



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

**“Implementación de un modelo experimental para  
evaluar nocicepción en (*Danio rerio*)”**

**Tesis**

Para obtener el título de  
Químico Farmacéutico Biólogo

Presenta:

**Jennifer Pineda Oliveros**

Director: Dra. Myrna Déciga Campos

Asesoras: M en F. Leticia Huerta Flores

M en F. María Martha Ugalde Hernández

Ciudad de México Agosto del 2023



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.



*El presente estudio fue desarrollado bajo la dirección de la **Dra. Myrna Déciga Campos**, adscrita a la Sección de Estudios de Posgrado e Investigación de la Escuela Superior de Medicina del Instituto Politécnico Nacional. **El financiamiento fue otorgado por la Secretaría de Investigación y Posgrado del IPN con los proyectos SIP-20210049 y SIP- 20220300.***

*El presente trabajo se presentó en los siguientes foros académicos estudiantiles:*

***Jennifer Pineda Oliveros, Myrna Déciga Campos. “Evaluación del efecto antinociceptivo de metamizol en *Danio rerio*”, Presentado en el Foro XVII PIFI del IPN en Ciudad de México del 17 al 20 de octubre del 2022.***

***Jennifer Pineda Oliveros, Myrna Déciga Campos. “Implementación de un modelo experimental para evaluar nocicepción en *Danio rerio*”, Presentado en el XXVIII congreso estudiantil de farmacología del 17 al 18 de abril del 2023.***

## Dedicatoria

### A mi familia

A papá por siempre alimentar esa chispa de curiosidad en mi ser, la paciencia de tus enseñanzas, hasta volver a encontrarnos.

A mamá por la responsabilidad, disciplina y acompañamiento en esta trayectoria con todo el amor y gratitud.

Para mis amigos, gracias por acompañarme en esta travesía, y las aventuras vividas en esta última etapa de mi vida estudiantil.

A mis asesoras, por los conocimientos adquiridos durante este proyecto, el apoyo y supervisión del mismo.

A la Dra. Myrna por toda su sabiduría y su labor más allá de lo académico, con gratitud y respeto.

## Agradecimientos

Con especial agradecimiento a la Escuela Superior de Medicina por el apoyo y las facilidades brindadas para la elaboración de este proyecto.

## Tabla de contenido

1	Resumen.....	11
2	Introducción.....	12
3	Antecedentes.....	13
	3.1. Dolor.....	13
	3.1.1. Clasificación del dolor.....	14
	3.1.2. Nocicepción.....	17
	3.2. Tratamiento del dolor.....	21
	3.2.1. Fármacos Antiinflamatorios No Esteroideos (AINE´s).....	22
	3.2.2. Fármacos analgésicos opioides.....	29
	3.3. Modelos animales para el estudio del dolor.....	35
	3.4. Características que debe cumplir un modelo de nocicepción.....	37
	3.5 Estímulos para evaluar nocicepción.....	39
	3.6 Pez cebra ( <i>Danio rerio</i> ) como modelo animal.....	42
	3.6.1 Anatomía del pez cebra.....	43
4	Planteamiento del problema.....	45
5	Pregunta de investigación.....	46
6	Hipótesis.....	46
7	Objetivo general.....	46
	7.1. Objetivos específicos.....	46
8	Metodología.....	47
	8.1 Universo.....	47
	8.2 Materiales y reactivos.....	47
	8.3 Variables.....	48
	8.4 Procedimiento.....	48
	8.5 Análisis estadístico.....	51
9	Resultados .....	51
	9.1 Determinación de la conducta normal de <i>Danio rerio</i> .....	51
	9.2 Determinación de la conducta de <i>Danio rerio</i> en presencia de sustancias algésicas.....	53
	9.3 Determinación del efecto antinociceptivo de fármacos AINE´s en un modelo de nocicepción inducido ácido acético en <i>Danio rerio</i> .....	56
	9.4 Determinación del efecto antinociceptivo de fármacos AINE´s en un modelo de nocicepción inducido ácido acético en <i>Danio rerio</i> .....	58
10	Discusión.....	61
11	Conclusión.....	64
12	Referencias.....	65

---

## Índice de figuras

Figura 1	Factores biopsicosociales que intervienen en la percepción del dolor.....	14
Figura 2	Etapas fisiológicas del proceso nociceptivo.....	18
Figura 3	Clasificación de las fibras nociceptivas.....	18
Figura 4	Láminas de rexed involucradas en el proceso de nocicepción.....	19
Figura 5	Estructura química de la salicina, ácido salicílico y ácido acetil salicílico.....	25
Figura 6	Estructura química de diclofenaco.....	26
Figura 7	Estructura química de metamizol.....	28
Figura 8	Estructura química de buprenorfina, morfina y tramadol.....	33
Figura 9	Características que debe cumplir un modelo animal.....	38
Figura 10	Homología con del pez cebra con el humano.....	43
Figura 11	Modelo de nocicepción en pez cebra.....	49
Figura 12	Evaluación de la conducta normal de <i>Danio rerio</i> .....	52
Figura 13	Evaluación de sustancias algésicas en <i>Danio rerio</i> .....	55
Figura 14	Evaluación del efecto antinociceptivo de fármacos AINE´s en <i>Danio rerio</i> .....	56
Figura 15	Evaluación del efecto antinociceptivo de fármacos opioides en <i>Danio rerio</i> .....	60

---

---

## Índice de Cuadros

Cuadro 1	Tipos de neuronas en el asta dorsal de la médula espinal.....	20
Cuadro 2	Clasificación estructural de los AINE´S.....	23

## Índice de Tablas

Tabla 1	Categorización de los AINE basada en la acción inhibitoria selectiva de PG.....	23
---------	---	----

## Índice de Diagramas

Diagrama 1	Evaluación de sustancias algésicas.....	50
Diagrama 2	Evaluación del efecto antinociceptivo de AINE´s y opioides en <i>Danio rerio</i> .....	50

---

## **Abreviaturas**

5-HT	5-hidroxitriptamina
AA	Ácido araquidónico
ABC	Área bajo la curva
AINE	Analgésico Antiinflamatorio No Esteroideo
ANOVA	Análisis de Varianza
CI <sub>50</sub>	Concentración Inhibitoria 50
COX-1	Ciclooxigenasa 1
COX-2	Ciclooxigenasa 2
FDA	Administración de Alimentos y Medicamentos (Federal Drug Administration, siglas en inglés)
IASP	Asociación Internacional para el Estudio del Dolor (International Association for the Study of Pain, siglas en inglés)
i.p.	Intraperitoneal
M6G	Morfina-6-glucurónido
NMDA	N-metil-D-aspartato
N/OFQ	nociceptina/orfaninaFQ
OMS	Organización Mundial de la Salud
PG	Prostaglandinas
SNC	Sistema Nervioso Central



---

## 1. Resumen

El dolor se percibe como una emoción negativa desagradable, para buscar tratamientos para el dolor se utilizan modelos experimentales particularmente en mamíferos. Sin embargo, se hace necesario mejorar los modelos actuales en investigación de fármacos por lo que se han desarrollado numerosos ensayos nuevos de nocicepción en peces. El pez cebra ya es un modelo animal bien establecido en muchas otras áreas de investigación, como pruebas de toxicidad, como modelo para enfermedades o regeneración, y también tiene un gran potencial en la investigación del dolor. Los métodos de electrofisiología, biología molecular, análisis de comportamiento reflexivo o no reflexivo e imágenes fluorescentes se aplican de forma rutinaria, pero es la combinación de estas herramientas lo que hace que el modelo del pez cebra sea tan poderoso.

En el presente trabajo se implementaron las condiciones adecuadas para utilizar el comportamiento del pez cebra en presencia de estímulos analgésicos para evaluar fármacos analgésicos. Se estableció que el empleo de ácido acético al 1% es mejor que el empleo de formalina, solución ácida (pH=5), o aceite de mentol. También se determinó que la conducta puede ser evaluada indistintamente en peces hembras y macho. En la literatura se recomienda que las evaluaciones se realicen en peces cebra grises, sin embargo, en este estudio se demostró que peces modificados genéticamente para su venta en diferentes colores también pueden ser utilizados indistintamente debido a que se observó la misma conducta sin encontrar diferencias estadísticamente significativas.

Para demostrar la utilidad del modelo para la evaluación de nocicepción en el pez cebra se evaluó el efecto antinociceptivo de fármacos de tipo Analgésico Antiinflamatorio no Esteroideo (AINE) como el diclofenaco, ácido acetil salicílico y metamizol, de tipo opioide como morfina, buprenorfina y tramadol. En todas las evaluaciones se pudo establecer un efecto dependiente de la concentración. Este modelo será de utilidad para evaluar compuestos con potencial efecto analgésico obtenidos de síntesis química o productos naturales.

---

## 2. Introducción

El dolor es una sensación que todos hemos percibido; de acuerdo con su intensidad se puede percibir como leve, moderado o intenso. Dependiendo de sus características fisiológicas se utilizan fármacos específicos para tratar un dolor leve, moderado o intenso. Para un dolor de tipo nociceptivo inflamatorio se utilizan los Analgésicos Antiinflamatorios No Esteroideos (AINE's) y en caso de un dolor más intenso o crónico se emplean los opioides y coadyuvantes. Sin embargo, el empleo a largo plazo de estos fármacos trae como consecuencia una gran cantidad de efectos adversos, como daño gástrico, renal y cardiovascular. Por esta razón es necesario buscar fármacos con un aumento del efecto terapéutico con menos reacciones adversas.

La búsqueda de nuevos fármacos es un proceso largo y costoso; la primera etapa consiste en un desarrollo químico de búsqueda de posibles blancos terapéuticos. Para lo cual se hacen diseños *in silico* que permite la identificación de las posibles estructuras que se dirigen hacia blancos moleculares específicos. Una vez identificados y que se analizan sus propiedades farmacológicas y toxicológicas *in silico* se inicia la síntesis química y caracterización de las estructuras propuestas con actividad biológica. Finalmente hay que evaluar los compuestos propuestos *in vivo*, en donde se requiere el empleo de numerosos animales de investigación, generalmente roedores, para poder establecer cuales moléculas podrían ser viables para posible uso terapéutico. En muchas ocasiones, de una serie de varios compuestos uno o ninguno resulta activo.

Con la finalidad de optimizar la selección de posibles estructuras químicas, en el presente proyecto se establecieron las condiciones adecuadas de un modelo de nocicepción en peces cebras para realizar un cribado de estructuras con potencial utilidad como analgésicos. El empleo de teleósteos en lugar de roedores permitirá no solo disminuir costos, sino que se podrán evaluar muchas series de compuestos con posible utilidad analgésica.

---

### **3. Antecedentes**

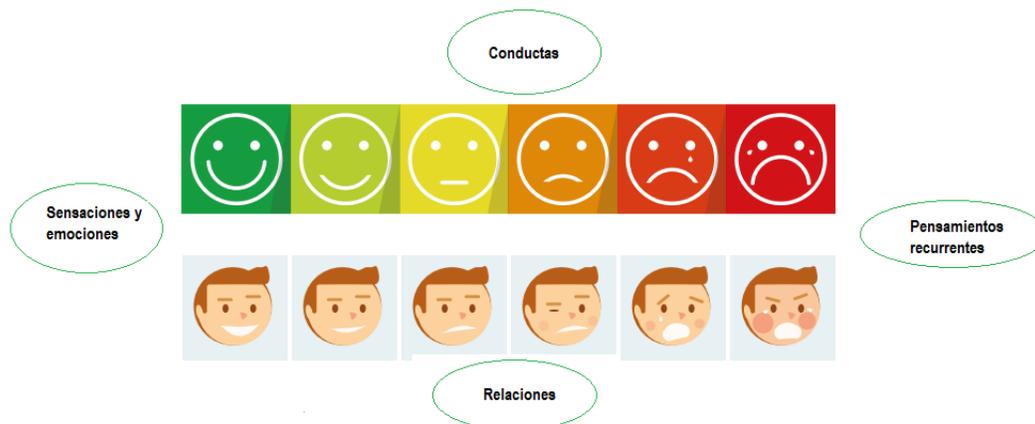
#### **3.1 Dolor**

De acuerdo con la Asociación Internacional para el Estudio del Dolor (IASP, por sus siglas en inglés) el dolor se define como una experiencia sensorial y emocional desagradable, asociada o similar a la asociada con un daño tisular real o potencial (IASP 2020). Este proceso fisiológico tiene como objetivo la protección del organismo, desencadenando reacciones o comportamientos de reflejo que conllevan a la disminución de la causa y sus posibles daños (García et al., 2010).

