



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

“Efecto de la administración de un inhibidor y un inductor de la glicoproteína
P durante el proceso nociceptivo en un modelo murino de formalina”

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
LICENCIADA EN BIOQUÍMICA DIAGNÓSTICA**

PRESENTA:

ITZEL ELVIRA LARA XOMETL

Asesor: M en C. José Carlos Aguilar Carrasco

Coasesora: M en F.C. Cecilia Hernández Barba



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
Efecto de la administración de un inhibidor y un inductor de la glicoproteína P durante el proceso nociceptivo en un modelo murino de formalina
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLÁN

ASUNTO: VOTO APROBATORIO



DEPARTAMENTO DE
EXÁMENES PROFESIONALES

ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales
de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: **Trabajo de Tesis**

Efecto de la administración de un inhibidor y un inductor de la glicoproteína P durante el proceso nociceptivo en un modelo murino de formalina.

Que presenta la pasante: **Itzel Elvira Lara Xometl**

Con número de cuenta: **308238473** para obtener el Título de la carrera: **Licenciatura en Bioquímica Diagnóstica**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

ATENTAMENTE

“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 02 de Agosto de 2017.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

NOMBRE

FIRMA

PRESIDENTE

Q. Arcadia Hernández Beltrán

VOCAL

MFC. Cecilia Hernández Barba

SECRETARIO

QFB. Nydia Berenice González Angeles

1er. SUPLENTE

QFB. Elisa Pedraza Vázquez

2do. SUPLENTE

L.F. Miguel Ángel Trejo Rodríguez

Trejo Rodriguez Miguel A



Efecto de la administración de un inhibidor y un inductor de la glicoproteína P durante el proceso nociceptivo en un modelo murino de formalina

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Farmacología Experimental en el Instituto Nacional de Perinatología *Isidro Espinosa de los Reyes*. México, CDMX. La dirección de esta tesis estuvo a cargo del M. en C. José Carlos Aguilar Carrasco y de la M en F.C. Cecilia Hernández Barba.



AGRADECIMIENTOS

El desarrollo de este trabajo no hubiera sido posible sin la participación de personas e instituciones que han facilitado los medios para que llegue a un buen término.

Debo agradecer de manera especial y sincera al M. en C. José Carlos Aguilar Carrasco, por las horas dedicadas a la revisión y desarrollo de mi tesis, sobre todo por su comprensión, apoyo y compromiso.

A mi coasesora la M. en F.C. Cecilia Hernández Barba por sus comentarios y sugerencias durante el desarrollo del proyecto.

A todos mis amigos de la facultad por todos los momentos que pasamos juntos, gracias por brindarme su amistad.

A la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán-UNAM, por el apoyo brindado en el desarrollo de mi formación profesional y académica.



DEDICATORIAS

A mis padres

Por darme su apoyo en los momentos que más lo necesité, por su comprensión y amor incondicional, ya que sin ustedes no hubiera podido llegar a este momento.

A mi hermano Arturo

Porque siempre estás ahí para escucharme y apoyarme en todo.

A mi novio Fer

Gracias por siempre creer en mí y brindarme tu apoyo, amistad y amor.

A mi mejor amiga Lore

Sé que siempre puedo contar contigo, gracias por todos estos años de amistad.



ÍNDICE GENERAL

I.	LISTA DE FIGURAS	8
II.	LISTA DE GRÁFICAS	9
III.	LISTA DE TABLAS	10
IV.	LISTA DE ABREVIATURAS	11
V.	RESUMEN	13
1.	MARCO TEÓRICO	15
1.1	Dolor	15
1.1.1	Clasificación del dolor	15
1.1.2	Fisiología del dolor	16
1.1.3	Nocicepción	17
1.1.4	Mediadores bioquímicos en la nocicepción	20
1.1.5	Dolor inflamatorio	21
1.2	Modelos animales para el estudio de la nocicepción	23
1.2.1	Modelo de formalina	24
1.3	Glicoproteína P	27
1.3.1	Estructura de la glicoproteína P	28
1.3.2	Sustratos exógenos y endógenos de la glicoproteína P	30
1.3.3	Inhibidores de la glicoproteína P	32
1.3.4	Inductores de la glicoproteína P	34
1.4	Ketoconazol	35
1.4.1	Mecanismo de acción de ketoconazol	35
1.4.2	Farmacocinética de ketoconazol	36
1.5	Rifampicina	38
1.5.1	Mecanismo de acción de rifampicina	39
1.5.2	Farmacocinética de rifampicina	40
2.	HIPÓTESIS	41
3.	OBJETIVOS	41
3.1	Objetivo general	41
3.2	Objetivos particulares	41
4.	MATERIALES Y MÉTODOS	42
4.1	Desarrollo experimental	42
4.2	Animales	43
4.3	Materiales	43
4.4	Fármacos y reactivos	43
4.5	Prueba de formalina	43



5. RESULTADOS	44
5.1 Efecto nociceptivo del ketoconazol y rifampicina vía oral	44
5.2 Efecto nociceptivo del ketoconazol y rifampicina vía subcutánea	46
5.3 Comparación de los tratamientos administrados por vía oral y vía subcutánea	47
6. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	47
6.1 Efecto de la administración de rifampicina sobre el desarrollo de nocicepción	48
6.2 Efecto de la administración de ketoconazol sobre el desarrollo de nocicepción	49
7. CONCLUSIONES	53
8. REFERENCIAS	54



I. LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fases en el proceso de nocicepción	17
Figura 2. Activación de los nociceptores por estímulos térmicos, mecánicos o químicos	18
Figura 3. Modulación de la información nociceptiva en el asta dorsal de la médula espinal	19
Figura 4. Dolor inflamatorio y su amplificación con el tiempo	22
Figura 5. Sensibilización periférica en situaciones de dolor inflamatorio	23
Figura 6. Prueba de formalina	26
Figura 7. Estructura tridimensional de la glicoproteína P	29
Figura 8. Estructura química de ketoconazol	35
Figura 9. Mecanismo de acción de ketoconazol	36
Figura 10. Concentración plasmática media de los enantiómeros de KCZ en función del tiempo	38
Figura 11. Estructura química de la rifampicina	39
Figura 12. Diagrama de flujo del desarrollo experimental	42



II. LISTA DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Relación tiempo-respuesta de los tratamientos evaluados por vía oral	45
Gráficas 2 y 3. Área bajo la curva del efecto producido por los tratamientos evaluados por vía oral durante la fase I y II	45
Gráfica 4. Relación tiempo-respuesta de tratamientos administrados por vía subcutánea	46
Gráficas 5 y 6. Área bajo la curva del efecto producido por los tratamientos evaluados por vía subcutánea durante la fase I y II	46
Gráfica 7. Área bajo la curva durante la fase II del efecto producido por los tratamientos evaluados por ambas vías de administración; oral (O) subcutánea (S)	47



III. LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Principales neuroreguladores implicados en la respuesta de dolor	20
Tabla 2. Principales modelos para estudiar la nocicepción en animales	25
Tabla 3. Diversos sustratos exógenos y endógenos conocidos de la gp-P	31
Tabla 4. Sustancias comúnmente involucradas en procesos de inhibición de la glicoproteína P	33
Tabla 5. Fármacos comúnmente involucrados en procesos de inducción de la glicoproteína P	34
Tabla 6. Parámetros farmacocinéticos de KCZ en humanos y en ratas	37
Tabla 7. Parámetros farmacocinéticos de RIF en humanos	40



IV. LISTA DE ABREVIATURAS

5-HT	Receptor de serotonina
ABC	Área bajo la curva
AMPA	Receptor de glutamato
ASICs	Canales iónicos sensibles a ácido
ATP	Adenosín trifosfato
BDNF	Factor nervioso derivado del cerebro
BHE	Barrera hematoencefálica
CGRP	Péptido relacionado con el gen de la calcitonina
COX	Ciclooxigenasa
CsA	Ciclosporina A
CYP3A4	Citocromo P450 3A4
DAG	1,2-diacil-glicerol
DHT	Dihidrotestosterona
DIC	Diclofenaco
GABA	Ácido gamma-aminobutírico
GBRs	Complejo de receptores de benzodiazepina
GDNF	Factor neurotrófico derivado de la glía
Glu	Glutamato
gp-P	Glicoproteína P
GRD	Ganglios de la raíz dorsal
IL	Interleucinas
KCZ	Ketoconazol
LT	Leucotrienos
MDR	Resistencia Múltiple a Drogas
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato
NGF	Factor de crecimiento nervioso
NO	Óxido nítrico
P2X	Receptor de ATP
PG	Prostaglandinas
pH	Potencial de hidrogeno
PIP₂	Fosfatidil-inositol 4,5-bifosfato
PKC	Proteína cinasa C
PLC	Fosfolipasa C
RIF	Rifampicina
s.c.	Subcutáneo



Efecto de la administración de un inhibidor y un inductor de la glicoproteína P durante el proceso nociceptivo en un modelo murino de formalina

SNC	Sistema nervioso central
SP	Sustancia P
T	Testosterona
TMJ	Articulación temporomandibular
TNF	Factor de necrosis tumoral
TRAAK	Canal de potasio estimulado por ácido araquidónico
TREK-1, 2	Canales de potasio con dos dominios de poro
TRPA1	Receptor de potencial transitorio subfamilia A miembro 1
TRPM8	Receptor de potencial transitorio subfamilia M miembro 8
TRPV1, TRPV2 y	
TRPV3	Receptores de potencial transitorio vaniloide
TX	Tromboxanos
α	Receptor adrenérgico
μ, δ, κ	Receptores opiodes



V. RESUMEN

La glicoproteína P (gp-P) es una proteína de membrana de gran importancia en muchos aspectos fisiológicos y bioquímicos de los organismos vivos relacionados con el transporte de eflujo celular de moléculas exógenas y endógenas en distintos tejidos, principalmente a nivel intestinal, renal, hepático así como en sistema nervioso central (Ambudkar et al., 2003). Su función puede ser inhibida o inducida por ciertas moléculas, lo cual puede impactar de manera importante en la concentración de sustratos transportados hacia el exterior celular (Zhou, 2008). Investigaciones recientes han sugerido una participación esencial de la gp-P a nivel de barrera hematoencefálica (BHE) transportando compuestos del tipo opioides con propiedades antinociceptivas (Ueda et al., 1997). En ese sentido, en este proyecto se investigó el efecto producido por dos fármacos (de los cuales no se han reportado efectos antinociceptivo y/o pronociceptivo) que actúan como inhibidor (ketoconazol) y como inductor (rifampicina) de la gp-P, sobre la nocicepción producida mediante el modelo de formalina en ratas. Se utilizaron ratas Wistar machos de 180 a 250 g de peso. Se conformaron cuatro grupos de estudio (n=6) que recibieron una dosis única por vía oral de ketoconazol, rifampicina, diclofenaco (control positivo) y vehículo (control negativo). Se administraron 50 μ L de formalina (1%) por vía subcutánea en la parte dorsal de la pata derecha de la rata y se midió la respuesta dolorosa exhibida durante un minuto en intervalos de cinco minutos por un periodo de una hora. Los resultados obtenidos mostraron un efecto nociceptivo y antinociceptivo clásico del modelo después de la administración del vehículo y de diclofenaco, respectivamente. La administración de ketoconazol propició un efecto pronociceptivo de manera notable y estadísticamente significativo con la dosis evaluada (32 mg/kg), mientras que la administración de rifampicina (60 mg/kg) provocó una disminución nociceptiva sin llegar a ser estadísticamente significativa. Para discernir un efecto local o sistémico, estos fármacos se administraron por vía subcutánea previo a la administración de formalina sin observarse diferencias con respecto al grupo control. Los resultados obtenidos sugieren una posible participación de la gp-P de



manera sistémica en el proceso nociceptivo. La evidencia más notoria fue después de la administración de ketoconazol como inhibidor de la gp-P. Una posible explicación es la inhibición del transporte de algunas endorfinas producidas en el SNC y expulsadas a través de la BHE hacia la circulación sistémica (King et al., 2001). La nula respuesta antinociceptiva observada con rifampicina se pudo deber a que la inducción de la gp-P es un mecanismo que requiere de un mayor tiempo o de exposiciones repetidas al inductor. Estos resultados ofrecen una posible nueva línea de investigación en los mecanismos relacionados con la nocicepción en el modelo de formalina en ratas.



1. MARCO TEÓRICO

1.1 Dolor

La Asociación Internacional para el Estudio del Dolor (IASP, International Association for the Study of Pain) define al dolor como una experiencia sensorial y emocional desagradable asociada a un daño tisular real o potencial que puede describirse en términos de la magnitud del daño (Grünenthal Group, 2017).

El dolor es una experiencia consciente que interpreta los estímulos nociceptivos (son aquellos que estimulan a los nociceptores, los cuales son receptores sensitivos encargados de percibir el dolor y de transmitirlo, estos estímulos pueden ser de tipo mecánico, térmico o químico) con base en la memoria, el estado emocional y factores patológicos, además de factores cognitivos y genéticos. No obstante, cuando existe un funcionamiento anormal dentro de los componentes que conforman este proceso de nocicepción (que es la sensación que se asocia en general a un daño tisular), el dolor sobrepasa su función normal y se vuelve patológico (Turk & Okifuji, 1999).

1.1.1 Clasificación del dolor

Existen muchos tipos de dolor, debido a la gran cantidad de factores que influyen al presentarse la percepción dolorosa, entre los que se encuentran: el estado emocional, estrés, sexo, edad, raza, experiencias previas, factores culturales, personalidad, condicionamiento del individuo y estos pueden agruparse en factores anatómicos, fisiológicos y psicológicos (Turk & Okifuji, 1999).

La clasificación de los tipos de dolor es un tema de debate entre investigadores y clínicos, los cuales suelen clasificar al dolor de acuerdo a su origen anatómico y características clínicas o etiológicas (Puebla, 2005). Loeser y Melzack (1999) proponen una clasificación de dolor, basada principalmente en la duración y características fisiopatológicas que lo producen, en:

- a. Dolor transitorio: se activa por nociceptores cutáneos u otros tejidos del cuerpo en ausencia de daño tisular, su función es la de proteger al



individuo de un posible daño físico provocado por el medio ambiente o estrés excesivo sobre el tejido (Mesas, 2012).

- b. Dolor agudo: el dolor agudo se origina con un estímulo nocivo y causa una reacción inmediata de alarma en la persona, por lo que posee una función biológica protectora. Las secuelas psicológicas no son importantes y el dolor desaparece con la lesión que lo originó. El dolor agudo se activa por la estimulación de nociceptores presentes en el tejido dañado (Mesas, 2012).

- c. Dolor crónico: es la consecuencia de un daño y/o disfunción del sistema nervioso periférico o central (dolor neuropático), o bien de un daño al tejido periférico y la sucesiva respuesta inflamatoria (dolor inflamatorio) (Levine & Reichling, 2003). Además, el dolor patológico se caracteriza por generar respuestas nociceptivas como son la alodinia que es el dolor producido por un estímulo que normalmente no causa dolor y la hiperalgesia que se caracteriza por sentir un dolor producido por un estímulo nocivo que se percibe con mayor intensidad de lo normal (Woolf & Mannion, 1999a).

1.1.2 Fisiología del dolor

El dolor surge a partir de la estimulación de receptores específicos llamados nociceptores (Schaible, 2007) que se encuentran en cuatro zonas principales del cuerpo: tejido cutáneo, muscular, articular y visceral. Los somas de los nociceptores se localizan en ganglios sensoriales, como los ganglios de la raíz dorsal (GRD) (Basbaum et al., 2009). La señal eléctrica producida mediante la transducción del estímulo nocivo se conduce en forma de potencial de acción a lo largo de las fibras aferentes primarias para ser transmitida a neuronas de segundo orden en el asta dorsal de la médula espinal donde se puede inhibir o amplificar la señal en un proceso de modulación.



Desde la médula espinal la señal se proyecta a neuronas sensoriales de tercer orden localizadas en centros superiores del cerebro, donde dicha señal se percibe e interpreta como desagradable (Basbaum et al., 2009).

El organismo puede diferenciar entre los estímulos inocuos y aquellos que son potencialmente nocivos. El mecanismo por el cual se lleva a cabo la discriminación entre estímulos se basa en la presencia de diversos tipos de nociceptores, los cuales tienen la propiedad de codificar la magnitud del estímulo detectado dentro de un rango de intensidades nocivas y generalmente no responden a estímulos de baja intensidad (Ossipov, 2012).

1.1.3 Nocicepción

La palabra nocicepción se deriva de la raíz latina “nocere” que significa daño o lesión y es un término neurofisiológico que se refiere a los procesos neuronales por los cuales se detectan los estímulos nocivos. Este mecanismo electroquímico comprende los procesos de transducción, transmisión, modulación y percepción como se muestra en la **figura 1** (Schaible, 2007).

