción de la acupuntura.

4. Receptores tipo 4: también se encuentran en el músculo y su acción es semejante a los nociceptores de tipo C.

Experimentalmente se ha demostrado que la estimulación reiterada de las fibras C que intervienen en la nocicepción produce un incremento de su sensibilidad, disminución del umbral de dolor y respuesta aumentada y mantenida a la estimulación (Asburn M. et al.). A este conjunto de respuestas se le denomina sensibilización. Fisiológicamente el daño tisular produce un fenómeno similar denominado hiperalgesia primaria.

#### **2.2.1.2 Activación bioquímica del nociceptor.**

Las sustancias que intervienen en el proceso de la nocicepción y de la inflamación pueden tener tres orígenes:

- i. De las células dañadas
- ii. De las células inflamatorias
- iii. De los propios nociceptores

Las cininas: la bradicinina se produce como resultado de la acción de los cininógenos (un tipo de enzimas) sobre la calicreina liberada por los tejidos dañados. Actúa sobre dos receptores el B2 que es el habitual y el B1 que se induce como consecuencia de la inflamación. La activación del receptor B2 favorece la producción de citosinas pro inflamatorias, prostaglandinas y de péptidos por parte de los aferentes primarios. Activa los nociceptores por medio de la activación de la fosfolipasa C, que a su vez favorece el aumento del Ca intracelular. La expresión del receptor B1 sería el responsable de los efectos a largo plazo de la bradicinina.



Citosinas: son proteínas producidas por las células inflamatorias (monocitos, linfocitos o macrófagos). Favorecen la producción de prostaglandinas y aminas simpáticas. Entre ellas destacan la IL1 $\beta$ , el TNF $\alpha$  y la IL8 (Price D.).

Prostanoides: al producirse daño celular se liberan fosfolípidos de membrana, la acción de la enzima fosfolipasa A2 sobre estos fosfolípidos produce ácido araquidónico, los glucocorticoides inhiben este paso. Del ácido araquidónico se derivan dos moléculas diferentes según la enzima que actúe sobre él. Si lo hace la lipooxigenasa, se obtendrán los leucotrienos, que tienen acciones pro inflamatoria. Si la enzima que actúa es la ciclooxigenasa (que tienen dos isoformas la COX-1 y la COX 2) entonces se producen los prostanoides, este paso es inhibido por los AINEs. Dentro de los prostanoides destacamos la prostaglandina E2 (PGE2) y la prostaciclina o prostaglandina I2 (PGI2). Los prostanoides son sensibilizadores .

Neurotrofinas: las interleucinas que se liberan durante el proceso de inflamación incrementan la producción de factor de crecimiento neural (FCN). La unión del FCN al receptor TrkA del terminal sensitivo, origina un complejo que es interiorizado y transportado hasta el cuerpo de la neurona en el ganglio raquídeo posterior. Esto produce una alteración en la síntesis de la neurona que incrementa la producción de sustancias que van a favorecer el mantenimiento de la hiperalgesia. Entre esas sustancias destacan: PRGC, canales del sodio resistentes a la tetrodotoxina (Patrizia Olivia, Liberato Berrino).

Es muy interesante destacar el papel del FCN en lo que se denomina sensibilización central, ya que favorece la síntesis del factor neurotrófico derivado del cerebro en los terminales medulares de las células C, y este a su vez produce una sensibilización de los receptores NMDA medulares (Vito de Novellis, Enza Palazzo).

Péptidos: son sustancias liberadas por el propio terminal sensitivo al ser activado por un estímulo nociceptivo. Entre ellos destacan la sP, el PRGC y la neurocinina A. Producen vasodilatación y liberación de histamina por los mastocitos. Son la base de la denominada inflamación neurógena, que a su vez es causa de la hiperalgesia secundaria o en mancha de aceite (aquella hiperalgesia que se extiende hacía los tejidos sanos adyacentes al lugar de la lesión). La capsaicina deplecciona las reservas de sP en la piel. Se cree que la sP puede ser la responsable de los cambios tróficos articulares en la artritis.

Hidrogeniones y ATP: aumentan la conductancia iónica al Na, Ca y K. Las soluciones ácidas producen dolor. Son verdaderos algógenos.

Péptidos opioides endógenos: al interactuar con los receptores  $\delta$  y  $\kappa$  de las terminaciones de las neuronas postgangliónicas simpáticas inhiben la producción de PGE2. Reducen la hiperalgesia en áreas inflamadas. La activación de los receptores opioides endógenos situados en el nociceptor, producen su inhibición (Ida Marabese).

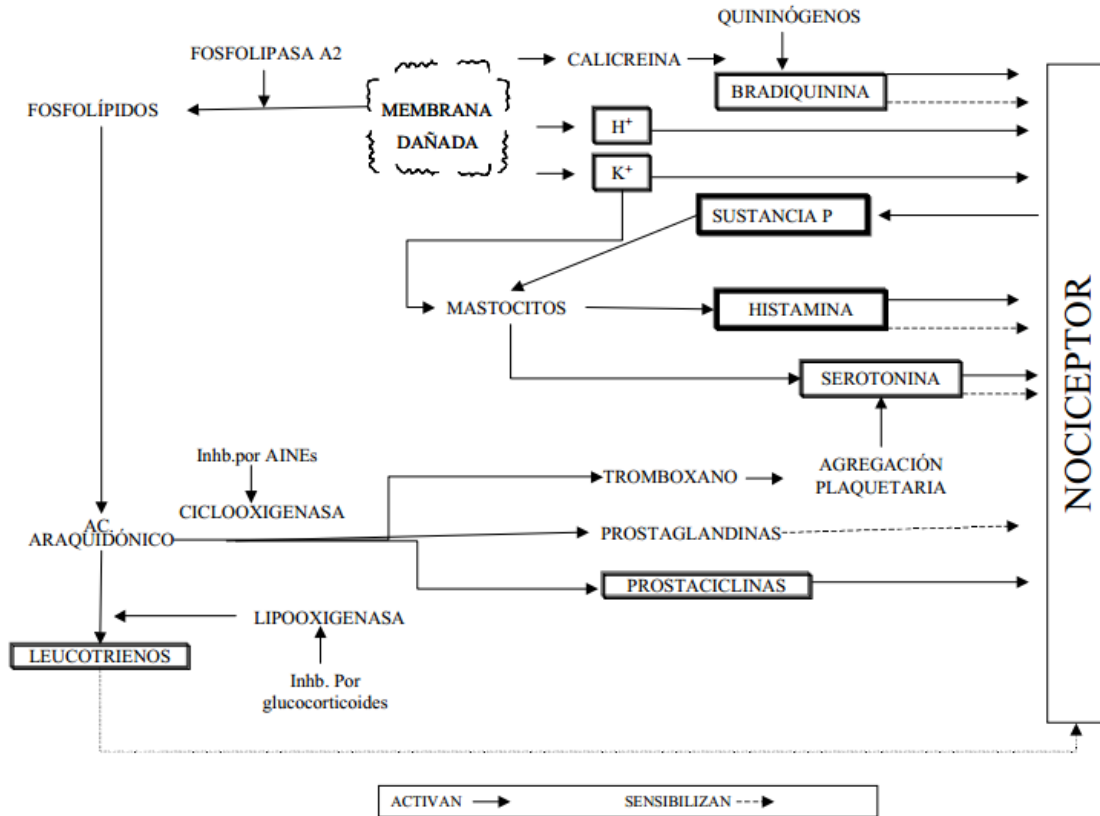
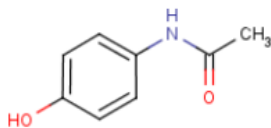


Figura 2. Mediadores bioquímicos periféricos de la nocicepción.

