



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA**

**EVALUACIÓN DE LA CONDUCTA
NOCICEPTIVA GENERADA POR DOLOR
ASOCIADO A CÁNCER EN RATA**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIOLÓGICO

P R E S E N T A :

JULIO MUÑOZ PÉREZ



**DIRECTOR: DRA. MYRNA DÉCIGA CAMPOS
ASESOR TÉCNICO: M. EN F. IDALIA L. FLORES GÓMEZ**

MÉXICO, D.F. MAYO 2015



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.

Agradecimientos

A mis padres

Julio Muñoz Espinosa y María Guadalupe Pérez Martínez, gracias por todo su apoyo incondicional, por la educación y valores que me han inculcado a lo largo de mi vida y sobre todo por haberme brindado la oportunidad de superarme. ¡Por todo eso y más los amo!

A mis hermanas

Dra. Sandra María Muñoz Pérez, Marilú Muñoz Pérez y Nathalie Muñoz Pérez, gracias por todo el apoyo, consejos, regaños y ayuda que me brindaron a lo largo de este camino. ¡Las amo!

A la Dra. Myrna Déciga Campos

Gracias por todo su apoyo, tiempo, consejos, paciencia, opiniones y sobre todo el conocimiento que me otorgó en el transcurso de la elaboración de mi tesis.

A la M. en F. Idalia L. Flores Gómez y la M. en F. Leticia Huerta Flores

Gracias por todo su tiempo, paciencia, consejos y apoyo que me brindó durante mi estancia en la facultad, así como en el transcurso de mi servicio social.

A mis amigos

Gracias a cada uno de ustedes por todos esos momentos inolvidables; alegrías, tristezas, experiencias, desveladas, parrandas y demás y hacer especial mi estancia en la facultad (David, Alfonso, Guillermo, Marco, Víctor, Iván, Mariana, Mauricio, Rocío)

Este trabajo se desarrolló en el Laboratorio del Dr. Francisco Javier López Muñoz del Departamento de Farmacología del Centro de Investigación de Estudios Avanzados del IPN. 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 y la asesoría de la M. en F. Idalia L. Flores Gómez, profesora adscrita a la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza de la Universidad Nacional Autónoma de México.

TABLA DE CONTENIDO

ÍNDICE DE FIGURAS	i
ÍNDICE DE SIGLAS	ii
1. RESÚMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	3
3. ANTECEDENTES	4
3.1 CÁNCER	4
3.1.1 DEFINICIÓN DE CÁNCER	4
3.1.2 EPIDEMIOLOGÍA DEL CÁNCER EN MÉXICO	6
3.1.3 TIPOS DE CÁNCER MÁS COMÚNES EN MÉXICO	9
a) CÁNCER DE PRÓSTATA	9
b) CÁNCER DE MAMA	9
c) CÁNCER CÉRVICO-UTERINO	10
d) CÁNCER DE PULMÓN	10
e) CÁNCER DE ESTÓMAGO	11
f) MELANOMA.....	11
g) CÁNCER DE HUESO	12
3.2 DOLOR	12
3.2.1 DEFINICIÓN DE DOLOR Y NOCICEPCIÓN	12
3.2.2 NEUROBIOLOGÍA DEL DOLOR	14
3.3 DOLOR ASOCIADO A CÁNCER	16
a) DOLOR NOCICEPTIVO	16
b) DOLOR INFLAMATORIO	16
c) DOLOR CRÓNICO O PATOLÓGICO	17
3.3.1 BIOLOGÍA DEL DOLOR EN CÁNCER	19
3.3.2 INESTABILIDAD MECÁNICA DEL HUESO INDUCIDA POR TUMOR	20
3.3.3 TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO DEL DOLOR EN CÁNCER	22
a) RADIOTERAPIA	25
b) BIFOSFONATOS	26
c) ANALGÉSICOS ANTIINFLAMATORIOS NO ESTEROIDEOS	27
d) OPIODES	29

e) MEZCLAS DE ANALGÉSICOS	31
3.4 EVALUACIÓN DEL DOLOR	31
3.4.1 MODELOS ANIMALES DEL DOLOR	32
3.4.2 CONSIDERACIONES ÉTICAS EN EL ESTUDIO DEL DOLOR EN ANIMALES	34
3.4.3 MODELO MURINO DE DOLOR ASOCIADO A CÁNCER	37
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	40
5. HIPÓTESIS.....	41
6. OBJETIVOS.....	41
6.1 OBJETIVO GENERAL	41
6.2 OBJETIVOS PARTICULARES	41
7. METODOLOGÍA.....	42
7.1 MATERIAL BIOLÓGICO	42
7.2 MODELO DE CÁNCER EN HUESO	43
7.2.1 CONDUCTA NOCICEPTIVA	44
a) SACUDIDA DE LAS EXTREMIDADES	44
b) LAMIDA Y ACICALAMIENTO.....	44
DIAGRAMA DE FLUJO.....	45
8. RESULTADOS	46
a) CONDUCTA DE LAMIDA Y ACICALAMIENTO	46
b) SACUDIDA DE EXTREMIDADES.....	50
9. DISCUSIÓN	54
10. CONCLUSIONES.....	57
11. REFERENCIAS	58
11.1 REFERENCIAS ELECTRÓNICAS	61

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Infografía de la mortalidad por cáncer en México.....	8
Figura 2. Esquema de los procesos que participan en la percepción del dolor ...	15
Figura 3. Factores liberados por células tumorales y del estroma que originan dolor oncológico	22
Figura 4. Destrucción del hueso en un modelo de dolor oncológico óseo en ratón	39
Figura 5. Cursos temporales de lamida y acicalamiento en rata <i>Wistar</i> macho ...	49
Figura 6. Cursos temporales de sacudida de las extremidades en rata <i>Wistar</i> macho	52

ÍNDICE DE SIGLAS

a. C.	antes de Cristo
ASIC3	Canales de iones 3 Sensibles a Ácidos
ATCC	American Type Culture Collection
CINVESTAV	Centro de Investigación y de Estudios Avanzados
COX-1	Enzima Ciclooxygenasa-1
COX-2	Enzima Ciclooxygenasa-2
d. C.	después de Cristo
IASP	International Association for the Study of Pain (siglas en inglés)
IL	Interleucina
INEGI	Instituto Nacional de Estadística y Geografía
OCDE	Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos
OMS	Organización Mundial de la Salud
PGE2	Prostaglandina E2
SNC	Sistema Nervioso Central
SSA	Secretaría de Salud
TRPV1	Receptor Vanilloide 1 de Potencial Transitorio
UICC	Unión Internacional Contra el Cáncer

1. RESUMEN

El presente proyecto incide de manera importante en el área de la Farmacología, se pretende por primera vez en el país implementar un modelo animal de nocicepción (dolor) asociado a cáncer. Este modelo permitirá determinar el efecto antinociceptivo (analgésico) de fármacos con potencial utilidad terapéutica para pacientes que presentan dolor asociado a diferentes neoplasias. Adicionalmente, se podrán investigar los mecanismos moleculares involucrados en el proceso nociceptivo y de los blancos terapéuticos propuestos.

Actualmente, no existe ningún grupo de investigación en México que evalúe alternativas terapéuticas para el dolor asociado a cáncer. Con la implementación de este modelo de nocicepción se iniciará en México una línea de investigación que permita establecer la utilidad terapéutica de fármacos que ya se utilizan en clínica y que se desconoce su eficacia en pacientes oncológicos, así como combinaciones de analgésicos de acuerdo a los lineamientos establecidos por la Organización Mundial de la Salud (OMS) y nuevas alternativas terapéuticas a partir de productos naturales o mediante diseño químico.

El presente proyecto tiene como objetivo establecer de manera preliminar el desarrollo de un modelo experimental de nocicepción en rata (*Wistar macho*) asociado a cáncer de hueso. Para lo cual se inocularon células de glioma C6 (*Rattus norvegicus* ATCC) en el fémur de los animales. Posteriormente, se

evaluaron dos conductas de los animales que caracterizan el proceso nociceptivo, dentro de las cuales se determinó que la lamida, el acicalamiento y sacudida son adecuadas para cuantificar el proceso nociceptivo 33 días después de la inoculación de las células tumorales.

2. INTRODUCCIÓN

En circunstancias fisiológicas el dolor tiene una función protectora para mantener la homeostasis del organismo. Sin embargo, existen patologías en las que el dolor se convierte en un síntoma capital que llega a ser el centro de la enfermedad. Los modelos experimentales en animales han permitido el conocimiento de los mecanismos moleculares que participan en la generación de dolor. Este conocimiento lleva a la generación de fármacos que ayuden a controlar en dolor cuando se ha convertido en una patología.

El cáncer es una enfermedad que va acompañada de dolor, un dolor crónico y persistente, difícil de tratar. Existen pocos modelos experimentales en animales que permitan la evaluación de alternativas terapéuticas para el tratamiento del dolor. En México, no existe ningún grupo de investigación que tenga un modelo experimental de dolor asociado a cáncer. Por lo anterior, nuestro grupo de trabajo está iniciando la implementación de un modelo experimental en rata. El presente trabajo presenta las primeras evaluaciones conductuales por las cuales se genera dolor (nocicepción) asociado a cáncer de hueso en rata.

3. ANTECEDENTES

3.1 CÁNCER

3.1.1 DEFINICIÓN DE CÁNCER

Antes de abordar la definición, cabe destacar que el cáncer parece ser una enfermedad tan antigua como lo es la vida en nuestro planeta. Son testimonio de ello, los tumores encontrados en los huesos de fósiles de dinosaurios o en las momias humanas descubiertas en Egipto y Perú. Su estudio y tratamiento ha sido objeto de gran interés desde épocas remotas en distintas culturas, lo cual ha quedado asentado en documentos llegados hasta nosotros, en los que se describe el avance del conocimiento, y que nos hacen ver el talento y capacidad de observación y deducción de nuestros antepasados.

Documentos que datan de 2000 a 1500 años a.C., como el *Ramayana* de la India o el papiro egipcio Ebers, por ejemplo, hacen referencia a este padecimiento. En tanto que su nombre, *cáncer*, se inspiró en la observación de los tumores de mama, que, al crecer, toman la forma de un cangrejo, según explica Galeno (131-203 d.C.) en su tratado *Definitiones Medicae*. Cuando el microscopio moderno fue inventado en el siglo XIX, se comenzó a estudiar el cáncer y así nació el “estudio patológico moderno de cáncer” (Cortinas, 1997).

El término “cáncer” es genérico y designa un amplio grupo de enfermedades que pueden afectar a cualquier parte del cuerpo. Se define como un crecimiento tisular producido por la proliferación continua de células anormales con capacidad de invasión y destrucción de otros tejidos. Puede originarse a partir de cualquier tipo de célula, en cualquier tejido corporal, no es una enfermedad única; sino un conjunto de enfermedades que se clasifican en función del tejido y de la célula de origen. Existen cientos de formas distintas, siendo tres los principales subtipos (Cortinas, 1997):

- Los sarcomas, que proceden del tejido conectivo como huesos, cartílagos, nervios, vasos sanguíneos, músculos y tejido adiposo.
- Los carcinomas, que proceden de tejidos epiteliales como la piel o los epitelios que tapizan las cavidades y órganos corporales, y de los tejidos glandulares de la mama y de la próstata. Los carcinomas incluyen algunos de los cánceres más frecuentes. Los de estructura similar a la piel se denominan carcinomas de células escamosas. Los que tienen una estructura glandular se denominan adenocarcinomas.
- Las leucemias y los linfomas, que incluyen los cánceres de los tejidos formadores de las células sanguíneas. Producen inflamación de los ganglios linfáticos, invasión del bazo y de la médula ósea, y sobreproducción de células blancas inmaduras.