La nocicepción se refiere única y exclusivamente al proceso fisiológico por el cual se manifiesta el dolor; en presencia de un estímulo nocivo, éste se transmite hacia el sistema nervioso central (SNC) y su integración ocasiona que los individuos puedan percibir un daño en el tejido (Castañeda, 2020). Ante un estímulo de naturaleza química, mecánica o térmica se activan los receptores del dolor (nociceptores), que son fibras específicas que censan estímulos específicos o la combinación de éstos cuando se activan fibras polimodales.

El estudio del dolor en el humano es complejo, el empleo de métodos de biología molecular y celular o modelos de órgano aislado, no son suficientes para estudiar la sensación de dolor ya que en este proceso están involucrados componentes psicológicos y sociales que ocasionan las diferentes interpretaciones de dolor (Castañeda, 2020). Entonces, la variabilidad de la percepción de dolor ante un estímulo no solo depende de individuos diferentes, sino que en el mismo individuo puede percibir el mismo estímulo más intenso, cuando este se encuentra sujeto a estrés. Por el contrario, si se mejora su estado anímico, el dolor será percibido con menor intensidad, aun cuando en ambos casos el estímulo no haya cambiado.

Para evaluar el dolor en los humanos se utiliza la escala visual análoga en donde el individuo puede indicar como percibe el dolor; leve, moderado o intenso. También puede indicar en una escala de 0 a 10 como percibe su dolor, siendo 10 el dolor más intenso que haya sentido. En la figura 1 se muestra una escala de facciones que se emplea en la clínica para que el paciente indique como es el dolor que percibe, esta escala es de utilidad sobre todo en niños.



**Figura 1.** Factores biopsicosociales que intervienen en la percepción del dolor. El dolor se percibe mediante las sensaciones y emociones que tiene el paciente; además de sus relaciones afectivas y sus pensamientos recurrentes que de forma integral manifiesta una conducta específica de dolor. Así, el alivio del dolor no solo se refiere al empleo de fármacos, sino que también se requiere de apoyo psicológico y paliativo (Modificado de Castañeda, 2020).

### 3.1.1 Clasificación del dolor

El dolor es una percepción consecuente de la activación del sistema nociceptivo, es uno de los responsables de la homeostasis del organismo, su función es la protección, desencadenando reacciones que induce a comportamientos de evitación aprendidos que llevan a la disminución de la actuación del agente causal y los posibles daños (Ortega et al., 2002).

Por otra parte, en las enfermedades inflamatorias, neuropatías, y cáncer entre otras patologías, el dolor deja de ser un signo de alerta, y se vuelve uno de los síntomas centrales de la enfermedad (Ortega et al., 2002)

Clifford y Woolf, (2004) han clasificado al dolor de acuerdo con:

- Intensidad (leve, moderado, grave)
- Calidad (punzante, ardor o sordo)
- Remisión (superficial o profundo; localizado o difuso)
- Duración (transitorio, intermitente o persistente)
- Evolución (agudo o crónico)

---

Debido a que el dolor es esencialmente una sensación, tiene fuertes componentes cognoscitivos y emocionales, vinculados o descritos en términos de sufrimiento, por tal motivo también se asocia con reflejos motores de producción autonómica para evitar lesiones graves, por lo que el dolor es dividido en dos grandes categorías:

- Adaptativo: como su nombre lo indica el dolor contribuye a la adaptación de la supervivencia mediante la protección del organismo de una lesión y/o promoción de la curación cuando ésta se produce.
- Mal adaptativo: es una expresión patológica del sistema nervioso.

El dolor también se puede clasificar de acuerdo con sus características patológicas en nociceptivo, inflamatorio, neuropático y funcional:

*a) Dolor nociceptivo*

Este tipo de dolor se produce a través de los nociceptores, receptores que se encuentran en los tejidos periféricos, activados por estímulos químicos, físicos, mecánicos o térmicos. Juegan un papel fundamental en la regulación de la defensa natural, provocan dolor como respuesta ante un daño potencial al tejido.

En el dolor nociceptivo existe la participación de mediadores inflamatorios y celulares que intensifican la respuesta una vez que son activados. Algunas sustancias químicas que participan en el proceso son la bradicinina, la histamina, la serotonina, las prostaglandinas (PG) y las ciclooxigenasas 1 y 2 (COX-1 y COX-2) (Dureja et al., 2017). El dolor somático es un ejemplo de dolor nociceptivo, éste es producido por un traumatismo o torsión de una articulación afectando la piel, músculo, ligamentos, articulaciones o huesos. Caracterizado por ser un dolor bien localizado en la zona dañada y no suele ser acompañado de reacciones vegetativas (náuseas, vómitos, etc.).

*b) Dolor inflamatorio*

Es producido por un daño a los tejidos vascularizados, puede ser por causa de una infección bacteriana, un golpe, una quemadura, irritación por agentes químicos o cualquier otro fenómeno. Los tejidos afectados secretan múltiples sustancias que causan cambios en la apariencia y estructura de la zona afectada, dichas alteraciones son consecuencias del daño producido (desgarre, abrasión, ruptura). A las modificaciones que se observan desde que ocurre el daño hasta que el tejido

---

vuelve a la normalidad, o se remodela para resistir daño continuo, se le conoce como inflamación.

La inflamación se clasifica como aguda o crónica (Scholz y Woolf., 2002).

- Inflamación aguda: es un proceso de corta duración, aparece durante los primeros minutos u horas después del daño y termina después de que el estímulo dañino se retira.
- Inflamación prolongada o crónica: se presentan cambios progresivos en las células presentes en el sitio de la inflamación y se caracteriza por la destrucción del daño tisular.

El dolor visceral es un ejemplo de dolor inflamatorio, se produce en órganos internos, es asociado a fuertes contracciones en músculos viscerales, se presenta inflamación por la distensión de vísceras huecas. El dolor se agrava por la contracción del órgano afectado; se caracteriza por ser un dolor mal localizado que se extiende más allá del órgano lesionado, frecuentemente se localiza en la superficie distante de la víscera en donde se originó.

#### *c) Dolor neuropático*

Se caracteriza principalmente por una lesión primaria o daño al SNC, incluye trastornos tales como: la neuropatía periférica, la neuropatía diabética, neuralgia postterapéutica y ciertos tipos de dolor oncológico. Las vías de este tipo de generación implican una excitabilidad anormal de las neuronas aferentes. Se presenta un fenómeno de sensibilización después de la activación periférica de las neuronas, pérdida de la respuesta aferente y la activación de mediadores proinflamatorios como las citocinas (Dureja et al., 2017).

#### *d) Dolor funcional*

El dolor funcional se caracteriza por el desconocimiento de su origen, se consideró por mucho tiempo como una sensación dolorosa psicológica por el desconocimiento de la causa que lo genera. Actualmente se están estudiando los mecanismos involucrados en procesos como fibromialgia.

---

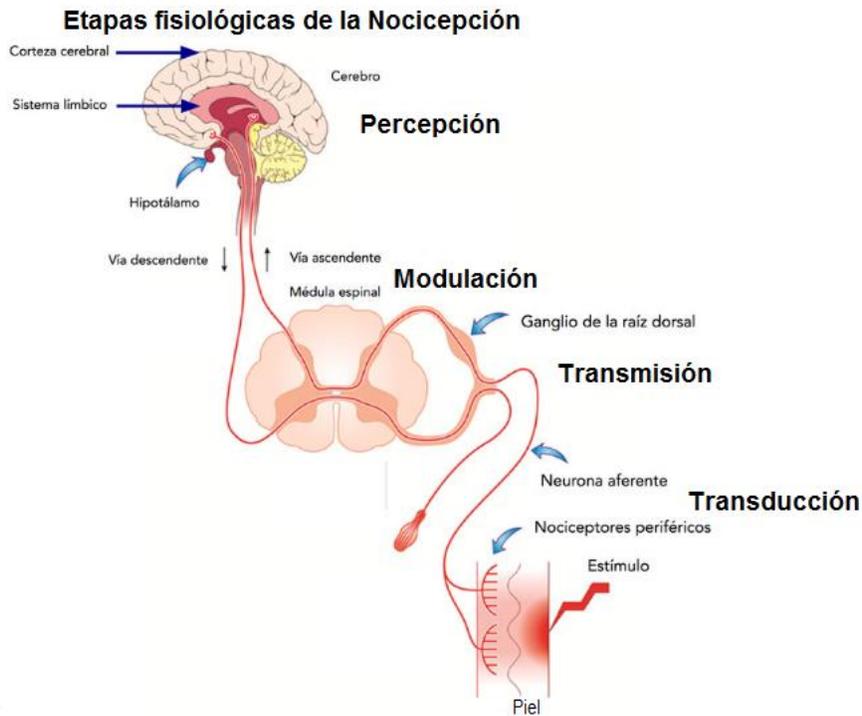
### 3.1.2. Nocicepción

Los nociceptores son los receptores encargados de la detección del daño físico o químico en el tejido circundante, también conocidas como fibras aferentes primarias, dichas fibras tienen terminaciones libres que penetran entre las células de la piel u otros órganos. La nocicepción es un proceso electroquímico que comprende 4 etapas fisiológicas (Fig. 2).

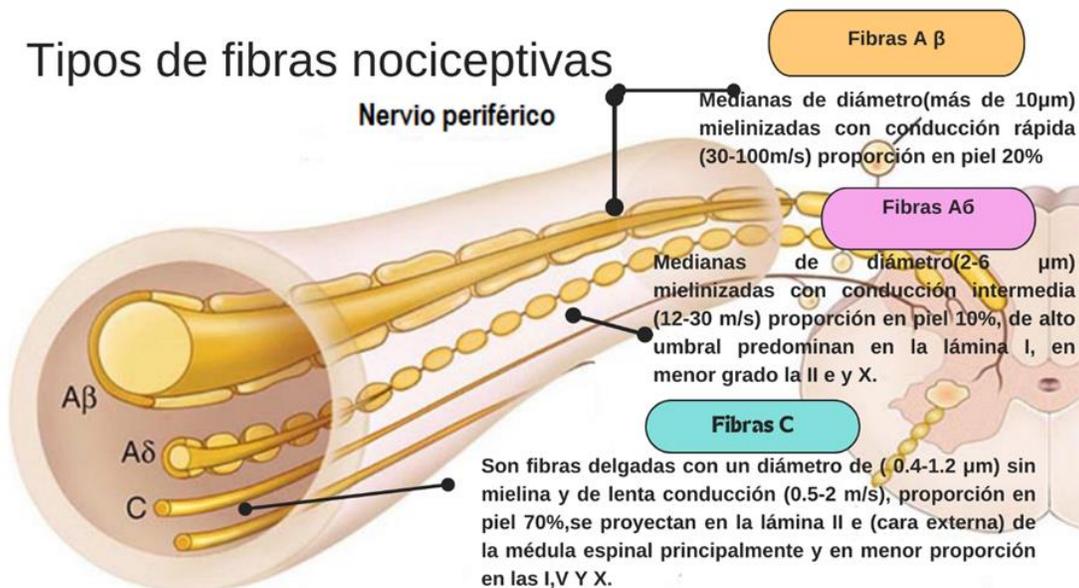
1. **Transducción** es la conversión de los estímulos percibidos en las terminaciones nerviosas periféricas o neuronas aferentes primarias en señales eléctricas, dicho paso es necesario ya que el resto de las etapas solo procesan la información de tipo eléctrico.
2. **Transmisión** es la propagación de las señales eléctricas a través de las fibras nerviosas.
3. **Modulación** se lleva a cabo en el asta dorsal de la médula espinal, en este sitio se modula la señal eléctrica ya sea por amplificación o inhibición.
4. **Percepción** fase en la cual se integran los impulsos nociceptivos en la corteza cerebral, la cognición y las emocionales crean la experiencia del dolor.