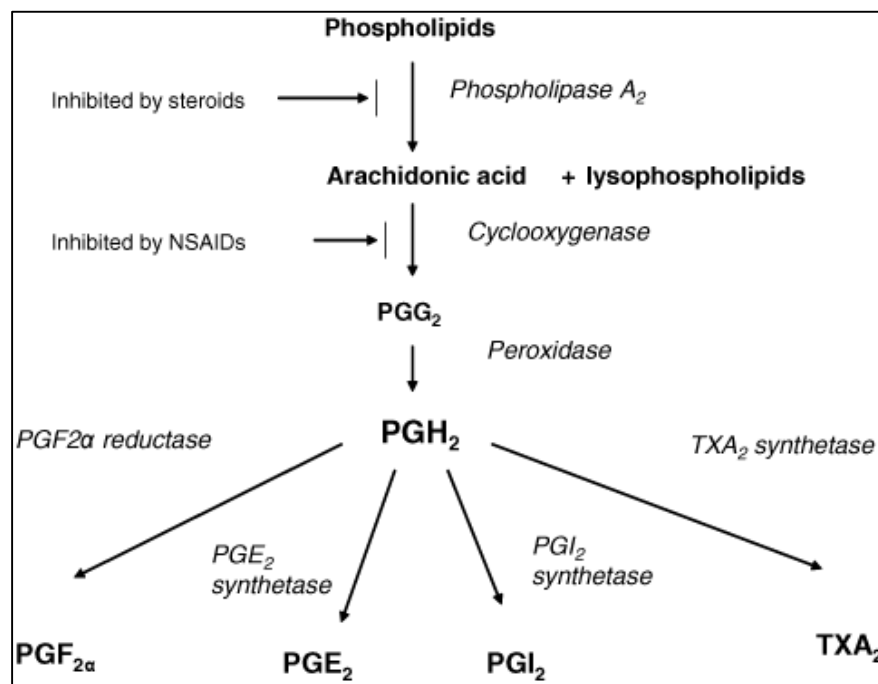
### 2.3. Paracetamol.



El Paracetamol (Acetaminofén) es un analgésico para-aminofenólico. Este fármaco posee propiedades analgésicas y antipiréticas. El paracetamol es rápidamente y casi por completo absorbido en tracto gastro-intestinal, cuando se administra vía oral, es excretado principalmente por vía urinaria en pequeñas cantidades de sulfato de acetaminofén aproximadamente un 85% es excretado por esta vía. Su pKa es de 9.38 y su LogP es de 0.46 (pubchem.ncbi).

### 2.3.1 Mecanismo de acción de paracetamol.

Se ha demostrado que el paracetamol actúa a través de la inhibición de la vía de la ciclooxigenasa (COX) (Figura 3). Este es el camino que siguen los AINE's inhiben la producción de prostaglandinas (sustancias químicas pro-inflamatorias; PGE<sub>2</sub>, PGI<sub>2</sub>, PGF<sub>2a</sub>) y ejercen consiguiente efecto. También influyen tromboxano (TXA<sub>2</sub>). TXA<sub>2</sub> es un vasoconstrictor, agente hipertensivo potente, y facilitador de la agregación plaquetaria. La naturaleza ubicua de las PGs en el cuerpo humano significa que las indicaciones pediátricas para los AINE gama de pirexia y analgesia para el cierre del conducto arterioso, la prevención de la trombosis vascular y la gestión de la fibrosis quística.



**Figura 3.** Diagrama esquemático del metabolismo del ácido araquidónico.

Flower and Vane demostraron que el paracetamol inhibe la actividad de la COX en homogeneizados de cerebro más que los del bazo. Este experimento apoya la idea de que existen variantes de las enzimas COX y que el paracetamol actúa a nivel central. Tal una

enzima (COX-3 o PGHS 1b) ha sido identificado en la corteza cerebral canina. Esta enzima, cuando se expresa en los perros, comparte una fuerte similitud con las otras enzimas COX, produce productos químicos pro-inflamatorias, y se inhibe selectivamente por el paracetamol. Sin embargo, la investigación posterior ha sugerido que en los seres humanos y ratones, la COX-3 codifica proteínas con completamente diferentes secuencias de aminoácidos que PGHS-1 o PGHS-2, y sin actividad de la COX, por lo que es improbable que la COX-3 en estas especies juegue un papel en la fiebre PG mediada y el dolor. . La fiebre se asocia con la rápida inducción de PGHS-2 y un aumento en la producción de PGE2 en el hipotálamo en lugar de la corteza cerebral. PGHS-1 o una variante de PGHS-1 (COX-3) parece tener poco papel aquí. Del mismo modo, PGHS-2 se expresa constitutivamente en el SNC y rápidamente hasta ser reguladas para reforzar la percepción del dolor. Esto sugeriría una variante de isoforma de PGHS-2 en lugar de PGHS-1. A pesar de las limitaciones con la creencia de que la COX-3 puede ser el sitio de acción de paracetamol, se ha sugerido que puede haber diversos productos de las dos proteínas de la COX con la superposición de distintas contribuciones a la producción de prostanoïdes en todo el cuerpo (Anderson J. Brian, 2008).

#### **2.4 Mecanismos de acción de los cannabinoides.**

Dadas las propiedades hidrófobas de los cannabinoides, durante algún tiempo existió la idea de que actúa en el organismo y esto podría estar relacionado con una interacción con los componentes lipídicos de la célula. Los efectos podrían ser similares a los atribuidos en la década de los setenta a algunos anestésicos, como por ejemplo desorganización de la fase lipídica con un aumento en la fluidez de la membrana plasmática. El mejor conocimiento de

la estructura de estos compuestos demostró posteriormente que este tipo de mecanismo solo podía justificar una pequeña parte de los efectos producidos por estos compuestos. El descubrimiento de los receptores para cannabinoides permitió comprobar que las acciones mejor conocidas del THC sobre el organismo son mediadas por alguno de los dos tipos de receptores actualmente conocidos y que han sido denominados CB1 y CB2 (Lynch ME. 2008).

El receptor CB1 fue caracterizado farmacológicamente utilizando el cannabinoide sintético (-)-CP-55.940. Este receptor media los efectos psicoactivos de los cannabinoides (Devane y cols., 1988).

La clonación de su gen en corteza cerebral de rata, permitió la caracterización de un polipéptido de 476 aminoácidos. Se trata de un miembro de la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G que se inserta en la membrana plasmática, donde se une tanto al THC como a los cannabinoides endógenos (Matsuda y cols., 1990).

Este receptor está presente a lo largo de toda la escala vertebrada, con un patrón de distribución que se ha conservado a lo largo de la evolución. En humanos, su gen se encuentra en la región q14-q15 del cromosoma 6, presentando una homología del 97,3% con el de rata (Hoehe y cols., 1991).

El receptor CB1 ha sido localizado en varias regiones del sistema nervioso central (hipocampo, corteza, ganglios basales, cerebelo, hipotálamo...), en terminales nerviosas periféricas y en los testículos (Herkenham y cols., 1991). Su abundancia en los ganglios basales, cerebelo e hipocampo, explica los efectos de los cannabinoides sobre la actividad motora y la memoria. Otros efectos, como los producidos sobre la regulación neuroendocrina

y el control nociceptivo tienen que ver con receptores localizados en el hipotálamo y en el tallo cerebral y médula espinal, respectivamente.

El receptor CB<sub>2</sub>, aislado de bazo de rata y de una línea leucémica humana (HL60), es un polipéptido de 360 aminoácidos, que también es miembro de la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G (Munro y cols., 1993). Ha sido localizado en células mieloides, macrófagos y monocitos de bazo, en zonas externas del bazo y en otras zonas relacionadas con el sistema inmune. Algunos autores han indicado su presencia en neuronas y astrocitos (Skaper y cols., 1996a; Sagan y cols., 1999). Este receptor podría participar en el mecanismo por el que los cannabinoides interactúan con el sistema inmune, produciendo el efecto inmunosupresor que los caracteriza. No se excluye la existencia de otros subtipos de receptores para cannabinoides que pudieran explicar algunos de los efectos producidos por estos compuestos y para los que todavía no se ha encontrado una explicación a nivel molecular (Pertwee, 1999). Por otro lado, se ha aislado un ARNm para el receptor CB<sub>1</sub>, que parece proceder del procesamiento alternativo de su transcrito primario. El receptor resultante contiene 61 aminoácidos menos que el CB<sub>1</sub> y se ha denominado CB<sub>1A</sub> (Shire y cols., 1995).