3.1.2 EPIDEMIOLOGÍA DEL CÁNCER EN MÉXICO

De acuerdo a la Secretaria de Salud, la mortalidad por cáncer se incrementó a 56% en los últimos 30 años. De 1980 a 2011 la tasa de mortalidad paso de 39.5 a 61.7 por cada 100 mil habitantes.

A pesar del incremento de pacientes con esta enfermedad en el país, y que en el caso de las mujeres ocupa la primera causa de muerte entre las jóvenes, México carece de un programa enfocado en el control de esta enfermedad, así como de un registro detallado del número de casos y muertes que se producen cada año.

En el Programa Sectorial de Salud 2013-2018, solo el cáncer mamario y cervicouterino forman parte de los indicadores de desempeño para final del sexenio, con la meta de disminuir de manera importante sus tasas de mortalidad. Y aunque la actual administración no se compromete específicamente a lograrlo, sí reconoce que diferentes especialistas consultados para la elaboración del Programa urgieron a desarrollar una estrategia, crear un registro nacional de casos, promover políticas de detección oportuna de la enfermedad, fortalecer redes de referencia de pacientes a unidades especializadas, así como actualizar las guías de práctica clínica para la atención de esta enfermedad.

En la figura 1 se presenta una infografía con cifras del cáncer en México y a nivel mundial, compartidas por la Secretaría de Salud (SSA), la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la fundación Tómatelo a Pecho. El cáncer es la tercera causa de muerte en el país. Tan sólo en 2012 las autoridades sanitarias tuvieron conocimiento de 148 mil nuevos enfermos, la mayoría de ellos, en etapas muy avanzadas, cuando el tratamiento para combatir su propagación es menos efectivo (<http://ciudadanosenred.com.mx/en-30-anos-muertes-por-cancer-aumentan-50-infografia/>).

El problema es tan grave que basta con observar las cifras de muertes por cáncer en territorio nacional. De acuerdo al registro oficial, anualmente fallecen 120 mil mexicanos por tumores malignos, un promedio de 333 personas mueren cada día (<http://www.sexenio.com.mx/articulo.php?id=43358>).



Figura 1. Infografía de la mortalidad por cáncer en México (<http://www.sexenio.com.mx/articulo.php?id=43358>).

3.1.3 TIPOS DE CÁNCER MÁS COMUNES EN MÉXICO

a) CÁNCER DE PRÓSTATA

Según cifras de *Globocan*, se trata del tipo de cáncer más predominante en el país, teniendo entre sus principales víctimas a las personas de edades avanzadas; tan sólo 19.7% de los afectados tienen más de 80 años de edad y 9.3% se ubican entre los 70 y 74 años.

Entre los principales síntomas de este mal está la interrupción de la orina, el crecimiento de la próstata y las fracturas inexplicables de los huesos, consecuencia de la propagación de las células afectadas a otras regiones del cuerpo (<http://www.sexenio.com.mx/articulo.php?id=43358>).

b) CÁNCER DE MAMA

Es el tipo de cáncer más común en la comunidad femenina del país. De acuerdo al Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI), el 70% de los casos se presenta en mujeres de entre 30 y 59 años de edad.

Los datos oficiales indican que la mortalidad más elevada se registra en féminas mayores de 60 años, con 25.5 fallecimientos por cada cien mil habitantes.

En tanto, el rango de mujeres de entre 30 y 59 años reporta 7 muertes por la misma cantidad de personas (<http://www.sexenio.com.mx/articulo.php?id=43358>).

c) CÁNCER CÉRVICO-UTERINO

En 2008, el 8% de las enfermas fueron atacadas por este tipo de cáncer, teniendo como víctimas principales a la población de entre 45 y 49 años. De todas las que padecen esta clase de tumores, 15.1% tienen un diagnóstico maligno.

Entre los síntomas más comunes se encuentran sangrados poscoitales, así como desprendimientos fuera del periodo menstrual. Además, se pueden presentar dolores durante las relaciones sexuales. Este cáncer está vinculado a la presencia del virus del papiloma humano, por lo que se recomienda la prueba de Papanicolaou anual (<http://www.sexenio.com.mx/articulo.php?id=43358>).

d) CÁNCER DE PULMÓN

Del total de casos de cáncer en México, 7.2% son tumores malignos de pulmón, convirtiéndose en la segunda causa de muerte entre los hombres, únicamente por debajo del cáncer de próstata.

Entre sus principales síntomas destaca la tos persistente, expectoraciones sanguinolentas y, en algunas ocasiones, dolor de pecho (<http://www.sexenio.com.mx/articulo.php?id=43358>).

e) CÁNCER DE ESTÓMAGO

Una enfermedad que afecta a 6.2% de todas las víctimas de cáncer en el país, siendo el mal digestivo que ocasiona mayor número de muertes. Según datos de *Globocan*, 15 personas fallecen por cada cien mil habitantes en adultos de 30 a 59 años.

La sintomatología implica dolores abdominales, diarrea, estreñimiento, sangrados, cambios en el ritmo intestinal y dificultad para ingerir alimentos. La gran problemática radica en que la detección del mal se produce, normalmente, en etapas avanzadas, debido a que los síntomas son difíciles de notar durante los primeros meses (<http://www.sexenio.com.mx/articulo.php?id=43358>).

f) MELANOMA

Es un tipo de cáncer en las células que dan pigmentación a la piel, conocidas como melanocitos. En México, se reportan aproximadamente mil casos anualmente. En el caso de alteraciones malignas, la proliferación del cáncer se presenta de manera vertiginosa, duplicando su incidencia en diez años.

En territorio nacional, el tipo de melanoma más común es el *acral lentiginoso*, generalmente, causando daños a las palmas de las manos, las plantas de los pies y por debajo de las uñas (<http://www.sexenio.com.mx/articulo.php?id=43358>).

g) CÁNCER DE HUESO

El cáncer de hueso se produce en los pacientes con tumores óseos primarios (sarcomas y tumores malignos hematopoyéticos) y con mayor frecuencia en pacientes con otro tipo de cáncer, que ha hecho metástasis en sitios distantes como el de mama, próstata o pulmón. El dolor es el síntoma más frecuente de la destrucción ósea inducida por el cáncer. Las metástasis óseas pueden comprometer significativamente la calidad de vida del paciente debido a que inducen fracturas óseas, hipercalcemia, déficits neurológicos, y el dolor crónico (Luger, 2001).

3.2 DOLOR

3.2.1 DEFINICIÓN DE DOLOR Y NOCICEPCIÓN

Desde hace muchos siglos, el papel del médico ha sido preservar y restaurar la salud, así como aliviar el sufrimiento de los pacientes. Una forma de lograr estos objetivos es con la comprensión satisfactoria del síntoma conocido

como dolor. Al respecto, es necesario diferenciar el concepto de nocicepción, y por otra, el concepto de dolor.

La nocicepción se define como la percepción de señales eléctricas en el sistema nervioso central (SNC), que se originan por la estimulación y activación de receptores sensoriales (nociceptor: es un receptor de dolor, localizado en las terminaciones nerviosas, puede detectar estímulos nociceptivos de carácter térmico, químico o mecánico. La activación de estos receptores depende de la intensidad del estímulo por lo que estímulos inocuos no activaran el receptor y aquellos que sean capaces de pasar cierto umbral generaran un potencial de acción hacia el SNC) y que nos informan acerca del daño en algún tejido. Por otra parte, 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 (López-Muñoz y Granados, 1998).

El dolor es un término que no tiene un significado exacto. La Asociación Internacional para el Estudio del Dolor (IASP, en inglés), lo ha definido como “una experiencia sensorial y emocional desagradable relacionada con daño potencial o real a un tejido o descrito en términos de tal daño” (IASP Part III, 1994). Es decir, el dolor es un estado subjetivo, y como tal, es influido importantemente por varios factores como son las emociones, el medio ambiente, el estado afectivo, la

experiencia previa, factores socio-culturales, acondicionamiento previo, entre otros.

Es importante señalar que el dolor es la experiencia humana más compleja; es la causa más común de estrés psíquico y fisiológico, y el motivo más frecuente para buscar atención médica. Asimismo, es el factor más importante de ausentismo laboral, incapacidad y pensión por invalidez (**Woolf y Salter, 2000**).

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 (**López-Muñoz y Granados, 1998**).

3.2.2 NEUROBIOLOGÍA DEL DOLOR

La nocicepción es un mecanismo electroquímico que comprende cuatro procesos fisiológicos (**ver Figura 2**):

- Transducción. Es la conversión de los estímulos nocivos en señales eléctricas por las terminaciones nerviosas periféricas.
- Transmisión. Es la propagación de las señales eléctricas mediante potenciales de acción a lo largo de las vías nociceptivas, las cuales son fibras nerviosas periféricas que van desde toda la economía hacia la médula espinal. Las fibras nerviosas se caracterizan por estar mielinizadas para poder propagar el estímulo nocivo, a mayor número de mielina mayor conductividad del estímulo.
- Modulación. Es la alteración de las señales nociceptivas dentro del asta dorsal de la médula espinal; aquí se inhibe o amplifica la señal sensorial.
- Percepción. Es el proceso por el cual se integran los impulsos nociceptivos con factores cognoscitivos y emocionales para crear la experiencia subjetiva de dolor.

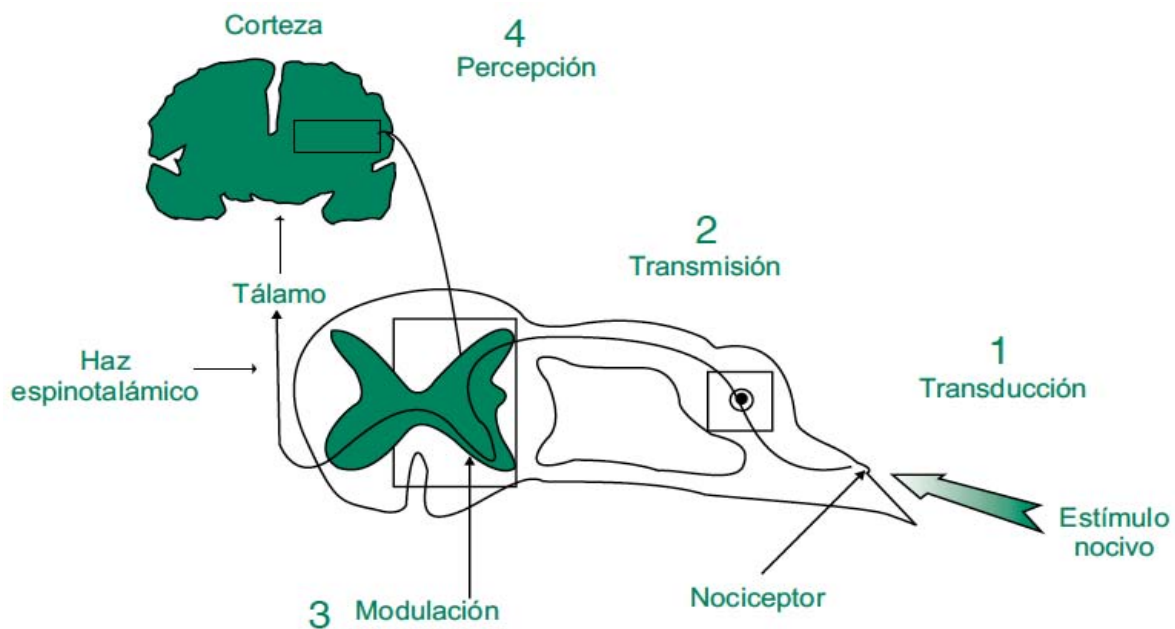


Figura 2. Esquema de los procesos que participan en la percepción del dolor (Woolf y Salter, 2000; Otto, 1999).

3.3 DOLOR ASOCIADO A CÁNCER

Actualmente, se reconocen tres tipos diferentes de dolor que se clasifican de acuerdo a los distintos mecanismos responsables de su presencia (**Basbaum y cols., 2009**).