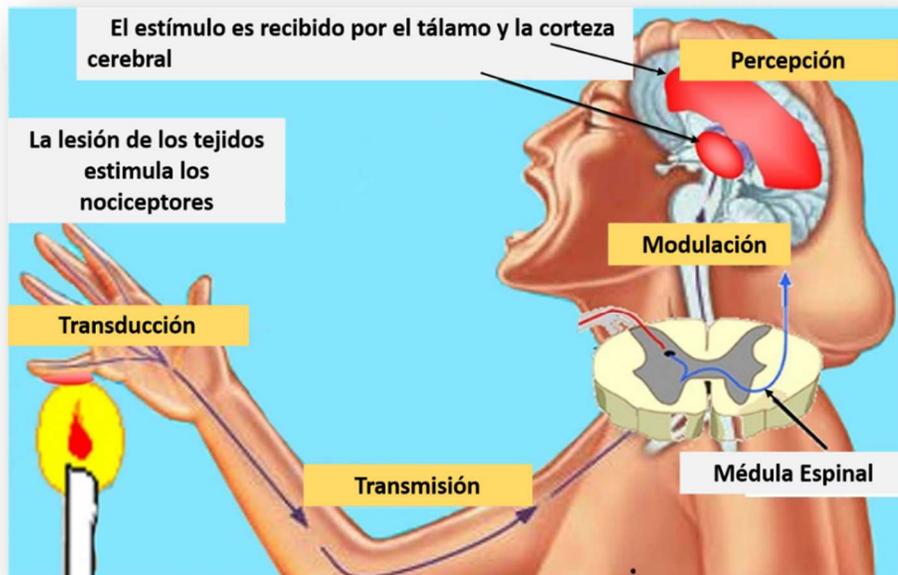


Figura 1. Fases en el proceso de nocicepción (Anestesiólogos Mexicanos en internet, A.C., 2013)



Para transmitir información nociceptiva la neurona debe ser selectiva, es decir, debe haber algún mecanismo con la capacidad de distinguir entre estímulos inocuos y nocivos. Los nociceptores poseen dos características que ayudan a realizar esta distinción: un umbral alto de estimulación y la capacidad de relacionar de manera directa la frecuencia de la descarga con la intensidad del estímulo (Schaible, 2007).

Los nociceptores son las estructuras que nos permiten responder ante diversos estímulos nocivos, como se muestra en la **figura 2** los estímulos pueden ser químicos, térmicos, mecánicos o de cualquier otra característica que pueda producir dolor (Scholz & Woolf, 2002).

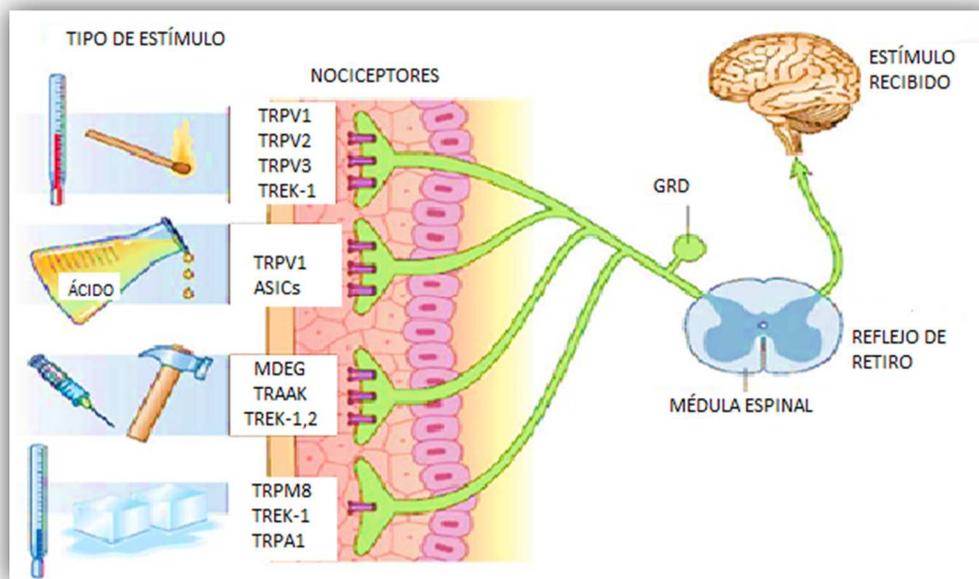


Figura 2. Activación de los nociceptores por estímulos térmicos, mecánicos o químicos (Modificado de Scholz & Woolf, 2002).

Estas terminaciones nerviosas libres, presentan una serie de proteínas, muy variadas y especializadas, que actúan como receptores de esa información nociceptiva y la transmiten al SNC por fibras nerviosas de tipo Aδ (1-5 μm de diámetro) son mielínicas, mientras que las C (< 1 μm de diámetro) son amielínicas. La velocidad de conducción es mayor cuanto mayor es el diámetro y grado de mielinización (Julius & Basbaum, 2001). Estos receptores pueden ser canales



iónicos (que modifican el tránsito de iones dentro y fuera de la neurona) o receptores metabotrópicos (es decir que generan cambios en la síntesis de proteínas citoplásmicas). Los receptores vaniloides, que codifican la información relacionada con la temperatura y los cambios de pH, pertenecen al grupo de los receptores iónicos (Costigan et al., 2009).

Una vez estimulados los nociceptores, inducen cambios en la carga eléctrica de la membrana neuronal, lo que resulta en la propagación del estímulo nervioso hasta el asta dorsal de la médula. Allí se libera glutamato (Glu), un aminoácido excitador que se une a un receptor específico, denominado AMPA y localizado en una neurona postsináptica, que transmite la información hacia los centros superiores del SNC, hasta el tálamo y la corteza cerebral (Goicoechea & Martín, 2006). Desde estos mismos núcleos superiores, se ponen en marcha vías descendentes que llegan de nuevo al asta dorsal de la médula y liberan sustancias endógenas inhibitoras como opioides endógenos y GABA (**Figura 3**).

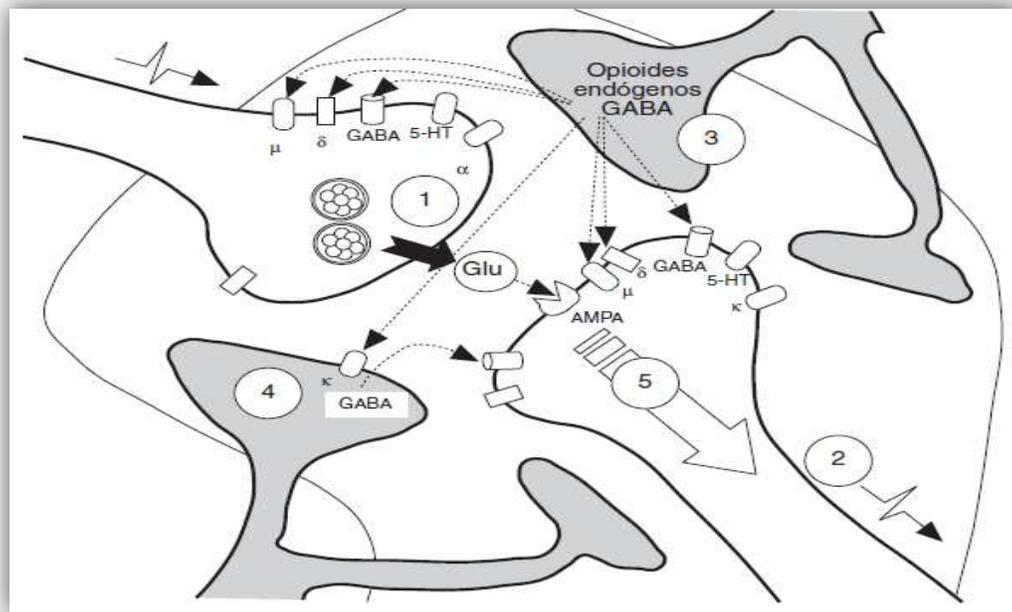


Figura 3. Modulación de la información nociceptiva en el asta dorsal de la médula espinal. (La flecha negra indica liberación y las flechas punteadas, unión a receptor). 1: liberación de glutamato; 2: transmisión a los centros superiores; 3: liberación de sustancias inhibitoras desde las vías ascendentes; 4: liberación de sustancias inhibitoras desde las interneuronas; 5: transmisión de la señal modulada al sistema nervioso central (Goicoechea & Martín, 2006).



Estas sustancias inhibidoras actúan modulando la transmisión del estímulo, por un lado disminuyendo la liberación de glutamato y por otra hiperpolarizando la membrana de la neurona postsináptica. También entran en juego unas interneuronas inhibidoras que, liberando también opioides endógenos, imitan y potencian el efecto inhibidor de las vías descendentes (Mason, 2005).

1.1.4 Mediadores bioquímicos en la nocicepción

La actividad y metabolismo de las fibras sensoriales es alterada por una variedad de mediadores que se generan por el daño tisular y la inflamación. Estos mediadores incluyen sustancias liberadas por el tejido dañado, sustancias de origen vascular, de fibras aferentes, fibras simpáticas y diversas células inmunes (**Tabla 1**).

El efecto de estos mediadores consiste en activar o sensibilizar las fibras aferentes produciendo cambios en los canales iónicos y receptores de membrana. Estos cambios tienen el potencial de alterar la transcripción de genes e inducir a largo plazo alteraciones en la bioquímica de las neuronas sensoriales (Woolf & Costigan, 1999).

Tabla 1. Principales neuroreguladores implicados en la respuesta del dolor

Pronociceptivos	Antinociceptivos	Ambos
Protones		
Histamina	β-Endorfinas	
Sustancia P	Dinorfina	
NGF	Encefalinas	
Prostaglandinas	Acetilcolina	Serotonina
Glutamato	Dopamina	Bradicinina
CGRP	GABA	Óxido Nítrico
Leucotrienos	Norepinefrina	
Tromboxanos	Epinefrina	
TNF	Glicina	
IL-1,6		

*Datos recopilados de Woolf & Costigan (1999), Scholz & Woolf (2002), Woolf (2004), Basbaum et al. (2009).



Dentro de la modulación, los neuroreguladores juegan un papel muy importante en la comunicación celular nerviosa, pueden subdividirse en neurotransmisores y neuromoduladores (Basbaum et al., 2009).

Los neurotransmisores básicamente llevan información entre células nerviosas adyacentes, mientras que los neuromoduladores aumentan o disminuyen la actividad: afectando la síntesis, recaptura, biotransformación o unión al receptor de los neurotransmisores (Basbaum et al., 2009).

1.1.5 Dolor inflamatorio

Desde hace varios siglos se han descrito y tipificado los síntomas del proceso inflamatorio. Se suelen describir como la “Tétrada de Celso” por ser cuatro las manifestaciones durante la inflamación: tumor, rubor, calor y dolor (Marienfeld et al., 1997).

El dolor de tipo inflamatorio se genera cuando se daña la integridad del tejido. Esto sucede cuando existen incisiones en la piel, quemaduras, frío extremo, fracturas, artritis, procesos autoinmunes, presión extrema, infecciones o vasoconstricción. Múltiples moléculas median este proceso inflamatorio y algunas de hecho actúan como precursores de otros agentes pro-inflamatorios (Woolf & Costigan, 1999).

Así, el daño tisular se acompaña por la acumulación de factores endógenos liberados desde los nociceptores activos o de células no neuronales (incluyendo células cebadas, basófilos, plaquetas, macrófagos, neutrófilos, células endoteliales, queratinocitos y fibroblastos) en el área lesionada como se observa en la **Figura 4** (Levine & Reichling, 2003).

Colectivamente estos factores son referidos como la “sopa inflamatoria” y representan una amplia gama de moléculas de señalización que incluyen neurotransmisores peptídicos como la SP, CGRP y bradisinina, lípidos como prostaglandinas, tromboxanos, leucotrienos y endocannabinoides. Además de neurotrofinas, citocinas y quimiocinas, así como proteasas extracelulares y protones (Levine y Reichling, 2003).

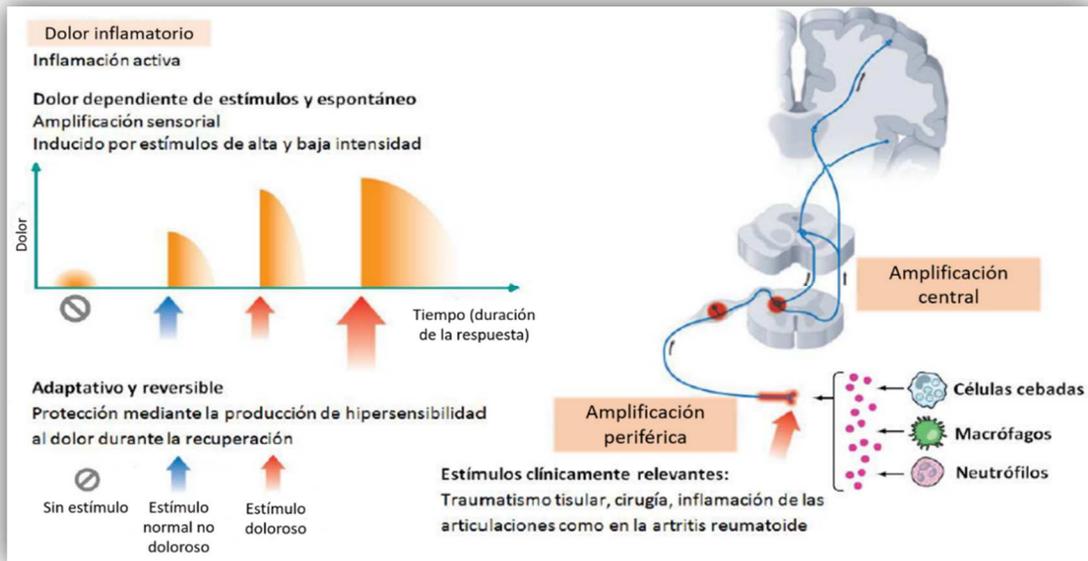


Figura 4. Dolor inflamatorio y su amplificación con el tiempo. La lesión al tejido periférico genera una hipersensibilidad al dolor, involucrando la acción de diversos mediadores inflamatorios en los nociceptores y una sensibilización del sistema nociceptivo a nivel periférico y central (Modificado de Costigan et al., 2009).

Las terminales nerviosas de las neuronas aferentes primarias expresan en su membrana canales iónicos y receptores capaces de reconocer y responder a cada uno de los agentes pro-inflamatorios o pro-analgésicos (Huang et al., 2006, Basbaum et al, 2009). Por lo tanto, la liberación de mediadores inflamatorios aumenta la excitabilidad de los nociceptores generando el fenómeno de sensibilización periférica, incluso en zonas alejadas del sitio de inflamación (**Figura 5**). Esta sensibilización de los nociceptores se produce por diversos mecanismos entre los que se incluye un incremento en la actividad de los canales de sodio y calcio regulados por voltaje (Huang, Zhang, & McNaughton, 2006).

La generación de la sensibilización periférica tiene la función de proteger el área afectada y la hipersensibilidad que se percibe en el dolor inflamatorio regresa a la normalidad cuando el proceso se controla; subsecuentemente el sistema se restablece en respuesta al daño generado (Woolf & Salter, 2000).

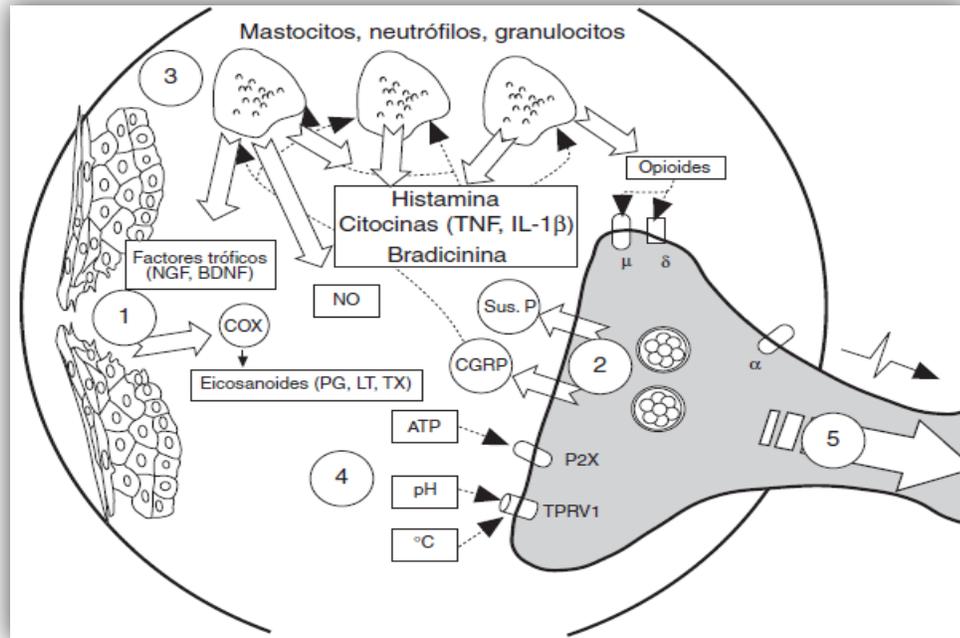


Figura 5. Sensibilización periférica en situaciones de dolor inflamatorio. 1: la lesión origina el envío de información al asta dorsal; 2: liberación de sustancia P y CGRP; 3: liberación de sustancias pronociceptivas e inflamatorias de los mastocitos y los neutrófilos; 4: activación de los receptores vaniloides y sensibles a ATP; 5: transmisión de la señal amplificada al sistema nervioso central (Goicoechea y Martín, 2006).