Los receptores CB<sub>1</sub> y CB<sub>2</sub> poseen una afinidad muy parecida por el THC y por el CP- 55,940, mientras que el WIN-55,212-2 posee mayor afinidad por el CB<sub>2</sub> que por el CB<sub>1</sub> (Felder y Glass, 1998). El receptor CB<sub>1</sub> puede modificar la actuación de los canales iónicos para calcio y para potasio, mientras que el CB<sub>2</sub> no parece poder hacerlo (ver Tabla 1).

<b>Tabla 1. Características más importantes de los receptores CB<sub>1</sub> y CB<sub>2</sub></b>		
	Receptores CB <sub>1</sub>	Receptores CB <sub>2</sub>
Localización	Sistema nervioso central terminales nerviosos periféricos testículos	Células del sistema inmune

Ligandos endógenos	Araquidoniletanolamida (anandamida) homo-linoleniletanolamida 7,10,13,16- docosatreniletanolamida 2-araquidonil- glicerol	2-araquidonil-glicerol
Otros agonistas	<u>Cannabinoides tricíclicos y bicíclicos:</u> $\Delta^9$ - tetrahidrocannabinol cannabinoil, cannabidiol CP-55940, desacetil-leonantradol <u>Aminoalquilindoles:</u> WIN-55,212	Similares al CB1 pero algunas diferencias en la relación estructura- actividad.
Antagonistas	SR141716 AM630 AM251 LY320135	SR144528
Mecanismo intracelular	Inhibición de adenilato ciclasa Inhibición canales de $Ca^{+}$ tipo N Inducción de genes de transcripción temprana	Inhibición de adenilato ciclasa Inhibición de genes de transcripción temprana

### 2.5 Mecanismos de transducción de los endocannabinoides.

La unión de la anandamida a los receptores CB1 o CB2 inhibe la formación de AMPc y activa la vía de transducción de señales de las MAPKs. Únicamente su unión al receptor CB1 inhibe los canales de  $Ca^{++}$  tipo N (Pertwee, 1997). También se ha indicado que la unión de la anandamida al receptor de cannabinoides está acoplada a la liberación de óxido nítrico en el sistema nervioso central de invertebrados y en las células del sistema inmune de invertebrados y de humanos (Stefano, Liu y Goligorsky, 1996).

La anandamida, al igual que ocurría con el THC, estimula la liberación intracelular de ácido araquidónico a través de mecanismos que implican un aumento de la actividad de las MAPKs y de la fosforilación de una fosfolipasa A2 citoplasmática (Wartmann y cols., 1995).

Se ha visto que la anandamida aumenta en hipocampo y en cerebro anterior de rata la fosforilación de la quinasa de adhesión focal pp125 (FAK+) (Derkinderen y cols., 1996). Esta proteína está presente en los conos de crecimiento de neuronas jóvenes por lo que podría ejercer efectos neurotróficos. También está relacionada con la interacción entre las integrinas



y el citoesqueleto asociado a actina, lo que podría implicar a la anandamida en la modificación de la plasticidad sináptica. También se ha postulado un posible papel de la anandamida como factor de crecimiento en las células hematopoyéticas, en las que actuaría sinérgicamente con IL3 (interleukina 3), GM-CSF (factor estimulante de colonias granulocitosmacrófagos), G-CSF (factor estimulante de colonias de granulocitos) y Epo (eritropoyetina) (Valk y cols., 1997).

La exposición crónica a anandamida produce, igual que ocurría con los cannabinoides, la desensibilización del receptor CB1. Se ha descrito la aparición de tolerancia para alguno de los efectos producidos por esta amida, que puede deberse a una disminución del número de receptores CB1 (Romero y cols., 1995).

El 2-araquidonilglicerol se une a los receptores CB1 y CB2 inhibiendo la actividad de la adenilato ciclasa. Durante su caracterización, se identificaron otros dos monoacilgliceroles, el 2-palmitoilglicerol y el 2-linoleilglicerol, ninguno de los cuales presenta afinidad por los receptores CB1 o CB2, ni actividad cannabimimética.

Sin embargo, ambos compuestos potencian algunos efectos producidos por el 2-araquidonilglicerol, como la inhibición de la adenilato ciclasa, la inhibición del comportamiento motor, la inmovilidad y la hipotermia (Ben-Shabat y cols., 1998). Esta activación podría deberse a su capacidad de inhibir la hidrolasa que degrada el 2-araquidonilglicerol, lo que prolongaría la permanencia de este compuesto en el organismo.

En cuanto a las posibles funciones del 2-araquidonilglicerol en el organismo, además de los efectos sobre el comportamiento motor y la regulación de la temperatura corporal, inhibe la potenciación a largo plazo en hipocampo de rata (Stella, Schweitzer y Piomelli, 1997).

También parece participar en las respuestas proliferativas de los linfocitos T a los mitógenos B y T (Lee, Yang y Kaminski, 1995).