- a) **Dolor nociceptivo:** se presenta cuando se detectan y procesan los estímulos nocivos (**Woolf y Ma, 2007**). Es el dolor que se percibe al tocar algo demasiado caliente, frío o afilado. Su función de protección exige una acción y atención inmediata, que se produce en virtud de la activación del reflejo de retirada, así como el desagrado de la sensación provocada y la angustia emocional que esto genera (**Basbaum y cols., 2009**).

- b) **Dolor inflamatorio:** este dolor también desempeña un papel adaptativo y protector. El aumento en la sensibilidad sensorial después del daño en los tejidos es inevitable. El dolor inflamatorio contribuye a la sanación de la parte lesionada mediante una situación que limita el contacto físico y el movimiento de la zona afectada. Esto es, la hipersensibilidad del dolor reduce el riesgo adicional de daño y promueve la recuperación, por ejemplo, después de una herida quirúrgica o en una articulación inflamada, donde los estímulos normalmente inocuos ahora generan dolor. El dolor

inflamatorio se caracteriza por la activación del sistema inmune (Woolf y Ma., 2007).

c) Dolor crónico o patológico: se presenta como resultado de un funcionamiento anormal del sistema nervioso. Este dolor se puede generar después de una lesión al sistema nervioso (dolor neuropático), o bien, en condiciones en las que no hay tal daño (dolor disfuncional), pero al igual que el anterior se presenta una amplificación de las señales sensoriales en el sistema nervioso central y una disminución del umbral nociceptivo (Costigan y cols., 2009). El dolor crónico se asocia con enfermedades como la fibromialgia, síndrome del intestino irritable, migraña, artritis, herpes zoster, neuropatía diabética, síndrome de la articulación temporomandibular y cáncer (Basbaum y cols., 2009).

Los pacientes con cáncer presentan dolor en todas las etapas de la enfermedad, este dolor va en incremento gradual a medida que avanza la enfermedad y cuando los pacientes desarrollan metástasis el dolor es insoportable. Se ha demostrado que el principal sitio de metástasis de pacientes con cáncer de mama, próstata, tiroides, colon y pulmón es el hueso (Coleman y Rubens, 1987).

El dolor óseo asociado a neoplasias se percibe como un dolor constante y continuo que poco a poco va incrementando en intensidad hasta hacerse

insoportable. A medida que el paciente va avanzando en la enfermedad el dolor es “episódico” e “incidente” y se caracteriza por la percepción de una mezcla de todos los tipos de dolor, nociceptivo (IASP Part III, 1994; Mercadante, 1997). Esta es la razón por la que la terapia tradicional para cada tipo de dolor no tiene eficacia en el paciente con cáncer ya que está presentando una mezcla de estímulos nocivos. Por otra parte, desafortunadamente, el movimiento del paciente o el uso de alguna extremidad en donde se presenta el tumor están asociados a la percepción del dolor (Portenoy et al., 1999).

El dolor proviene del hueso del paciente, la proliferación e hipertrofia de osteoclastos está presente. Los osteoclastos pueden reabsorber el hueso en la interfase osteoclasto/hueso ocasionando fractura del hueso en los pacientes con metástasis, incrementándose consecuentemente la percepción del dolor (Mercadante, 1997).

El dolor asociado a cáncer se presenta como un dolor crónico que de acuerdo a la IASP se define como un dolor que persiste más allá de la fase normal de curación después de una lesión (Woolf, 2010). Un estado crónico de dolor se debe a cambios neuroplásticos que modifican el procesamiento de las señales nociceptivas. Estos cambios ocurren tanto en las terminales periféricas de las fibras sensoriales (sensibilización periférica), como en la médula espinal y centros supraespinales (sensibilización central), alterando así el procesamiento de la información sensorial. Bajo estas circunstancias el dolor se presenta de manera

espontánea, generado por alodinia e hiperalgesia primaria y secundaria (Woolf, 2010).

3.3.1 BIOLOGÍA DEL DOLOR EN CÁNCER

Estudios en la última década demostraron que una subpoblación de neuronas sensoriales que detectan los estímulos nocivos expresan el receptor vanilloide1 de potencial transitorio (TRPV1) y los canales de iones 3 sensibles a ácidos (ASIC3). Estos estudios fueron de gran interés para los investigadores que estudian el dolor en cáncer, ya que ambos canales responden a la acidosis producida de manera directa e indirecta por las células cancerosas, que en general tienen un pH menor que las células normales (Ghilardi et al., 2005).

Es importante destacar que muchos tumores que producen metástasis en los huesos también inducen una marcada proliferación e hipertrofia de osteoclastos. Los osteoclastos reabsorben rápidamente hueso por la generación de un pH de 2-4 en la interfase osteoclasto/ hueso que conduce a la reabsorción ósea excesiva, que puede conducir a la fractura del hueso donde se encuentra el tumor (Ghilardi et al., 2005).

Como se mencionó anteriormente, el hueso es el sitio más común de metástasis de carcinomas de próstata, renales, pulmonares, mamarios y tiroideos. Una vez que las células tumorales han hecho metástasis en el sistema óseo, se

inicia el crecimiento del tumor, destrucción ósea y/o formación de tejido óseo (tumores osteoblásticos); todo esto puede resultar en la presencia de dolor severo, fracturas e hipercalcemia (Scholz y Woolf 2002).

Las células tumorales no destruyen directamente el hueso, sino que junto con las células del estroma sintetizan y liberan el ligando RANK (receptor activador del factor nuclear KB-L; por sus siglas en inglés). Este ligando se une a su receptor RANK, que se encuentra en la membrana de los osteoclastos. La activación de la vía RANK-L/RANK promueve la proliferación e hipertrofia de los osteoclastos, destruyendo, de esta manera, el hueso. El proceso de reabsorción está asociado a una acidosis que puede estimular los canales TRPV1 o ASIC y generar el dolor oncológico óseo. En la década pasada varios estudios mostraron que las terapias que reducen significativamente la función de los osteoclastos también reducen de manera significativa el dolor oncológico óseo (Scholz y Woolf 2002; Honore et al., 2000).

3.3.2. INESTABILIDAD MECÁNICA DEL HUESO INDUCIDA POR TUMOR

Además de la acidosis, el exceso de la reabsorción por los osteoclastos que destruyen el hueso origina una inestabilidad mecánica y fractura, que ocasiona distorsión mecánica de las fibras nerviosas que inervan el hueso. De esta manera, tras el debilitamiento o fractura debido al remodelado del hueso por el crecimiento

tumoral, puede presentarse un tipo de dolor generado por el movimiento, presumiblemente, debido a la distorsión mecánica de las fibras nerviosas mecanosensitivas que inervan el hueso. Es evidente que el dolor asociado a la fractura se atenúa si se estabiliza el hueso y se reubica en su orientación normal. Los tumores osteolíticos y osteoblásticos inducen pérdida de la resistencia mecánica y la estabilidad del hueso mineralizado, de modo que, con la remodelación ósea, la tensión mecánica normalmente inocua ahora puede resultar en la distorsión o activación de las fibras nerviosas mecanosensitivas que inervan el hueso. Los bifosfonatos y las terapias anti-RANK-L (denosumab), reducen el remodelado óseo inducido por los osteoclastos, disminuyen la acidosis en animales y humanos, así como también promueven la resistencia mecánica de los huesos y reducen las fracturas (Jiménez-Andrade et al., 2010).

En la figura 3 se muestran los factores liberados por células tumorales y del estroma que originan dolor oncológico. El tumor se compone no solo de células cancerosas sino también de células del estroma asociadas a los tumores e incluyen a las células endoteliales, fibroblastos, así como una amplia variedad de células inflamatorias e inmunes. Las células cancerosas y las del estroma secretan una amplia variedad de factores, como la bradicinina, cannabinoides, citocinas, endotelinas (ET), el factor estimulante de colonias de macrófagos y el NGF, quienes sensibilizan o activan directamente las fibras nerviosas sensoriales (Jiménez-Andrade et al., 2010).

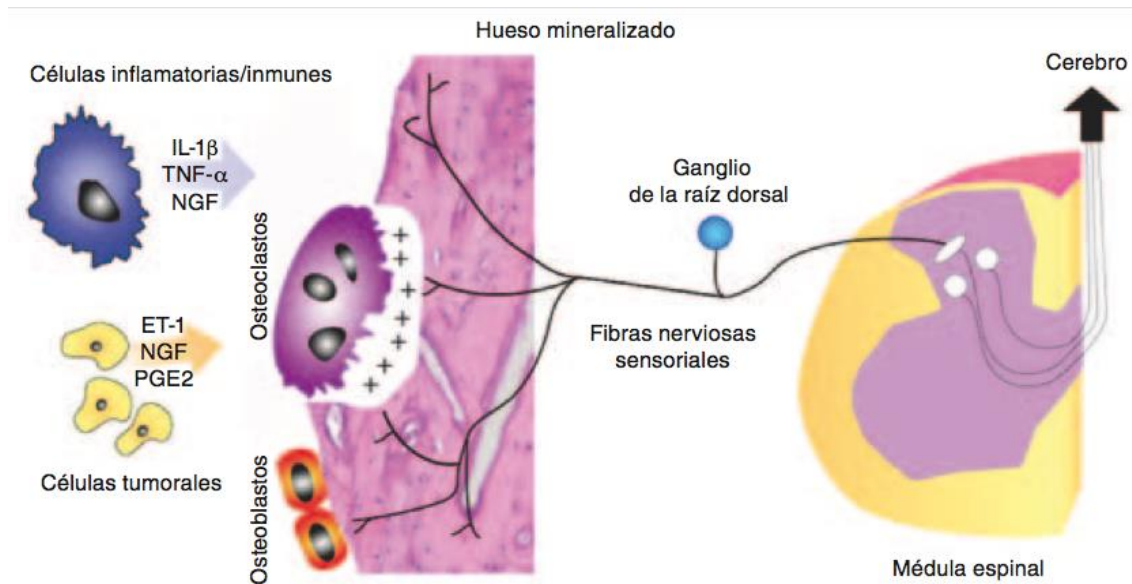


Figura 3. Factores liberados por células tumorales y del estroma que originan dolor oncológico. IL: interleucina; TNF: factor de necrosis tumoral; PGE2: prostaglandina E2 (**Jiménez-Andrade et al., 2010**).

3.3.3. TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO DEL DOLOR EN CÁNCER

La variabilidad significativa de paciente a paciente en la gravedad y la extensión del dolor por cáncer de hueso, presenta dos componentes principales; un dolor sordo o punzante en su carácter, que suele ser constante y aumenta en intensidad con el tiempo, con frecuencia es la primera indicación de la metástasis del tumor a un hueso. Un segundo componente, surge con frecuencia con el tiempo y es más agudo por naturaleza, se trata de un dolor incidente, ya que a menudo se produce espontáneamente, con exacerbaciones intermitentes. Este dolor se conoce como irruptivo y es uno de los dolores de cáncer más difíciles de tratar (**Luger, 2001**). El paciente debe comenzar por saber cuál es el origen y la causa de su dolor (<http://whqlibdoc.who.int/publications/9241544821.pdf>).

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 (**López-Muñoz y Granados, 1998**).

Los osteoclastos, son las células de resorción ósea principal del cuerpo, estos participan en la destrucción ósea inducida por el cáncer. Recientemente se ha sugerido que el dolor óseo inducido por el cáncer puede estar relacionado con la resorción ósea, se sabe muy poco sobre el mecanismo(s) exacto que participa en la generación y mantenimiento del dolor por cáncer de hueso. Se ha sugerido que los mecanismos que generan el dolor por cáncer de hueso pueden ser más complejos e implican la liberación de compuestos pronociceptivos del tumor y las células inflamatorias, la compresión de los nervios, y la actividad de los osteoclastos (**Luger, 2001**). En la actualidad, los resultados del tratamiento del dolor por cáncer de hueso puede ser impredecible, y las mejoras pueden ser temporales (**Globirsch et al., 2005**).