1.2 Modelos animales para el estudio de la nocicepción

El conocimiento científico concerniente a la percepción del “dolor en animales” es limitado y se ha obtenido por analogías basadas en la anatomía comparativa, fisiología, patología y por inferencias basadas en respuestas subjetivas del dolor (Ortega & Micó, 2006).

Desde un punto de vista general, los investigadores tienen que seguir las recomendaciones dictadas por la IASP en las que se establece que el animal no debe ser visto como un objeto, sino como un ser vivo con sensaciones (Ortega, Roca, & Micó, 2002). También se recomienda minimizar o eliminar de los protocolos el dolor producido a los animales, la evaluación del beneficio potencial que traerá la investigación y en la medida de lo posible que el estímulo nocivo que se va aplicar se lleve en el menor número de animales y que no sea invasivo (Zimmermann, 1983).



Se han desarrollado una gran variedad de modelos experimentales para determinar la actividad antinociceptiva de fármacos en animales de laboratorio con el fin de desarrollar, seleccionar y predecir la actividad farmacológica de analgésicos, así como estudiar y comprender los mecanismos de acción de los fármacos que actúan a nivel periférico y central. La mayoría de los modelos experimentales desarrollados hasta ahora no son ideales (Le Bars et al., 2001). Sin embargo, han sido muy útiles en la farmacología para evaluar y caracterizar efectos analgésicos.

Existen modelos de dolor con estímulos de corta duración que son empleados para producir principalmente dolor somático, en estos se estimula un área superficial mínima con excepción de la prueba “hot plate” (plancha caliente) y “electrified grid” (reja electrificada) y pueden clasificarse de acuerdo a la naturaleza del estímulo en mecánicos, térmicos o eléctricos (Le Bars et al., 2001).

También están los modelos de dolor con estímulos de larga duración que involucran la administración de sustancias algésicas representando una forma lenta o muy lenta de estimulación. Este tipo de estímulo es diferente a los otros tipos de estímulos debido a que son progresivos, de larga duración y ofrecen la ventaja de medir el comportamiento del animal a través del tiempo (Le Bars et al., 2001). En la **tabla 2** se enlistan algunos modelos para el estudio de la nocicepción en animales.

1.2.1 Modelo de formalina

El modelo de formalina se lleva a cabo principalmente en roedores, aunque se han hecho experimentos en gatos, conejos, cobayos, primates, cocodrilos y aves domésticas. Esta prueba se conoce como un modelo de dolor inflamatorio, se basa en la administración de una disolución de formaldehído diluido (formalina), en un intervalo de concentraciones que van del 1 al 5%, y administrando un volumen de 20-25 μL en ratones y 30-100 μL en ratas (Granados et al., 2009).



La inyección se aplica usualmente en la superficie dorsal de la pata posterior derecha y los animales son generalmente sacrificados poco después de terminada la prueba (Wu et al., 2004).

Tabla 2. Principales modelos para estudiar la nocicepción en animales

Modelos de dolor con estímulos de corta duración	Modelos de dolor con estímulos de larga duración
<p>1) Prueba “<i>Tail-Flick</i>” se aplica calor radiante sobre una pequeña superficie en la cola del animal.</p> <p>2) Prueba “<i>Paw Withdrawal</i>” se aplica calor radiante a la pata del animal que se encuentra inflamada debido a una inyección subcutánea de carragenina.</p> <p>3) Prueba “<i>Hot Plate</i>” consiste en introducir a la rata en un espacio cilíndrico con un piso metálico que es calentado por un líquido hirviendo.</p> <p>4) Prueba “<i>Cold Plate</i>” Esta prueba es usada principalmente en modelos de dolor neuropático.</p> <p>5) Pruebas basadas en un estímulo mecánico (aplicación de una presión constante en la cola o pata del animal).</p> <p>6) Pruebas basadas en estímulos eléctricos.</p>	<p>1) Pruebas basadas en estimulación de órganos que sirven para estudiar el dolor visceral (la más conocida es la distensión colorectal).</p> <p>2) Inyección intraperitoneal o “<i>Writhing Test</i>” provoca un comportamiento típico que se caracteriza por contorsión abdominal y reducción de la coordinación y actividad motora.</p> <p>3) Inyección intradermal en esta prueba se utilizan sustancias como la salina hipertónica, EDTA, adyuvante de Freund y capsaicina.</p> <p>4) Prueba de formalina consiste en la administración subcutánea de formalina (formaldehído en un intervalo de concentraciones que van del 1 al 5%). La inyección se da generalmente en la superficie dorsal de la pata posterior derecha.</p>

*Datos recopilados de Ortega & Micó (2006), Gonzalez (2000).

La prueba de formalina describe diferentes comportamientos, entre los que se encuentran el morder (biting), lamer (licking) y sacudir (flinching/shakes) la pata inyectada (Wu et al., 2004).

El modelo presenta dos fases; la primera se presenta del minuto 0 al 5 y se caracteriza por conductas nociceptivas de lamida y sacudida de la pata administrada, siendo este último el parámetro más utilizado para cuantificar el grado de dolor. La segunda fase inicia a los 10 minutos y termina alrededor del minuto 60 (la prueba tiene una duración de 60 minutos aproximadamente) después de la inyección del irritante químico. Durante esta fase también se observan las conductas nociceptivas mencionadas en la primera fase (Veiga et al., 2004).



Se ha sugerido que la nocicepción observada durante la primera fase se debe a la estimulación directa de nociceptores, principalmente fibras C. La segunda fase (tónica o inflamatoria), se atribuye al proceso inflamatorio desencadenado por la histamina, serotonina, prostaglandinas y bradicinina. Es por esta segunda fase que la temperatura es un factor importante de controlar, pues a menor temperatura el proceso de inflamación se desarrolla más lentamente. Se propone una temperatura de 22-23°C para ratones y 25-27°C para ratas (Tjølsen et al., 1992).

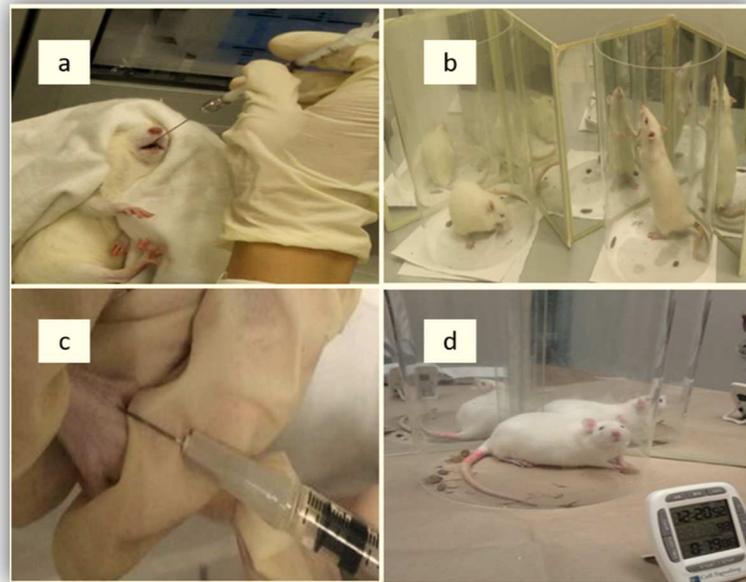


Figura 6. Prueba de formalina. a) Administración oral del fármaco y/o vehículo, b) Se coloca a la rata en el cilindro de acrílico para que se adapte al entorno, c) Inyección subcutánea de la formalina en la pata, d) Evaluación de la conducta nociceptiva en la rata. (Fotos: Lara, I., 2016).

Esta prueba se ve afectada por factores de estrés como son los sonidos, los olores, luz intensa, elevada presión atmosférica o intensa actividad humana en el cuarto durante el período en que se está llevando a cabo la prueba, por lo que se recomienda tener un cuarto exclusivo para la realización de esta prueba o establecer restricciones en cuanto al sonido y nivel de actividad durante la realización de la misma (Rosland, 1991).



1.3 Glicoproteína P

Los transportadores son proteínas de membrana que regulan la entrada de nutrientes esenciales y iones, así como la salida de los productos del metabolismo celular, las toxinas ambientales y otros xenobióticos (Ferreiros, 2009).

En lo referente al transporte de fármacos, los transportadores más representativos son los miembros de dos superfamilias:

- ABC (ATP binding cassette) casete enlazador de trifosfato de adenosina.
- SLC (solute carrier) acarreador de solutos.

La mayor parte de las proteínas ABC corresponden a transportadores activos primarios, que dependen de la hidrólisis de ATP para bombear en forma activa sus sustratos a través de la membrana. Existen 49 genes conocidos como las proteínas ABC, que se pueden agrupar en siete subclases o familias de ABCA a ABCG. Uno de los transportadores mejor conocidos en la superfamilia ABC es la glicoproteína-P la cual tiene un peso de 170 kDa, también es llamada ABCB1, y es codificada por el gen MDR1. Muchos transportadores funcionan como objetivos de los fármacos o bien intervienen en la absorción y disposición de las sustancias farmacológicas (Ferreiros, 2009).

El gen MDR1 se localiza en el brazo largo del cromosoma 7 (7q21), este gen forma parte de una pequeña familia que tiene 2 miembros en los humanos: MDR1 el cual está involucrado en el fenotipo MDR (Resistencia a multidroga, por sus siglas en inglés) (Hennessy & Spiers, 2007), mientras que la proteína codificada por el gen humano MDR2 funciona como fosfatidil translocasa en el hígado (Ruetz & Gros, 1994), en ratas se conocen tres isoformas de esta proteína: *mdr1a*, *mdr1b*, estas confieren el fenotipo MDR y *mdr2* sirve en el transporte hepático de fosfolípidos hacia la bilis (Smit et al., 1993). Algunas isoformas de la gp-P han sido encontradas en otras especies, incluyendo insectos, peces, anfibios, reptiles, aves y mamíferos. Estas isoformas muestran muchas coincidencias estructurales tanto en el humano como en ratas y los productos de estos genes son similares hasta en un 80% (Bauer et al., 2005).



El polimorfismo humano del gen MDR1 puede alterar la expresión y función de la glicoproteína P resultando en una modificación de la farmacocinética y farmacodinamia de las drogas. La familia MDR pertenece a la superfamilia de proteínas ABC especializadas en el transporte celular dependiente de energía, que participa en un amplio rango de eventos como la expulsión de sustancias nocivas, secreción de toxinas y movilización de iones y péptidos (Ambudkar et al., 2003).

1.3.1 Estructura de la glicoproteína P

La molécula de glicoproteína P consiste en dos mitades homólogas (dímero), unidas entre sí. Cada mitad de molécula presenta seis dominios hidrofóbicos transmembranales unidos, dispuestos en tres pares y asociados con un dominio hidrofílico C-terminal que contiene la secuencia consenso de unión e hidrólisis del ATP (**Figura 7**) (Aller et al., 2009).

La secuencia de aminoácidos contiene un extenso segmento hidrofóbico en el extremo N-terminal. Los segmentos transmembrana, en la membrana plasmática están orientados de forma que el extremo C-terminal se sitúa en el lado citoplasmático de la membrana (Zhou, 2008).

Los tres pares de segmentos transmembrana están separados por largas cadenas de aminoácidos en la cara citoplásmica de la membrana y cortas cadenas en la superficie celular. Además, la molécula presenta una cadena externa de carbohidratos, situada sobre la cadena exterior de aminoácidos que une a los primeros segmentos transmembrana, cerca del extremo N-terminal (Hennessy & Spiers, 2007).

Al menos 20 kDa de los 170-180 kDa de la proteína corresponden a carbohidratos. Existen evidencias que aseguran que la porción exterior de carbohidratos no interviene en el transporte de drogas o en su reconocimiento (Sharom, 2011).

El estudio de las secuencias de la glicoproteína P muestra una estructura altamente conservada en la porción transmembrana N-terminal, la cual contiene



las características de un dominio en forma de canal. Los dominios intracitoplasmáticos de unión e hidrólisis del ATP forman un poro y actúan conjuntamente en el transporte activo de drogas al exterior celular. Esta proteína actúa como una bomba extrusora dependiente de energía. El eflujo se realiza a través del poro directa o indirectamente, tras la unión a moléculas transportadoras que pueden ser péptidos o proteínas (Ferreiros, 2009).

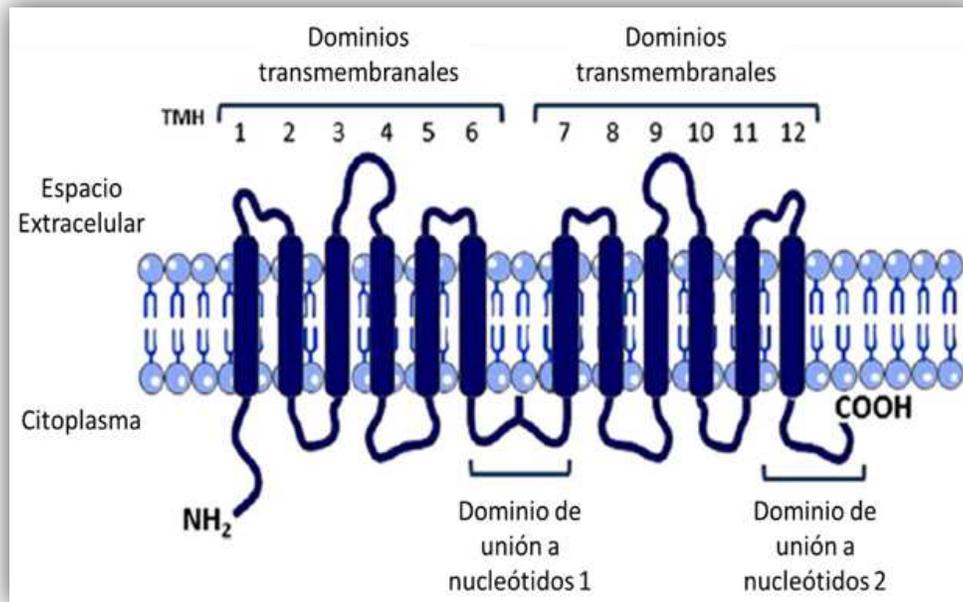


Figura 7. Estructura tridimensional de la glicoproteína-P. Esta molécula presenta una región formada por doce subunidades ancladas en la membrana. En el centro de esta porción se sitúa un canal por donde se extruyen los fármacos. Además, presenta una porción intracelular donde radica la actividad ATPasa y una cadena extracelular de carbohidratos (Modificado de Silva et al, 2015).

La gp-P forma un canal en la membrana plasmática y transporta drogas fuera de la célula usando la energía derivada de la hidrólisis del ATP. Cada mitad de la molécula no actúa independientemente en el transporte de drogas, ya que la inactivación de uno o dos puntos de unión e hidrólisis del ATP conlleva a la pérdida de su actividad (Ferreiros, 2009).

El mecanismo exacto por el cual la gp-P extruye sustratos del citoplasma, aún no se conoce bien, se han desarrollado diferentes teorías para explicar esto, la



primera tiene parecido a la interacción que tiene una enzima con su sustrato, en la cual el sustrato de la gp-P se une a una región citoplasmática de esta, que resulta en un cambio conformacional de la proteína siendo este mecanismo dependiente de energía, y así se expulsa la sustancia hacia el exterior de la membrana plasmática (Jones & George, 1998).

Otra propuesta alternativa es el modelo de la “*flipasa*”, el cual explica que se necesita un bajo índice de movimiento espontáneo de los sustratos entre los dos partes de la bicapa para generar un gradiente de concentración del sustrato, para que esto ocurra el sustrato tiene que estar localizado en el centro hidrofóbico de la membrana plasmática y así pueda ser expulsado del interior de la membrana hacia el espacio extracelular o al contrario (Hennessy & Spiers, 2007) (Varma et al., 2003).

En otro modelo llamado “hydrophobic vacuum cleaner” que tiene como principio que la gp-P reconoce compuestos hidrofóbicos que se encuentran en el interior de la bicapa lipídica y los expulsa fuera de la membrana directo al medio acuoso externo (Higgins, 1992). Esta acción origina un gradiente de concentración a través de la membrana plasmática y una alta concentración del fármaco o sustrato en el exterior de la célula. Siendo estos dos últimos modelos son los dos más aceptados (Sharom, 2011).

1.3.2 Sustratos exógenos y endógenos de la glicoproteína P

La gp-P puede transportar una amplia gama de compuestos fuera de la célula, estos son química, estructural y farmacológicamente diferentes, por lo cual es difícil identificar características en común (Ueda et al., 1997).