La transducción y la transmisión se llevan a cabo mediante distintos tipos de fibras, las cuales se clasifican por tres características; diámetro, grado de mielinización y velocidad de conducción (Fig. 3).

Los cuerpos celulares de las neuronas aferentes primarias están localizados de manera estratégica en los ganglios de la raíz dorsal, de éstos salen raíces dorsales hacia la médula espinal, particularmente llegan a la sustancia gris del asta posterior (Zegarra, 2007). La función principal es recoger información sensorial de las porciones distales hacia el interior de la médula espinal, dicha información posteriormente es enviada hacia las vías superiores o puede descartarse si el estímulo no es suficiente para pasar un umbral específico de dolor.



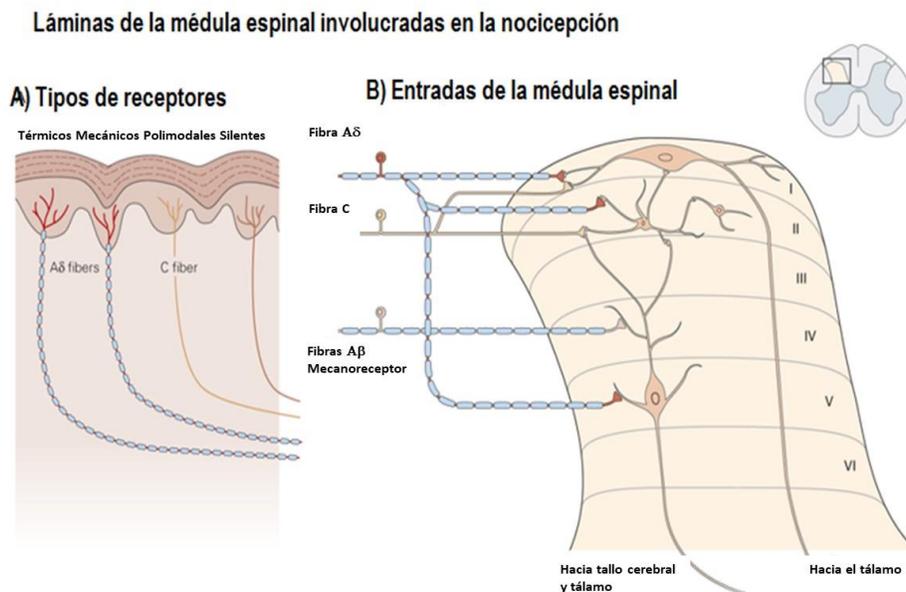
**Figura 2.** Etapas fisiológicas del proceso nociceptivo. Una vez que se detecta un estímulo nocivo, éste se traduce a señales eléctricas que viajan a través de las fibras periféricas hacia la médula espinal y de ahí hacia la corteza (proceso aferente). Después de la integración del proceso doloroso se genera una respuesta de regreso (descendente) para contrarrestar al estímulo nocivo en la periferia (Modificado de Dureja et al., 2017).



**Figura 3.** Clasificación de las fibras nociceptivas Modificado de (Kendal et al., 2014)

a. *Asta dorsal de la médula espinal*

El asta dorsal de la médula espinal es de suma importancia, ya que es el centro de integración de la información nociceptiva. Es el primer eslabón de la conexión hacia el SNC, debido a su estructura, éste no se limita a solo ser un eslabón donde la información transita a través de él para su transmisión hacia los centros superiores, también es sometida a transformaciones mediante las cuales dicha información nociceptiva será filtrada, discriminada, integrada y codificada (Guevara, 2005). A su vez se encarga de la distribución y dirección de la información hacia una o varias vías ascendentes que implican a estructuras y funciones nerviosas diferentes (Guevara, 2005). Es el centro que integra y elabora las respuestas reflejas, tanto vegetativas como somato-motoras y es la región preferente donde estructuras superiores emiten sus prolongaciones axónicas para la modulación de estímulos nociceptivos (Guevara, 2005). La sustancia gris de la médula espinal se divide en 10 láminas de rexed, al asta media dorsal espinal I corresponden las láminas de la I a VI. Las láminas más superficiales (I y II) con las más profundas (V y VI) y X constituyen las regiones con mayor implicación en la recepción, el procesamiento y la transmisión de la información de nocicepción (Fig. 4).



**Figura 4.** Láminas de rexed involucradas en el proceso de nocicepción (Kandel et al., 2014).

Las fibras C proyectan principalmente a la lámina II (cara externa de la lámina II) y en menor grado hacia las láminas I, V y X. Por otra parte, las fibras A $\delta$  de alto umbral inervan de manera predominante la lámina I, y en menor grado, las láminas II y X. Las aferencias desmielinizadas viscerales, de articulaciones y de los músculos, proyectan sus axones principalmente hacia las láminas I, V/VI y X. Existe un grado notable de convergencia, ya que las aferencias de diversas regiones del organismo proyectan hacia una sola neurona espinal (Villanueva, 1998).

*b. Neuronas de la asta dorsal de la médula dorsal*

Las neuronas de la asta dorsal de la médula espinal se clasifican en tres categorías, debido a la proyección de los axones, dando como resultado neuronas de proyección, neuronas propio-espinales e interneuronas locales (Hunt y Mantyh, 2001). Las *neuronas de proyección* se encargan de transferir la información sensitiva desde la médula espinal hacia los centros cerebrales superiores, estos relacionados con percepción, atención, aprendizaje, conducta, emoción y respuestas autonómicas, del mismo modo está comprometida en la activación de los sistemas ascendentes moduladores, y estos a su vez controlan el estado de excitabilidad de las neuronas del asta dorsal, por medio de mecanismos de excitación o inhibición. En el asta dorsal se encuentran tres tipos de neuronas como se muestra en el cuadro 1 (Hunt y Mantyh, 2001).

**Cuadro 1.** Tipos de neuronas en el asta dorsal de la médula espinal

Neuronas nociceptivas específicas	Neuronas multirreceptoriales	Neuronas no nociceptivas
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Solo se activan con estímulos nocivos de alta intensidad</li> <li>• Mediadas por fibras C y A <math>\delta</math></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Muestran convergencia con estímulos cutáneos, musculares y viscerales</li> <li>• Mediadas por los tres tipos de fibras</li> <li>• Responden a estímulos térmicos mecánicos y químicos</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Se encuentran principalmente en la láminas II, III y IV y en menor proporción en la I</li> </ul>

---

Las *Neuronas propio-espinales* se encargan de transferir información de un segmento a otro, en la nocicepción funcionan como vías multi-sinápticas que posteriormente pueden transferir la información al cerebro (Walter, 2005). Las *interneuronas* pueden ser de tipo inhibitorias o excitatorias, jugando así un rol homeostático dentro del mantenimiento de los campos receptivos del asta dorsal. La actividad de la sinapsis de las fibras aferentes primarias e interneuronas puede producir potenciales postsinápticos excitatorios acumulándose la excitabilidad neuronal, puede usarse cuando la transmisión sensorial necesita ser incrementada (Hunt y Mantyh, 2001).

### **3.2 Tratamiento del dolor**

El alivio del dolor es fundamental en la práctica médica, para proporcionar el mejor tratamiento, se debe considerar que en el dolor intervienen factores biológicos (como el daño a tejidos), psicológicos (emociones y experiencias anteriores) y sociales (aprendizaje previo e interacción con los demás) (Castañeda, 2020). Ante la presencia del dolor la idea principal es eliminar la causa, se debe identificar la localización y sus características. En la mayoría de los casos el dolor se puede controlar con el uso de fármacos, que son capaces de inducir analgesia, es decir producen la insensibilidad o disminución de la sensación del dolor. A estos fármacos que son capaces de aliviar el dolor, sin aliviar el estado de conciencia se les llama analgésicos (López y Granados, 1998). Los fármacos analgésicos se clasifican en general como Analgésicos Antiinflamatorios no Esteroideos (AINE's) y analgésicos opioides. Dependiendo del tipo de dolor la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha establecido para el tratamiento una escalera analgésica, ésta consiste en ir aumentando la intensidad de efecto de acuerdo con la intensidad del dolor, así por ejemplo si el dolor es de leve a moderado se utilizan AINE's, si el dolor es de moderado a intenso se sugiere el uso de opioides, si el dolor persiste se recurre a coadyuvantes como anticonvulsivos, ansiolíticos o sedantes. Si aún con estos fármacos no hay alivio del dolor se recurre a combinaciones; primero AINE's con

---

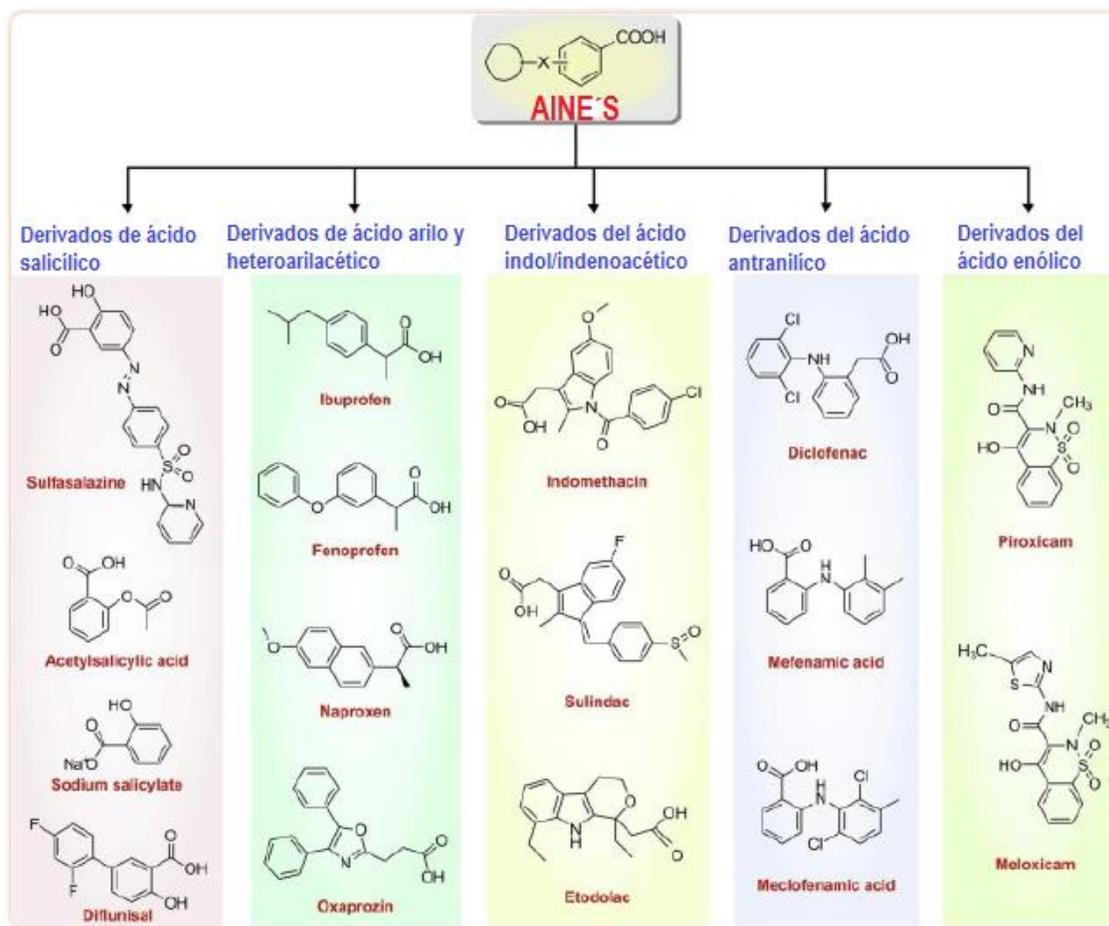
opioides débiles y luego AINE's con opioides fuertes y finalmente opioides con coadyuvantes.