Actualmente, el tratamiento del dolor producido por el cáncer de hueso implica el uso de una variedad de enfoques diferentes pero complementarios que incluyen la radioterapia, los analgésicos opioides y antiinflamatorios no esteroideos (AINE's), los bifosfonatos y la cirugía. Una de las principales razones por la que es difícil controlar el dolor producido por el cáncer es que las metástasis óseas no se limitan a un solo sitio generalmente, pero a menudo están presentes en varios sitios, incluyendo los huesos largos, la pelvis y vértebras de la columna. Aunque la radioterapia sigue siendo la piedra angular para el tratamiento del dolor por cáncer de hueso, es más eficaz para el tratamiento sintomático del dolor óseo local. Cuando las células tumorales han metastatizado a múltiples huesos del cuerpo, la radioterapia regional puede ser utilizada. Sin embargo, este tratamiento se acompaña de efectos secundarios significativos, tales como vómitos, diarrea, depresión de la médula ósea severa, y neumonitis aguda secundaria a daño alveolar de células. Analgésicos tales como AINE's y los opiáceos también son eficaces en el tratamiento del dolor por cáncer de huesos, pero el aumento de dosis suele ser necesario a medida que avanza el cáncer. Además, el control completo de avance o movimiento de dolor evocado puede ser problemático porque las dosis requeridas para controlar totalmente este dolor son generalmente altas y van acompañadas de efectos secundarios adversos tales como deterioro cognitivo, sedación y estreñimiento, por lo que se recurre al empleo de mezclas analgésicas (Luger, 2001).

a) RADIOTERAPIA

La Radioterapia de haz externo es el tratamiento más común para el dolor por cáncer óseo avanzado. Desafortunadamente, no todos los pacientes que reciben la radioterapia paliativa experimentan alivio al dolor. En una reciente revisión de ensayos clínicos se encontró que el empleo de la radioterapia paliativa de alta frecuencia ocasiona recaída de los síntomas después de la respuesta inicial a la radiación. Específicamente, el estudio determinó que la duración mediana de la supervivencia fue mucho mayor que la mediana de la duración de alivio del dolor. A nivel preclínico en perros con cáncer de hueso de la extremidad, se determinó que la radiación en general, disminuyó la cojera, pero no todos los animales se beneficiaron de la radioterapia paliativa local. Además, el tratamiento de los seres humanos y caninos con dolor por cáncer de hueso a menudo proporciona un alivio solamente parcial (Globirsch et al., 2005).

La radioterapia para el cáncer de hueso ha tratado de explotar las características radiosensibles inherentes a las células tumorales (es decir, las altas tasas de proliferación, vascularización significativa, no diferenciación), pero el mecanismo por el cual la radioterapia alivia el dolor por cáncer de hueso es especulativo. Nuestro conocimiento es limitado sobre el mecanismo por el cual la radiación disminuye el dolor por cáncer de hueso, se erige como un obstáculo importante para la mejora de la magnitud y la duración del alivio del dolor después de la radioterapia. Recientemente se ha descrito un modelo experimental para el

estudio de la influencia de la radiación en el dolor por cáncer de hueso y demostrado que la radiación disminuyó la osteólisis inducida por el cáncer de hueso y reducción de área del tumor en el hueso (Globirsch et al., 2005). El mecanismo por el cual la radiación alcanza estas influencias es desconocido. Específicamente, no se sabe si la radiación ejerce su efecto anti-tumoral actuando directamente sobre las células tumorales o indirectamente a través de las células no cancerosas (Globirsch et al., 2005).

b) BIFOSFONATOS

Una de las terapias más ampliamente utilizadas son los bifosfonatos. Este grupo de fármacos fácilmente se adhieren al hueso. Una vez internalizado el bifosfonato en el osteoclasto, este interfiere con el metabolismo energético del adenosina trifosfato (bifosfonatos que no contienen nitrógeno) o con la vía del mevalonato (bifosfonatos que contienen nitrógeno), resultando en la disfunción y, consecuentemente, en la apoptosis de los osteoclastos. Como una población de fibras nerviosas que inervan el hueso expresan TRPV1, una vía en la cual los bifosfonatos podrían reducir el dolor óseo es por la disminución de la acidosis inducida por osteoclastos, que, a su vez, disminuye la activación de los receptores TRPV1 o ASIC3 que se expresan en la fibras nerviosas sensoriales (Scholz y Woolf, 2002).

Otro método que es altamente eficaz para la disminución de la reabsorción del hueso inducida por tumores en animales y humanos es por el bloqueo de la unión del RANK-L a su receptor, que se requiere para la proliferación y maduración de los osteoclastos. Estudios previos demostraron que en la administración de fármacos que interfieren en la unión del RANK-L al receptor RANK (p.ej. osteoprotegerina o denosumab) hay una pérdida casi total de los osteoclastos activados, una amplia reducción en los marcadores plasmáticos de la reabsorción ósea y una significativa reducción del dolor oncológico óseo. Cabe señalar que recientes ensayos clínicos fase III han demostrado que el denosumab disminuye de manera significativa las complicaciones del sistema óseo en pacientes con cáncer de mama y próstata en estados avanzados (Montiel-Ruiz, et al., 2013).

c) ANALGÉSICOS ANTIINFLAMATORIOS NO ESTEROIDEOS (AINE's)

Los AINE's (tipo aspirina y/o ácido acetil salicílico) son agentes 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.

Los analgésicos tipo aspirina son compuestos con una diversidad química muy grande, en la que el ácido acetil salicílico (aspirina) es el agente prototipo con el que todos los otros compuestos de la familia son comparados en cuanto a eficacia antiinflamatoria y analgésica (acetaminofeno, indometacina, diclofenaco, ibuprofeno, ketorolaco y dipirona). Los principales efectos adversos de estos fármacos son 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 compuesto 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 (López-Muñoz y Granados, 1998).

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. Con el descubrimiento de dos 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 (López-Muñoz y Granados, 1998).

El uso clínico de los antiinflamatorios no esteroides en la quimioprevención y tratamiento del cáncer es limitado porque todavía permanecen numerosos interrogantes sin respuesta definitiva. El debate incluye la elección del fármaco y la dosis, junto con la duración del tratamiento y el mecanismo de acción (Guadagni et al., 2007).

d) OPIOIDES

Los fármacos opioides, cuyo prototipo es la morfina, son sustancias de origen natural o sintético que producen efectos similares a los que produce la morfina. La morfina es el principal y mayor compuesto analgésico contenido en la goma de opio obtenida de la amapola y es el agente prototipo de comparación de los analgésicos.

Los opioides producen hiperpolarización de las células nerviosas e inhibición presináptica de liberación de neurotransmisores excitadores. Esta acción farmacológica la realizan mediante la interacción con receptores opioides específicos que se encuentran en la membrana de las neuronas sensoriales a nivel del sistema nervioso central y periférico. Esta interacción simula la acción de

neurotransmisores que activan vías inhibitorias endógenas, como por ejemplo las endorfinas.

Los receptores opioides también se encuentran en otros sitios, como el tracto gastrointestinal. En términos generales el efecto de los opioides se produce por la interacción del analgésico con tres familias de receptores: (μ), (δ) y (κ), cada uno de los cuales exhibe diferentes especificidades de unión por los fármacos. Los receptores opioides están presentes en alta densidad en varias áreas del sistema nervioso central que se sabe están involucradas en el procesamiento integrativo del dolor: corteza cerebral, sistema límbico, hipotálamo, tálamo medio, médula espinal y más recientemente en tejidos periféricos inflamados (López-Muñoz y Granados, 1998).

Además de su efecto terapéutico útil para aliviar el dolor de moderado a severo, se sabe que los opioides pueden generar efectos adversos a dosis muy cercanas a las dosis terapéuticas o cuando se dan tratamientos crónicos. Los efectos adversos más comunes son depresión respiratoria, miosis, vómito, urticaria y constipación. En tratamiento crónico existe la posibilidad de generar dependencia y tolerancia analgésica. Aun así es necesario valorar adecuadamente el brindar alivio al paciente y alejarle del sufrimiento del dolor intenso a pesar de los efectos adversos posibles o buscar otras alternativas que le eviten un sufrimiento innecesario (López-Muñoz y Granados, 1998).

e) 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 y a que algunas interacciones de fármacos han resultado peligrosas. En el caso particular de los analgésicos, los diferentes grupos de fármacos actúan en diferentes sitios y por diferentes mecanismos de acción, por lo que la administración combinada de analgésicos con diferente mecanismo de acción en dosis adecuadas puede ser un camino para obtener una buena eficacia analgésica con un mínimo de efectos adversos (López-Muñoz y Granados, 1998).

3.4. EVALUACIÓN DEL DOLOR

El estudio del dolor se inicia desde la antigüedad. Aristóteles lo definió como un estado de “sufrimiento del alma”. Por otro lado, la teoría del dolor que heredamos en el siglo XX fue propuesta por Descartes hace tres siglos, quien planteó que el organismo trabaja como una máquina que puede ser estudiada con métodos experimentales, así como la existencia de fibras que transmiten la información sensorial al cerebro de manera directa. El impacto de esta teoría fue enorme. La historia de los experimentos de anatomía y fisiología del dolor realizado durante la primera mitad del siglo XX estuvo dirigida hacia la búsqueda de fibras específicas para el dolor y de un centro de dolor en el cerebro.

La palabra inglesa “pain” (dolor) deriva del latín “poene” y del griego “poine”, que significa pena, castigo o suplicio. La Asociación Internacional para el estudio del Dolor (International Association for the Study of Pain, IASP), define el dolor como una sensación desagradable que implica la abstracción y la experiencia previa, por lo que resulta de naturaleza típicamente subjetiva. Por tal motivo, existen varios factores que pueden influir sobre tal sensación, como son el estado de ánimo, el sexo, la edad, el medio ambiente, entre otros factores (Weiss, 2001). Por lo que se ha recurrido al empleo de animales de experimentación para evaluar la respuesta nociceptiva excluyendo los factores que vuelven a esta experiencia subjetiva.

3.4.1. MODELOS ANIMALES DE DOLOR

La investigación básica en el área de dolor es de gran utilidad para generar información en lo referente al conocimiento del sistema nociceptivo tanto en su situación fisiológica como en diferentes situaciones patológicas. En gran medida, estos avances se producen como consecuencia de la utilización de los modelos animales de dolor. A este respecto, es importante considerar que el dolor se describe en humanos como una sensación compleja. En la actualidad, no se conocen las sensaciones de un animal, ya que obviamente no nos las puede comunicar, sólo podremos estudiar las reacciones de éstos ante estímulos nocivos de muy diversa naturaleza. Es por ello que Zimmerman adaptó la definición de dolor de la Asociación Internacional para el Estudio del Dolor (IASP) para que

podiera ser aplicada a los animales. Así, el dolor en animales se refiere a “una experiencia sensorial aversiva causada por una lesión real o potencial que produce reacciones motoras y vegetativas progresivas, se desencadena una respuesta conductual de retiro al estímulo nocivo que es específico para cada especie” (Ortega et al., 2002).

A partir de esta definición los modelos experimentales en animales son imprescindibles para evaluar el proceso nociceptivo involucrado en el dolor. En este sentido, un modelo de dolor es el procedimiento por el cual se valora la reacción de un animal ante un estímulo nocivo de naturaleza variada o situación patológica inducida que puede ser utilizado en circunstancias fisiológicas o patológicas. A pesar de ello, es necesario tener una visión crítica de los mismos ya que en el animal valoramos fundamentalmente la dimensión somática de la respuesta nociceptiva ante un estímulo nocivo mientras que no podemos valorar la dimensión afectiva inherente al dolor en el ser humano y probablemente en los animales. Conociendo sus ventajas y sus inconvenientes se logra una mejor interpretación de los resultados obtenidos. Por otra parte, no podemos dejar de lado los aspectos éticos de la investigación con modelos de dolor en animales (Ortega et al., 2002).