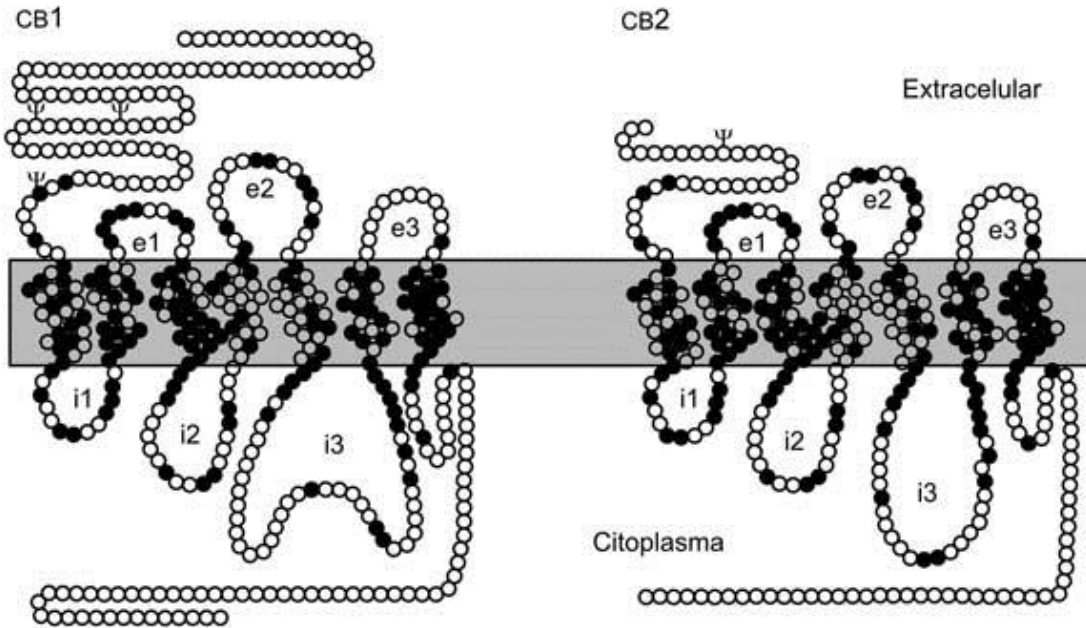


Figura 4. Representación esquemática de los receptores CB1 y CB2

### 2.5.1 Síntesis y degradación de los endocannabinoides.

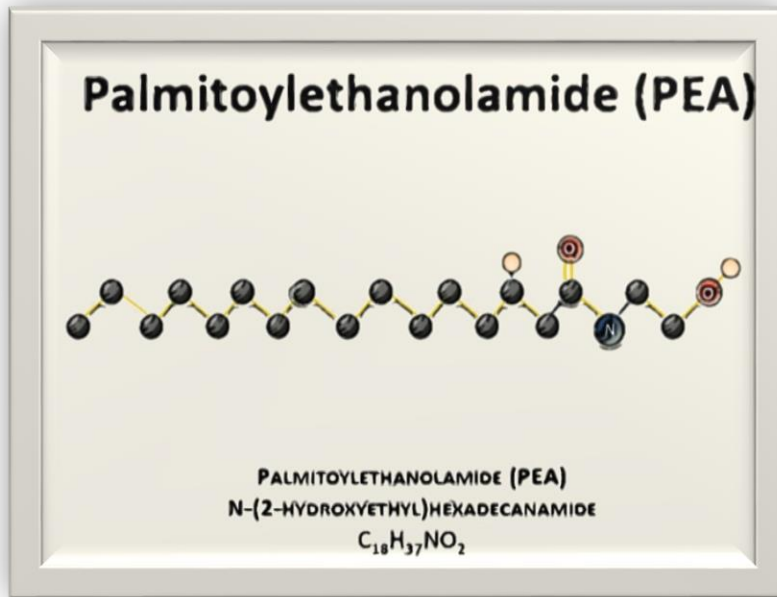
Se ha descrito recientemente como se produce la síntesis del 2-araquidonilglicerol en las neuronas de la corteza cerebral, mediante un mecanismo activado por la entrada de  $\text{Ca}^{++}$  a la neurona. Una diacilglicerol lipasa o la fosfolipasa C actúan sobre diacilglicerol, liberando una molécula de ácido graso de la posición sn1 del glicerol. La enzima se activa al despolarizarse la membrana, vía canales de  $\text{Ca}^{++}$  dependientes de voltaje. Una vez cumplida su función, el compuesto es degradado a ácido araquidónico y glicerol por una monoacilglicerol lipasa cuya presencia en los tejidos cerebrales se conoce desde hace tiempo (Stella, Schweitzer y Piomelli, 1997).

El diacilglicerol puede proceder de la degradación de los fosfolípidos de membrana, tras la actuación de una fosfolipasa C. La síntesis del 2-araquidonilglicerol también puede estar asociada a otros procesos metabólicos como por ejemplo la síntesis de nuevo de diacilglicerol o la remodelación de los fosfolípidos.

El mecanismo más probable para la síntesis de la anandamida es el inicialmente descrito en estriado y corteza de rata (Di Marzo y cols., 1994). La anandamida se sintetiza y libera tras la entrada de  $\text{Ca}^{++}$  al interior de la neurona. La síntesis de anandamida y de otras N-aciletanolaminas (NAEs) se produce mediante la hidrólisis de un precursor fosfolipídico presente en la membrana celular, la Nacil-fosfatidiletanolamina (NAPE), que puede estar N-acilada por diferentes ácidos grasos: araquidónico, g-linolénico, linoleico, oleico, palmítico o esteárico. La acción de la fosfolipasa D, libera ácido fosfatídico y los correspondientes tipos de NAEs. El que se formen y liberen unas u otras depende del ácido graso que forma parte de la NAPE presente en la célula estimulada.

Respecto de la síntesis de este precursor, recientemente se ha caracterizado en corteza cerebral de rata una N-aciltransferasa (NAT), dependiente de  $\text{Ca}^{++}$  que produce NAPE mediante la transferencia de un grupo acilo procedente de una fosfatidilcolina al grupo amino de la fosfatidiletanolamina. La reacción es estimulada por la actividad neuronal que conduce a la despolarización de la membrana.

## 2.6 N-palmitoiletanolamida



En los años 40's se realizó un descubrimiento clínico cuando ciertos investigadores notaron que las dietas suplementadas con yema de huevo a niños de bajos recursos previenen la recurrencia de fiebre reumática a pesar de presentar infecciones con *Streptococcus sp.* Estudios posteriores demostraron que una fracción lipídica purificada de la yema del huevo, así como del aceite de cacahuete y de lecitina de soya, posee efectos antialérgicos en el cobayo (Lo Verme et al., 2005). Pronto se aisló el agente responsable de la producción de efectos antiinflamatorios y antialérgicos, la *N*-palmitoiletanolamida (PEA) (Kuehl et al., 1957). Más tarde, la PEA fue comercializada con el nombre de Impulsin por la compañía farmacéutica Czech, en Europa del Este, para la prevención de infecciones del tracto respiratorio. Tras el descubrimiento del endocannabinoide anandamida, se empezó el estudio de las propiedades farmacológicas que poseía la PEA y los mecanismos de acción involucrados en los efectos biológicos del compuesto (Mašek et al., 1974).

### **3. Planteamiento del problema.**

Hoy en día existen diversos tipos de analgésicos para diferentes tipos de dolor y todos ellos producen reacciones adversas. Debido a que el dolor es considerado un problema de salud pública a nivel mundial que presenta un impacto social y económico importante, es necesario buscar diferentes estrategias terapéuticas para el tratamiento del mismo. Una de estas estrategias es la combinación de fármacos.

En el presente trabajo se combinó un endocanabinoide con una AINE con la finalidad de potencializar el efecto antinociceptivo. Por lo anterior se seleccionó a la *N*-palmitoiletanolamida, un endocannabinoide, y al paracetamol el cual se ha demostrado que inhibe a la enzima de COX.

### **4. Objetivo.**

Evaluar el efecto antinociceptivo que presenta la *N*-palmitoiletanolamida en combinación con Paracetamol a nivel local en la prueba de la formalina en ratón.

#### **4.1 Objetivos particulares**

1. Evaluar el efecto antinociceptivo a nivel local de la administración individual de la *N*-palmitoiletanolamida y paracetamol en la pata de ratón, utilizando la prueba de la formalina.
2. Determinar la interacción antinociceptiva local de las combinaciones de la *N*-palmitoiletanolamida con paracetamol mediante un análisis isoblográfico en la prueba de la formalina.

## **5. Hipótesis.**

La administración de N-palmitoiletanolamida combinada con paracetamol presentara un efecto antinociceptivo sinérgico en el ratón.

## **6. Metodología.**

### **6.1 Material.**

#### **6.1.1 Material biológico.**

Se utilizaron ratones hembra de la cepa ICR con un peso entre 25 y 35 gramos procedentes del bioterio del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER) de la S.S.A. Los animales permanecieron en condiciones ambientales del laboratorio (23-25°C) con ciclos de 12 horas luz/oscuridad con acceso libre a comida y agua. El experimento se desarrolló a una temperatura de 27-28°C; los animales utilizados se sacrificaron en una cámara de CO<sub>2</sub>, terminado el experimento de acuerdo a lo establecido en la NOM-062-ZOO-1999 que establece las especificaciones técnicas para la producción y uso de los animales de laboratorio.

#### **6.1.2 Reactivos**

Se utilizaron la N-palmitoiletanolamida y el cual se adquirió de Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA) y paracetamol que fue obtenido de Millikan (Ciudad de México, México). El formaldehído utilizado fue obtenido de J.T. Baker (Pennsylvania, USA). Para preparar la PEA, se realizó una solución madre con una concentración de 3 mg/mL, esta solución se preparó pesando 9 mg de la PEA y se disolvió en 3 mL DMSO al 20% (el dimetilsulfoxido

DMSO se diluyó con solución salina isotónica), a partir de esta solución se prepararon las concentraciones que se probaron.

## **7. Modelo experimental.**

### **7.1 Medición de la de respuesta nociceptiva.**

Entre los modelos de dolor-inflamatorio utilizados se encuentra la prueba de la formalina descrita entre los modelos agudos y crónicos. En esta prueba, la primera fase del mismo refleja un dolor nociceptivo debido a la irritación química de la formalina subcutánea y su segunda fase presenta un dolor de origen inflamatorio. La ventaja de este modelo es que produce una serie de conductas que son contabilizadas (lamidos, sacudidas etc.) y se cuantifican como efecto nociceptivo (Ortega et al., 2002), para este proyecto se contabilizaron las dos fases del comportamiento nociceptivo, las cuales se presentan en un periodo de evaluación de 30 min. La disminución de la conducta nociceptiva de fase I y fase II representa el efecto antinociceptivo total.