Estos sustratos se pueden dividir en exógenos entre los que se encuentran fármacos quimioterapéuticos, bloqueadores de los canales de calcio, esteroides, péptidos lineales y cíclicos, colorantes fluorescentes, pesticidas, antidepresivos, entre muchos otros (**Tabla 3**) (Ueda et al., 1997; Seeling, 1998; Kim, 2002; Varma



et al., 2003; Hennessy & Spiers, 2007; Zhou, 2008; Sharom, 2011) y sustratos endógenos que varían en tamaño, estructura y función, y van desde moléculas pequeñas, como cationes orgánicos, carbohidratos y aminoácidos, hasta macromoléculas tales como polisacáridos y proteínas (Zhou, 2008). La mayoría de estos sustratos son débilmente anfipáticos y relativamente hidrofóbicos (en algunos casos, no siempre), además pueden contener anillos aromáticos y un átomo de nitrógeno cargado positivamente (Sharom, 2011).

Tabla 3. Diversos sustratos exógenos y endógenos conocidos de la gp-P

Exógenos	Ejemplos
Analgésicos opioides	Morfina, fentanil
Antiarrítmicos	Quinidina, verapamil
Agentes anticancerígenos	Alcaloides de la vinca, taxanos
Antidepresivos	Amitriptilina, doxepina
Agentes antidiarreicos	Loperamida
Antieméticos	Ondansetrón, domperidona
Antiepilépticos y anticonvulsionantes	Fenitoína, carbamazepina
Agentes antihiperuricémicos	Colchicina
Antihelmínticos	Ivermectina
Antihistamínicos	Terfenadina, fexofenadina
Agentes contra VIH	Nelfinavir, ritonavir
Antihipertensivos	Reserpina, losartán
Agentes antimicrobianos	Eritromicina, doxiciclina
Bloqueadores de canales de calcio	Nifedipina, verapamil
Antagonistas de calmodulina	Trifluoperazina, trans-flupentixol
Glicósidos cardíacos	Digoxina, digitoxina
Agentes para bajar colesterol	Lovastatina, simvastatina
Péptidos cíclicos	Valspodar (PSC833), beauvericina
Colorantes fluorescentes	Rhodamina 123, Hoechst 33342
Antagonistas de histamina	Cimetidina, ranitidina
Agentes inmunosupresores	Ciclosporina A, tacrolimus
Péptidos lineares	Leupeptina, pepstatina A
Productos naturales	Flavonoides, curcuminoides
Neurolépticos	Clorpromazina, fenotiazina
Pesticidas	Metil-paratión, endosulfán
Relajantes musculares	Vecuronio
Endógenos	Ejemplos
Hormonas esteroides	Aldosterona, cortisol, cortisona
Péptidos	β -amiloide, leupeptina
Endorfinas	β -endorfina

*Datos recopilados de Kim (2002), Matheny et al. (2001), Morrissey et al. (2012), Sharom (2011), Zhou (2008).



1.3.3 Inhibidores de la glicoproteína P

Los inhibidores de la gp-P actúan por tres mecanismos diferentes: a) bloqueando el sitio de unión al sustrato ya sea por inhibición competitiva, no competitiva e inhibición alostérica (Varma et al., 2003), b) interfieren en la hidrólisis del ATP, necesario para su función de transporte (Shapiro & Ling, 1997) y c) alterando la integridad de los lípidos en la membrana celular (Drori et al., 1995).

Algunos inhibidores que actúan bloqueando competitivamente el sitio de unión al sustrato son el verapamil (bloqueador de canales de calcio) y la ciclosporina A (inmunosupresor), la presencia de múltiples sitios de unión a la glicoproteína complica la comprensión del mecanismo y obstaculiza llegar a una conclusión de la relación que existe entre la estructura y la actividad de los sustratos y los inhibidores de la gp-P (Tsuruo et al., 1981). Entre los compuestos que inhiben la hidrólisis del ATP se encuentra la quercetina (flavonoide). Finalmente los agentes químicos como los surfactantes entre los que se encuentran el dodecilsulfato sódico, el Tween 20 y el Span 80 están clasificados como inhibidores de la gp-P porque alteran la integridad de los lípidos en la membrana celular lo que impide la fluidez de la membrana (Prakash, 2010), y altera la conformación de las proteínas transmembranales, por lo tanto ocurren modificaciones en las estructuras secundaria y terciaria lo que hace que la gp-P pierda su función (Varma et al., 2003).

El fenómeno de la resistencia a multidroga se ha venido estudiando ya que es necesario comprender esto para que los tratamientos médicos como las quimioterapias puedan ser efectivas y así ayudar a la mejora de los pacientes con cáncer, pero antes es necesario comprender y estudiar el mecanismo de inhibición de la gp-P, ya que tanto puede traer beneficios en la innovación de terapias, pero también podría ser perjudicial, un ejemplo de esto es la inhibición de la gp-P a nivel de SNC, que se asocia a un aumento de la concentración tisular de determinados fármacos (Higgins, 2007).



Se han encontrado varios inhibidores de la gp-P (**Tabla 4**) y aún siguen siendo estudiados los mecanismos por los cuales actúan y lo que puede causar la inhibición de esta glicoproteína, ya que se puede usar tanto para mejorar alguna terapia en el caso de algún tratamiento para un tipo de cáncer o en alguna infección en la cual se necesite llegar a SNC, en estos casos se requiere reducir la actividad de esta proteína para que los fármacos deseados puedan actuar sobre el órgano deseado, aunque también se deben tomar precauciones ya que al igual que puede contribuir a mejorar alguna terapia, también puede ser perjudicial para la salud, porque como se mencionó anteriormente esta glicoproteína actúa protegiendo al cuerpo de sustancias ajenas a él y elimina fármacos para que no alcancen concentraciones tóxicas en el cuerpo (Cannon et al., 2012).

Tabla 4. Sustancias comúnmente involucradas en procesos de inhibición de la glicoproteína P

Amitriptilina	Eritromicina
Astemizol	Fluoperazina
Carvediol	Atorvastatina
Claritromicina	Haloperidol
Verapamil	Ketoconazol
Diltiazem	Nifedipina
Disulfiram	Ritonavir

*Datos recopilados de Kim (2002).

Un ejemplo de esto es la administración de quinidina que es un inhibidor de la gp-P la cual se administra junto con un sustrato de la gp-P, en este caso loperamida, esto produce una depresión respiratoria en voluntarios sanos, a pesar de que no se presentan cambios en las concentraciones plasmáticas de loperamida. La base de esta interacción se explica porque la quinidina inhibe a la gp-P en la BHE resultando en un aumento de la penetración de la loperamida en el SNC (Cannon et al., 2012). Sin embargo, también debe tomarse en cuenta que las variaciones individuales determinadas genéticamente en la función transportadora, pueden contribuir a las diferencias interindividuales en los efectos terapéuticos y adversos a los fármacos (Cannon et al., 2012).



1.3.4 Inductores de la glicoproteína P

Aunque la gp-P está constitutivamente expresada de una manera específica en células y tejidos (Zhou, 2008), puede ser inducida por muchos fármacos. En la literatura ya han sido descritos varios inductores conocidos de la gp-P, así como los modelos y métodos experimentales utilizados en el estudio de cada uno de ellos (Chin et al., 1990; Chaudhary & Roninson, 1993; Fardel et al., 1997; Nielsen et al., 1998; Hu et al., 1999; Tian et al., 2005; Kageyama et al., 2006; Harmsen et al., 2009).

El análisis que se ha realizado sobre los inductores de la gp-P destaca su enorme diversidad estructural, lo que sugiere una vez más la presencia de diferentes vías de señalización capaces de regular la transcripción de MDR1, así como su capacidad para responder a una gran diversidad de estímulos químicos internos o externos (por ejemplo, fármacos, citocinas, radicales libres, genes supresores de tumores, etc.) y a otros factores ambientales, como la radiación por rayos X o la radiación con rayos UV (Chin et al., 1990; Kioka et al., 1992; Miyazaki et al., 1992; Uchiumi et al., 1993; Zastawny et al., 1993; Ohga et al., 1998; Zhou, 2008). En la **Tabla 5** se muestran algunos fármacos que son inductores de la gp-P.

Tabla 5. Fármacos comúnmente involucrados en procesos de inducción de la glicoproteína P

Amprenavir	Ácido retinóico
Clotrimazol	Rifampicina
Dexametasona	Fenotiazina
Indinavir	Saquinavir
Morfina	Verapamilo
Nelfinavir	Tacrolimus

*Datos recopilados de Chin et al. (1990), Kioka et al. (1992), Miyazaki et al. (1992), Uchiumi et al. (1993), Zastawny et al. (1993), Ohga et al. (1998), Zhou (2008).



1.4 Ketoconazol

El ketoconazol es un fármaco antifúngico de la familia de los imidazoles, activo por vía oral. La formulación oral está disponible en E.U.A. desde 1981. El ketoconazol es el único miembro de la clase del imidazol que se usa actualmente para el tratamiento de infecciones sistémicas (Sánchez et al., 1999).

Este antifúngico es un compuesto lipofílico, propiedad que le permite encontrarse en concentraciones altas en los tejidos adiposos aunque sus concentraciones en el fluido cerebroespinal son pobres en presencia de inflamación. Su absorción oral y solubilidad es óptima a pH ácido gástrico (Sánchez et al., 1999).

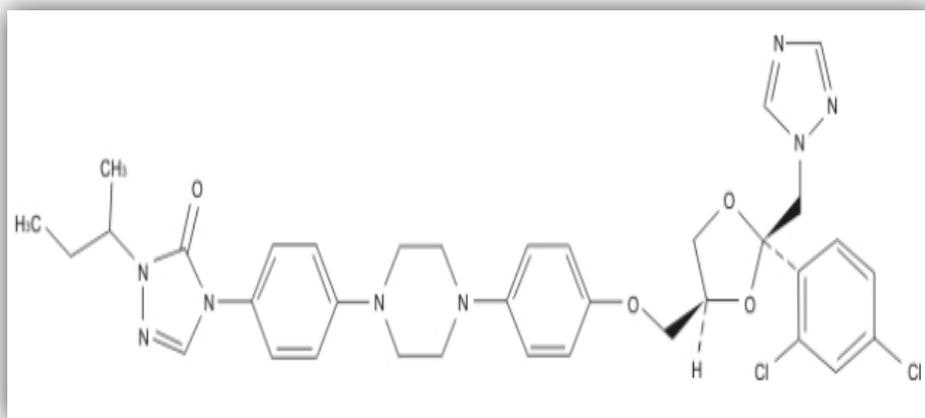


Figura 8. Estructura química de ketoconazol (Gregorí Valdés, 2005).

1.4.1 Mecanismo de acción de ketoconazol

De la misma manera que otros antifúngicos imidazólicos, el ketoconazol ejerce su efecto alterando la síntesis de la membrana celular de los hongos. La inhibición de la síntesis de ergosterol produce inestabilidad de la membrana con aumento de la permeabilidad celular y fugas del contenido de las células (**Figura 9**) (Como & Dismukes, 1994).

En el hombre, el ketoconazol inhibe la síntesis de los esteroides, incluyendo la aldosterona, el cortisol y la testosterona. En dosis de 200 a 400 mg/día, el ketoconazol ya inhibe la secreción de testosterona y en dosis de 400 a 600 mg/día



las del cortisol. El ketoconazol actúa en varios de los pasos de la síntesis de los esteroides, y ha sido utilizado con cierto éxito para tratar el cáncer de próstata avanzado (Centro colaborador de la Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica ANMAT Argentina, 2012).

El ketoconazol inhibe principalmente la actividad de la 17- α -hidroxilasa; también inhibe los pasos de 11-hidroxilación y, a dosis más altas, inhibe la enzima de escisión de la cadena lateral del colesterol. Además, es un potente inhibidor de la síntesis de andrógenos; inhibe la actividad de la C17-20 liasa en las glándulas suprarrenales y en las células de Leydig (Agencia Europea de Medicamentos, 2017).

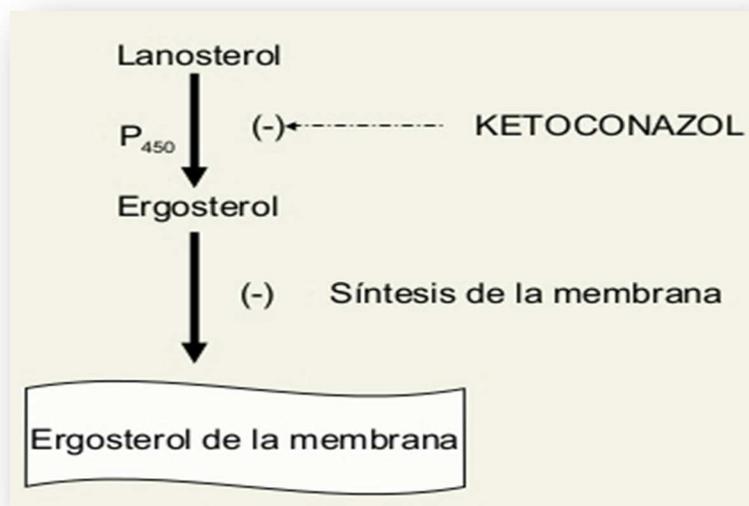


Figura 9. Mecanismo de acción de ketoconazol. El ketoconazol inhibe la síntesis de ergosterol, al interaccionar con la 14-alfa-desmetilasa, una enzima del citocromo P-450 que es necesaria para la conversión del lanosterol a ergosterol, un componente esencial de la membrana de los hongos. (Como & Dismukes, 1994).

1.4.2 Farmacocinética de ketoconazol

El ketoconazol es una sustancia débilmente dibásica y, por eso, precisa de acidez para su disolución y absorción. La $C_{m\acute{a}x}$ y el ABC (área bajo la curva) aumentan proporcionalmente con la dosis. In vitro, la unión a proteínas plasmáticas es de en



torno a un 99%, principalmente a la fracción albúmina. El ketoconazol se distribuye ampliamente por los tejidos; no obstante, sólo una proporción despreciable de ketoconazol llega al líquido cefalorraquídeo (Agencia Europea de Medicamentos, 2017).

El ketoconazol es metabolizado ampliamente, formándose gran cantidad de metabolitos inactivos. En estudios llevados a cabo in vitro, se ha demostrado que CYP3A4 es la principal enzima que participa en su metabolismo. Las principales vías metabólicas identificadas son la oxidación y la degradación de los anillos de imidazol y piperazina, la O-desalquilación oxidativa y la hidroxilación aromática. El ketoconazol es un potente inhibidor de CYP3A4 y de la gp-P (Centro colaborador de la Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica ANMAT Argentina, 2012).

Tabla 6. Parámetros farmacocinéticos de KCZ en humanos y en ratas

Humanos				Ratas (Wistar macho, edad 60 días)				
Parámetros farmacocinéticos								
Dosis	C _{max} (µg/mL)	T _{max} (h)	t _{1/2} (h)	ABC (µg·h/mL)	Dosis	Cl (mL/min/kg)	t _{1/2} (h)	ABC (µg·h/mL)
200 mg (Vía oral)					10 mg/Kg	9.05±1.07	1.01±0.28	18.61±2.12
*En el parámetro ABC 200 mg a 1200 mg	3.5	1 a 2	2	*1,7 a 15,6	20 mg/Kg	7.58±3.78	1.07±0.20	52.22±22.62
					40 mg/Kg	2.11±0.22	1.17±0.15	317.08±30.51

*Datos recopilados de Hamdy & Brooks (2009), Centro colaborador de la Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica ANMAT Argentina (2012).

La semivida del ketoconazol aumenta con la dosis y con la duración del tratamiento. En torno al 13% de la dosis se excreta en la orina, y de dicha excreción del 2% a 4% es el fármaco sin modificación alguna. El ketoconazol se absorbe rápidamente en el tubo digestivo, se metaboliza parcialmente en el hígado y se elimina principalmente con la bilis y las heces (OMS, 2017).

De acuerdo al perfil farmacocinético observado en ratas (Hamdy & Brooks, 2009) no se observa diferencia considerable con las dosis de 40, 50 y 80 mg/kg. Esto



significa que dosis mayores a 40 mg/kg no incrementa sustancialmente los niveles plasmáticos de ketoconazol y por lo tanto no se esperarían efectos farmacológicos mayores.