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, electricidad,

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 antinocicepción “analgésia”, 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 (López-Muñoz y Granados, 1998).

3.4.2. CONSIDERACIONES ÉTICAS EN EL ESTUDIO DEL DOLOR EN ANIMALES

La investigación en dolor es necesaria, debido a que se requiere conocer nuevos aspectos clínicamente relevantes de los mecanismos de la nocicepción o de nuevos tratamientos farmacológicos. Ésta debe realizarse siguiendo las líneas que marca el Comité para la Investigación y la Ética de la IASP en lo concerniente a los aspectos éticos de los experimentos que implican dolor o sufrimiento a los animales. Por ello, las investigaciones con modelos de dolor deben tener una adecuada planificación con la intención de minimizar al máximo el sufrimiento del animal, ya que el animal no es un objeto para explotar sino un ser vivo (Ortega et al., 2002).

Al realizar experimentos en animales conscientes habrá que utilizar los estímulos menos nocivos y las desviaciones del comportamiento normal de los

animales deben ser evaluadas y comunicadas en los manuscritos. A la hora de utilizar los modelos de dolor hay que asegurarse de que los animales son expuestos al mínimo dolor necesario para alcanzar los objetivos del experimento y que la duración del experimento sea lo más corta posible así como que el número de animales utilizados sea el mínimo posible. Además, el investigador debe estar convencido de que la justificación en que basa la realización de sus experimentos es ética.

La creación de Comités Éticos para la Experimentación de animales tiene como finalidad revisar que los protocolos experimentales cumplan con las normas oficiales para el adecuado uso de animales y garantizar que los resultados que se obtengan realmente tengan una utilidad terapéutica, además de valorar los posibles beneficios que pueden producir (Ortega et al., 2002). Desafortunadamente, los diferentes antecedentes culturales, el nivel de educación y las restricciones económicas, hacen que el enfoque del uso de animales en la investigación biomédica sea distinto en cada país, y por consiguiente, que no en todas partes existan mecanismos formales de reglamentación y legislación al respecto (Vanda-Cantón, 2003).

Los códigos internacionales vigentes para la experimentación en seres humanos, como son los de Helsinki I y II y las normas del Consejo de Organizaciones Internacionales de Ciencias Médicas y la Organización Mundial de la Salud, reconocen que los experimentos con seres humanos deben estar sujetos

a estrictas regulaciones en materia de ética y en el caso de los animales debe existir la misma responsabilidad. Las consideraciones éticas son tan importantes para los humanos como para los vertebrados no humanos, por tanto, la experimentación en animales también requiere de códigos sustentados en ciertos principios que la comunidad científica debe aceptar (Vanda-Cantón, 2003).

Entre los principales códigos bioéticos vigentes para este objetivo en México, se tienen los siguientes:

- Guía del Consejo Internacional de Organizaciones de Ciencias Médicas para la investigación biomédica que involucre animales.
- Guías para el cuidado y uso de los animales de laboratorio, de los Institutos Nacionales de Salud de Estados Unidos de Norteamérica.
- Reglamento en materia de investigación para la salud, contenido en la Ley General de Salud de los Estados Unidos Mexicanos, Título séptimo, artículos 121 al 126.
- Norma oficial mexicana (NOM-062-ZOO- 1999), sobre las especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de los laboratorios.
- Guía para el cuidado y uso de los animales de laboratorio.
- Declaración Mexicana y principios básicos de la experimentación en animales (Comisión Nacional de Bioética).

En estos códigos y guías se contemplan las condiciones en las que los animales deben ser adquiridos y trasladados. Los requerimientos mínimos indispensables con que deben cumplir los bioterios y demás instalaciones donde serán alojados, así como el espacio mínimo y alimento con que deben contar, según su especie (Vanda-Cantón, 2003).

3.4.3. MODELO MURINO DE DOLOR ASOCIADO A CANCER

Dado que muchos tipos de cáncer pueden causar dolor, el empleo de células tumorales para generar cáncer puede provenir de diversos tipos de cáncer humano, ya sea de mama, próstata o sarcoma entre otros. El objetivo es generar un tumor en animales y que genere una conducta nociceptiva. Esto permitirá que además de investigarse los mecanismos moleculares que participan en el dolor se puedan evaluar terapias que puedan tener una utilidad en humanos. Debido a que se ha establecido que el 2% de los pacientes en el momento del diagnóstico inicial de cáncer de mama y en 30% de los pacientes con cáncer de mama recurrente presentan destrucción de hueso (Luger, 2001). El desarrollo de un modelo murino de nocicepción por cáncer de hueso es adecuado para evaluar el proceso nociceptivo que se asemeja a los humanos.

En 1999 se desarrolló el primer modelo experimental de dolor oncológico óseo en ratones. El modelo se ha utilizado en diferentes laboratorios del mundo para determinar los mecanismos que generan y mantienen el dolor oncológico

óseo. Las primeras líneas de células tumorales que se estudiaron con este modelo experimental fueron las células 2472 de osteosarcoma de ratón que fueron inoculadas y depositadas en el espacio intramedular del fémur de ratón (Figura 4A) (Honore et al., 2000; Sabino y Mantyh, 2005). Estas células tumorales crecen rápidamente y reemplazan a las células hematopoyéticas en la médula ósea. Semanas después de la inoculación, todo el espacio de la médula es ocupado por las células tumorales y células estromales, inflamatorias e inmunes. En términos de la remodelación ósea, la inoculación de células de osteosarcoma al fémur induce la proliferación e hipertrofia de los osteoclastos en la interfase del tumor en el hueso, con una significativa destrucción ósea en la epífisis proximal y distal del fémur (ver Figura 4B) (Schwei et al., 1999). En el modelo de osteosarcoma, las conductas nociceptivas incrementan significativamente con el tiempo y se correlacionan con el crecimiento del tumor y la destrucción del hueso, lo cual es semejante a lo que ocurre en pacientes con cáncer óseo primario o metastásico de tipo osteolítico (ver Figuras 4C y D)(Mantyh et al., 2010). Mientras las células de osteosarcoma constituyeron la primera línea de células tumorales utilizada, otros modelos de dolor oncológico óseo se han desarrollado con líneas de células tumorales de próstata, glándula mamaria, piel y colon. Estos modelos han proporcionado información sobre las similitudes y diferencias que originan el dolor óseo debido al crecimiento de diferentes tipos de tumores (Schwei et al., 1999; Honore et al., 2000; Halvorson et al., 2008; Lozano-Ondoua et al., 2009; Mantyh et al., 2010).

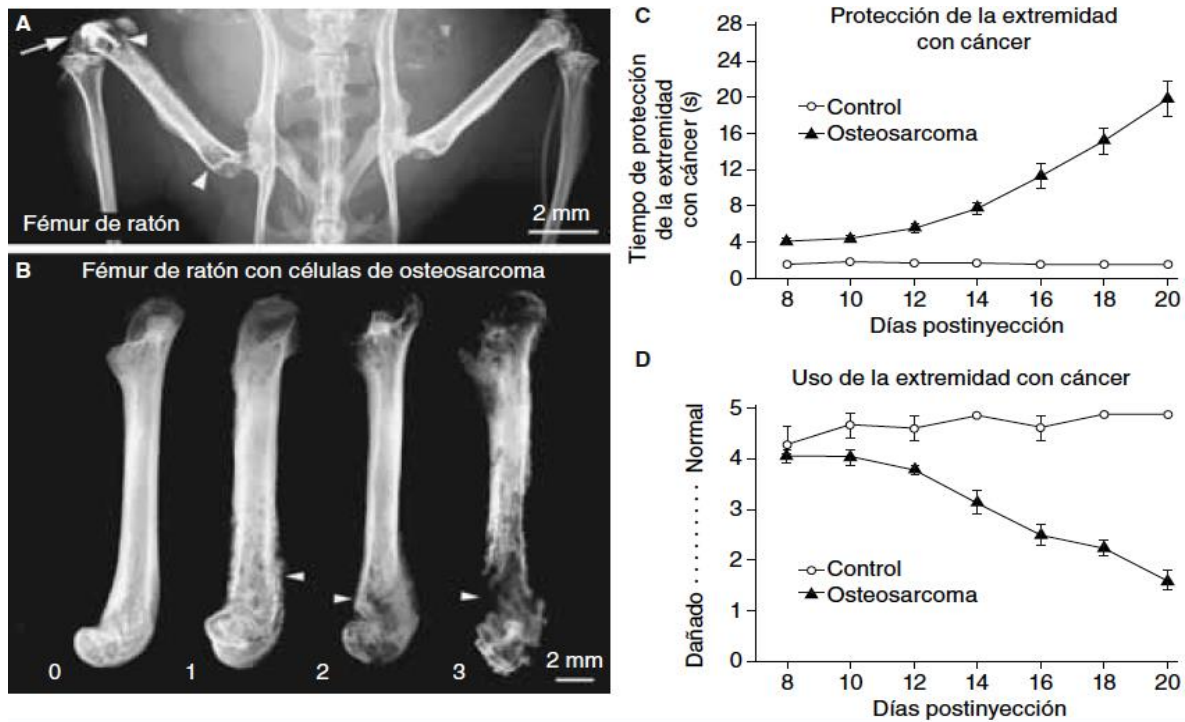


Figura 4. Destrucción del hueso en un modelo de dolor oncológico óseo en ratón. Radiografía de baja resolución de la pelvis y patas traseras del ratón después de la inyección de células tumorales y cierre del sitio de inyección con una amalgama dental (flecha en A). Las puntas de las flechas indican las áreas de destrucción ósea (A). Radiografías del fémur de ratón que muestran la pérdida progresiva del hueso mineralizado causada por el crecimiento del tumor (B) durante 3 semanas. En la semana 1, hay una pérdida menor del hueso alrededor de la epífisis distal; en la semana 2, hay una pérdida sustancial del hueso mineralizado, tanto en la epífisis proximal como distal, y en la semana 3, se observa una pérdida de hueso mineralizado a lo largo de todo el fémur y una fractura en la epífisis distal (puntas de flecha). Las conductas nociceptivas incrementan significativamente con el tiempo y se correlacionan con el crecimiento del tumor y la destrucción del hueso, lo cual es semejante a lo que ocurre en pacientes con cáncer óseo. Los animales con dolor oncológico muestran mayor tiempo de protección (C) y disminución del uso (D) de la pata inyectada. (Honore, et al., 2013; Schwei, et al., 1999; Mantyh, et al., 2010).

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El cáncer es la principal causa de muerte a escala mundial. Se le atribuyen 8,2 millones de defunciones ocurridas en todo el mundo en 2012. Los principales tipos de cáncer son los siguientes: pulmonar (1,59 millones de defunciones); hepático (745 000 defunciones); gástrico (723 000 defunciones); colorrectal (694 000 defunciones); mamario (521 000 defunciones) y cáncer de esófago (400 000 defunciones).

Un paciente con cáncer cursa por un dolor intenso y este se va incrementando a medida que progresa la patología. Desafortunadamente, cuando el paciente presenta metástasis el dolor es insoportable. Actualmente no existe un tratamiento adecuado que pueda controlar el dolor, el uso de opioides es restringido y muy pocos pacientes que tienen cáncer tienen acceso a este fármaco. A nivel preclínico se han desarrollado modelos experimentales de dolor en animales. Sin embargo, en nuestro país no se ha implementado ninguno de éstos en donde se puedan evaluar alternativas terapéuticas para el tratamiento del dolor.

El presente trabajo tiene como finalidad implementar un modelo animal en el que se puedan evaluar alternativas terapéuticas de origen sintético y/o natural que puedan ser de utilidad en dolor asociado a cáncer.