El ratón se coloca en una cámara de observación transparente de acrílico de 20 cm de diámetro y 30 cm de altura; provisto de dos espejos en la parte trasera formando un ángulo de 45° entre ellos para una mejor observación. El ratón se deja 15 minutos en ambientación, transcurrido este tiempo se le administró el tratamiento a evaluar (extracto y/o vitaminas).

Terminando la administración se regresa el ratón a la cámara de observación por otro periodo de 15 minutos. Posteriormente, se administró de manera subcutánea 50 µL de formalina en el dorso de la pata a una concentración de 2% v/v. Inmediatamente después de la inyección se vuelve a colocar el ratón dentro de la cámara de observación. Con ayuda de un cronómetro se cuenta el tiempo acumulativo de lamida de la pata, pierna o cola

(Licking, en inglés). El conteo se realizó por intervalos de 5 minutos hasta completar 30 minutos de evaluación. Terminada la prueba se retira el ratón del cilindro y se sacrifica.

### **7.2 Evaluación del efecto antinociceptivo.**

Se realiza una prueba inicial del modelo de respuesta nociceptiva de formalina; en un grupo de 6 ratones, administrándose solución salina fisiológica (vehículo) por vía subcutánea 15 minutos antes de la inyección de formalina para observar la conducta típica de sacudidas y el lamido de la pata inyectada. Posteriormente, se realiza otra prueba del modelo de respuesta nociceptiva de formalina en un grupo de 6 ratones administrando un AINE con la finalidad de observar el comportamiento antinociceptivo o la disminución de la conducta típica de la prueba bajo nuestras condiciones experimentales y demostrar que este modelo es útil para el presente proyecto.

Se evaluó el efecto antinociceptivo local de la combinación de la PEA con los inhibidores de la COX (paracetamol). Para lo cual, se determinó la curva concentración-respuesta del efecto antinociceptivo local de la administración individual de la PEA (0.3, 3, 10, 30, 56  $\mu\text{g/pata}$ ), 15 minutos después de la administración de los tratamientos se administró 50  $\mu\text{L}$  de formalina al 1%; se cuantificó el número de sacudidas que presente el animal por cada 5 minutos durante 30 minutos. Todos los experimentos se realizaron a una temperatura de  $27 \pm 1^\circ\text{C}$ . Posteriormente, se calculó la concentración efectiva 30 ( $\text{CE}_{30}$ ) de cada uno de los fármacos utilizados. Con las  $\text{CE}_{30}$  de la PEA y paracetamol se establecieron las combinaciones en una proporción 1:1 y se realizó el análisis isoblográfico.

Posteriormente, se realizaron las evaluaciones de las combinaciones de la PEA con el inhibidor de la COX. Las combinaciones se administraron también 15 minutos antes de la

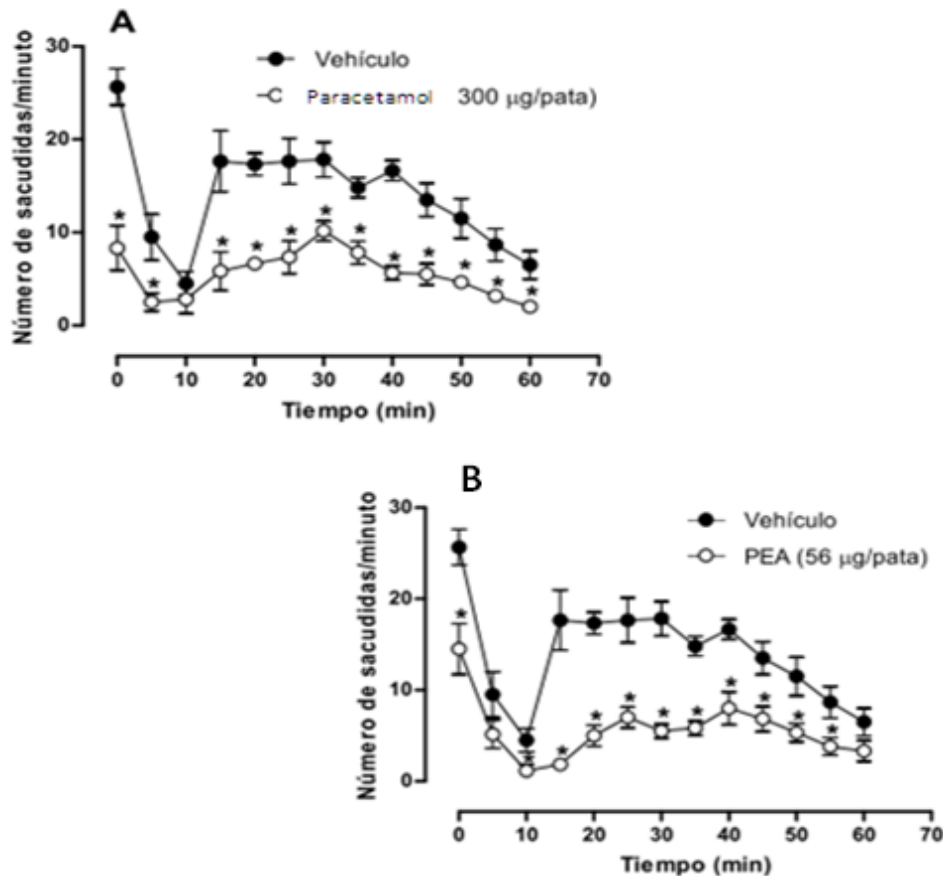


administración de la formalina el inhibidor de la COX y PEA, los tiempos de administración de los fármacos que se utilizaron, se decidieron de acuerdo a la realización de pruebas preliminares para observar el tiempo adecuado en el cual los fármacos actuaban en sus respectivos blancos de acción y presentaban una respuesta antinociceptiva a nivel local, sin embargo se siguieron parcialmente, los tiempos sugeridos en ciertas referencias bibliográficas (Aguirre-Bañuelos y Granados-Soto, 2000; Ortiz et al., 2001; Granados-Soto et al., 2002; Ortiz et al., 2002; Ortiz, 2012).

## **8. Resultados**

La prueba de la formalina en la rata es un modelo ampliamente utilizado por la comunidad científica para estudiar posibles mecanismos fisiopatológicos del dolor, además de ser útil en la evaluación del potencial terapéutico de nuevos compuestos para el dolor, en especial de tipo inflamatorio.

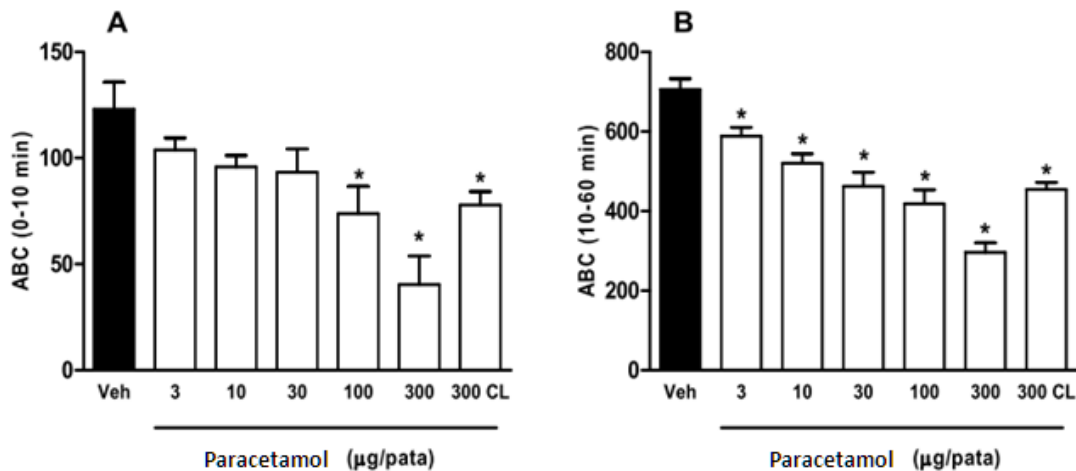
En la figura 5 se muestran tres cursos temporales, en los cuales se observa el grupo control y adicionalmente el de los fármacos utilizados en este trabajo (paracetamol y PEA). Se puede notar como al administrar, a nivel local, las concentraciones más altas evaluadas de los tratamientos (paracetamol, 300 µg/pata y PEA, 56 µg/pata), se presenta una disminución en el número de sacudidas, esto es indicativo del efecto antinociceptivo de cada fármaco. Hay una disminución de la conducta nociceptiva durante la prueba (60 minutos). La reducción significativa de la conducta nociceptiva en las dos fases de la prueba, indica que los fármacos actúan tanto a nivel de las fibras aferentes primarias (fase I) como a nivel de mecanismos inflamatorios (fase II).