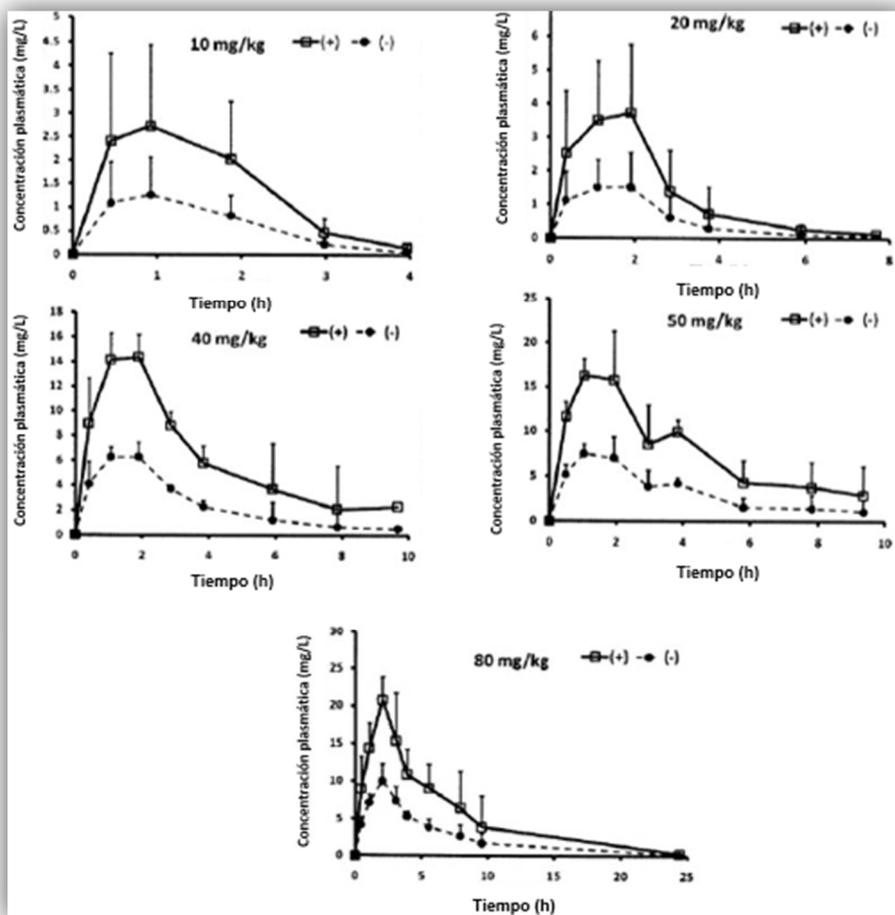


Figura 10. Concentración plasmática media de los enantiómeros de KCZ en función del tiempo. Se dieron dosis racémicas orales de 10, 20, 40, 50 ó 80 mg/kg. Enantiómero positivo (+) y enantiómero negativo (-) (n= 4 ratas por grupo de dosis (Hamdy & Brocks, 2009).

1.5 RIFAMPICINA

La rifampicina es un antibiótico bactericida del grupo de las rifamicinas. Es un componente semisintético derivado de la bacteria *Amycolatopsis rifamycinica*. Dentro de la literatura la rifampicina puede ser abreviada como RIF, RMP, RD, RA o R. Se usa con otros medicamentos para tratar la tuberculosis o para tratar infecciones de *Neisseria meningitis* (un tipo de



bacteria que puede provocar una infección grave llamada meningitis) en la nariz o la garganta (Trevor et al., 2004).

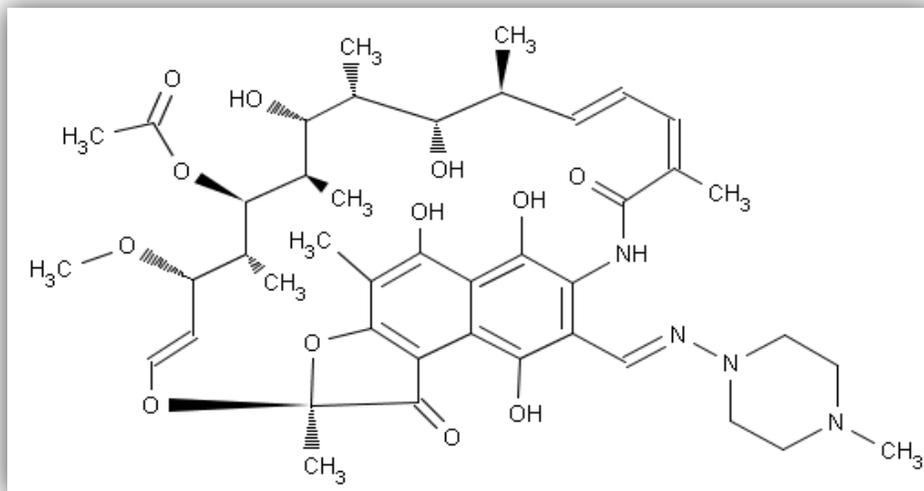


Figura 11. Estructura química de la rifampicina (López Tricas, 2015).

1.5.1 Mecanismo de acción de rifampicina

La rifampicina se une a la subunidad beta de la DNA-polimerasa RNA-dependiente, impidiendo que esta enzima se una al DNA, bloqueando la transcripción del RNA. La rifampicina no se une a las polimerasas de las células eucarióticas de tal manera que la síntesis del RNA humano no es afectada. La rifampicina es bacteriostática o bactericida según las concentraciones que alcance en su lugar de acción y de la susceptibilidad del microorganismo. La rifampicina es eficaz frente a microorganismos en fase de división rápida en las lesiones cavitarias y también frente a los que se dividen lentamente, como los que se encuentran en las lesiones caseosas (tipo de necrosis característica en inflamaciones granulomatosas) y en los macrófagos (Centro Colaborador de la administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica, 2012).

La rifampicina induce la actividad enzimática microsomal aumentando el metabolismo y la excreción urinaria de los ácidos biliares y ha sido utilizada para aliviar el prurito secundario a la colestasis asociada a la cirrosis biliar (Velasco et al., 2004).



1.5.2 Farmacocinética de rifampicina

La rifampicina se administra por vía oral o intravenosa. Después de la administración de una dosis oral, se absorbe rápidamente. Los alimentos afectan tanto la rapidez como la extensión de la absorción. El fármaco se distribuye muy bien en la mayoría de los órganos y tejidos incluyendo los pulmones, el hígado, el hueso, saliva y los fluidos peritoneal y pleural. Atraviesa las meninges inflamadas alcanzando unos niveles en el líquido cefalorraquídeo que son el 10-20% de los presentes en el plasma. También atraviesa la barrera placentaria y se excreta en la leche materna (Goodman & Gilman, 2012).

La rifampicina se metaboliza en el hígado a desacetil-rifampicina, un metabolito que también posee actividad antibacteriana. La rifampicina experimenta una circulación enterohepática con una reabsorción significativa. En su mayoría, la rifampicina y su metabolito desacetilado son eliminados en las heces hasta en un 60% siendo un 30% aproximadamente eliminado en la orina (Velasco et al., 2004).

Tabla 7. Parámetros farmacocinéticos de RIF en humanos

Parámetro farmacocinético	Valor
Unión a proteínas (%)	85
Biodisponibilidad después de la administración oral (%)	68
$t_{\text{máx}}$ (hrs)	1.5-2.0
$C_{\text{máx}}$ total ($\mu\text{g/mL}$)	8-20
$C_{\text{máx}}$ del fármaco libre ($\mu\text{g/mL}$)	1.5
$t_{1/2}$ (hrs)	2-5

*Datos recopilados de Goodman & Gilman (2012).



2. HIPÓTESIS

- La administración de un inhibidor (KCZ) y de un inductor (RIF) de la gp-P modificará la respuesta nociceptiva en el modelo murino de formalina.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

- Evaluar el efecto que produce la administración de un inhibidor y un inductor de la gp-P, mediante un modelo murino de formalina para determinar como se modifica la respuesta nociceptiva

3.2 Objetivos particulares

- Determinar el efecto que produce sobre la nocicepción, la administración de una dosis única por vía oral de ketoconazol (inhibidor de gp-P), rifampicina (inductor), diclofenaco (control positivo) y el vehículo utilizado (control negativo) en el modelo murino de formalina.
- Determinar el efecto que produce sobre la nocicepción la administración de una dosis única por vía subcutánea en el sitio de la lesión de ketoconazol (inhibidor de gp-P), rifampicina (inductor), y el vehículo utilizado en el modelo murino de formalina.



4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Desarrollo experimental

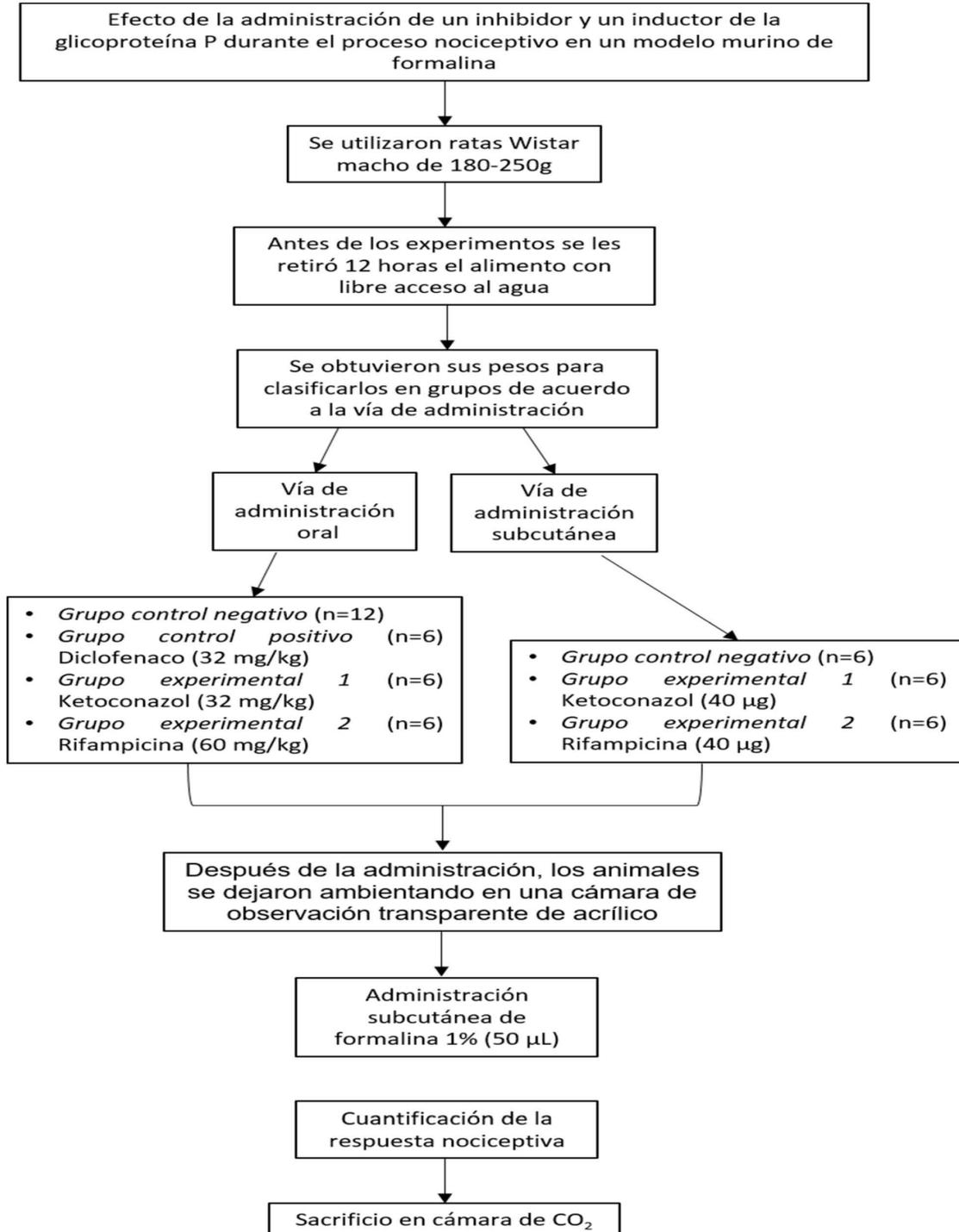


Figura 12. Diagrama de flujo del desarrollo experimental.



4.2 Animales

Se utilizaron ratas Wistar machos con un peso de 180-250 g provenientes del bioterio del Instituto Nacional de Perinatología. Se mantuvieron en un cuarto con temperatura controlada ($22 \pm 1^\circ\text{C}$). Todos los experimentos se realizaron de acuerdo con las guías sobre aspectos éticos para la investigación de dolor experimental en animales (IASP, 1983).

4.3 Materiales

- Agujas
- Jeringas de 1, 3 y 5 mL
- Cronómetros
- Cilindros
- Espejos
- Contadores manuales de 4 dígitos
- Cánula intragástrica de metal
- Cámara de observación transparente de acrílico (Plexiglas) de 20 cm de diámetro y 30 cm de altura durante 30 minutos
- Cámara de CO₂
- Balanza granataria con canastilla
- Jaulas para animales

4.4 Fármacos y reactivos

- Ketoconazol (USP)
- Rifampicina (Rifadin®, suspensión de 20 mg/mL)
- Diclofenaco sódico (USP)
- Formaldehído grado reactivo
- Solución salina isotónica

4.5 Prueba de formalina

Se inició con la administración de los fármacos en estudio, después la rata se colocó en una cámara de observación transparente de acrílico de 20 cm de diámetro y 30 cm de altura durante (esto le permite al animal adaptarse a su



entorno), cabe mencionar que a cada fármaco se le dio un tiempo determinado antes de la inyección subcutánea de formalina; en los casos de ketoconazol y rifampicina se administraron 45 minutos antes de la formalina y diclofenaco se administró quince minutos antes.

Adicionalmente, en los experimentos para determinar el posible efecto local, los fármacos en estudio se administraron subcutáneamente a concentraciones terapéuticas en un volumen de 50 μ L, 30 minutos antes a la inyección de formalina. Después de este periodo de tiempo se les administró de manera subcutánea 50 μ L de formalina (solución de formaldehído al 1% en solución salina isotónica) en el dorso de la pata posterior derecha utilizando una aguja para insulina. Enseguida a la administración, la rata se colocó nuevamente en el interior del cilindro de acrílico. En la parte trasera de estos cilindros previamente se colocaron dos espejos de 30 x 30 cm cada uno formando un ángulo de 45° entre ellos para facilitar la observación de la pata inyectada. Se cuantificó el número de sacudidas de la pata inyectada de la rata, en intervalos de 1 minuto cada 5 minutos hasta completar 60 minutos después de la inyección con ayuda de contadores manuales. La prueba se realizó en un intervalo de temperatura de 25 a 27°C (temperatura estandarizada en el laboratorio). Al final del experimento los animales se sacrificaron en una cámara de CO₂.

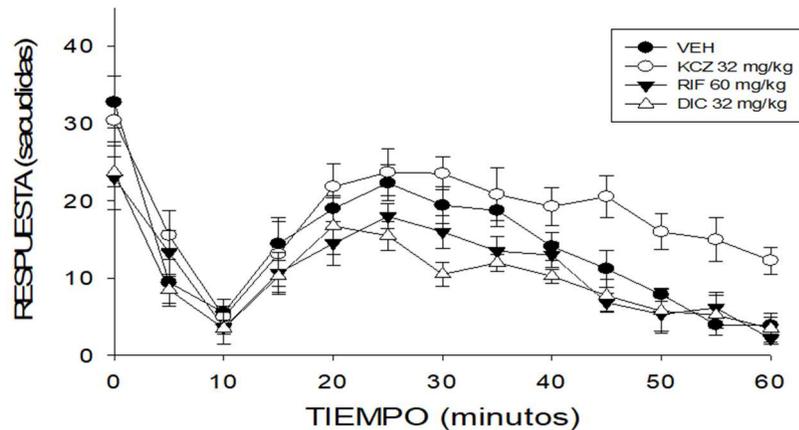
5. RESULTADOS

5.1 Efecto nociceptivo del ketoconazol y rifampicina vía oral

La inyección intraplantar de formalina produjo la conducta típica de sacudidas caracterizada por el retiro breve y rápido o la flexión de la pata inyectada (Lázaro-Ibáñez, Torres-López, & Granados-Soto, 2001). Cuando se graficó el número de sacudidas en función del tiempo se obtuvieron gráficas donde se distingue la conducta bifásica característica de este modelo (Tjølsen, Berge, Hunskaar, Rosland, & Hole, 1992). Además, se comparó el comportamiento del grupo control con los otros tratamientos administrados por vía oral (ketoconazol (KCZ), rifampicina (RIF) y diclofenaco (DIC) como control positivo para confirmar el efecto

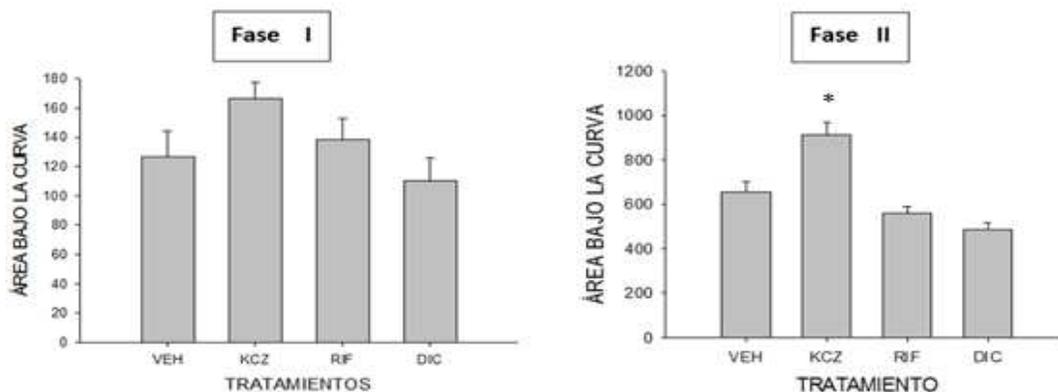


analgésico de este fármaco. En la **gráfica 1** se observa que el grupo con mayor número de sacudidas por minuto fue el de KCZ, seguido del grupo control, después el grupo de RIF y por último el de DIC.