### **3.2.1 Fármacos Antiinflamatorios No Esteroideos (AINE's)**

Debido a su eficacia para reducir el dolor e inflamación, los medicamentos de tipo AINE se encuentran entre los más utilizados en la población; también tienen propiedades antiinflamatorias y antipiréticas. Los AINE's son fármacos de venta libre en México y en algunas partes del mundo, se ha documentado que constituyen el 5% de todos los medicamentos prescritos, tradicionalmente se emplean en el dolor vinculado a enfermedades reumáticas (Mazumder y Bandyopadhyay, 2020). Tradicionalmente se clasificaban en función de sus características químicas como derivados principales del ácido salicílico, derivados de ácido arilo y heteroarilacético, derivados del ácido indol/indenoacético, derivados del ácido antranílico y derivados del ácido enólico (Cuadro 2) (Mazumder y Bandyopadhyay, 2020).

Actualmente los AINE's se clasifican de acuerdo con la selectividad para inhibir la enzima ciclooxigenasa (COX) de la cual se conocen 2 isoformas (COX-1 y COX-2). En las membranas celulares se localiza el ácido araquidónico (AA), el cual es metabolizado por la COX a prostaglandinas (PG) y prostaciclina. La selectividad de los AINE's se obtiene de la concentración inhibitoria 50 (CI<sub>50</sub>) sobre la actividad de la enzima COX particularmente en ensayos *in vitro* de sangre completa humana. Si la relación es 1, entonces ambas enzimas COX son igualmente inhibidas por el AINE en cuestión, si la relación es inferior a 1, significa que el AINE en cuestión es menos selectivo para COX-2 en comparación con COX-1 y en caso de relación mayor que 1, el AINE es preferentemente selectivo hacia COX-2 (Tabla 1).

**Cuadro 2.** Clasificación estructural de los AINE'S



**Tabla 1.** Categorización de los AINE basada en la acción inhibidora selectiva de PG

Categoría	Selectividad de COX	AINE'S representativos
Categoría 1	COX-1 y COX-2	Indometacina ,Aspirina ,Diclofenaco, Naproxeno, Ibuprofeno
Categoría 2	Selectividad 5-50 veces para COX-2	Meloxicam, Celecoxib, Nimesulida, Etodolaco
Categoría 3	Selectividad superior a 50 veces para COX-2	NS-398
Categoría 4	Baja selectividad para COX-1 y COX-2	Sulfalazina, Salicilato de sodio, Nabumetona

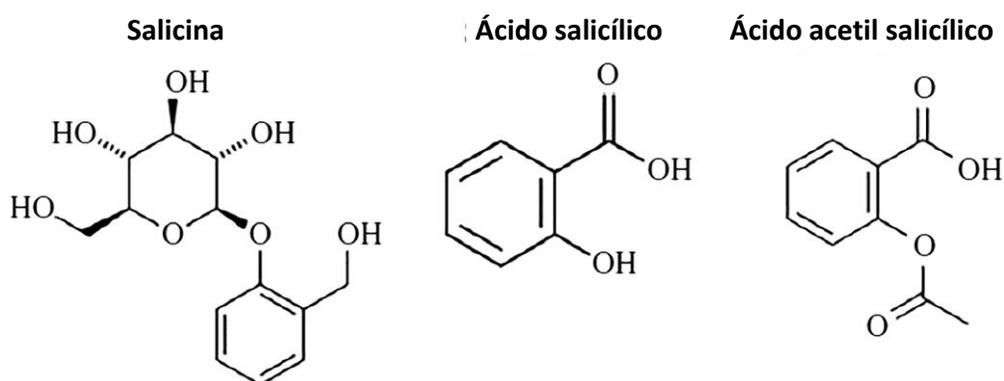
---

A continuación se detalla una breve historia de los AINES utilizados en este proyecto:

**Ácido acetil salicílico:** La corteza de sauce se ha utilizado como medicina tradicional durante más de 3500 años. Los antiguos sumerios y egipcios quienes la utilizaban desconocían su componente activo, la salicina (Fig. 5), compuesto base del descubrimiento de la aspirina. Como antecedente histórico se tiene la existencia de dos papiros datan de alrededor del 1500 a. C. El primero se conoce como el papiro quirúrgico de Edwin Smith y detalla 48 casos quirúrgicos y su manejo, el otro se conoce como el Papiro de Ebers y es un registro egipcio con alrededor de 160 remedios herbales y vegetales, entre los cuales está escrito el uso de tjeret o salix (ahora conocido como sauce) para el tratamiento de dolores inespecíficos. Se ha documentado que *“Johann Buchner (1783–1852) refinó por primera vez la corteza de sauce en cristales amarillos y la llamó Salicin (en honor a Salix, el género del sauce). En 1829, Pierre-Joseph Leroux (1795–1870) perfeccionó el proceso en Francia y dio un paso más en 1838 cuando Raffaele Piria (1814–1865) produjo un compuesto más fuerte a partir de los cristales aislados del sauce. corteza, a la que denominó ácido salicílico”* (Desborough et al., 2017).

En 1852, el químico francés Charles Gerhardt fue el primero en modificar el ácido salicílico (Fig. 5) con la introducción de un grupo acetilo en lugar de un grupo hidroxilo, pero el compuesto no era estable. Posteriormente, la acetilación del ácido salicílico demostró ser el paso clave para reducir sus propiedades irritantes. A nivel clínico Thomas Maclagan, un médico escocés del Dundee Royal Infirmary publicó el primer ensayo para aliviar la fiebre reumática, el fue el primero en tomar salicina antes de sus pacientes, sin embargo, se presentaron complicaciones con la gastritis. En 1890, el fabricante alemán de colorantes, Bayer, estableció una división farmacéutica con instalaciones de investigación para científicos. Esto siguió al éxito inicial obtenido con medicamentos antipiréticos a partir de productos de desecho del proceso de fabricación de tintes. El establecimiento de esta unidad resultó en un rápido desarrollo de una gran cantidad de medicamentos (Desborough et al., 2017). Tres figuras clave en el descubrimiento de la aspirina en Bayer fueron Arthur Eichengrün (1867–1949) (jefe de la división farmacéutica, responsable del

desarrollo de nuevos medicamentos, Felix Hoffmann (1868–1946) (químico que trabajaba para Eichengrün, y Heinrich Dreser) (1860–1924) (jefe de la sección de farmacología, responsable de los ensayos clínicos). Existe una controversia en curso sobre cómo se debe distribuir el crédito por el descubrimiento de la aspirina (fig. 5). En 1897, Eichengrün decidió desarrollar una forma de salicilato que no causara irritación gástrica. Asignó esta tarea a Hoffmann. Hoffmann había estudiado como químico farmacéutico en la Universidad de Munich y en 1894 fue contratado por Farbenfabriken vormals Frederich Bayer & Company. Cuando Eichengrün le asignó esta tarea, Hoffmann se puso a trabajar tratando de manipular el ácido salicílico que extraía de las hojas secas de reina de los prados. Fue capaz de acetilar un grupo fenol del ácido salicílico, produciendo ácido acetilsalicílico. Su avance se registró en su libro de laboratorio el 10 de agosto de 1897 (Desborough et al., 2017).

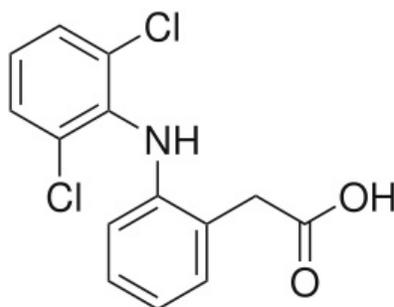


**Figura 5.** Estructura química de la salicina, ácido salicílico y ácido acetil salicílico.

En 1971, Vane descubrió el mecanismo por el cual la aspirina ejerce sus acciones antiinflamatorias, analgésicas y antipiréticas. Demostró que la aspirina y otros AINE´s inhiben la actividad de la enzima COX que conduce a la formación de PG que causan inflamación, hinchazón, dolor y fiebre (Vane y Botting, 2003). Sin embargo, las PGs tienen una doble función; por una parte participan en los procesos de dolor e inflamación, pero por otro lado tienen efectos protectores fisiológicos como la homeostasis cardiovascular y renal, además de protección gástrica. Entonces al inhibir a la COX se producen los efectos adversos de los AINE´s, daño gástrico, renal y cardiovascular. Adicionalmente, se estableció que la isoforma COX-

1 tiene efectos protectores y que la responsable del dolor e inflamación era la COX-2. Sin embargo, ahora se sabe que ambas isoformas participan tanto en procesos de dolor como en protección, aunque la isoforma COX-2 presenta un mayor porcentaje de actividad en la generación de dolor e inflamación (Consalvi et al., 2015).

**Diclofenaco:** El diclofenaco es un derivado del ácido fenilacético (2-[2,6-ácido dicloroanilino]fenilacético) que está disponible para su venta en formulaciones en sodio y potasio (Fig. 6). La sal sódica de diclofenaco está indicada para la osteoartritis, artritis reumatoide, espondilitis anquilosante, y dolor de leve a moderado (Atzeni et al., 2018). La formulación de diclofenaco de liberación lenta resiste la disolución en el pH bajo del estómago, pero permite una liberación rápida al pH más alto del duodeno. El diclofenaco potásico es de liberación inmediata, se libera en el estómago para una absorción rápida.



**Figura 6.** Estructura química de diclofenaco.

El diclofenaco por ser un AINE tiene como mecanismo de acción la inhibición de COX (Altman et al., 2015). Adicionalmente, se ha encontrado que diclofenaco no puede inhibir la actividad de la fosfolipasa A2 (PLA2) como lo hace indometacina, pero puede aumentar la absorción del AA en monocitos y macrófagos, no así en células cancerosas. Sin embargo, en condiciones *in vivo* el diclofenaco puede inhibir la actividad de la PLA2 en un 90% (Schaloske y Dennis, 2006). Otro mecanismo de acción propuesto para el diclofenaco es a través de la L-arginina-óxido nítrico-cGMP, mediante la actividad de canales de potasio, debido a que el efecto analgésico fue bloqueado por inhibidores de la guanilato ciclasa y la formación de

---

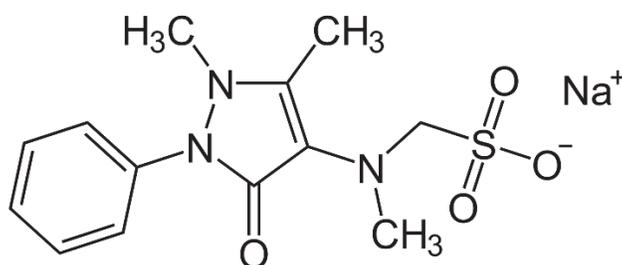
óxido nítrico a partir de L-arginina fue potenciados por un inhibidor de cGMP (Tonussi y Ferreira, 1994; Lázaro-Ibáñez et al., 2001).

El diclofenaco también tiene afinidad por PPAR $\gamma$  50 veces mayor que el reportado para otros AINEs, al igual que la indometacina son agonistas selectivos para PPAR $\gamma$  ocasionando la reducción de la proliferación celular al disminuir la viabilidad celular e induciendo la apoptosis. Este dato es contradictorio ya que también se ha documentado que el diclofenaco actúa como un antagonista de la señalización de PPAR $\gamma$ , lo que lleva a 60% de disminución en la diferenciación de células adiposas mediada por PPAR $\gamma$  lo que sugiere que bajo ciertas condiciones, podría promover la inflamación al bloquear la actividad antiinflamatoria de PPAR $\gamma$  (Na y Surh, 2003). En un modelo de macrófagos el diclofenaco induce la expresión de COX-2 a través de una vía PPAR $\gamma$ , lo que resulta en la liberación de varias citocinas antiinflamatorias, incluida la interleucina-10 (IL-10) y el factor de transformación del crecimiento (Ayoub et al., 2009)

Aunque los AINE son generalmente bien tolerados, la Administración de Drogas y Alimentos de EEUU (FDA) ha establecido los riesgos que presentan éstos fármacos como lo es el sangrado, la ulceración y perforación del estómago o los intestinos y el aumento del riesgo de eventos trombóticos cardiovasculares graves, miocardio infarto y apoplejía. Además, como la inhibición de COX-2 puede afectar la formación de prostaglandinas y los niveles de transaminasas, la insuficiencia renal y la hepatotoxicidad son potenciales complicaciones del tratamiento con diclofenaco.