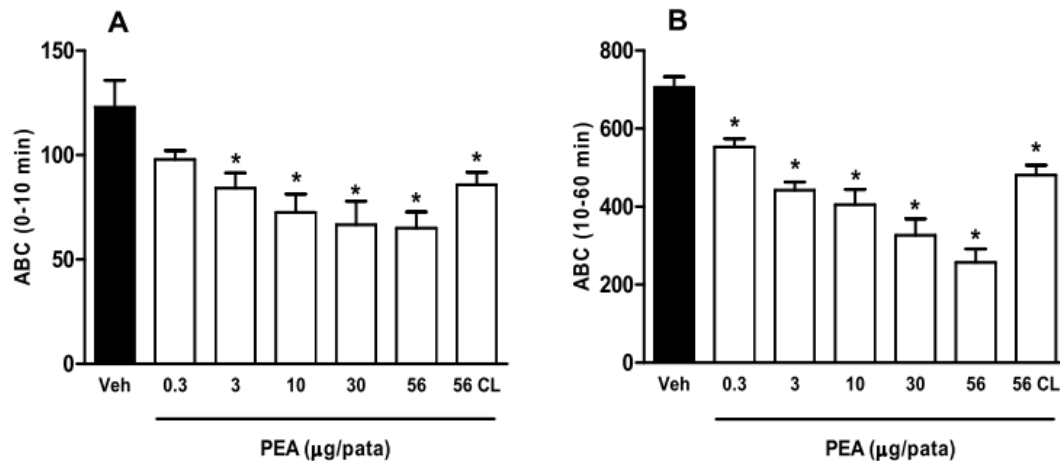
**Figura 5.** Curso temporal del efecto antinociceptivo de la administración local de paracetamol y PEA en la prueba de la formalina. Administración ipsilateral de 300 µg/pata de paracetamol (panel A) y 56 µg/pata de PEA (panel C), 10 minutos antes de la administración de formalina al 1%. Cada valor representa el promedio de 6 animales  $\pm$  EEM. \*Estadísticamente diferente con respecto al vehículo (DMSO al 20%),  $p < 0.05$  determinado por una  $t'$  student.

Para observar el efecto antinociceptivo del paracetamol y la PEA, los datos se expresan en relación al área bajo la curva (ABC) del curso temporal. En las figuras 6 y 7 se presentan el ABC de la fase 1 (la respuesta que presentó de 0-10 minutos) y el ABC de la fase 2 (la respuesta que presentó de 10-60 minutos) de paracetamol y la PEA, respectivamente. En el caso de la curva concentración-respuesta, además de evaluar el efecto que producen los fármacos en el lugar de la aplicación de la formalina (ipsilateral), se realizó la administración contralateral de los fármacos (en la pata contraria a la aplicación de formalina). En este

trabajo las concentraciones utilizadas de paracetamol y de la PEA fueron incapaces de lograr una respuesta de más del 60% de efecto, por lo tanto, el cálculo de la CE50 no era factible, por consiguiente se estimó la CE30 para todos los fármacos utilizados. La elección de una menor concentración a la efectiva 50, ha demostrado ser una técnica valiosa en el análisis isobolográfico (Tallarida et al., 1999; Jiménez Andrade et al., 2003; Granados-Soto y Argüelles, 2005; Ortiz et al., 2008). Se calculó la CE30 de cada uno de los fármacos (paracetamol,  $17.2 \pm 3.2 \mu\text{g/pata}$ ; PEA,  $1.1 \pm 0.3 \mu\text{g/pata}$ ).

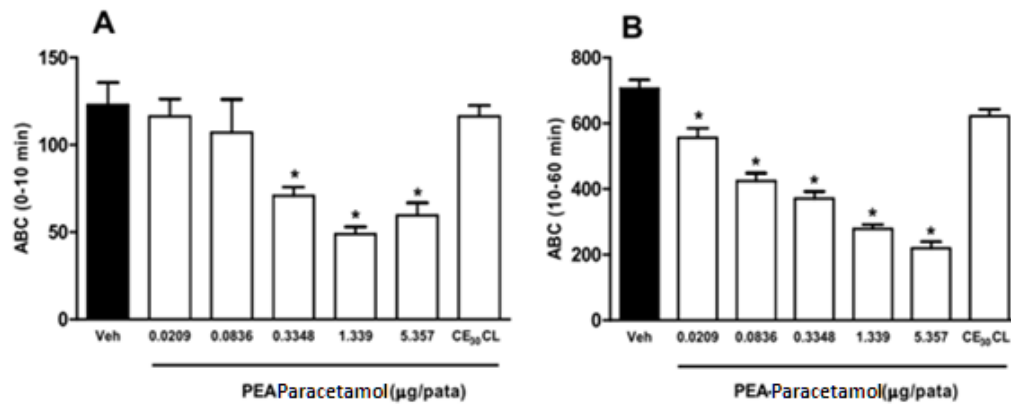


**Figura 6.** Efecto antinociceptivo de la administración local de paracetamol en la rata. Administración ipsilateral (3-300  $\mu\text{g/pata}$ ) y contralateral (CL, 300  $\mu\text{g/pata}$ ) de paracetamol 10 minutos antes de la administración de formalina al 1%. En el panel A se muestra la fase 1 y en el panel B la fase 2. \*Estadísticamente diferentes con respecto al vehículo (Veh, DMSO al 20%),  $p < 0.05$  determinado por una ANADEVa de una vía seguido de una prueba post-hoc de Dunnett.



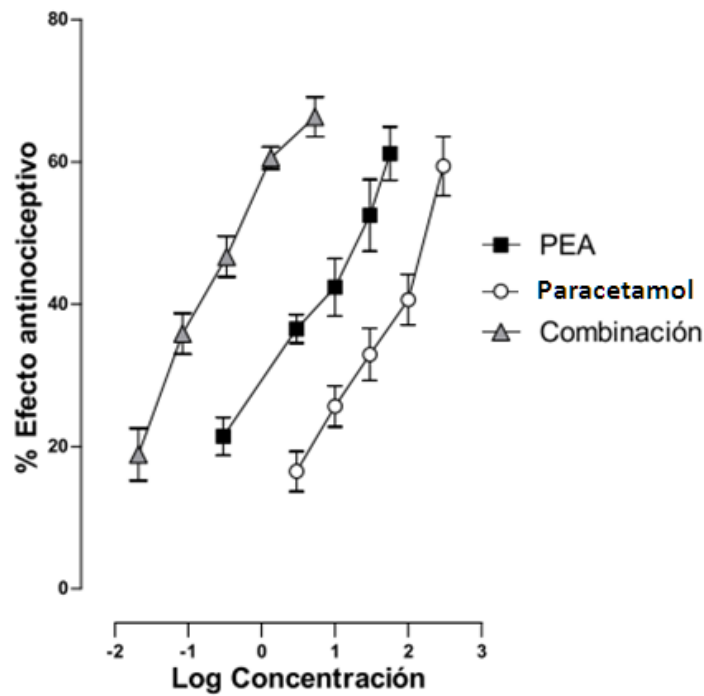
**Figura 7.** Efecto antinociceptivo de la administración local de PEA en la rata. Administración ipsilateral (0.3-56 µg/pata) y contralateral (CL, 56 µg/pata) de PEA 10 minutos antes de la administración de formalina al 1%. En el panel A se muestra la fase 1 y en el panel B la fase 2. \*Estadísticamente diferentes con respecto al vehículo (Veh, DMSO al 20%),  $p < 0.05$  determinado por una ANADEVIA de una vía seguido de una prueba post-hoc de Dunnett.