Gráfica 1. Relación tiempo-respuesta de los tratamientos evaluados por vía oral. Vehículo (VEH), Ketoconazol (KCZ), Rifampicina (RIF), Diclofenaco (DIC).

Posteriormente se obtuvieron las **gráficas 2 y 3**, del área bajo la curva para la fase I y II. Es posible diferenciar las dos fases del modelo así como un perfil de sacudidas mayor en las ratas que recibieron ketoconazol en comparación con las que recibieron rifampicina, diclofenaco e incluso el grupo que recibió el vehículo únicamente.

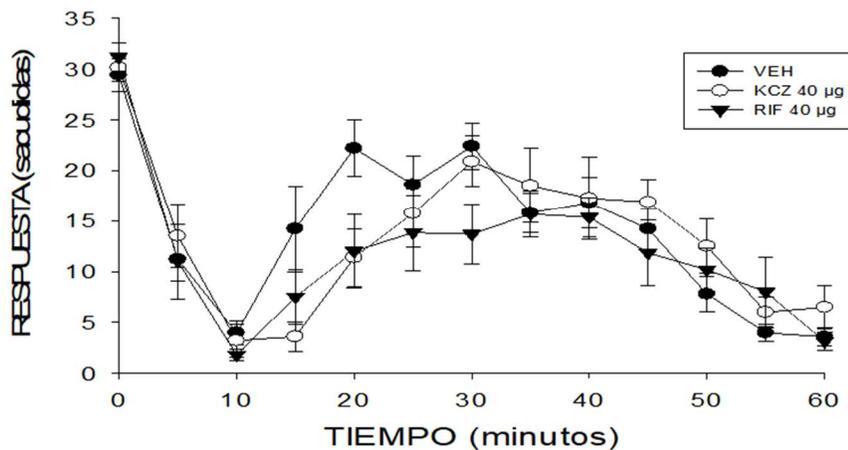


Gráficas 2 y 3. Área bajo la curva del efecto producido por los tratamientos evaluados por vía oral durante la fase I y II. Vehículo (VEH), Ketoconazol (KCZ), Rifampicina (RIF), Diclofenaco (DIC). *Diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) con respecto al grupo VEH mediante prueba de análisis de varianza de una vía seguida de una prueba de Tukey.

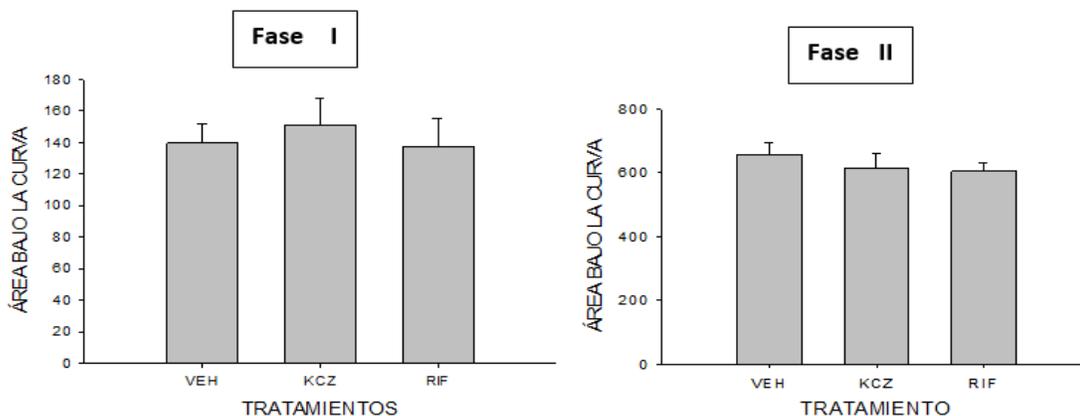


5.2 Efecto nociceptivo del ketoconazol y rifampicina vía subcutánea

En la **gráfica 4** se hizo la comparación de ambos tratamientos administrados por vía subcutánea (RIF y KCZ), donde se administró una dosis única del fármaco (40 μ g). Como se puede observar en las **gráficas 5 y 6** del área bajo la curva, durante la primera y segunda fase en la respuesta con KCZ y RIF no se encontraron diferencias estadísticamente significativas.



Gráfica 4. Relación tiempo-respuesta de tratamientos administrados por vía subcutánea. Vehículo (VEH), Ketoconazol (KCZ), Rifampicina (RIF).

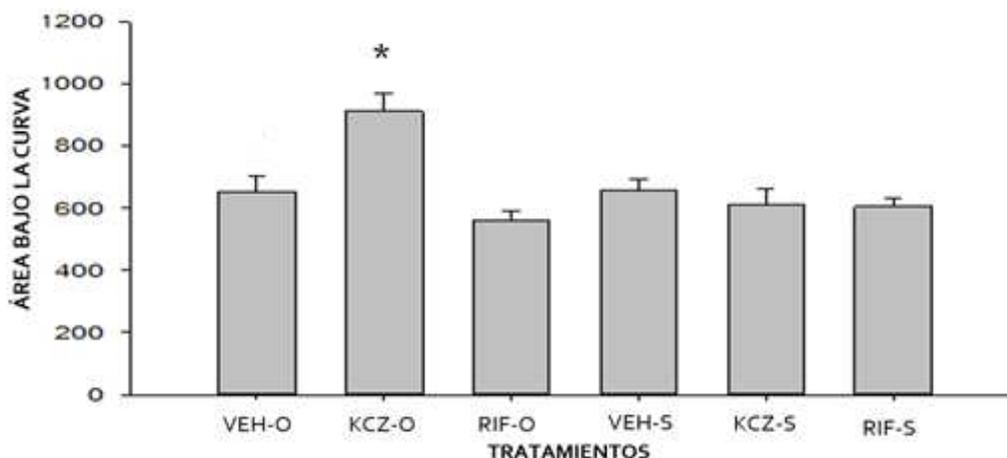


Gráficas 5 y 6. Área bajo la curva del efecto producido por los tratamientos evaluados por vía subcutánea durante la fase I y II. Vehículo (VEH), Ketoconazol (KCZ), Rifampicina (RIF). *No se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) con respecto al grupo VEH mediante prueba de análisis de varianza de una vía seguida de una prueba de Tukey.



5.3 Comparación de los tratamientos administrados por vía oral y vía subcutánea

Por último, se obtuvo el área bajo la curva de ambos tratamientos (KCZ y RIF) administrados por vía oral y vía subcutánea, donde se puede observar un incremento en la respuesta nociceptiva en el tratamiento de KCZ administrado vía oral, en el caso de la RIF su comportamiento nociceptivo fue menor a comparación del grupo administrado sólo con el vehículo. Y en los grupos experimentales administrados por vía local no se observan diferencias significativas en ninguno de los tres tratamientos.



Gráfica 7. Área bajo la curva durante la fase II del efecto producido por los tratamientos evaluados por ambas vías de administración; oral (O) subcutánea (S), Vehículo (VEH), Ketoconazol (KCZ), Rifampicina (RIF). *Diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) con respecto al grupo VEH mediante prueba de análisis de varianza de una vía seguida de una prueba de Tukey.

6. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En la prueba de formalina la conducta dolorosa después de la inyección intraplantar fue bifásica: la fase 1 inició inmediatamente después de la inyección del irritante (0-10 min), mientras que la fase 2 comenzó después de los 15 minutos, con una respuesta máxima entre los 20-35 minutos. La fase 1 y 2 se consideran dolor neurogénico e inflamatorio, respectivamente. A la fecha, la evidencia experimental farmacológica y electrofisiológica sugiere que la fase 1 es por una acción directa de la formalina sobre los nociceptores (Dickenson &



Sullivan, 1987) (Puig & Sorkin, 1995) y la liberación inmediata de mediadores químicos. La fase 2 es el resultado de una combinación de eventos periféricos y centrales. Se ha descrito que hay cambios en la actividad neuronal en el asta dorsal de la médula espinal con evolución temporal similar a la conducta dolorosa observada (Dickenson & Sullivan, 1987) (Puig & Sorkin, 1995). Sin embargo, se requiere del estímulo periférico para el desarrollo de la segunda fase y está asociado con la liberación de diferentes mediadores inflamatorios a nivel periférico y espinal.

En este estudio se utilizaron dos compuestos con afinidad sobre la gp-P, ketoconazol y rifampicina, inhibidor e inductor, respectivamente, se han descrito por tener una fuerte afinidad por la gp-P. La decisión de utilizar estos compuestos obedece a que hasta nuestro conocimiento no se han estudiado en modelo de formalina ni se han descrito efectos antinociceptivo o pronociceptivo.

6.1 Efecto de la administración de rifampicina sobre el desarrollo de nocicepción

En el grupo en el que se administró RIF (en una dosis de 60 mg/kg), por vía oral aun cuando se observó una ligera disminución en el ABC del número de sacudidas de la pata de las ratas, esto podría indicar un modesto efecto antinociceptivo. Sin embargo, estadísticamente el efecto no fue significativo.

Teóricamente, un inductor de gp-P podría producir un efecto antinociceptivo lo cual fue escasamente observado en este estudio. La explicación al respecto pueda ser relacionada con la dosis administrada, probablemente se requieran dosis únicas mayores, o bien, una exposición repetida en días consecutivos de manera previa al experimento de formalina. Por otra parte, tampoco se observó efecto cuando se administró RIF a nivel local.



6.2 Efecto de la administración de ketoconazol sobre el desarrollo de nocicepción

Diversos estudios de biología molecular, inmunocitoquímica y bioquímica (Stamatovic et al., 2008) muestran que las células del endotelio cerebral, poseen una amplia variedad de enzimas metabólicas (ej. fosfatasa alcalina, enzimas citocromo P450, glutatión transferasa) y proteínas de eflujo transportadoras dependientes de energía (ej. gp-P), que son importantes para un mecanismo de protección en la BHE (Bauer et al., 2005; Stamatovic et al., 2008).

La gp-P se expresa en el parénquima cerebral (ej. astrocitos y microglía) al igual que en la BHE, su función es prevenir la acumulación de compuestos peligrosos en el cerebro, mediante la eliminación activa de ellos desde este órgano hacia la circulación periférica (Davis et al., 2014).

Además, en varios artículos está reportada la localización de la gp-P en capilares de cerebro de rata, así como el uso de modelos *in vitro* de la BHE, también se han utilizado líneas celulares inmortales como la de endotelio cerebral de rata (RBE4) (Croop et al., 1989) y los análisis por Western blot, en esta misma línea celular han logrado revelar una banda de peso molecular de entre 170-180 kDa, un tamaño previamente reportado para la gp-P (Davis et al., 2014). También, se han realizado análisis inmunohistoquímicos empleando anticuerpos monoclonales, demostrando así la presencia de la gp-P en la membrana plasmática, en las vesículas y en la envoltura nuclear de las células del endotelio cerebral de rata tanto *in vitro* como *in vivo*. Por lo tanto, los diferentes sitios en donde ha sido identificada la gp-P, sugieren que juega un papel importante en la distribución de sustratos a nivel subcelular en el cerebro (Croop et al., 1989).

Se sabe que algunos factores pueden regular la expresión de la gp-P, entre ellos se encuentran el estrés oxidativo, los tratamientos como la quimioterapia, las radiaciones ionizantes e incluso el dolor inflamatorio, en el cual se ha comprobado que provoca una redistribución de la gp-P en las células del endotelio microvascular, también existe un incremento de la actividad ATPasa de la gp-P, al



igual que promueve un incremento en la expresión de esta, provocando un mayor eflujo de fármacos en la BHE, esto se ha comprobado a través de análisis con Western blot (Scotto, 2003).

Como se sabe en la prueba de formalina la fase 2 se considera dolor de tipo inflamatorio, en la cual existen diversos mediadores que participan, como son las IL proinflamatorias 1, 2, 6 y 7, TNF, prostaglandinas, cininas (ej. bradicinina), citocinas, serotonina, ATP y H⁺ (De Oliveira et al., 2011).

Se ha investigado la participación de la IL-6 sobre la regulación del gen MDR1, ya que el estrés inducido en las células por algunos agentes quimioterapéuticos lleva a la sobreexpresión de la gp-P, su función es la de generar un mecanismo de defensa celular, la participación del factor NF-IL6, en la regulación del gen MDR1 es importante para inducir la expresión de la gp-P pero esto se da bajo ciertas circunstancias y en ciertos tipos de células (Combates et al., 1994).

Por lo tanto el dolor inflamatorio y algunos otros estímulos fisiológicos y celulares pueden inducir la activación del factor nuclear NF-IL6, el cual es miembro de la familia de los factores de transcripción C/EBP, y que a su vez induce la expresión del gen MDR1 (Combates et al., 1994) (Akira et al., 1990).

Una posible explicación adicional que no debemos omitir es la inhibición de la síntesis de testosterona (T) debida a la administración de ketoconazol (Pont, y otros, 1982). Se ha descrito que esta hormona tiene una participación importante en los procesos nociceptivos (Vincent & Tracey, 2008). En ratas el tratamiento con testosterona está asociado a la reducción de dolor (Steiner, Dunn, & Born, 2003). Se ha observado que la administración oral de este fármaco a dosis de 24 mg/kg en ratas Wistar macho interfiere en los niveles de testosterona plasmática disminuyéndola significativamente en comparación con las ratas no tratadas dentro de las primeras dos horas de haberse administrado el fármaco (Vawda & Davies, 1986).



El mecanismo de acción por el cual la testosterona produce analgesia, ansiolisis y mejora el rendimiento cognitivo se puede deber a su metabolismo. La T es metabolizada por la 5 α -reductasa para convertirse en dihidrotestosterona (DHT), que posteriormente es metabolizada por la 3 α -hidroxiesteroide dehidrogenasa para formar al 3 α -Diol. La T y la DHT tienen una gran afinidad por los receptores intracelulares androgénicos (Cunningham, Tindall, & Means, 1979) (Verhoeven, Heyns, & De Moor, 1975), pero la 3 α -Diol no posee esta afinidad (Roselli, 1991). La 3 α -Diol es un potente modulador de GABA y del complejo de receptores de benzodiazepina (GBRs por sus siglas en inglés), mientras que la T y la DHT tienen una actividad débil en el GBRs (Frye, Duncan, Basham, & Erskine, 1996) (Frye & Reed, Androgenic neurosteroids: Antiseizure effects in an animal model of epilepsy, 1998).

La síntesis de esta hormona puede ser inhibida por ketoconazol (Pont, y otros, 1982) (Vawda & Davies, 1986). Adicionalmente, se ha descrito que el metabolismo de testosterona se lleva a cabo parcialmente por CYP3A4 generando metabolitos como la 3 α -Diol del cual algunos reportes señalan que tiene propiedades analgésicas. De acuerdo con esto, al inhibirse la producción de estos compuestos endógenos, cabe la posibilidad de un incremento en las respuestas dolorosas tal como se ha reportado previamente (Vawda & Davies, 1986).

Como se sabe las endorfinas producen analgesia en situaciones de dolor al ser extruidas desde el cerebro hacia la periferia por la gp-P y en condiciones de dolor inflamatorio incrementa la expresión de gp-P a nivel de BHE (Sanchez-Covarrubias et al., 2014). Por lo tanto, otra explicación a los resultados obtenidos podría ser que la gp-P al estar inhibida por el KCZ no permita que ciertas endorfinas salgan del cerebro para producir un efecto analgésico, a pesar de que en situaciones de dolor inflamatorio se sobreexpresa esta glicoproteína.

El cerebro libera neurotransmisores funcionalmente activos directamente desde este hacia la sangre a través de un sistema saturable de transporte de gp-P. Se ha visto que la disminución de la expresión de gp-P disminuye el transporte de



morfina, β -endorfina y otros opioides del cerebro hacia sangre periférica (King et al., 2001). Se han realizado algunas investigaciones y se observó que los ratones knock out con genes suprimidos de *mdr1a/b* $-/-$ son más sensibles al péptido sintético opioide cíclico (DEPDP, por sus siglas en inglés D-penicilamina 2,5 encefalina), esto causa una hipersensibilidad inducida por la analgesia de este péptido, lo cual sugiere que la gp-P tiene una participación importante en la disposición y la disminución de la actividad de este péptido (Chen & Pollack, 1998).

El grupo de péptidos opioides endógenos que son transportados por la gp-P incluyen a la adrenorfina, endorfina 1 y 2, neurocinina y sustancia P (Oude Elferink & Zadina, 2001). Esta regulación del sistema de transporte de la glicoproteína P para bombear compuestos funcionalmente activos desde el cerebro a la periferia establece un mecanismo potencialmente importante para que el SNC module los sistemas periféricos nociceptivos.

Una aportación adicional de este proyecto fue el explorar la posible participación de la gp-P a nivel del sitio de la lesión. Al administrar ketoconazol o rifampicina, como inhibidor e inductor fuertes de la gp-P, no se observaron cambios en la conducta dolorosa de las ratas. Esto sugiere una participación nula de la gp-P a nivel local, lo cual tampoco ha sido previamente reportado. De esta manera se refuerza más la teoría de la amplia participación de gp-P a nivel de SNC y BHE. Aun cuando existen otros fármacos que son inhibidores o inductores de la gp-P, no se ha reportado su participación en procesos nociceptivos, los resultados de este estudio permiten establecer la participación de la gp-P en dichos procesos y apuntan hacia una nueva línea de investigación en la terapéutica del dolor e inflamación.