5. HIPÓTESIS

La inoculación de células de glioma en el fémur de rata genera conductas nociceptivas (sacudida de pata, lamida y acicalamiento) que son cuantificables.

6. OBJETIVOS

6.1. OBJETIVO GENERAL

Implementar un modelo de nocicepción experimental asociado a cáncer de hueso en rata.

6.2. OBJETIVOS PARTICULARES

- Realizar una artrotomía en rata *Wistar* para la inoculación de células cancerosas de glioma*.
- Realizar un curso temporal de las conductas nociceptivas (lamida y acicalamiento, sacudida ipsilateral y sacudida contralateral) generada en ratas inoculadas con diferente número de células de cáncer de glioma (50 000, 100 000, 300 000 y 600 000) en fémur.
- Establecer las conductas nociceptivas más adecuadas y el número celular más adecuado que permitan evaluar tratamientos farmacológicos de utilidad en el dolor asociado a cáncer.

7. METODOLOGÍA

7.1. MATERIAL BIOLÓGICO

1.- Células de glioma C6 de origen *Rattus Novergicus* ATCC. Proporcionadas por la Dra. Patricia García López del Instituto Nacional de Cancerología.

2.- Los experimentos se realizaron en ratas *Wistar* (animales proporcionados por el Departamento de Farmacobiología del CINVESTAV-Sur), que tenían aproximadamente 4-5 semanas de edad con un peso de 80-90 g en el momento de la inoculación de células tumorales. Todos los experimentos fueron realizados siguiendo las recomendaciones de la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 sobre las especificaciones técnicas para la producción cuidado y uso de los animales de laboratorio. El empleo de animales fue evaluado por el Comité de Ética de la Escuela Superior de Medicina del Instituto Politécnico Nacional con el número de proyecto autorizado: CICUAL-03/19-11-2013-2015 “Búsqueda de alternativas terapéuticas para el tratamiento del dolor”. Los animales fueron resguardados antes del experimento bajo condiciones controladas de temperatura y ciclos de luz y oscuridad de 12h cada uno. Al término de los experimentos los animales fueron sacrificados.

7.2. MODELO DE CÁNCER DE HUESO

A un grupo de 18 ratas se le realizó una artrotomía después de la administración intraperitoneal de la anestesia general con ketamina (50 mg/kg, i.p.) y xilacina (12 mg/kg, i.p.). Para ello se realizó una pequeña incisión en la piel para descubrir el cuádriceps femoral, se hizo una limpieza del músculo para evitar el daño en el mismo, con el objetivo de llegar a los cóndilos. Se hizo una perforación con una broca de 0.5 mm de diámetro, muy cerca de la fosa intercondiloide, para crear una vía para las células.

Posteriormente se procedió a la inoculación de las células de glioma C6 a grupos de 3 ratas por número celular (50 000, 300 000 y 600 000 células en un volumen de 50 µl), solo en el número celular de 100 000 se administró a un grupo de 6 ratas. El sitio de la inoculación se selló con un tapón de cera de hueso para confinar las células dentro del canal intramedular, seguido por el riego con agua estéril (solución hipotónica). Por último, se suturó el músculo con hilo absorbible y la piel con hilo de seda. Un grupo de 3 ratas sirvió de control, se consideró control a aquella rata a la cual se le realizó el proceso de cirugía sin administración de células, solo se inyectó solución salina y sirvió para verificar que la conducta del animal no se modificara por la manipulación quirúrgica.

7.2.1. CONDUCTA NOCICEPTIVA

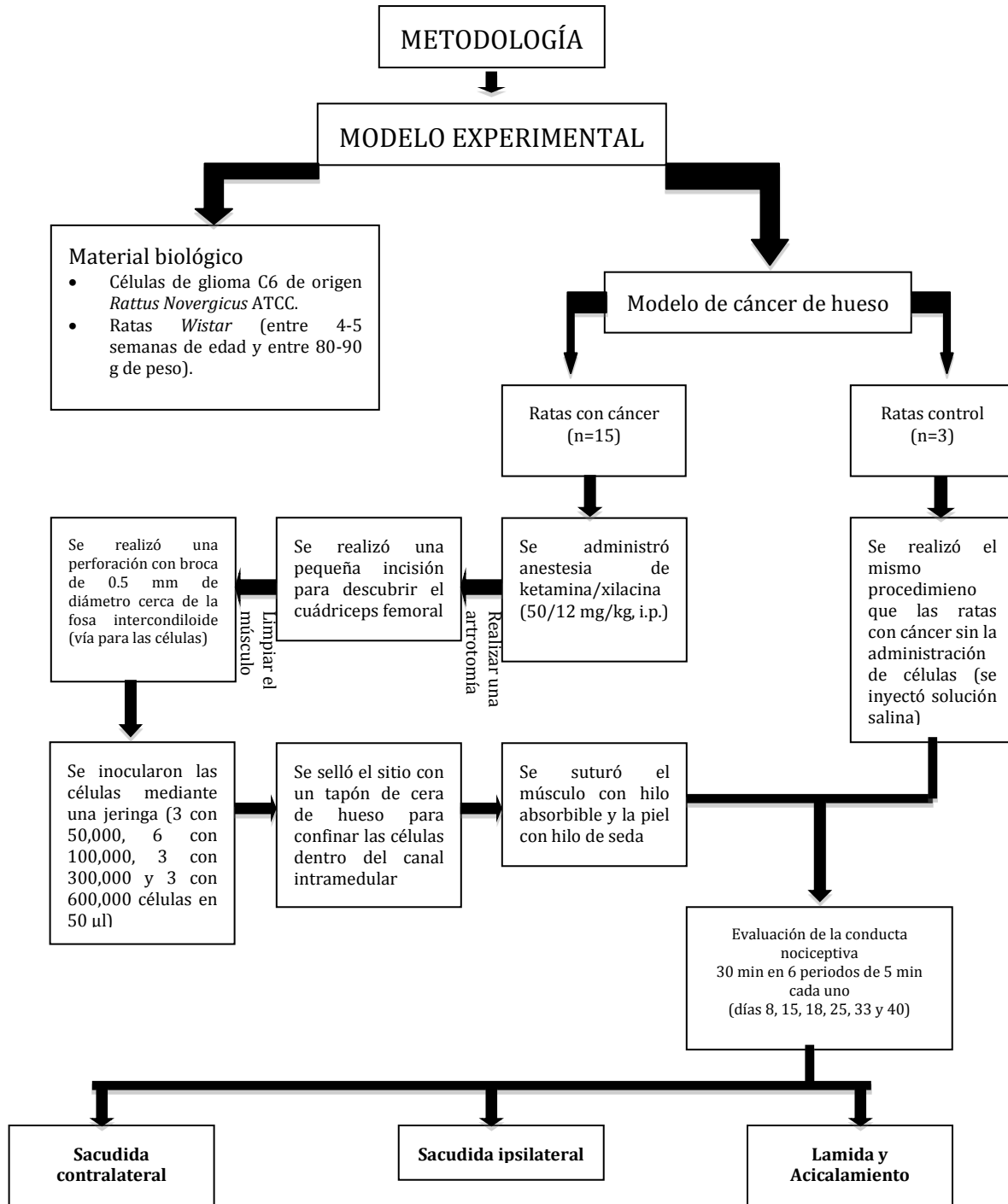
En todas las ratas se evaluaron las conductas relacionadas con el proceso nociceptivo antes de la inoculación y después de ésta en los días 8, 15, 18, 25, 33 y 40 y en un horario establecido (10:00-13:00 h). Los días fueron seleccionados con base a datos previos que se habían realizado en el laboratorio.

- a) **Sacudida de las extremidades:** La conducta de sacudidas de pata es espontánea y rápida; se considera ipsilateral a la pata trasera de la rata a la cual se le realizó la cirugía de artrotomía (derecha). Y la pata trasera contralateral es la que no tiene cirugía (izquierda).

- b) **Lamida y acicalamiento:** Esta conducta es muy característica ya que el animal comienza a lamerse su cuerpo, cuando no es posible acceder al sitio en donde percibe el estímulo, lame las patas delanteras y se acicala con esas mismas.

Las ratas fueron colocadas en una caja de acrílico transparente sobre una malla de alambre para contar el tiempo acumulado de lamida y sacudidas y durante un lapso de 30 minutos divididos en periodos de 5 minutos cada uno, para así obtener 6 tiempos acumulados dentro de cada periodo y con ayuda de un cronómetro.

DIAGRAMA DE FLUJO



8. RESULTADOS

Los resultados se presentan mediante gráficas de cursos temporales de la conducta nociceptiva generada en ratas a las cuales se les inocularon 50 000, 100 000, 300 000 y 600 000 células de cáncer de glioma. El curso temporal muestra en el eje X el tiempo de evaluación durante un periodo de 40 días después de la inoculación y en el eje Y la conducta nociceptiva expresada como tiempo acumulado de la conducta: acicalamiento y lamida o de sacudida de pata ipsilateral (pata trasera derecha en la cual se realizó la cirugía e inoculación de las células) y contralateral (pata trasera izquierda en donde no hubo procedimiento quirúrgico).

a) CONDUCTA DE LAMIDA Y ACICALAMIENTO

En la figura 5 se observa que los animales control, aquellos a los cuales solo se les realiza la cirugía sin administración de células, muestran una disminución de la conducta de lamida y acicalamiento. Esta disminución de la conducta está relacionada a la habituación que tiene el animal cada vez que se le coloca en la caja de acrílico para su observación.

La inoculación de un número de 50 000 células de cáncer de glioma en el fémur incrementa la conducta de acicalamiento debido al crecimiento o migración de las células tumorales. Con este número celular, los animales presentaron

movimiento durante todo el tiempo de evaluación. Es importante mencionar que para el día 40 solo sobrevivieron 2 animales y este es el tiempo de mayor incremento en la conducta debido a la intensidad del proceso nociceptivo, además de presentar una metástasis siendo así el mejor tiempo de evaluación para este número celular hasta el día 33 (Figura 5A).

La inoculación de 100 000 células de cáncer de glioma en el fémur de la rata genera un aumento de la conducta de lamida y acicalamiento. En la Figura 5B se observa que en el día 18 la respuesta disminuye drásticamente, esto puede deberse a que fue un día no adecuado para la evaluación y que factores ambientales como ruido y/o manipulación, temperatura, traslado del bioterio al laboratorio de investigación, entre otros pudieron generar esta disminución de la conducta, ya que una evaluación previa y posterior a este tiempo los animales presentan una conducta de lamida y acicalamiento mayor con respecto a los animales control. Este número celular resultó ser el más adecuado para establecer el modelo de dolor de hueso asociado a cáncer, ya que estos resultados en conjunto con otras evaluaciones permitieron establecer que este es el número de células adecuado. El mejor tiempo de evaluación de esta conducta es igual que en la inoculación de 50 000 células el día 33 después de la artrotomía. Esta es la razón por la cual el lote de 100 000 células es de 6 animales, ya que se procedió a la evaluación de 3 animales adicionales con respecto a las otras concentraciones y así verificar que la conducta que se observa es reproducible a este número celular.

La inoculación de 300 000 células en el fémur de la rata ocasiona un incremento en la conducta de lamida y acicalamiento; 8 días después de la cirugía se observa un aumento considerable de la conducta de lamida y acicalamiento, la cual está muy por arriba de la inoculación de 50 000 y 100 000 células (Figura 5C). Por lo que si se requiere de una evaluación rápida de algún tratamiento y para no esperar los 33 días post-cirugía como en el caso de la inoculación de 50 000 y 100 000 células el número de 300 000 células a los 8 días sería el modelo adecuado.