En la figura 8 se presenta el ABC de la fase 1 (la respuesta que presentó de 0-10 minutos) y el ABC de la fase 2 (la respuesta que presentó de 10-60 minutos) de la combinación de PEA/paracetamol. En el caso de la curva concentración-respuesta, además de evaluar el efecto que producen los fármacos en el lugar de la aplicación de la formalina (ipsilateral), se realizó la administración contralateral de los fármacos (en la pata contraria a la aplicación de formalina). Se realizaron cálculos para conocer la  $CE_{30}$  del efecto antinociceptivo a nivel local (PEA/paracetamol,  $0.05 \pm 0.01$  µg/pata).

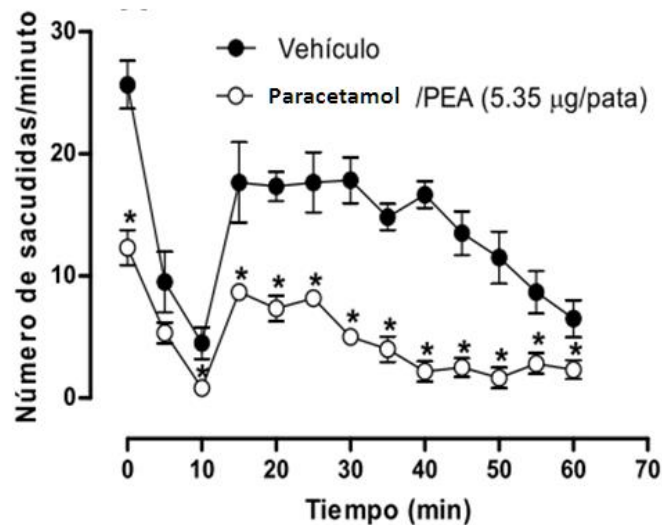


**Figura 8.** Efecto antinociceptivo de la administración local de PEA en combinación con paracetamol en la rata. Administración ipsilateral (0.0209-5.357 µg/pata) y contralateral (CL, CE30: 0.05 µg/pata) de paracetamol 15 minutos y de PEA 10 minutos antes de la administración de formalina al 1%. En el panel A se muestra la fase 1 y en el panel B la fase 2. \*Estadísticamente diferentes con respecto al vehículo (Veh, DMSO al 20%),  $p < 0.05$  determinado por una ANADEVIA de una vía seguido de una prueba post-hoc de Dunnett.

En la figura 9 se puede observar las curvas concentración-respuesta de los fármacos individuales y de la combinación PEA/paracetamol (A). Las curvas de las combinaciones se desplazan hacia la izquierda, indicando que presentan una potencia farmacológica, es decir, que a menor concentración se alcanza una eficacia similar al del fármaco individual (PEA o el AINE), lo cual es representativo de un efecto sinérgico. En la figura 10 se puede observar como al administrar a nivel local las concentraciones más altas evaluadas de cada combinación (PEA/paracetamol), se presenta una disminución en el número de sacudidas, esto es indicativo del efecto antinociceptivo de estas combinaciones (PEA/Inhibidor de la COX).



**Figura 9.** Curva concentración-respuesta de los inhibidores de la COX y del endocannabinoide administrados individualmente y en combinación. En el panel se muestra el efecto antinociceptivo de paracetamol, PEA y de la combinación.



**Figura 10.** Curso temporal del efecto antinociceptivo de la administración local de paracetamol en combinación con PEA en la prueba de la formalina. Administración ipsilateral de 5.35  $\mu\text{g/pata}$  de paracetamol/PEA (panel A) 15 minutos antes de la administración de formalina al 1%. Cada valor representa el promedio de 6 animales  $\pm$  EEM. \*Estadísticamente diferente con respecto al vehículo (DMSO al 20%),  $p < 0.05$  determinado por una  $t'$  student.

## 9. Análisis de resultados

Al administrar de manera individual el paracetamol y PEA en sus diferentes concentraciones se puede observar una disminución en el efecto que presenta durante la fase 1 y la fase 2. Cuando se realiza la administración de manera local de paracetamol y PEA presenta una disminución en la conducta nociceptiva.

Por otra parte la prueba de la formalina presenta dos fases, la fase neurogénica y la fase inflamatoria.

El paracetamol es un AINEs por lo que pueden inhibir la producción de prostaglandinas esto explica porque estos dos fármacos son capaces de producir una disminución del ABC de la fase 2. Durante el trabajo se demostró que el paracetamol es capaz de disminuir la conducta nociceptiva, esto a una concentración alta (300 µg/pata). Mientras que la PEA presenta varios mecanismos de acción los cuales hacen posible un efecto antinociceptivo y antiinflamatorio.

Es por esto que se explica la disminución del ABC en las dos fases de la prueba, ya que PEA es capaz de promover por varias vías el efecto antinociceptivo y antiinflamatorio

Se sugiere que la cantidad administrada de paracetamol de 300 µg/pata, este fármaco puede llegar a ser absorbido y distribuido vía torrente sanguíneo para finalmente llegar a ejercer su efecto, lo cual ocasiona una disminución de la conducta nociceptiva de la pata a la que se le administró formalina. Para la PEA, en este proyecto produjo un efecto antinociceptivo en la pata con formalina, puede deberse a que el fármaco al ser un ácido graso saturado, es fácilmente absorbido, esto provoca que se introduzca al torrente sanguíneo y por tanto pueda actuar en otros lugares distantes al sitio de aplicación.

Al combinar dos fármacos se busca una mayor eficacia en el proceso de medicación y donde sea una dosis menor. Durante el trabajo se logró observar que en la combinación de paracetamol y PEA a dosis menores a las individuales se obtuvo el efecto antinociceptivo deseado.

El resultado de la combinación del indica que no se tiene un efecto sistémico (Figura 8), dicho efecto solo se presenta de manera local. Lo cual nos puede indicar que el efecto sistémico que presentan los fármacos es solo administrado individualmente o debido a las concentraciones elevadas.

No se puede decir concretamente cual es el mecanismo de acción para que se presente el efecto antinociceptivo observado en la sinergia de la combinación de PEA y paracetamol. Pero tomando en cuenta lo revisado en la literatura se puede crear posibles explicaciones de lo que está sucediendo

Al administrar un agente nocivo como la Formalina van a existir una serie de efectos nociceptivos tanto neurogenicos como inflamatorios. Durante la administración de fármacos combinados como la PEA y paracetamol existirá una disminución de los eventos antes mencionados.

La PEA puede disminuir la expresión de la FAAH, enzima encargada principalmente del catabolismo de la AEA (Di Marzo et al., 2001). Al administrarse la PEA está actuando en los receptores CB1 y CB2, produciendo un efecto antinociceptivo importante. Además, la enzima COX es capaz de degradar a la AEA (Woodward et al., 2008), la adición de un inhibidor de la COX como lo es el paracetamol, se produce un bloqueo de esta vía de degradación, por lo tanto se estará incrementando aún más las concentraciones disponibles de la AEA, potenciando el efecto antinociceptivo inicialmente observado al administrar la El



sinergismo observado por la combinación de PEA y paracetamol puede ser debido a la combinación de otros mecanismos de acción de dicha combinación.