7. CONCLUSIONES

- En el tratamiento oral con KCZ, se observaron respuestas nociceptivas aumentadas en comparación con el grupo control.
- En el tratamiento oral con RIF no se observaron diferencias significativas comparadas con el grupo control.
- Cuando se administró RIF y KCZ vía subcutánea, no se observaron diferencias significativas en la respuesta nociceptiva con respecto al grupo control, lo cual indica que el mecanismo de inhibición de KCZ sobre la gp-P no es a nivel local, sino a nivel sistémico.
- Se necesitan hacer más investigaciones para poder dilucidar el mecanismo por el cual interviene la gp-P en vías de dolor.



8. REFERENCIAS

- Abbott, F., Franklin, K., & Westbrook, R. (1995). The formalin test: Scoring properties of the first and second phases of the pain response in rats. *Pain*, 91-102.
- Agencia Europea de Medicamentos. (2017). *DocPlayer*. Obtenido de DocPlayer: http://docplayer.es/4497347-Anexo-i-ficha-tecnica-o-resumen-de-las-caracteristicas-del-producto.html#show_full_text
- Akira, S., Isshiki, H., Sugita, T., Tanabe, O., Kinoshita, S., Nishio, Y., . . . Kishimoto, T. (1990). A nuclear factor for IL-6 expression (NF-IL6) is a member of a C/EBP family. *The EMBO Journal*, 1897-1906.
- Aller, S., Yu, J., Ward, A., Weng, Y., Chittaboina, S., & Zhuo, R. (2009). Structure of P-glycoprotein reveals a molecular basis for poly-specific drug binding. *Science*, 323(5922), 1718–1722.
- Ambudkar, S., Kimchi-Sarfaty, C., Sauna, Z., & Gottesman, M. (2003). P-glycoprotein: from genomics to mechanism. *Oncogene*, 22: 7468-7485.
- Anestesiólogos Mexicanos en internet, A.C. (Septiembre de 2013). *La gaceta de AMI*. Obtenido de La gaceta de AMI: <https://boletindeanestesiologia.wordpress.com/tag/percepcion/>
- Barchas, J., Akil, H., Elliott, G., Holman, R., & Watson, S. (1978). Behavioral neurochemistry: neuroregulators and behavioral states. *Science*, 964-973.
- Basbaum, A., & Fields, H. (1984). Endogenous pain control systems: brainstem spinal pathways and endorphin circuitry. *Annual Review of Neuroscience*, 309-338.
- Basbaum, A., Bautista, D., Scherrer, G., & Julius, D. (2009). Cellular and molecular mechanisms of pain. *Cell*, 267-284.
- Bauer, B., Hartz, A., Fricker, G., & Miller, D. (2005). Modulation of p-Glycoprotein Transport Function at the Blood-Brain Barrier. *Society for Experimental Biology and Medicine*, 118-127.
- Bendayan, R., Lee, G., & Bendayan, M. (2002). Functional Expression and Localization of P-Glycoprotein at the Blood Brain Barrier. *Microscopy Reserch Technique* , 365-380.



- Beric, A. (1997). Estados dolorosos después de una lesión de la médula espinal. En: clínicas de anestesiología de Norteamérica. McGrawHill.
- Besson, J., & Chaouch, A. (1987). Descending serotonergic systems; neurotransmitters and pain control. In: pain headache . Ed. H. Akil, Lewis J.W., 64-100.
- Bessou, P., & Perl, E. (1969). Responses of cutaneous sensory units with unmyelinated fibers to noxious stimuli. *Journal of Neurophysiology*, 1025-1043.
- Bonica, J. (1990). Evolution and current status of pain programs. *Journal Pain Symptom Manag*, 347-368.
- Burris, A., Gracely, R., Carter, C., Sherins, R., & Davidson, J. (1991). Testosterone therapy is associated with reduced tactile sensitivity in human males. *Horm Behav*, 195- 205.
- Cannon, R., Peart, J., Hawkins, B., Campos, C., & Miller, D. (2012). Targeting blood-barin barrier sphingolipid signaling reduces basal P-glycoprotein activity and improves drug delivery to the brain. *Proc Natl Acad Sci USA*, 109: 15930-15935.
- Centro Colaborador de la administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica. (01 de 02 de 2012). *VADEMECUM*. Obtenido de VADEMECUM: <http://www.iqb.es/cbasicas/farma/farma04/k002.htm>
- Centro colaborador de la Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica ANMAT Argentina. (01 de 02 de 2012). *VADEMECUM*. Obtenido de VADEMECUM: <http://www.iqb.es/cbasicas/farma/farma04/k002.htm>
- Cerveró, F., & Laird, J. (1995). En *Fisiología del dolor. En tratamiento del dolor: teoría y práctica*. (págs. 9-25). Barcelona: MCR.
- Chaudhary, P., & Roninson, I. (1993). Induction of multidrug resistance in human cells by transient exposure to different chemotherapeutic drugs. *J Natl Cancer Inst* , 632-639.
- Chen, C., & Pollack, G. (1998). Altered disposition and antinociception of D-penicillamine (2,5) enkephalin in mdr1a-gene-deficient mice. *J Pharmacol Exp Ther*, 545-552.



- Chin, K. V., Chauhan, S., Pastan, I., & Gottesman, M. (1990). Regulation of mdr RNA levels in response to cytotoxic drugs in rodent cells. *Cell Growth Differ*, 361–365.
- Chin, K., Tanaka, S., Darlington, G., Pastan, I., & Gottesman, M. (1990). Heat shock and arsenite increase expression of the multidrug resistance (MDR1) gene in human renal carcinoma cells. *J Biol Chem*, 221–226.
- Combates, N., Kwon, P., Rzepka, R., & Cohen, D. (1997). Involvement of the transcription factor NF-IL6 in phorbol ester induction of P-glycoprotein in U937 cells. *Cell Growth Differ*, 213-219.
- Combates, N., Rzepka, R., Chen, Y., & Cohen, D. (1994). NF-IL6, a member of the C/EBP family of transcription factors, binds and trans-activates the human MDR1 gene promoter. *J Biol Chem*, 715-719.
- Como, J., & Dismukes, W. (1994). Oral azole drugs as systemic antifungal therapy. *N Engl J Med*, 330: 263-272.
- Costigan, M., & Woolf, C. (2000). Pain: molecular mechanisms. *Journal of Pain*, 35-44.
- Costigan, M., Scholz, J., & Woolf, C. (2009). Neuropathic pain: a maladaptive response of the nervous system to damage. *Annual Review of Neuroscience*, 1-32.
- Croop, J., Raymond, M., Haber, D., Devault, A., Arceci, R., & Gros, P. (1989). The three mouse multidrug resistance (mdr) genes are expressed in a tissue-specific manner in normal mouse tissues. *Mol Cell Biol*, 9(3), 1346–1350.
- Cunningham, G., Tindall, D. J., & Means, A. (1979). Differences in steroid specificity for rat androgen binding protein and the cytoplasmic receptor. *Steroids*, 261-276.
- Curfs, J., Meis, J., & Hoogkamp-Korstanje, J. (1997). A primer on cytokines: sources, receptors, effects, and inducers. *Clin Microbiol Rev*, 742-780.
- Damas, J., & Francois, L. (1999). The inflammatory reaction induced by formalin in the rat paw. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 220-227.
- Davis, P. T., Sanchez, C., & Tome, M. (2014). P-glycoprotein trafficking as a therapeutic target to optimize CNS drug delivery. *Adv Pharmacol*, 25-44.



- De Oliveira, C., Sakata, R., Issy, A., Gerola, L., & Salomao, R. (2011). Citocinas y Dolor . *Rev Bras Anesthesiol*, 137-142.
- DeCastro, B., Costabile, R., McMann, L., & Peterson, A. (2008). Oral Ketoconazole for Prevention of Postoperative Penile Erection: A Placebo Controlled, Randomized, Double-Blind Trial. *The Journal of Urology*, 1930-1932.
- Dickenson, A., & Sullivan, A. (1987). Subcutaneous formalin-induced activity of dorsal horn neurones in the rat: differential response to an intrathecal opiate administered pre or post formalin . *Pain*, 349-360.
- Donaldson, L., Seckl, J., & McQueen, D. (1993). A discrete adjuvant-induced monoarthritis in the rat: Effects of adjuvant dose. *Journal of Neurosciences Methods* , 5-10.
- Doubell, T., Mannion, R., & Woolf, C. (1999). En *The dorsal Horn: state-dependent sensory processing, plasticity and the generation of pain* (págs. 165-182). Churchill Livingstone: Textbook of Pain.
- Dray, A. (1995). Inflammatory mediators of pain. *Journal of Anesthesiology*, 125-131.
- Drori, S., Eytan, G., & Assaraf, Y. (1995). Potentiation of anticancer-drug cytotoxicity by multidrug-resistance chemosensitizers involves alterations in membrane fluidity leading to increased membrane permeability. *Eur J Biochem*, 1020-1029.
- Dubuisson, D., & Dennis, S. (1977). The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine and brain stem stimulation in rats and cats. *Pain* , 161-174.
- Erickson, H., & Kitchell, R. (1984). Pain perception and alleviation in animals. *Fed Proc.*, 1307-1312.
- Fardel, O., Lecureur, V., Daval, S., Corlu, A., & Guillouzo, A. (1997). Up-regulation of P-glycoprotein expression in rat liver cells by acute doxorubicin treatment. *Eur J Biochem* , 186–192.
- Ferreiros, G. M. (2009). En *Modulación de la actividad de la glicoproteína P por los cannabioides* (págs. 16-18). Buenos Aires: Universidad de Buenos Aires.
- Fischer, L., Clemente, J., & Tambeli, C. (2007). The Protective Role of Testosterone in the Development of Temporomandibular Joint Pain. *The Journal of Pain*, 437-442.



- Forth, W., Martin, E., & Peter, K. (1995). En *Dolor. En: El alivio del dolor* (págs. 1-20). México: Hoechst SA.
- Frye, C., & Lacey, E. (2001). Posttraining androgens enhancement of cognitive performance is temporally distinct from androgens increases in affective behavior. *Cognitive, Affective & Behavioral Neuroscience*, 172-182.
- Frye, C., & Reed, T. (1998). Androgenic neurosteroids: Antiseizure effects in an animal model of epilepsy. *Psychoneuroendocrinology*, 385-399.
- Frye, C., Duncan, J., Basham, M., & Erskine, M. (1996). Behavioral effects of 3 alfa-androstanediol. II: Hypothalamic and preoptic area actions via a GABAergic mechanism. *Behavioral Brain Research*, 119-130.
- García, J., & Herrero, J. (1998). En *Somestesia: mecanorrecepción, termorrecepción y nocicepción. En: manual de neurociencia* (págs. 18:457-481). España: Síntesis.
- Goicoechea, C., & Martín, M. (2006). Mecanismos periféricos y centrales de dolor. *Reumatología clínica*, 2 Supl 1: S5-9.
- Gonzalez Darder, J. M. (2000). Modelos animales de dolor y aspectos éticos de la experimentación animal. *Rev Soc Esp Dolor*, 313-318.
- Goodman, & Gilman. (2012). Las bases farmacológicas de la terapéutica. En Goodman, & Gilman, *Las bases farmacológicas de la terapéutica* (págs. 1553-1554). McGrawHill.
- Granados, S., Amaya, C. E., Ambriz, T., & Castañeda, C. R. (2009). Methodological aspects of pain models. *Transworld Research Network*, 99-118.
- Green, D. P., Ruparel, S., Roman, L., Henry, M. A., & Hargreaves, K. M. (2013). Role of endogenous TRPV1 agonists in a postburn pain model of partial-thickness injury. *PAIN*, 2512-2520.
- Gregorí Valdés, B. S. (2005). Estructura y actividad de los antifúngicos. *Rev Cubana Farm*, 39(2). Obtenido de Instituto Cubano de Investigaciones de Derivados de la Caña de Azúcar .
- Groenendaal, D., Strabach, G., Garcia-Hernandez, A., Kadokura, T., Heeringa, M., Mol, R., . . . Onkels, H. (2012). The pharmacokinetics of darexaban are not affected to a clinically relevant degree by rifampicin, a strong inducer of P-



- glycoprotein and CYP3A4. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 440-449.
- Gros, P., Neriah, Y., Croop, J., & Housman, D. (1986). Isolation and expression of a cDNA (mdr) that confers multidrug resistance. *Nature*, 728-731.
- Grünenthal Group. (2017). *Change Pain*. Obtenido de Change Pain: http://www.change-pain.org/grt-change-pain-portal/change_pain_home/chronic_pain/insight/definition/es_ES/324800317.jsp
- Hamdy, D., & Brocks, D. (2009). Nonlinear Stereoselective Pharmacokinetics of Ketoconazole in Rat After Administration of Racemate. *Chirality*, 21:704-712.
- Handwerker, H., & Kobal, G. (1993). Psychophysiology of experimentally induced pain. *Physiology Reviews*, 639-671.
- Harmsen, S., Meijerman, I., Febus, C., Maas-Bakker, R., Beijnen, J., & Schellens, J. (2009). PXR-mediated induction of P-glycoprotein by anticancer drugs in a human colon adenocarcinoma-derived cell line. *Cancer Chemother Pharmacol*, 765-771.
- Haydon, D., & Hladky, S. (1972). Ion transport across thin lipid membranes: a critical discussion of mechanism in selected systems. *Biophys.*, 187-282.
- Hennessy, M., & Spiers, J. (2007). A primer on the mechanics of P-glycoprotein the multidrug transporter. *Pharmacol Res*, 1-15.
- Higgins, C. (1992). ABC transporters: from microorganisms to man. *Annu Rev Cell Biol*, 67-113.
- Higgins, C. (2007). Multiple molecular mechanisms for multidrug resistance transporters. *Nature*, 446(7137), 749-757.
- Hu, X., Slater, A., Rischin, D., Kantharidis, P., Parkin, J., & Zalcborg, J. (1999). Induction of MDR1 gene expression by anthracycline analogues in a human drug resistant leukaemia cell line. *Br J Cancer*, 831-837.
- Huang, S., Zhang, X., & McNaughton, P. (2006). Inflammatory Pain: The Cellular Basis of Heat Hyperalgesia. *Current Neuropharmacology*, 197-206.
- Hyman, S., & Cassem, N. (1995). Dolor en neurología. *Científica médica latinoamericana*, 1-20.



- IASP. (1983). Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain*, 109-110.
- Jeschke, M., Williams, F. N., Finnerty, C. C., Rodriguez, N. A., Kulp, L. K., Ferrando, A., . . . Suman, O. (2012). The effect of ketoconazole on post-burn Inflammation, Hypermetabolism and Clinical Outcomes. *Plos one*.
- Jones, P., & George, A. (1998). A new structural model for P-glycoprotein. *J Membr Biol*, 133-147.
- Julius, D., & Basbaum, A. (2001). Molecular mechanisms of nociception. *Nature* , 203-210.
- Kageyama, M., Fukushima, K., Togawa, T., Fujimoto, K., Taki, M., & Nishimura, A. (2006). Relationship between excretion clearance of rhodamine 123 and Pglycoprotein expression induced by representative Pgp inducers. *Biol Pharm Bull*, 779-784.
- Kanda, N., & Shinichi, W. (2006). Supressive effects of antimycotics on tumor necrosis factor alfa induced CCL27, CCL2, and CCL5 production in human keratinocytes. *Biochemical Pharmacology*, 463-473.
- Kim, R. (2002). Drugs as P-glycoprotein substrates, inhibitors, and inducers. *Drug Metabolism*, 47-54.
- King, M., Su, W., Chang, A., Zucherman, A., & Pasternak, G. W. (2001). Transport of opioids from the brain to the periphery by P-glycoprotein: peripheral actions of central drugs. *Nature Neuroscience*, 268-273.
- Kioka, N., Yamano, Y., Komano, T., & Ueda, K. (1992). Heat-shock responsive elements in the induction of the multidrug resistance gene (MDR1). *FEBS Lett* , 37-40.
- Lázaro-Ibáñez, G., Torres-López, J., & Granados-Soto, V. (2001). Participation of the nitric oxide-cyclic GMP-ATP-sensitive K⁺ channel pathway in the antinociceptive action of ketorolac. *Eur J Pharmacol*, 41-46.
- Le Bars, D., Rosario, M., & Camden, S. (2001). Animal models of nociception. *Pharmacological Reviews*, 597-652.
- Levine, J. (1996). En *Arthritis and myositis. IASP Committee on Refresher Courses* (págs. 351-360). Editor Campbell JN.