**Metamizol:** La dipirona o metamizol [(1,5-dimetil-3-oxo-2-fenil-2,3-dihidro-1H-piridazol-4-il)-N-metilamino] metansulfonato es un fármaco tipo AINE (Fig. 7). Se sintetizó por primera vez en 1920 en Alemania, y tiene propiedades analgésicas, antipiréticas y antiinflamatorias, se utiliza ampliamente en cirugía ambulatoria y cirugía menor. Al igual que el diclofenaco inhibe la síntesis de PG por inhibición de COX y presenta los mismos efectos adversos como gastrointestinales, cardiovasculares, renales e hipertensivos además de agranulocitosis (Hawkey 1999; Kötter et al., 2015).

La dipirona es un analgésico controvertido. Se usa más comúnmente para tratar el dolor posoperatorio, el dolor de tipo cólico, el dolor por cáncer y la migraña, y en muchos países como Rusia, España, México y en muchas partes de América del Sur, Asia y África sigue siendo un medicamento popular no recomendado para la salud. Es un analgésico opioide de primera línea y por ello en algunos países solo se vende con prescripción médica como en Alemania y España. En otros países esta prohibida su venta como lo es Estados Unidos de América, Reino Unido, Japón, Canadá y algunas partes de Europa y Escandinavia debido a su asociación con discrasias sanguíneas potencialmente mortales, como la agranulocitosis. En los países donde está prohibido, todavía puede estar disponible y ser ampliamente utilizado por las poblaciones inmigrantes (Bonkowsky et al., 2002).



**Figura 7.** Estructura química del metamizol.

Aunque la dipirona se ha utilizado durante muchos años, actualmente no se conocen a ciencia cierta los riesgos y daños de este fármaco. No hay grandes ensayos controlados aleatorios o concluyentes de la literatura existente. Existen tres revisiones Cochrane sobre la eficacia y la seguridad del metamizol para el dolor posoperatorio agudo, el dolor cólico renal agudo y las cefaleas primarias agudas, en todos los casos se ha documentado su eficacia analgésica pero no sobre su seguridad y solo se conocen algunos efectos adversos como somnolencia, molestias gástricas y náuseas (Kötter et al., 2015).

### 3.2.2 Fármacos analgésicos opioides.

La adormidera se cultivaba ya en 3400 AC en Mesopotamia. El término opio se refiere a una mezcla de alcaloides de la semilla de amapola. Los opiáceos son alcaloides naturales como la morfina o la codeína. Opiáceo es el término que se usa ampliamente para describir todos compuestos que funcionan en los receptores opioides. El término narcótico (de la palabra griega para estupor) originalmente se usó para describir medicamentos para dormir, luego se usó para describir los opioides, pero ahora es un término legal por las drogas de las que se abusa. En la actualidad, el término opioide se usa para cualquier molécula natural o sintética que actúa en los receptores de los opioides. Los analgésicos opioides son los fármacos de elección para el tratamiento de dolor post-operatorio agudo, dolor crónico, dolor por traumatismo y dolor asociado a cáncer o visceral (Rodríguez et al., 2009).

La clasificación de los fármacos opioides es compleja, se puede realizar según varios criterios:

- A. Origen: natural, sintético y semisintético.
- B. Estructura química: fenantrenos, fenilpiperidinas, fenilheptilaminas, benzomorfanos y morfanos.
- C. Intensidad del dolor que son capaces de suprimir: débiles y potentes.
- D. Tipo de interacción con el receptor: afinidad por receptores  $\mu$ ,  $\delta$ ,  $\kappa$  y eficacia (agonistas, antagonistas, agonistas parciales, agonistas-antagonistas).
- E. Duración de acción: retardada, corta y ultracorta.

Los opiáceos actúan en receptores opioides; estos se encuentran en el SNC, en el sistema periférico y el sistema entérico, a continuación, se describe los tipos de receptores opioides (Trescot et al., 2008).

---

**Mu ( $\mu$ ) (agonista de la morfina).** Se encuentran receptores Mu principalmente en el tronco encefálico y el tálamo medial. Los receptores Mu son responsables de la analgesia supraespinal, depresión respiratoria, euforia, sedación, disminución de la motilidad gastrointestinal y física dependencia. Los subtipos incluyen Mu1 y Mu2, con Mu1 relacionado con analgesia, euforia y serenidad, mientras que Mu2 se relaciona con depresión respiratoria, prurito, liberación de prolactina, dependencia, anorexia y sedación. Estos también se llaman OP3 o MOR (receptores opioides de morfina) (Trescot et al., 2008).

**Kappa ( $\kappa$ ) (agonista cetociclazocina).** Receptores Kappa se encuentran en el límbico y otras áreas del encefálico, el tronco encefálico y la médula espinal, y son responsables para analgesia espinal, sedación, disnea, dependencia, disforia y depresión respiratoria. Estos también se conocen como OP2 o KOR (receptores opioides kappa) (Trescot et al., 2008).

**Delta ( $\delta$ ) (agonista delta-alanina-delta-leucina-encefalina).** Los receptores delta se encuentran principalmente en el cerebro y sus efectos no están bien estudiados. Ellos pueden ser responsables de la psicomimética y disforia, éstos son llamados OP1 y DOR (Trescot et al., 2008).

Estos receptores tienen un dominio extracelular N-terminal, 7 hélices transmembrana, 3 bucles extracelulares e intracelulares, y un C-terminal intracelular. Cuando el receptor es activado se libera una porción de la proteína G, que se difunde dentro de la membrana que ocasiona la fosforilación de proteínas a través de la inhibición de AMP cíclico que actúa como un segundo mensajero dentro de la célula que resulta en la activación de proteínas quinasas (corto efecto a largo plazo) y proteínas de transcripción génica y/o transcripción de genes (efectos a largo plazo). A nivel presináptico la activación de receptores opioides en las fibras A delta inhiben indirectamente canales de voltaje dependientes de calcio y disminuyen el AMPc, lo que trae como consecuencia la inhibición de la liberación de mediadores

---

del dolor como de AMPc glutamato, sustancia P (SP) y péptido relacionado con el gen calcitonina (CGRP) en las fibras nociceptivas, lo que produce analgesia.

Los opioides endógenos o exógenos activan los receptores a nivel presináptico en las neuronas GABA, ocasionando la inhibición de la liberación de GABA en el área tegmental ventral lo que permite que las neuronas dopaminérgicas disparen más vigorosamente, y la dopamina extra en el núcleo accumbens ocasiona un efecto altamente placentero. Es importante mencionar que los efectos de los agonistas opioides están relacionados por la afinidad hacia los diferentes tipos de receptores. Los opioides también pueden antagonizar al receptor N-metil-D-aspartato (NMDA), lo que ocasiona la actividad de las vías descendentes del dolor como la serotonina y la noradrenalina a nivel del tronco cerebral. La sobreactivación de este receptor trae como consecuencia la generación de dolor neuropático y tolerancia analgésica (Mellon y Bayer, 1998).

Los opioides endógenos se descubrieron en 1973, la encefalina permite la regulación de secreciones de hormonas, participa en la termorregulación, y control cardiovascular, de estas encefalinas se deriva la proencefalina y las endorfinas se derivan de la pro-piomelanocortina. Las dinorfinas se derivan de las pro-dinorfinas y son altamente selectivas para el receptor  $\mu$ . Las Nociceptinas (nociceptina/orfaninaFQ [N/OFQ]) (orfanina), tienen potentes efectos hiperalgésicos poca afinidad por los receptores  $\mu$ ,  $\delta$  o  $\kappa$ , sus receptores se llaman ORL-1 ("similar a un receptor de opioides"). Los antagonistas de la nociceptina se caracterizan por tener efectos antidepresivos y analgésicos en el desarrollo de la tolerancia.

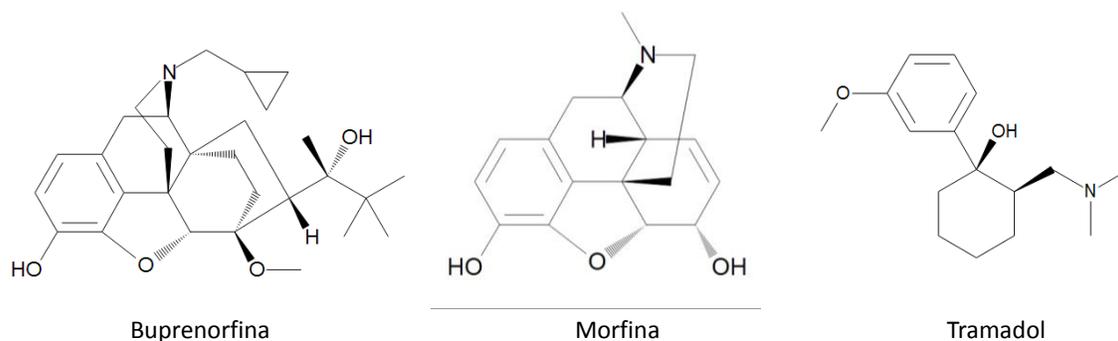
**Buprenorfina.** La buprenorfina es un analgésico opioide de la Lista III que fue aprobado por la FDA en 1981 como agente inyectable para el tratamiento del dolor moderado a intenso (Fig. 8). Después de la formulación sublingual (no inyectable), se aprobó la buprenorfina para el tratamiento del trastorno por uso de opioides. Más recientemente, nuevas formulaciones de buprenorfina han sido aprobadas por la FDA para el tratamiento del dolor crónico. Es un fármaco agonista de alta eficacia analgésica, se utiliza de forma transdérmica y sublingual debido a su rápida absorción para el tratamiento de dolor intenso y crónico. Después de su

---

administración se metaboliza a nivel de citocromos (P450-3A4). Como parte de los efectos adversos que presenta esta la sedación, náuseas y/o vómitos, mareos, dolor de cabeza y depresión respiratoria. Los efectos depresores respiratorios de la buprenorfina se invierten sólo con dosis relativamente altas de naloxona (antagonista de los receptores opioides).

Desafortunadamente, el historial de desarrollo de la buprenorfina ha llevado a confusión y malentendidos sobre su farmacología y utilidad clínica. Por ejemplo, el etiquetado de la buprenorfina como un agonista parcial del receptor opioide  $\mu$  se ha malinterpretado como implicando una eficacia “parcial” o baja en comparación con un agonista total del receptor opioide  $\mu$ ; este no es el caso. Además, aunque la dosis de buprenorfina para el dolor crónico es más baja que la del uso de otros opioides, esto no implica que la dosis analgésica sea de alguna manera menos efectiva. La buprenorfina a menudo se considera para su indicación en pacientes con mal uso de opioides; sin embargo, originalmente se formuló como un analgésico, ya que los datos respaldaban claramente su eficacia para aliviar el dolor. También puede haber una falta de conocimiento sobre las estrategias de conversión para minimizar o evitar la abstinencia precipitada (p. ej., abstinencia provocada por el cambio de opioides) cuando se pasa de un agonista del receptor opioide  $\mu$  completo a la buprenorfina (Webster et al., 2020)

Aunque se sabe que los efectos analgésicos de la buprenorfina están mediados por el receptor opioide  $\mu$ , los efectos multimecanísticos en otros receptores opioides también pueden contribuir a la eficacia y tolerabilidad. La buprenorfina es un agonista completo en el tipo de receptor opioide 1 (ORL1) identificado más recientemente, que puede contribuir a la analgesia, y es un antagonista de los receptores opioides  $\delta$  y  $\kappa$ , que disminuyen el estreñimiento, la disforia y el potencial de abuso y ayuda a reducir la depresión mental. De hecho, se ha demostrado que la buprenorfina reduce eficazmente los síntomas depresivos y la ideación suicida en pacientes que no responden a los medicamentos antidepresivos convencionales. Sin embargo, estas y otras interacciones complejas del receptor requieren más estudio (Yamamoto et al., 2006; Ahmadi et al., 2018).