Por otra parte, es importante señalar que la conducta de lamida y acicalamiento disminuye considerablemente después de los 8 días. Sin embargo esta disminución se debe a que el animal presentaba tanto dolor que para el mismo era difícil acicalarse de la desesperación que sentía por el dolor, el animal no alcanza a lamerse o rascarse ciertas partes de su cuerpo, si se pudo observar la molestia que el animal presenta. Así del día 8 al 33 esta conducta no es la más adecuada para evaluar el proceso nociceptivo, ya que no se puede caracterizar debido al exceso de actividad celular que ocurre en la rata por la inoculación de 300 000 células. Al día 40 se puede observar un incremento muy alto de la actividad nociceptiva que presenta la rata.

La inoculación de 600 000 células de cáncer de glioma en el fémur de la rata genera una conducta nociceptiva de lamida y acicalamiento extremadamente exagerada al día 8 de la evaluación (figura 5D), evidenciando un proceso intenso

de nocicepción y desarrollo del tumor con respecto a los otros números celulares. El aumento del número celular resultó ser no adecuado, ya que generó la muerte de un animal antes de la segunda evaluación (día 15) y después del día 18 todos los animales habían muerto. Así se demostró que aun cuando un número celular alto genera un intenso proceso nociceptivo a los 8 días post-inoculación no es adecuado para una evaluación de un tratamiento crónico.

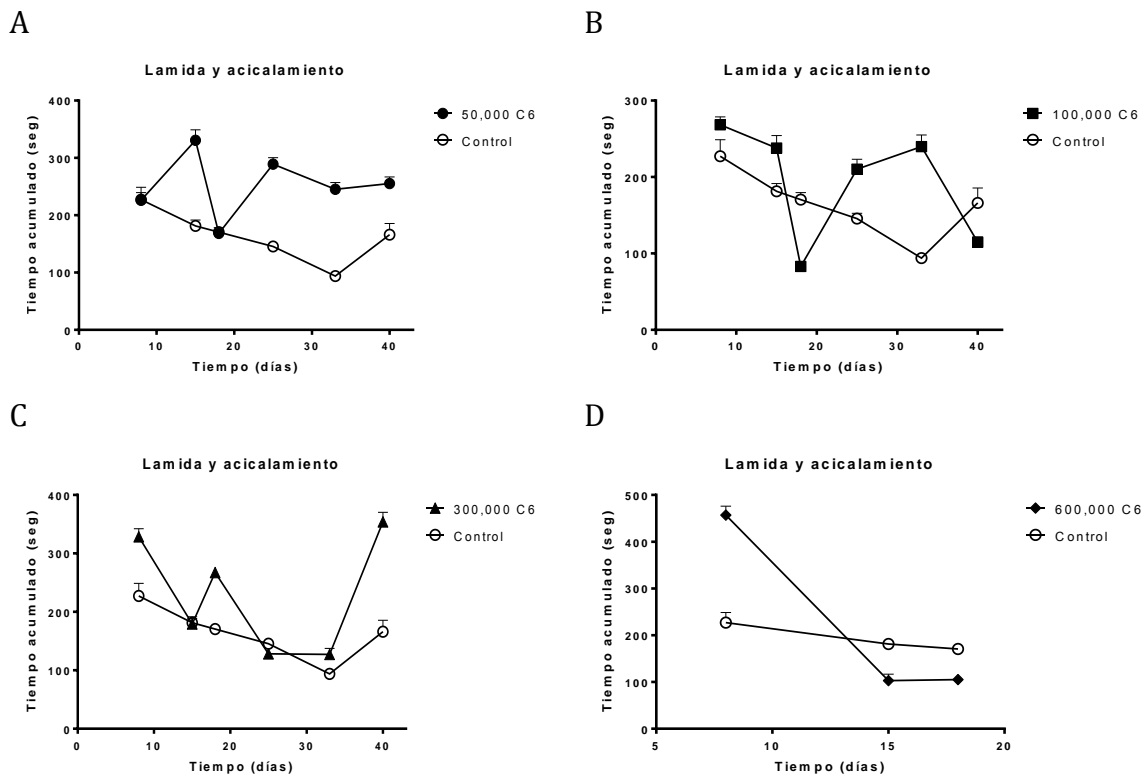


Figura 5. Cursos temporales de lamina y acicalamiento en rata *Wistar* macho después de la inoculación de 50 000 (A), 100 000 (B), 300 000 (C) y 600 000 (D) células de cáncer de glioma C6 en el fémur derecho de la rata. Cada punto representa el promedio de 3 animales de experimentación y control \pm E.E.M. Excepto para 100 000 células en donde la n=6.

b) CONDUCTA DE SACUDIDA DE EXTREMIDADES

En la figura 6 se observa que los animales control, aquellos a los cuales solo se les realiza la cirugía sin administración de células, no muestran una modificación de la conducta de sacudidas ipsilateral o contralateral, excepto el día 40 en donde se observa un aumento del tiempo de sacudida en ambas patas traseras por lo que se deduce que los animales solo podrían evaluarse hasta el día 33. La finalidad de observar la pata con cirugía (ipsilateral) y sin cirugía (contralateral) es de demostrar que la conducta nociceptiva se presenta sistémicamente independiente del sitio de inyección en el caso de presentarse actividad en la contralateral. Además, la conducta contralateral puede referir un efecto de hiperalgesia secundaria, es decir, un proceso nociceptivo referido a otro sitio del daño.

La inoculación de 50 000 células de cáncer de glioma en el fémur no modifica la conducta de sacudidas antes del día 33, sino hasta el 40. Debido a que también las ratas control generaron un aumento de la conducta en el día 40 se asume que este número celular no es adecuado para medir un proceso nociceptivo mediante la cuantificación de sacudidas (Figura 6A). En el caso de la pata contralateral se observa un aumento de la conducta de sacudidas en el día 8, 18, 33 y 40 (Figura 6B). Este aumento de actividad de la pata contralateral puede deberse al aumento del uso de esta pata debido a que la ipsilateral esta lesionada e incluso que pueda estar generando nocicepción, debida a una lesión o fractura

temprana así como desgaste de hueso, y que no se manifiesta en sacudida pero si en lamida y acicalamiento como se observa en la figura 5A.

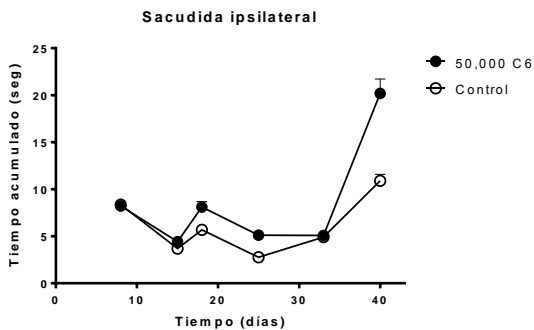
La inoculación de 100 000 células de cáncer de glioma en fémur de rata ocasiona que la pata ipsilateral no modifique su conducta en sacudidas hasta el día 25, 33 y 40. Sin embargo en la pata contralateral se observa a diferencia de la ipsilateral un aumento de la conducta a los 8 días post-cirugía y después disminuye. Podría sugerirse que al igual que en la inoculación de 50 000 células al inicio de la evaluación, el uso de la pata contralateral es estímulo que se percibe en la ipsilateral y cuando manifiesta la conducta ipsilateral ya no muestra la contralateral (Figura 6C y 6D).

Con la inoculación de 300 000 células se observa que tanto la pata ipsilateral como la contralateral presentan un aumento sustancial en la conducta de sacudidas con respecto a las ratas control en el día 8 después de la artrotomía. Sin embargo, después la conducta se ve disminuida, y como ya se mencionó antes, esto puede deberse a que al animal le cuesta trabajo manifestar la conducta nociceptiva aunque si es notorio que presenta sensibilidad e irritabilidad (Figura 6E y 6F).

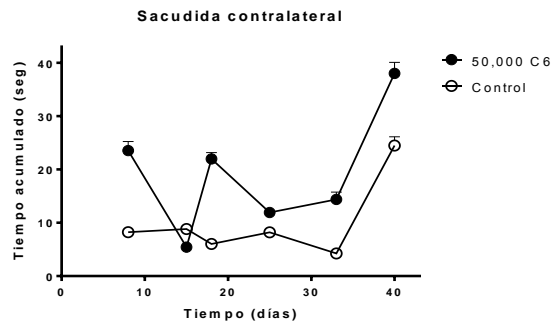
En la figura 6G y 6H se muestra que la inoculación de 600 000 células ocasiona un aumento considerable de la conducta de sacudidas de patas traseras (ipsilateral y contralateral). Es evidente que los animales utilizan más sus

extremidades debido al dolor que presentan; el empleo de las extremidades, se correlaciona con la conducta nociceptiva que se observó con respecto a las naive. Cabe señalar que este uso de extremidades no es normal (se manifiesta por el arrastre de las patas traseras) esto se debe a el daño que presenta el hueso generado por las células tumorales y la infiltración de estas células en el exterior del hueso.

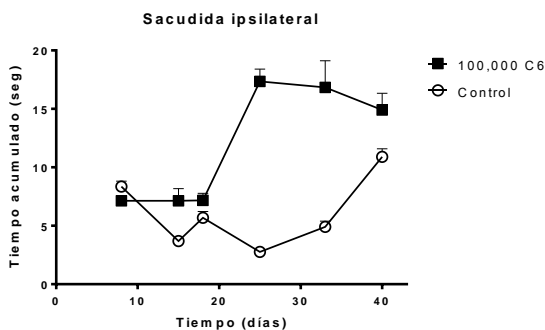
A



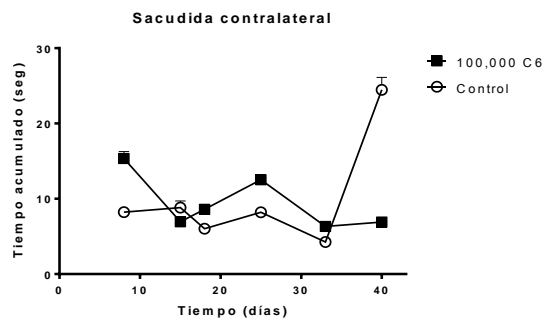
B



C



D



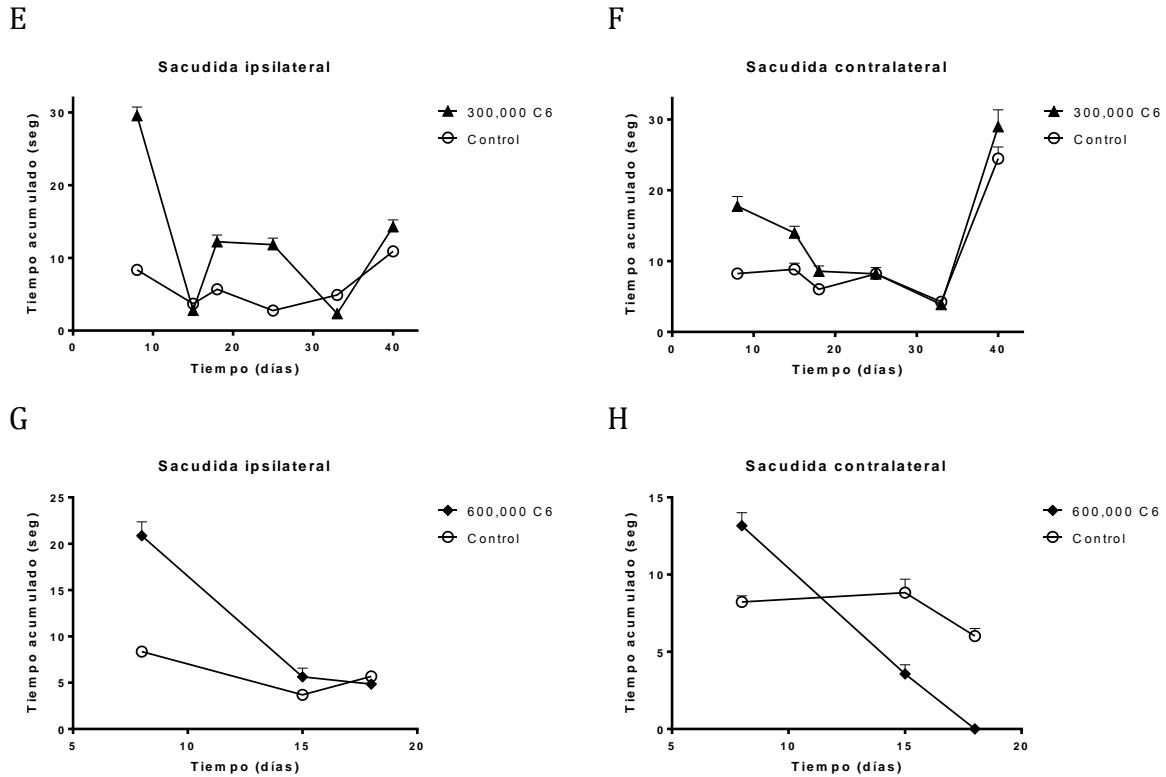


Figura 6. Cursos temporales de sacudida de las extremidades de rata *Wistar* macho después de la inoculación de 50,000 (A), 100 000 (B), 300 000 (C) y 600 000 (D) células de cáncer de glioma C6 en el fémur derecho de la rata. Cada punto representa el promedio de 3 animales de experimentación y control \pm E.E.M. Excepto para 100 000 células en donde la n=6. Ipsilateral: pata derecha a la cual se le realizó la artrotomía; Contralateral; pata izquierda sin astronomía.