- Levine, J., & Reichling, D. (2003). Peripheral mechanisms of inflammatory pain. En L. J.D., & D. Reichling, *Peripheral mechanisms of inflammatory pain* (págs. 59-84). Philadelphia: Churchill Livingstone: Textbook of Pain.
- Lin, E., Calvano, S., & Lowry, S. (2000). Inflammatory cytokines and cell response in surgery . *Surgery*, 117-126.
- Loeser, J., & Melzack, R. (1999). Pain: an overview. *Pain*, 1607-1609.
- López Tricas, J. M. (21 de 09 de 2015). *Info-farmacía*. Obtenido de Info-farmacía: <http://www.info-farmacía.com/ultimas-publicaciones/elesquivobacilodekoch>
- Magerl, W., Fuchs, P., Meyer, R., & Treede, R. (2001). Roles of capsaicin-insensitive nociceptors in cutaneous pain and secondary hyperalgesia. *Brain*, 1754-1764.
- Mariénfeld, R., Neumann, M., Chuvpilo, S., Escher, C., Kneitz, B., & Avots, A. (1997). Cyclosporin A interferes with the inducible degradation of NF-k B inhibitors, but not with the processing of p105/NF-k B1 in T cells. *European Journal of Immunology* , 1601-1609.
- Mason, P. (2005). Deconstructing endogenous pain modulation. *Journal of Neurophysiology*, 1659-1663.
- Matheny, C., Lamb, M., Brouwer, K., & Pollack, G. (2001). Pharmacokinetic and pharmacodynamic implications of P-glycoprotein modulation . *Pharmacotherapy*, 778-796.
- McCaffrey, G., Staatz, W., Sanchez-Covarrubias, L., Finch, J., DeMarco, K., Laracunte, M.-L., . . . Davis, T. (2012). P-glycoprotein trafficking at the blood-brain barrier altered by peripheral inflammatory hyperalgesia. *Journal of Neurochemistry*.
- McMahon, S., Armanini, M., Ling, L., & Phillips, H. (1994). Expression and coexpression of Trk receptors in subpopulations of adult primary sensory neurons projecting to identified peripheral targets. *Neuron*, 1161-1171.
- Mense, S. (1993). Nociception from skeletal muscle in relation to clinical muscle pain. *Pain*, 54: 241-289.
- Merskey, H. (1979). Pain terms: a list with definitions and notes on usage. Recommended by the IASP subcommittee on taxonomy. *Pain*, 6:249.



- Mesas Idáñez, Á. (2012). Dolor Agudo y Crónico. Clasificación del Dolor. Historia clínica en las Unidades de Dolor. *Hospital Universitario Vall d'Hebrón. Área de Traumatología Clínica del Dolor, Servicio de Anestesiología,*, 4-22.
- Meyer, R., Campbell, J., & Raja, S. (1994). En *Peripheral neural mechanisms of nociception* (págs. 13-44). Churchill Livingstone. New York: In Wall y Melzack's Textbook of pain.
- Millan, M. (1999). The induction of pain, an integrative review. *Neurobiology*, 57:1-164.
- Miyazaki, M., Kohno, K., Uchiumi, T., Tanimura, H., Matsuo, K., & Nasu, M. (1992). Activation of human multidrug resistance-1 gene promoter in response to heat shock stress. *Biochem Biophys Res Commun*, 677-684.
- Morrissey, K., Wen, C., Johns, S., Zhang, L., Huang, S., & Giacomini, K. (2012). The UCSF-FDA Transportal : a public drug transporter database. *Clinical Pharmacology Therapy*, 545-546.
- Nielsen, D., Eriksen, J., Maare, C., Jakobsen, A., & Skovsgaard, T. (1998). P-glycoprotein expression in Ehrlich ascites tumour cells after in vitro and in vivo selection with daunorubicin. *Br J Cancer*, 1175-1180.
- Ohga, T., Uchiumi, T., Makino, Y., Koike, K., Wada, M., & Kuwano, M. (1998). Direct involvement of the Y-box binding protein YB-1 in genotoxic stress-induced activation of the human multidrug resistance 1 gene. *J Biol Chem*, 273(11): 5997-6000.
- OMS. (10 de 02 de 2017). *Portal de Información Medicamentos Esenciales y Productos de Salud*. Obtenido de Portal de Información Medicamentos Esenciales y Productos de Salud: <http://apps.who.int/medicinedocs/es/d/Jh2920s/24.9.html>
- Ortega, A., & Micó, J. A. (2006). Modelos animales de dolor. *Reumatol Clin*, 1-3.
- Ortega, A., Roca, A., & Micó, J. (2002). Modelos animales de dolor. Una visión crítica. *Rev. Soc. Esp. Dolor*, 43-48.
- Ossipov, M. H. (2012). The perception and endogenous modulation of pain. *Scientifica*, 1-25.
- Oude Elferink, R. P., & Zadina, J. (2001). MDR1 P-glycoprotein transports endogenous opioid peptides. *Peptides*, 2015-2020.



- Pont, A., Williams, P., Azhar, S., Reitz, R., Bochra, C., Smith, E., & Stevens, D. (1982). Ketaconazole Blocks Testosterone Synthesis. *Arch Intern Med*, 2137-2141.
- Prakash, A. (2010). Selecting surfactants for the maximum inhibition of the activity of the multidrug resistance efflux pump transporter, P-glycoprotein: conceptual development. *J Excipients Food Chem*, 51-59.
- Puebla Díaz, F. (2005). Tipos de dolor y escala terapéutica de la O.M.S. Dolor iatrogénico. *Dolor*, 33-37.
- Puig, S., & Sorkin, L. (1995). Formalin-evoked activity in identified primary afferent fibers: systemic lidocaine suppress phase-2 activity. *Pain*, 345-355.
- Raeburn, C., Sheppard, F., & Barsness, K. (2002). Cytokines for surgeons. *Am J Surg*, 268-273.
- Ramji, D., & Foka, P. (2002). CCAAT/enhancer-binding proteins: structure, function and regulation. *Biochem J*, 561-575.
- Roberts, V. (1989). En *Ethical issues in the use of animals for pain research. In: issues in pain measurement: advances in pain research and therapy* (págs. 169-174). Raven press.
- Roselli, C. (1991). Sex differences in androgen receptors and aromatase activity in microdissected regions of the rat brain. *Endocrinology*, 1310-1315.
- Rosland, J. (1991). The formalin test in mice: the influence of ambient temperature. *Pain*, 211-216.
- Ruetz, S., & Gros, P. (1994). Phosphatidylcholine translocase: a physiological role for the mdr2 gene. *Cell*, 77:1071-1081.
- Ruparel, S., Green, D., Chen, P., & Hargreaves, K. M. (2012). The cytochrome P450 inhibitor, ketoconazole, inhibits oxidized linoleic acid metabolite mediated peripheral inflammatory pain. *Molecular Pain*, 1-9.
- Ruparel, S., Hargreaves, K. M., Eskander, M., Rowan, S., Almeida, J., Roman, L., & Henry, M. (2013). Oxidized linoleic acid metabolite-cytochrome P450 system (OLAM-CYP) is active in biopsy samples from patients with inflammatory dental pain. *PAIN*, 2363-2371.



- Sakurada, T., Katsumata, K., Tan-No, K., Sakurada, S., & Kisara, K. (1992). The capsaicin test in mice for evaluating tachykinin antagonists in the spinal cord. *Neuropharmacology*, 1279-1285.
- Sánchez, J., Obón, L., & Pont, V. (1999). Tratamiento actual de las micosis superficiales. *Rev Iberoam Micol*, 16: S26-S30.
- Sanchez-Covarrubias, L., Slosky, L., Thompson, B., Zhang, Y., Laracuenta, M.-L., DeMarco, K., . . . Davis, T. (2014). P-glycoprotein Modulates Morphine Uptake into the CNS: A role for the Non-steroidal Anti-inflammatory Drug Diclofenac. *PLOS ONE*, 1-10.
- Schaible, G. H. (2007). Peripheral and central mechanisms of pain generation. *Handbook of Experimental Pharmacology*, 3-28.
- Schinkel, A., Wagenaar, E., Mol, C., & Van Deemter, L. (1996). P-glycoprotein in the Blood-Brain Barrier of Mice Influences the Brain Penetration and Pharmacological Activity Of Many Drugs. *The American Society for Clinical Investigation*, 2517-2524.
- Scholz, J., & Woolf, C. (2002). Can we conquer pain? *Nature Neuroscience*, 1062-1067.
- Scotto, K. (2003). Transcriptional regulation of ABC drug transporters. *Oncogene*, 22(47), 7496–7511.
- Seelbach, M. J., Brooks, T. A., Egleton, R. D., & Davis, T. P. (2007). Peripheral inflammatory hyperalgesia modulates morphine delivery to the brain: a role for P-glycoprotein. *Journal of Neurochemistry*, 1677-1690.
- Seelig, A. (1998). A general pattern for substrate recognition by P-glycoprotein. *Eur J Biochem*, 252-261.
- Shapiro, A., & Ling, V. (1997). Effect of quercetin on Hoechst 33342 transport by purified and reconstituted P-glycoprotein. *Biochem Pharmacol*, 587-596.
- Sharom, F. (2011). The P-glycoprotein multidrug transporter. *Essays Biochemistry*, 161-178.
- Silva, R., Vilas-Boas, V., Carmo, H., Dinis Oliveira, R. J., Carvalho, F., Bastos, M., & Remiao, F. (2015). Modulation of P-glycoprotein efflux pump: induction and activation as a therapeutic strategy. *Pharmacology & Therapeutics*, 1-123.



- Smit, J., Schinkel, A., Oude-Elferink, R., Groen, A., Wagenaar, E., van Deemter, L., . . . van Roon, M. (1993). Homozygous disruption of the murine mdr2 P-glycoprotein expressed in a porcine kidney epithelial cell line LLCPK1. *J Pharmacol Exp Ther*, 263:840–845.
- Sommer, C., & White, F. (2010). Cytokines, Chemokines, and Pain. *Pharmacology of Pain*, 279-302.
- Stamatovic, S. M., Keep, R. F., & Andjelkovic, A. V. (2008). Brain Endothelial Cell-Cell Junctions: How to “Open” the Blood Brain Barrier. *Current Neuropharmacology*, 179-192.
- Steiner, M., Dunn, E., & Born, L. (2003). Hormones and mood: from menarche to menopause and beyond. *Journal Affect Disord*, 67-83.
- Stimmel, B. (1983). Neuroregulators and pain. In: pain, analgesia and addiction: The pharmacologic treatment of pain. NY: Raven Press.
- Stroh, M., Palcza, J., McCrea, J., Marsilio, S., Breidinger, S., & Panebianco, D. (2012). The effect of multiple doses of rifampin and ketoconazole on the single-dose pharmacokinetics of ridaforolimus. *Cancer Chemother Pharmacol*, 1247-1253.
- Sufka, K., Schomburg, F., & Giordano, J. (1992). Receptor mediation of 5-HT induced inflammation and nociception in rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 53-56.
- Sugar, A. M., Alsip, S. G., Galgiani, J., Graybill, J., Dismukes, W., & Cloud, G. (1987). Pharmacology and Toxicity of High-Dose Ketoconazole. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1874-1878.
- Svensson, A., Soderpalm, B., & Engel, J. (2000). Gonadectomy enhances shock-induced behavioral inhibition in adult male rats: Implications for impulsive behavior. *Pharmacology, Biochemistry & Behavior*, 731-736.
- Thiebaut, F., Tsuruo, T., Hamada, H., Gottesman, M., Pastan, I., & Willingham, M. (1987). Cellular localization of the multidrug-resistance gene product Pglycoprotein in normal human tissues. *Proc Natl Acad Sci USA*, 84(21), 7735-7738.
- Tian, R., Koyabu, N., Morimoto, S., Shoyama, Y., Ohtani, H., & Sawada, Y. (2005). Functional induction and de-induction of P-glycoprotein by St. John's wort



- and its ingredients in a human colon adenocarcinoma cell line. *Drug Metab Dispos* , 547–554.
- Tjølsen, A., Berge, O., Hunnskaar, S., Rosland, J., & Hole, K. (1992). The formalin test: an evaluation of the method. *Pain*, 5-17.
- Treede, R., Meyer, R., & Campbell, J. (1990). Comparison of heat and mechanical receptive fields of cutaneous C-iber nociceptors in monkey. *Journal of Neurophysiology* , 5: 1502-1513.
- Trevor, A., Katzung, B., & Masters, S. (2004). *Katzung and Trevor's Pharmacology*. USA: McGraw-Hill.
- Tsuruo, T., Iida, H., Tsukagoshi, S., & Sakurai, Y. (1981). Overcoming of vincristine resistance in P388 leukemia in vivo and in vitro through enhanced cytotoxicity of vincristine and vinblastine by verapamil. *Cancer Res*, 41(5): 1967-1972.
- Turk, D., & Okifuji, A. (1999). Assessment of patient's reporting of pain: an integrated perspective. *The Lancet*, 353:1784-1788.
- Tzanakakis, G. N., Krambovitis, E., Tsatsakis, A. M., & Vezeridis, M. P. (2002). The preventive Effect of Ketoconazole on Experimental Metastasis from a Human Pancreatic Carcinoma may be Related to its Effect on Prostaglandin Synthesis. *International Journal of Gastrointestinal Cancer*, 23-30.
- Uchiumi, T., Kohno, K., Tanimura, H., Matsuo, K., Sato, S., & Uchida, Y. (1993). Enhanced expression of the human multidrug resistance 1 gene in response to UV light irradiation. *Cell Growth Differ* , 147–157.
- Ueda, K., Cardarelli, C., Gottesman, M., & Pastan, I. (1987). Expression of a full length cDNA for the human mdr1 gene confers resistance to colchicine, doxorubicin and vinblastine. *Proc Natl Acad Sci USA*, 84:3004–3008. ¿.
- Ueda, K., Taguchi, Y., & Morishima, M. (1997). How does P-glycoprotein recognize its substrates? *Semin Cancer Biol*, 151-159.
- Varma, M., Ashokraj, Y., Dey, C., & Panchagnula, R. (2003). P-glycoprotein inhibitors and their screening: a perspective from bioavailability enhancement. *Pharmacol Res*, 347-359.
- Vawda, A., & Davies, A. (1986). An investigation into the effects of ketoconazole on testicular function in Wistar rats. *Acta Endocrinologica*, 111: 246-251.



- Veiga, A., Duarte, I., Avila, M., Motta, P., Tatsuo, M., & Francischi, J. (2004). Prevention by celecoxib of secondary hyperalgesia induced by formalin in rats. *Life Sciences* , 2807-2817.
- Velasco, M., Alsásua, V., Carvajal, G., Dueñas, L., de la Gala, S., García, M. P., . . . Serrano, M. J. (2004). *Farmacología Clínica y Terapéutica Médica*. Madrid: McGraw-Hill.
- Verhoeven, G., Heyns, W., & De Moor, P. (1975). Testosterone receptors in the prostate and other tissues. *Vitamins & Hormones*, 265-281.
- Vincent, K., & Tracey, I. (2008). Hormones and their interaction with the pain experience . *Reviews in pain*, 20-23.
- Wheeler-Aceto, H., & Cowan, A. (1991). Standardization of the rat paw formalin test for the evaluation of analgesics. *Psychopharmacology*, 35-44.
- Winter, C., Risley, E., & Nuss, G. (1962). Carrageenan-induced edema in hind paw of the rat as an assay for anti-inflammatory drugs . *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* , 544-547.
- Woolf, C. (2004). Pain: moving from symptom control toward mechanism-specific pharmacologic management . *Annals of Internal Medicine* , 441-451.
- Woolf, C., & Costigan, M. (1999). Transcriptional and posttranslational plasticity and the generation of inflammatory pain. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 7723- 7730.
- Woolf, C., & Salter, M. (2000). Neuronal plasticity increasing the gain in pain. *Science* , 1765-1769.
- Woolf, C., Shortland, P., & Sivilotti, L. (1994). Sensitization of high mechanotreshold superficial dorsal horn and flexor motor neurones following chemosensitive primary afferent activation. *Pain* , 141-155.
- Woolf, J. C., & Mannion, J. R. (1999a). Neuropathic pain: aetiology, symptoms, mechanisms, and management. *The lancet*, 353: 1959-1964.
- Wu, Y., Willcockson, H., Maixner, W., & Light, A. (2004). Suramin inhibits spinal cord microglia activation and long-term hyperalgesia induced by formalin injection. *The Journal of Pain* , 48-55.



- Yu, L., Wu, Q., Yang, C., & Horwitz, S. (1995). Coordination of transcription factors, NFY and C/EBP beta, in the regulation of the *mdr1b* promoter . *Cell Growth Differ* , 1505-1512.
- Zastawny, R., Salvino, R., Chen, J., Benchimol, S., & Ling, V. (1993). The core promoter region of the P-glycoprotein gene is sufficient to confer differential responsiveness to wild-type and mutant p53. *Oncogene*, 1529–1535.
- Zhang, J., & An, J. (2007). Cytokines, inflammation, and pain. *Int Anesthesiol Clin*, 27-37.
- Zhou, S. (2008). Structure, function and regulation of P-glycoprotein and its clinical relevance in drug disposition . *Xenobiotica*, 802-832.
- Zimmermann, M. (1984). Basic concepts of pain and pain therapy. *Drug Res*, 1053-1059.