**Figura 8.** Estructura química de buprenorfina, morfina y tramadol.

**Morfina.** A principios del siglo XIX los farmacéuticos alemanes Friedrich Wilhelm Sertürner aislaron por primera vez a la morfina (Fig.8) del opio, la cual se utiliza hoy en día para el tratamiento del dolor severo. Sin embargo, tiene como principales efectos secundarios náuseas, vómitos, sedación y depresión respiratoria, adicción y estreñimiento (Wicks et al., 2021).

Durante el siglo XX, se han desarrollado varios sustitutos de la morfina, incluyendo la metadona y los derivados de la fenilpiperidina (como la meperidina y el fentanilo); en un inicio se pensó que éstos no presentarían efectos adversos, sin embargo, comparten los mismos efectos secundarios que la morfina. La morfina al metabolizarse produce un metabolito activo, la morfina-6-glucurónido (M6G), el cual presenta una alta eficacia para disminuir el dolor (Wicks et al., 2021).

El mecanismo de acción de la morfina es mediante la estimulación de la proteína G acoplada a los receptores opioides  $\mu$ ,  $\kappa$  y  $\delta$ . La mayor afinidad de unión de la morfina es para el receptor  $\mu$  seguido de  $\kappa$  y luego  $\delta$ . En ratones deficientes del receptor  $\mu$ -opioide y con niveles normales de  $\kappa$  y  $\delta$ , se encontró que la respuesta de morfina se debe prácticamente a la ocupación del receptor  $\mu$ . Los receptores opioides se acoplan a las proteínas  $G_i/G_o$  que inhiben la vía AMPc. Las vías de señalización hacia abajo conducen al bloqueo de la excitación neuronal y la analgesia. La unión posterior de arrestinas desencadena la desensibilización e internalización del receptor.

Los receptores opioides están altamente expresados en el cerebro en regiones conocidas que regulan el dolor, secretan neurohormonas y están vinculados a zonas de estrés y recompensa. Los receptores opioides también se encuentran en la

---

médula espinal, sitio donde se regula ampliamente el proceso nociceptivo (Webste, 2015). El efecto de la morfina se complementa con la participación de los opioides endógenos que se liberan en las mismas regiones donde hay alta expresión de los receptores opioides. Se cree que la endomorfina es el ligando predominante para el receptor opioide  $\mu$  (La  $\beta$ -endorfina también se une a este receptor) mientras que, las encefalinas se unen a los receptores opioides  $\delta$  y las dinorfinas se unen a los receptores opioides  $\kappa$ . Además, hay una serie de péptidos opioides que no son selectivos para cualquier receptor. Por otra parte los antagonistas opioides; como la naltrexona y la naloxona, bloquean la acción de morfina en estos receptores. Tratamiento con estos antagonistas en animales dependientes de morfina conduce al desarrollo de un estado de abstinencia caracterizada por respuestas físicas y conductuales (Mercadante y Bruera, 2006).

Los opioides son la terapia fundamental para el tratamiento del dolor moderado a intenso. Aunque las preocupaciones comunes con respecto al uso de opioides incluyen la posibilidad de efectos secundarios perjudiciales, dependencia física y adicción, la evidencia acumulada sugiere que los opioides aún pueden causar otro problema, a menudo denominado hiperalgesia inducida por opioides. De manera un tanto paradójica, la terapia con opiáceos destinada a aliviar el dolor puede hacer que los pacientes sean más sensibles al dolor y potencialmente puede agravar su dolor preexistente (Angst et al., 2006).

**Tramadol.** El tramadol es un fármaco análogo de la codeína (Fig.8) analgésico de doble acción utilizado en el tratamiento de una variedad de síndromes dolorosos de moderado a intenso, a comparación de la morfina no presenta efectos adversos graves en dosis terapéuticas, se considera seguro ya que no causa depresión respiratoria ni adicción. Produce su acción al inhibir la actividad agonista a los receptores  $\mu$ , receptores serotoninérgicos y de catecolaminas GABA centrales (Subedi et al., 2019).

El tramadol Genera síndrome serotoninérgico con un uso prolongado, por interacciones de medicamentos y sobredosis. El síndrome serotoninérgico es la consecuencia de hiperactividad de los receptores de 5-hidroxitriptamina (5-HT) a

---

nivel central y periférico específicamente los receptores 5-HT<sub>1A</sub> y 5-HT<sub>2A</sub>. La serotonina se deriva de la descarboxilación e hidroxilación del triptófano. Se libera en la hendidura sináptica donde se ha demostrado que se une al menos a 7 receptores separados que modulan el comportamiento, la termorregulación y atención centralmente, mientras que influye periféricamente en la motilidad gastrointestinal, broncoconstricción, vasoconstricción y agregación plaquetaria. De los 7 receptores a los que se une la serotonina, el receptor 5-HT<sub>1A</sub> y 5-HT<sub>2A</sub> que están más asociados con síndrome serotoninérgico. Luego, la serotonina se degrada por la monoaminoxidasa para ser excretada en la orina como ácido 5-hidroxiindolacético. El síndrome serotoninérgico se asocia con el uso de fármacos serotoninérgicos. Estos incluyen medicamentos que influyen absorción, metabolismo, síntesis, liberación y actividad del receptor de serotonina; también fármacos con la capacidad interferir con el metabolismo del citocromo P450, específicamente CYP2D6 y CYP3A4 (Beakley et al., 2015)

### **3.3 Modelos animales para el estudio del dolor**

Los animales de experimentación contribuyen no solo al descubrimiento de los mecanismos que participan en el proceso nociceptivo, sino que permiten la identificación de compuestos activos con potencial efecto anti nociceptivo. El análisis de la conducta es una característica que se puede analizar en los animales y que se interpreta como dolor o analgesia. El proceso nociceptivo en animales de experimentación se define como “una experiencia sensorial aversiva causada por una lesión real o potencial que produce reacciones motoras y vegetativas progresivas que desencadena un comportamiento aprendido de evitación y éste puede modificar comportamientos específicos de la especie, incluyendo los sociales” (Ortega et al., 2002).

En este sentido, un modelo de nocicepción semeja a un dolor que padecen los humanos, en donde se valora la reacción de un animal ante un estímulo nocivo de naturaleza variada o situación patológica inducida que puede ser utilizado en circunstancias fisiológicas o patológicas (Ortega et al., 2002). Para evaluar

---

nocicepción se recurre a estímulos térmicos o químicos en los animales para que estos generen una conducta ante el estímulo (comportamientos espontáneos como morder, lamer, protegerse y estremecerse), el efecto nociceptivo es breve y temporal (Ortega et al., 2002; Rocha et al., 2009).

Una medida de estímulo-respuesta evocada consiste en una aplicación de un estímulo de intensidad creciente, que es comúnmente de naturaleza térmica, química o mecánica, seguida de la medición de un umbral o latencia en la que el animal muestra un comportamiento nocifensivo. Cuando cualquiera de estas medidas de estímulo-respuesta se aplican a animales normales, constituyen una medida de la nocicepción normal y se pueden utilizar para evaluar el efecto de analgésicos (Rocha et al., 2009).

La utilización de los modelos de dolor está justificada a nivel internacional por la (IASP) Asociación Internacional para el Estudio del Dolor, ante la necesidad de conocer las patologías y los potenciales compuestos terapéuticos que contribuyan al alivio del dolor. En los modelos de tipo nociceptivo se utilizan estímulos de naturaleza física o química, que tienen como objetivo determinar una latencia de respuesta por parte del animal ante dicho estímulo y tienen un desarrollo temporal breve (Ortega et al., 2002).

La nocicepción tiene al menos tres funciones:

- Advertir al individuo de la existencia de un daño tisular real;
- Advertir al individuo de la probabilidad de que un daño tisular está a punto de ocurrir al darse cuenta de que un estímulo tiene la potencial para causar tal daño;
- Para advertir a un grupo social de peligro que puede presentarse para cualquiera sus miembros (Le Bars et al., 2002).

Las metodologías empleadas para evaluar el dolor en animales suelen utilizar comportamientos espontáneos relacionados con el dolor o detección del umbral de dolor a un aumento gradual del estímulo. Algunos comportamientos relacionados con el dolor son: morder, lamer, protegerse y estremecerse. Estas conductas se

---

analizan primero en animales normales para después detectar si disminuyen o incrementan en animales sujetos a tratamientos y estímulos pro-nociceptivos (Rocha y Granados, 2009).

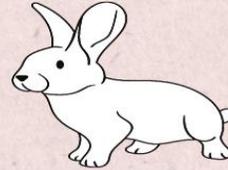
### **3.4 Características que debe cumplir un modelo de nocicepción**

En la figura 9, se enlistan algunas de las características que debe cumplir un modelo de nocicepción. Particularmente, resulta interesante establecer el tipo de estímulo nociceptivo que se utilizará ya que este debe activar el proceso fisiológico de nocicepción y debe controlarse para no generar un daño mayor así que hay que establecer la intensidad, duración y la superficie de estimulación, controlando la cantidad de respuesta que se genera a nivel de SNP y SNC. Por otra parte, es también importante considerar la vía de administración y el sitio. Hay que considerar si se requiere de un dolor de tipo somático, visceral, articular o muscular, dependiendo de ello el estímulo nociceptivo irá dirigido hacia cierto tejido; por ejemplo; la cola de los roedores es una estructura usada con frecuencia ya que es esencial para la termorregulación y equilibrio en los animales (Le Bars et al., 2002) El dolor nociceptivo agudo es un componente importante del sistema sensorial que permite a los organismos sobrevivir en ambientes hostiles evitando tejido lesión, pero no existen patologías asociadas a este proceso. Sin embargo, los modelos experimentales en animales han proporcionado los mecanismos para comprender el procesamiento de información nociceptiva en ausencia de lesión tisular o nerviosa. Por el contrario, después de una lesión o inflamación del tejido, un observador puede reportar un dolor continuo espontáneo, tanto en el áreas de la lesión como en el sitio que rodea al daño (hiperalgesia primaria) (Arrieta y Granados, 2009).

# Características que debe cumplir un modelo animal para evaluar nocicepción

## 1 Estímulo nociceptivo

También llamado "especificidad de entrada" debe provocar nocicepción y no conductas de reflejo

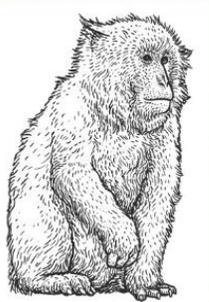


## 2 Especificidad de salida

De ser posible, se deben distinguir las respuestas conductuales producidas por estímulos nociceptivos y los no nociceptivos.

## 3 Cuantificar la respuesta

Debe ser posible el conteo de la respuesta y la correlación con el estímulo y la intensidad del mismo en un rango razonable.



## 4 Sensibilidad

El modelo debe ser sensible a manipulaciones sobre todo farmacológicas, que reducirán el comportamiento nociceptivo, de manera específica y diferenciable a distintos agentes a dosis comparables en humanos.

## 5 Validez

El modelo debe permitir la diferenciación de los cambios de comportamiento no específicos de los desencadenados por un mismo estímulo nociceptivo.



Figura 9. Características que debe cumplir un modelo animal (Le Bars, Gozariu, Cadden, 2002).



**Figura 9.** Continuación.

### **3.5 Estímulos para evaluar nocicepción**

El dolor que se produce en animales de investigación comúnmente se manifiesta por un proceso de hipersensibilidad conductual o hiperalgesia, éste es un estado en cual se aumentan las respuestas ante estímulos que son nocivos, también se puede presentar alodinia que es una respuesta ante estímulos que normalmente no son nocivos. Otra de las manifestaciones que se pueden evaluar son los comportamientos espontáneos. Los estímulos que son aplicados en los modelos animales que se utilizan comúnmente se pueden dividir en tres grupos:

1. Aplicación de una alta intensidad mecánica o térmica en distintos sitios de la piel.
2. Aplicación de una inyección local de una sustancia algésica: se utilizan compuestos a nivel local o sistémico que provocan una respuesta

---

inflamatoria y el dolor posterior a la inflamación. Los ejemplos de dichas sustancias son formalina, capsaicina, bradicinina, ácido diluído, carragenina, zimosan y el adyuvante de Freund.