9. DISCUSION

Cada año incrementa el número de pacientes con cáncer y aunque actualmente no existe un tratamiento para erradicar el desarrollo tumoral, si se han desarrollado numerosas técnicas que permiten la detección oportuna. Afortunadamente, esto ha permitido la sobrevivencia de muchos pacientes y en algunos casos prolongar las complicaciones, principalmente, la metástasis. Estos pacientes tienen que aprender a tolerar el dolor que presentan ya que no existe aún un fármaco efectivo que pueda eliminar el dolor asociado a cáncer.

Aunque el dolor es el síntoma más frecuente y perjudicial para los pacientes con cáncer de hueso, los mecanismos responsables de la generación y mantenimiento del dolor por cáncer de hueso no se entienden claramente. Por lo anterior, en el presente trabajo se identificaron conductas que caractericen un proceso nociceptivo asociado a cáncer en rata.

En la evaluación de cualquier modelo experimental animal, es importante determinar qué tanto el modelo se aproxima a la enfermedad humana (**Mercadante, 1997; Honore et al., 2000; Luger et al., 2001**). El modelo que hemos desarrollado parece compartir muchas características de dolor inducido por cáncer de hueso al del humano (**Honore et al., 2000**). Es importante mencionar que hasta el momento no existe literatura en donde se haya reportado la inoculación de células de glioma en rata para generar nocicepción. Este es el primer trabajo en donde se utiliza esta

línea celular, en este sentido, no se pueden comparar las conductas generadas por la rata con respecto a la inoculación de otras líneas celulares como de sarcoma (Luger et al., 2001).

En el presente trabajo se demostró que la línea celular de glioma utilizada en este estudio destruye progresivamente el hueso y proporciona hallazgos patológicos localizados que se encuentran en el cáncer. Las células de glioma se inoculan en el espacio intramedular del fémur de la rata y el agujero de la aguja se llena entonces con la amalgama dental para confinar el tumor al hueso. Se asume que el daño podría ser a nivel de osteoclastos debido a que las células tumorales han invadido el hueso y han ocasionado incluso fractura (observaciones macroscópicas al analizar el cadáver de los animales). Con la finalidad de demostrar el aumento de osteoclastos, actualmente en el laboratorio se están realizando los estudios inmunohistoquímicos pertinentes para correlacionar el grado de daño por la administración de las diferentes cantidades de células de glioma (estudio en proceso).

Las conductas relacionadas con el dolor aparecen desde los 8 días después de la inoculación y siguen en aumento hasta que el deterioro severo se presenta después de la inoculación cuando se produce la fractura del fémur afectada. Un paso esencial en el desarrollo de este modelo es asegurarse de que las células cancerosas están confinadas dentro del espacio intramedular del fémur y no invadan los tejidos blandos, lo cual se logró con la colocación de una

amalgama. Las ratas inoculadas con células de glioma exhiben un doloroso comportamiento en la forma de las conductas analizadas (sacudida de extremidades y lamida y acicalamiento), y este comportamiento se correlaciona con el grado de destrucción ósea.

La presencia de tumor en el espacio intramedular y el aumento en el número de osteoclastos activados son también evidentes en el modelo en ratón y rata con respecto al humano (**Honore et al, 2000; Luger et al., 2001; Jimenez-Andrade et al., 2010**). Por lo tanto, la calidad y la severidad del dolor del modelo implementado de cáncer de hueso son similares a lo que se observa clínicamente en humanos con cáncer de hueso (**Mantyh, 2002**). Estas características sugieren que este modelo comparte características clave con el dolor inducido por cáncer de hueso en humanos (**Mantyh, 2002**). Es importante destacar que la utilización de este modelo experimental animal es para evaluar y validar el desarrollo de conductas de dolor inducidas por cáncer de hueso y su alteración para la comprensión de los mecanismos que generan el dolor óseo, así como proporcionar un modelo en el que puedan desarrollarse nuevas estrategias terapéuticas que no solo reduzcan el dolor oncológico óseo inducido por el tumor sino que también puedan evitar o atenuar la progresión de la enfermedad, logrando así un impacto potencial a nivel clínico mejorando la calidad de vida, el estado funcional y la sobre todo la sobrevivencia de los pacientes.

10. CONCLUSIONES

- a) Se sugiere que la inoculación de 100 000 células de glioma C6 son suficientes para generar una conducta nociceptiva que se puede cuantificar mediante el tiempo de lamida y acicalamiento así como de sacudidas ipsilateral y contralateral.
- b) Se determinó que el tiempo de evaluación no puede exceder a los 33 días después de la cirugía, siendo este el mejor tiempo para evaluar las conductas nociceptivas.
- c) Se sugiere que el modelo implementado sirve para la evaluación de nuevos fármacos AINE's, opioides, así como nuevas combinaciones o terapias multimodales.
- d) Se sugiere que el número de 300 000 y 600 000 células de glioma C6 pueden servir para la evaluación de fármacos o tratamientos a corto plazo, siendo el modelo adecuado, mientras que para 50 000 células sería un modelo a largo plazo.

11. REFERENCIAS

1. Basbaum A. I. et al., 2009. Cellular and molecular mechanisms of pain. *Cell* 139:267-284.
2. Coleman R. E. y Rubens R. D., 1987. The clinical course of bone metastases from breast cancer. *Br J Cancer* 55;1:61-66.
3. Constigan M., Woolf C. J., 2000. Pain: molecular mechanisms. *The Journal of Pain* 1;3:35-44.
4. Cortinas C. *Cáncer: Herencia y Ambiente*. 2ª edición. Fondo de cultura económica, México, D. F., 1997.
5. Ghilardi J. R. et al., 2005. Selective Blockade of the Capsaicin Receptor TRPV1 Attenuates Bone Cancer Pain. *The Journal of Neuroscience* 25;12:3126-3131.
6. Goblirsch M. et al., 2005. Radiation Treatment Decreases Bone Cancer Pain through Direct Effect on Tumor Cells. *Radiation Research* 164:400-408.
7. Guadagni F. et al., 2007. Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs in Cancer Prevention and Therapy. *Anticancer Res.* 27;5A:3147-3162.
8. Halvorson K. G. et al., 2008. Intravenous Ibandronate Rapidly Reduces Pain, Neurochemical Indices of Central Sensitization, Tumor Burden, and Skeletal Destruction in a Mouse Model of Bone Cancer. *Journal of Pain and Symptom Management* 36;3:289-303.

9. Honore P. et al., 2000. Osteoprotegerin blocks bone cancer induced skeletal destruction, skeletal pain and pain-related neurochemical reorganization of the spinal cord. *Nature Medicine* 6;5:521-528
10. IASP; Taxonomy Pain terms: a current list with definitions and notes on usage. *Pain* 1986; Suplemento 3.
11. Jimenez Andrade J. M. et al., 2010. Bone Cancer pain. *Ann New York Academy of Sciences* 1198:173-81.
12. Lopez-Muñoz F. J. Y Granados V., 1998. Emplear o no fármacos para el alivio del dolor. *Avance y perspectiva*:219-225.
13. Lozano-Ondoua A. N. et al. 2010. A cannabinoid 2 receptor agonist attenuates bone cancer-induced pain and bone loss. *Life Sciences* 86:646-653.
14. Luger N. M. et al., 2001. Osteoprotegerin Diminishes Advanced Bone Cancer Pain. *Cancer Research* 61:4038-4047.
15. Mantyh P. W. et al., 2002. Molecular mechanisms of Cancer pain. *MacMillan Magazines Ltd* 2:201-209.
16. Mantyh W. G. et al., 2010. Blockade of nerve sprouting and neuroma formation markedly attenuates the development of late stage cancer pain, *Neuroscience* 171;2:588-598.
17. Mercadante S., 1997. Malignant bone pain: pathophysiology and treatment. *Pain* 69;1-2:1-18.
18. Montiel-Ruiz R. M. et al., 2013. Dolor oncológico: de la farmacología preclínica a los ensayos clínicos. *Gaceta Médica de México* 149:204-211.

19. Ortega A. et al., 2002. Modelos animales de dolor. Una visión crítica. Rev. Soc. Esp. Del Dolor 9;7:447-453.
20. Otto Shirley E., Enfermería oncológica, 3ª edición, Ed, Harcourt/Brace; Cap. 29 (Tratamiento del dolor), 1999.
21. Partenoy R. K. et al., 1999. Breakthrough pain: characteristics and impact in patients with cancer pain. Pain 81;1-2:129-134.
22. Sabino M. A., y Mantyh P. W., 2005. Pathophysiology of Bone Cancer Pain. The Journal of Supportive Oncology 3;1:15-24.
23. Scholz J., y Woolf C. J., 2002. Can we conquer pain?. Nature neuroscience supplement 5:1062-1067.
24. Schwei M. J. et al., 1999. Neurochemical and Cellular Reorganization of the Spinal Cord in a Murine Model of Bone Cancer Pain. The Journal of Neuroscience 19;24:10886-10997.
25. Vanda-Cantón B., 2003. La experimentación biomédica en animales en los códigos bioéticos. Laborat-acta 15;2:69-73.
26. Weiss S. C. et al., 2001. Understanding the experience of pain in terminally ill patients. The lancet 357:1311-1315.
27. Woolf C. J. y Ma Q., 2007. Nociceptors-noxious stimulus detectors. Neuron 55:353-364.
28. Woolf C. J. y Salter M. W., 2000. Neuronal plasticity: Increasing the gain in pain. Science's Compass 288:1765-1768.

11.1 REFERENCIAS ELECTRÓNICAS

29. Ciudadanos en Red; En 30 años, muertes por cáncer aumentan 50% (infografía) [en línea]; 2014 [fecha de acceso 1,2 y 5 de mayo de 2014] URL disponible en: <http://ciudadanosenred.com.mx/en-30-anos-muertes-por-cancer-aumentan-50-infografia/>
30. Sexenio; Los seis cánceres más comunes en México [en línea]; 2014 [fecha de acceso 3 y 4 de mayo de 2014] URL disponible en: <http://www.sexenio.com.mx/articulo.php?id=43358>
31. World Health Organization; Cancer pain relief [en línea]; 1996 [fecha de acceso 15 y 16 de mayo de 2014] URL disponible en: <http://whqlibdoc.who.int/publications/9241544821.pdf>