La PEA puede actuar en los receptores PPAR- $\alpha$ , produciendo la inducción de proteínas, represoras de las proteínas pro inflamatoria como la I $\kappa$ B- $\alpha$ . Por su parte el paracetamol puede disminuir las concentraciones de prostaglandinas, las cuales son mediadores inflamatorios. Todo esto ocasionaría una disminución del proceso inflamatorio.

Otra posible explicación del efecto sinérgico observado por la combinación realizada durante este trabajo, es que el paracetamol reduce la síntesis de prostaglandinas, lo que a su vez incrementaría la disponibilidad de ácido araquidónico, este ácido es transformado en hepxilinas, las cuales indirectamente inhibirían la liberación de GABA. La inhibición de liberación de GABA incrementa la actividad neuronal que se produce a causa de la antinocicepción por la liberación de sustancias analgésicas.

También la producción del efecto antinociceptivo observado, es que los mecanismos descritos anteriormente están sucediendo al mismo tiempo, lo cual ocasionaría la activación de todos los sistemas antinociceptivos y antiinflamatorios.

Las anteriores son algunas posibles explicaciones de lo ocurrido durante el trabajo y el efecto antinociceptivo sinérgico observado durante las combinaciones de PEA y paracetamol. Seguramente pueden existir más suposiciones sobre lo que está sucediendo al combinar dichos fármacos.

**10. Conclusiones**

Si suceden todas las hipótesis o teorías dadas en la discusión de resultados, las combinaciones farmacológicas realizadas durante este trabajo podrían ser utilizadas en patologías que presentan dolor crónico como la artritis, el cáncer o en la neuropatía diabética.

Con este trabajo se logró observar que durante la administración combinada de PEA con paracetamol en la prueba de formalina en rata, se presenta un efecto sinérgico antinociceptivo. Lo que podría darnos como resultado una alternativa terapéutica para el dolor inflamatorio.

Brian J. Anderson. Paracetamol (Acetaminophen): mechanisms of action. Article first published online: 2 SEP 2008

Guida G., Fabiani A., Lanaia F. La palmitoiletanolamida (Normast) en el dolor neuropático crónico por lumbociatalgia de tipo compresivo: estudio clínico multicéntrico. *Dolor* 2010; 25: 35-42.

Gutiérrez T., Farthing J.N., Zvonok A.M., Makriyannis A., Hohmann A.G. Activation of peripheral cannabinoid CB1 and CB2 receptors suppresses the maintenance of inflammatory nociception: a comparative analysis. *Br. J. Pharmacol.* 2007; 150:153-63.

Hampson A.J., Bornheim L.M., Scanziani M., Yost C.S., Gray A.T., Hansen B.M. Dual effects of anandamide on NMDA receptor-mediated responses and neurotransmission. *J. Neurochem.* 1998; 70: 671-676.

Han JS, Ren MF. The importance of monitoring tailskin temperature in measuring tail-flick latency. *Pain* 1991; 46: 117.

Hawkey C.J. COX-2 inhibitors. *The Lancet* 1999; 353: 307-314.

Helyes Z., Nemeth J., Than M., Bolcskei K., Pinter E., Szolcsányi J. Inhibitory effect of anandamide on resiniferatoxin-induced sensory neuropeptide release in vivo and neuropathic hyperalgesia in the rat. *Life Sci.* 2003; 73: 2345-2353.

Hill R. NK1 (substance P) receptor antagonists—why are they not analgesic in humans? Trends Pharmacol Sci 2000; 21: 244-6.

Keppel J.M. New targets in pain, non-neuronal cells, and the role of palmitoylethanolamide. The open pain Journal 2012; 5: 12-23.

Laird JM. Gut feelings about tachykinin NK 1 receptor antagonists. Trends in Pharmacol Sci 2001; 22: 169.

Le Bars D, Gozariu M, Cadden SW. Animal models of nociception. Pharmacol Rev 2001; 53: 597 - 652.

Mašek K., Perlík F., Klíma J., Kahlich R. Prophylactic efficacy of N-2-hydroxyethyl palmitamide (Impulsin) in acute respiratory tract infections. Europ. J. Clin. Pharmacol. 1974; 7: 415-419.

Matsuda L.A., Lolait S.J., Brownstein M.J., Young A.C., Bonner T.I. Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. Nature 1990; 346: 561-564.

Mazzari S., Canella R., Petrelli L., Marcolongo G., Leon A. N-(2-hidroxyethyl)hexadecanamide is orally active in reducing edema formation and

inflammatory hyperalgesia by down-modulating mast cell activation. *Eur. J. Pharmacol.* 1996; 300: 227-236.

Mechoulam R., Fride E., Di Marzo V. Endocannabinoids. *Eur. J. Pharmacol.* 1998; 359: 1-18.

Mehanna A.S. NSAIDs: Chemistry and pharmacological actions. *Am. J. Pharmaceu. Educat.* 2003; 67 (2): 1-7.

Millan M.J. Descending control of pain. *Prog. Neurobiol.* 2002; 66: 355-474.

Millan M.J. The induction of pain: and integrative review. *Prog. Neurobiol.* 1999; 57: 1-164

Miranda H.F., Puig M.M., Prieto J.C., Pinardi G. Synergism between paracetamol and nonsteroidal anti-inflammatory drugs in experimental acute pain. *Pain* 2006; 121: 22-28.

Morita I. Distinct functions of COX-1 and COX-2. *Prostag. Lipid Med.* 2002; 68-69: 165-175.

Munro S., Thomas K.L., Abu-Shaar M. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature* 1993; 365: 61-65.

Natarajan V., Schmid P.C., Schmid H.H.O. N-acyl ethanolamine phospholipids metabolism in normal and ischemic rat brain. *Biochimica et Biophysica Acta* 1986; 878: 32-41.

Ortiz M.I., Castañeda-Hernández G., Rosas R., Vidal-Cantú G.C., Granados-Soto V. Evidence for a new mechanism of action of diclofenac: activation of K<sup>+</sup> channels. *Proc. West. Pharmacol. Soc.* 2001; 44: 19-21.

Ortiz M.I., Lozano-Cuenca J., Granados-Soto V., Castañeda-Hernández G. Additive interaction between peripheral and central mechanisms involved in the antinociceptive effect of diclofenac in the formalin test in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 2008; 91: 32-37.

Ortiz M.I., Torres-López J.E., Castañeda-Hernández G., Rosas R., Vidal-Cantú G.C., Granados-Soto V. Pharmacological evidence for the activation of K<sup>+</sup> channels by diclofenac. *Eur. J. Pharmacol.* 2002; 438 (1-2): 85-91.

Ossipov M.H., Lai J., Malan T.P., Porreca F. Spinal and supraspinal mechanisms of neuropathic pain. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2000; 909: 12-24.

Scarpella F., Abramo F., Noli C. Clinical and histological evaluation of an analogue of palmitoylethanolamide, PLR 120 in cats with eosinophilic granuloma and eosinophilic plaque: a pilot study. *Veterinary Dermatology* 2001; 12: 29-39.

Schafer A. I. Effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on platelet function and systemic hemostasis. *J. Clin. Pharmacol.* 1995; 35, 209–219.

Schatz A.R., Lee M., Condie R.B., Pulaski J.T., Kaminski N.E. Cannabinoid receptors CB1 and CB2: a characterization of expression and adenylyl cyclase modulation within the immune system. *Toxicological Applications in Pharmacology* 1997; 142: 278-287.

Scuderi C., Valenza M., Stecca C., Esposito G., Carratù M.R., Steardo L. Palmitoylethanolamide exerts neuroprotective effects in mixed neuroglial cultures and organotypic hippocampal slices via peroxisome proliferator-activated receptor- $\alpha$ . *J. Neuroinflammation* 2012; 9: 1-7.