3. Inducción de una lesión del SNC producida por estímulos mecánicos directos, metabólicos o químicos. Por ejemplo, la ligadura de un nervio espinal, el daño por un proceso metabólico como el tratamiento con estreptozotocina y por tratamientos que a largo plazo generan dolor como el taxol.

*a) Pruebas para dolor inflamatorio en roedores*

La inflamación puede ocurrir por daños en los tejidos (incisiones o quemaduras), la exposición es estímulos químicos o procesos autoinmunes (algunas formas de artritis). En todos los casos, la estimulación del sistema inmunitario provoca la liberación de mediadores inflamatorios, como bradicinina, serotonina, prostaglandinas, ácido úrico, adyuvante de Freund y formalina entre otros. Estos mediadores a su vez producir varios efectos, incluida la activación sostenida y la sensibilización de ambos nociceptores primarios y neuronas de orden superior involucradas en la transmisión de entrada nociceptiva. Esta hipersensibilidad de las vías nociceptivas contribuye a los fenómenos conductuales de alodinia y/o hiperalgesia. En todas estas pruebas se deben utilizar los animales una sola vez e inmediatamente que se haya terminado de cuantificar la conducta deben sacrificarse para no generar un dolor innecesario en ellos.

El empleo de **ácido diluído** se utiliza desde la década de 1980, la administración de una sustancia irritante en la piel produce dolor y ardor de manera inmediata; en condiciones patológicas dolorosas, tales como artritis se asocia con pH bajos, por lo tanto al inducirlo ya sea por procesos patológicos o métodos experimentales el dolor se produce de forma dependiente de pH, también se encontró que en estos tejidos lesionados se encuentran con una osmolaridad elevada (Hamamoto et al., 2000). La **osmolaridad** de las sustancias irritantes también está implicada en la generación de ardor y dolor, dado que la disminución de pH en los tejidos aumenta la hiperosmolaridad (Hamamoto et al., 2000). Una de las sustancias más

---

ampliamente utilizada en la evaluación de nocicepción es la formalina, las soluciones de formol diluidas entre 0.1 y 5% están relacionadas con la generación de dos fases en la conducta de los animales, la primera fase está relacionada a un efecto neurogénico y la segunda a un proceso inflamatorio. La inyección de **formalina** en los animales de experimentación involucra cambios en el SNC como el factor de transcripción C-Fos en las neuronas, la activación de células gliales que pueden liberar citosinas y factores de crecimiento que pueden influir en la función neuronal (Cendán C, 2015). Tras la administración de formalina se activan los nociceptores, específicamente las fibras C y A  $\delta$  en los primeros 10 minutos (administrado en roedores), y si se administran anestésicos antes de la inyección de formalina, se encuentra que se suprimen las respuestas nocifensivas de esta primera fase en las neuronas multirreceptivas de la médula espinal (Cendán C, 2015).

Se ha demostrado que la formalina activa a neuronas sensoriales aferentes primarias por acción específica y directa en el receptor TRPA1, este pertenece a la familia de los canales iónicos del Potencial Receptor Transitorio (TRP), que se encuentra altamente expresado en una subpoblación de nociceptores en la fibras C (Cendán C, 2015).

El **mentol** es el aceite esencial natural refrescante obtenido de la *Mentha piperita*, es utilizado de manera amplia en diversas preparaciones para el alivio del dolor causado por lesiones deportivas, artritis, entre otras de las afecciones dolorosas (Boyi L et al., 2013). Este aceite esencial está compuesto por mentol en (50%) y mentona en (10%) (Martínez A, 2003).

En modelos animales la administración de mentol por vías tópica, oral o sistémica provoca analgesia del dolor agudo, inflamatorio y neuropático (Boyi L et al., 2013)

El mentol y el aceite de eucalipto activan receptores TRPM8 (Ferrer A, 2015), canales de potencial transitorio (TRP) detectores esenciales de estímulos fríos en las neuronas sensoriales, puede tener efectos similares al enfriamiento de los tejidos, lo que causa la disminución de dolor en algunas lesiones (Boyi L et al., 2013).

---

Los aceites de mentol y eucalipto tienen poca especificidad por los receptores TRPM8, y que estos interactúan a su vez con otros TRP, como los TRPA1, estos canales iónicos pueden provocar dolor y síntomas inflamatorios en pacientes tratados con preparaciones que contienen mentol, pero también pueden contribuir a la analgesia (Boyi L et al., 2013).

Se descubrió que el mentol inhibe los canales de  $\text{Ca}^{+2}$  dependientes de voltaje, también que activa receptores GABA, lo que puede inducir a la inhibición central de Nocicepción (Boyi L et al., 2013).

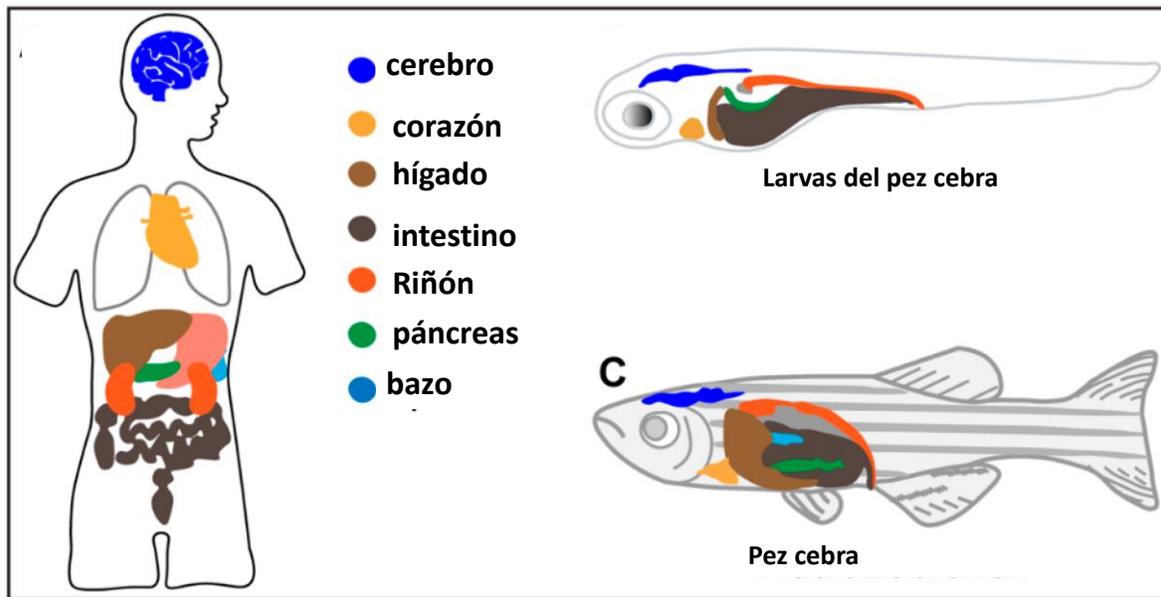
El mentol también puede provocar analgesia al inactivar los canales de sodio dependientes de voltaje que median los potenciales de acción en las neuronas sensoriales. También se descubrió que el mentol inhibe los receptores nicotínicos de acetilcolina y los canales iónicos activados por serotonina, que se sabe que contribuyen a la señalización del dolor (Boyi L et al., 2013).

### **3.6      *Pez cebra (*Danio rerio*) como modelo animal***

El pez cebra (*Danio rerio*), es una especie que recientemente ha adquirido mayor aceptación para la evaluación de procesos que se llevan a cabo en el SNC, por lo que podría ser de utilidad para realizar el cribado de compuestos y/o extractos con potencial utilidad analgésica. Se tienen algunas evidencias de que sustancias irritantes como la formalina o ácido acético son de utilidad para generar nocicepción en el pez cebra (Ohnesorge et al., 2021).

Con respecto al pez cebra se sabe por métodos de electrofisiología, biología molecular, análisis de comportamiento reflexivo o no reflexivo e imágenes fluorescentes que se aplican de forma rutinaria que la anatomía de *Danio rerio* es de utilidad para evaluar procesos a nivel de SNC. Al mismo tiempo, observar el comportamiento complejo del animal que nada libremente, así como su actividad neuronal a nivel celular, abre nuevas vías para la investigación en el área del dolor (Ohnesorge et al., 2021).

Las ventajas del pez cebra como modelo animal son; la alta fecundidad y el alto número de descendientes, corto tiempo de generación, los bajos costos de alojamiento y el rápido desarrollo externo de embriones, tres motivos lo hacen accesible para aplicaciones como técnicas de proyección de imagen, cribado y genética a gran escala, además de su homología con el humano (Fig. 10) (Ohnesorge et al., 2021).



**Figura 10.** Homología con del pez cebra con el humano (Modificado de Wang et al., 2021)

### 3.6.1 Anatomía del pez cebra

La estructura cerebral de los vertebrados está muy conservada entre peces y mamíferos, particularmente dentro del hipotálamo (Panula et al., 2010). Esta conservación se extiende significativamente a los tipos de células definidas molecularmente (Xie y Dorsky, 2017) que se agrupan de manera predecible y realizan muchos mecanismos funcionalmente análogos con su contraparte en los mamíferos (Machluf et al., 2011). Por ejemplo, el hipotálamo del pez cebra está formado por un número relativamente pequeño de células expresando una notable

---

diversidad de neurotransmisores (Herget y Ryu, 2015; Xie y Dorsky, 2017). La homología y similitud de su anatomía hipotalámica hace del pez cebra un modelo ideal para estudiar comportamientos y procesos que son regulados por el hipotálamo, como el dolor.

Una cuestión de suma importancia es si el pez cebra o en general cualquier pez es capaz de percibir el dolor, debido a que las repuestas de los peces suelen ser complejas tras recibir un estímulo doloroso. Se ha encontrado evidencia que peces como la trucha y el pez dorado muestran actividad en el prosencéfalo y mesencéfalo después de la aplicación de un estímulo nocivo (Dunlop y Laming, 2005), generándose cambios en la expresión génica del todo el cerebro después de la aplicación de un estímulo nociceptivo (Braithwaite y Boulcott, 2007).

El pez cebra comparte muchas similitudes a nivel de SNC con los mamíferos tanto en receptores como en los tipos de células (Malafoaglia et al., 2013). La piel del pez esta innervada por neuronas sensoriales desde las primeras horas de su desarrollo embrionario, dicho dato es importante debido a que algunos de los experimentos en larvas de pez cebra son realizados entre los 3-4 días después de la fecundación y por esta razón se tiene similitud con otros mamíferos que también cuentan con innervación de la piel como parte de sus neuronas nociceptivas (Malafoaglia et al., 2013). La trucha arcoíris presenta fibras de tipo A $\delta$  y C siendo este otro punto de la conservación de las fibras nociceptivas en mamíferos (Sneddon et al., 2003).

Se ha documentado que el pez expresa receptores opioides similares a los mamíferos (De Velasco et al., 2009) ya que la percepción del dolor disminuye cuando se les administra morfina en carpas doradas y truchas (Chadzinska et al., 2009; Nordgreen et al., 2009; Sneddon et al., 2003). En el caso de *Danio rerio* se ha demostrado que el empleo de opioides o AINE's puede disminuir el proceso nociceptivo (Magalhães et al., 2017). Por lo anterior se asume que los peces cuentan con las fibras nociceptivas necesarias para la percepción del dolor.

---

#### 4. Planteamiento del problema

El desarrollo de fármacos es un proceso largo y costoso, los analgésicos ocupan el primer lugar en ventas a nivel mundial incrementando el consumo de analgésicos entre un 4-7% en México derivado a la pandemia por COVID-19, es por ello que la industria farmacéutica invierte grandes cantidades de dinero en la búsqueda de nuevos analgésicos que tengan alta eficacia con menos efectos adversos.

Para establecer el efecto farmacológico de nuevos fármacos analgésicos se requiere primero realizar estudios *in silico*, en donde se buscan estructuras nuevas que químicamente interactúen con blancos moleculares específicos, en estos estudios se pueden predecir los efectos farmacológicos y toxicológicos mediante programas computacionales. Una vez que se identifican las series de potenciales fármacos que promete gran actividad terapéutica éstos se sintetizan, purifican y caracterizan químicamente para pasar a una fase de evaluación biológica.

La evaluación biológica de nuevas entidades químicas requiere el empleo de animales de investigación, particularmente se utilizan roedores, en éstos se identifica primero si presentan o no el efecto terapéutico en estudio. Se requiere seleccionar vías de administración y la realización de curvas dosis respuesta para establecer la dosis efectiva 50 del fármaco estudiado. Esto implica el empleo de muchos animales para identificar el efecto de una serie de fármacos y seleccionar cuáles pasarán a la siguiente fase de investigación, en donde se determinará a nivel molecular los mecanismos de transducción que generan el efecto farmacológico, los efectos adversos y su toxicidad. Desafortunadamente después de todo este trabajo en ocasiones solo un compuesto de una serie analizada tiene el potencial analgésico para seguir avanzando en el proceso de investigación.

El presente proyecto tiene la finalidad de probar el uso de animales alternos a los roedores para realizar cribados más sencillos y rápidos, para investigar el potencial analgésico en series de fármacos diseñados para el dolor. Para ello se propone el empleo de *Danio rerio* como especie animal para disminuir costos y tiempos de investigación en nocicepción, ya que dicha especie cuenta con características deseables, tales como su similitud hipotalámica con mamíferos además de la

---

inervación de su piel por fibras nociceptivas, el rápido desarrollo de embriones y la alta fecundidad del animal entre otras, y así demostrar mediante el empleo de (ácido acetilsalicílico, diclofenaco, metamizol) como fármacos de tipo AINE y opioides (buprenorfina, morfina y tramadol) la utilidad del modelo.

## **5. Pregunta de investigación**

¿Si la administración de sustancias algésicas generan nocicepción en el pez cebrá, la inmersión del pez cebrá en soluciones que contienen AINE´s y opioides reducirán la nocicepción?

## **6. Hipótesis**

Si la inyección de ácido acético al 1% produce nocicepción en *Danio rerio*, entonces la administración de fármacos de tipo AINE (ácido acetyl salicílico, diclofenaco y metamizol) u opioide (buprenorfina, morfina y tramadol) disminuirán el proceso nociceptivo.

## **7. Objetivo General**

Determinar la mejor sustancia algésica (ácido acético, formalina o aceite de mentol) para establecer un modelo de nocicepción en *Danio rerio* y demostrar mediante el empleo de AINE's y opioides la utilidad del modelo.

### **7.1 Objetivos específicos**

- 1.- Evaluar la conducta basal de movimiento de *Danio rerio* en peces macho y hembra, así como de diferentes colores.
- 1.2- Determinar la mejor sustancia algésica (formalina (1%, 0.1%), ácido acético (1%), solución ácida salina (pH=5.5) y aceite de mentol 0.001% y 1%) para la evaluación de una conducta nociceptiva en *Danio rerio*.

---

2.- Establecer el potencial efecto antinociceptivo de AINE´s (metamizol, diclofenaco y ácido acetilsalicílico) y opioides (morfina, tramadol y buprenorfina) en la nocicepción inducida en *Danio rerio*.

## **8. Metodología**

### **8.1 Universo**

Se utilizó como animal de experimentación al pez cebrá conocido científicamente como *Danio rerio*. Los peces utilizados fueron machos y hembras de 60-90 días ( $2.5 \pm 0.5$  cm de tamaño y peso de  $0.8 \pm 0.1$  g en promedio). Los peces se compraron de forma comercial en un criadero de peces en el estado de Yucatán y se mantuvieron en habituación durante seis semanas en promedio antes de ser utilizados en la evaluación. Las condiciones ambientales para su mantenimiento consisten en tener ciclos naturales de luz/oscuridad de 12x12 h (la luz inicia a las 6:00 AM y termina a las 6:00 PM). La temperatura ambiental fue de 30-32°C y la temperatura del tanque de almacenamiento de 25°C, el agua se mantuvo a un pH de 7.0 y los peces se alimentaron con *Artemia salina* L y hojuelas básicas para peces tropicales (Marca Biomsa S.A. de C.V.). El pez se utilizó una sola vez y después del experimento se sacrificaron por inmersión en hielo.

### **8.2 Materiales y reactivos**

Material: Pecera de (90x37x40 cm), filtros de agua, bombas de aire, hielo, hojuelas de alimento, caja de vidrio cuadrada (10 x 10 cm y 8cm de altura), cronómetro y contador.

Reactivos y/o fármacos: Ácido acético glacial, formol, aceite de mentol, diclofenaco y ácido acetil salicílico fueron adquiridos en Sigma Aldrich. Morfina y buprenorfina fueron adquiridos de forma comercial (Laboratorios Pisa), al igual que tramadol y metamizol (laboratorios AMSA).

---

### 8.3 Variables

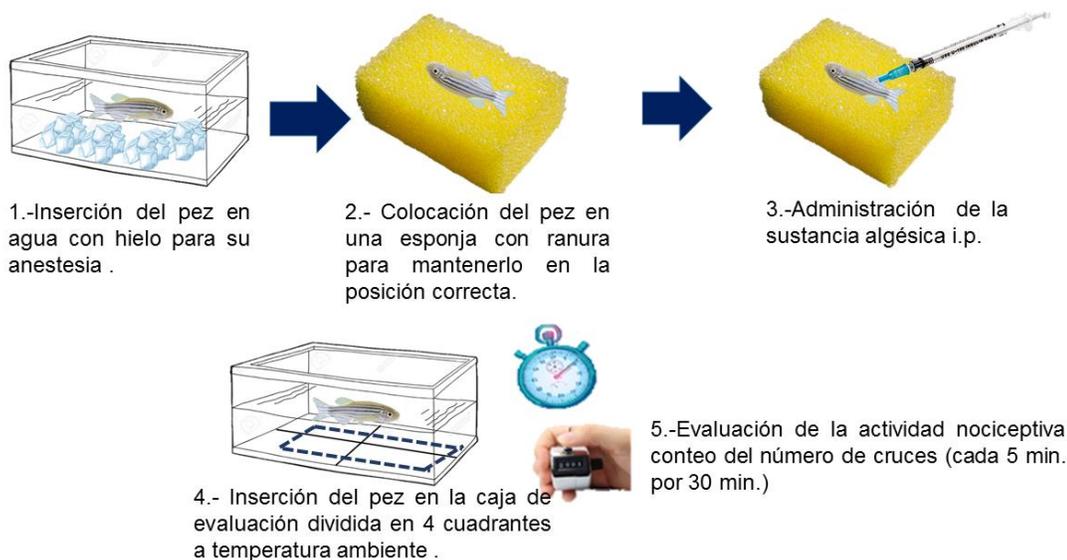
Independientes: ruido ambiental, temperatura.

Dependientes: Número de cuadros recorridos de *Danio rerio* en la caja de evaluación.

### 8.4 Procedimiento

En el presente proyecto se investigó que tipo de sustancia algésica es adecuada para generar el mejor efecto nociceptivo en pez cebra. Una vez que los peces fueron administrados con las sustancias algésicas el pez se coloca de forma individual en una caja de vidrio cuadrada (10x10x8 cm, dividida en 4 partes) con un nivel de agua de 3.5 cm, entonces el pez se coloca en un baño con hielo para su anestesia y administración, se coloca en la caja de evaluación a temperatura ambiente, en donde se recupera en promedio 5-10 segundos y entonces se inicia el conteo del número de veces que recorre cada uno de los cuadrantes cada 5 min durante 30 minutos, posteriormente el pez se sacrifica en hielo (Fig. 11). La conducta normal de movimiento fue evaluada en peces hembra y macho, así como en peces de diferentes colores.

Posteriormente para establecer la mejor sustancia algésica se evaluación diferentes sustancias algésicas (formalina (0.1 y 1%), ácido acético (0.1 y 1%), aceite de menta (0.001 y 1%) y solución ácida (solución de NaCl saturada pH=5.5) las cuales fueron administradas por vía intraperitoneal y evaluado su movimiento en la caja de vidrio cuadrada (Diagrama 1).

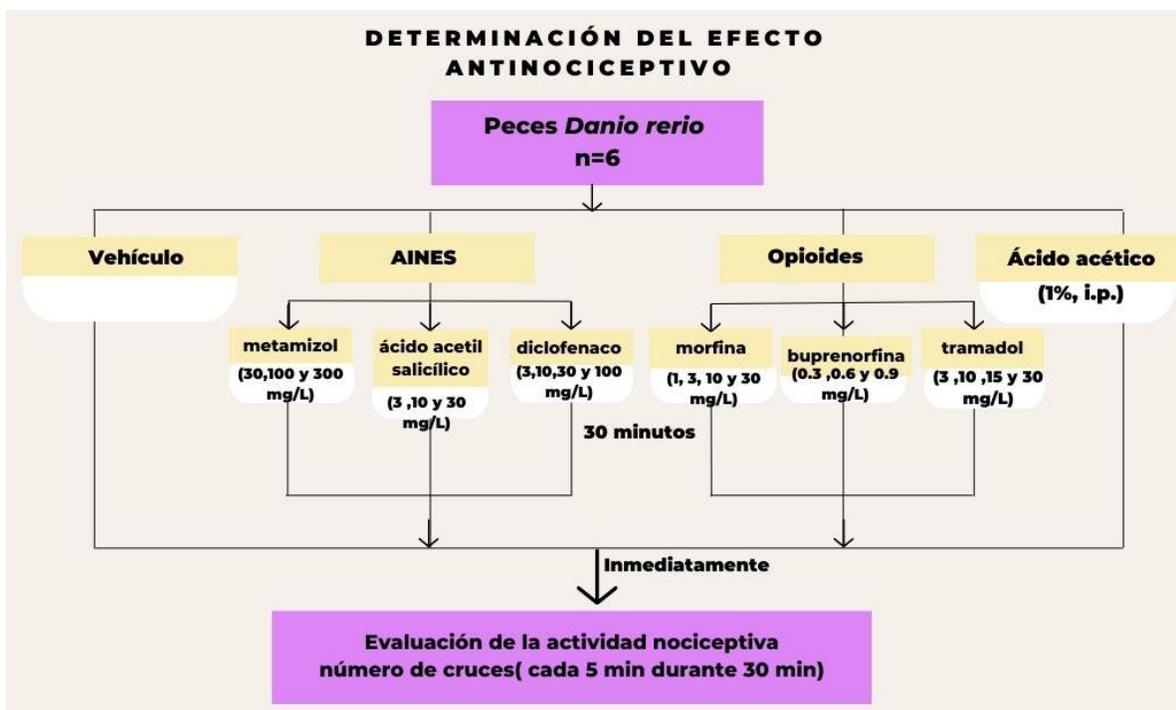


**Figura 11.** Modelo de nocicepción en pez cebra. Administración de sustancias algésicas intraperitoneal para generar nocicepción en el pez cebra.

Para los tratamientos se utilizó el método de inmersión de pez en la solución de prueba, entonces se preparó un litro de solución de metamizol (3, 100 y 300 mg/L), ácido acetilsalicílico (3, 10 y 30 mg/L), diclofenaco (3, 10, 30 y 100 mg/L), morfina (10 y 30 mg/L), tramadol (3, 10, 15 y 30 mg/L) y buprenorfina (0.3, 0.6 y 0.9 mg/L). Se utilizaron 120 peces, se formaron 20 grupos de 6 peces cada uno, uno de los grupos se utilizó como control (vehículo: agua de nado normal del pez) y el resto de los peces se introdujeron en peceras de 1 litro de solución, uno por uno se coloca durante 30 minutos de exposición e inmediatamente después se coloca la solución algésica de ácido acético 1% y se cuenta su movilidad en la caja de vidrio cuadrada contando los cuadrantes que recorre el pez (diagrama 2). Es importante mencionar que las concentraciones que se muestran como parte del diseño experimental se determinaron después de varios ensayos en los peces (datos no mostrados) y también por la toxicidad que generan, por ejemplo el ácido acetil salicílico genera la muerte del pez cebra a una concentración de 500 mg/L y en el caso de tramadol los peces mueren a una concentración de 50 mg/L.



**Diagrama 1.** Evaluación de sustancias algésicas



**Diagrama 2.** Evaluación del efecto antinociceptivo de AINE´s y opioides en *Danio rerio*.

---

## 8.5. Análisis estadístico

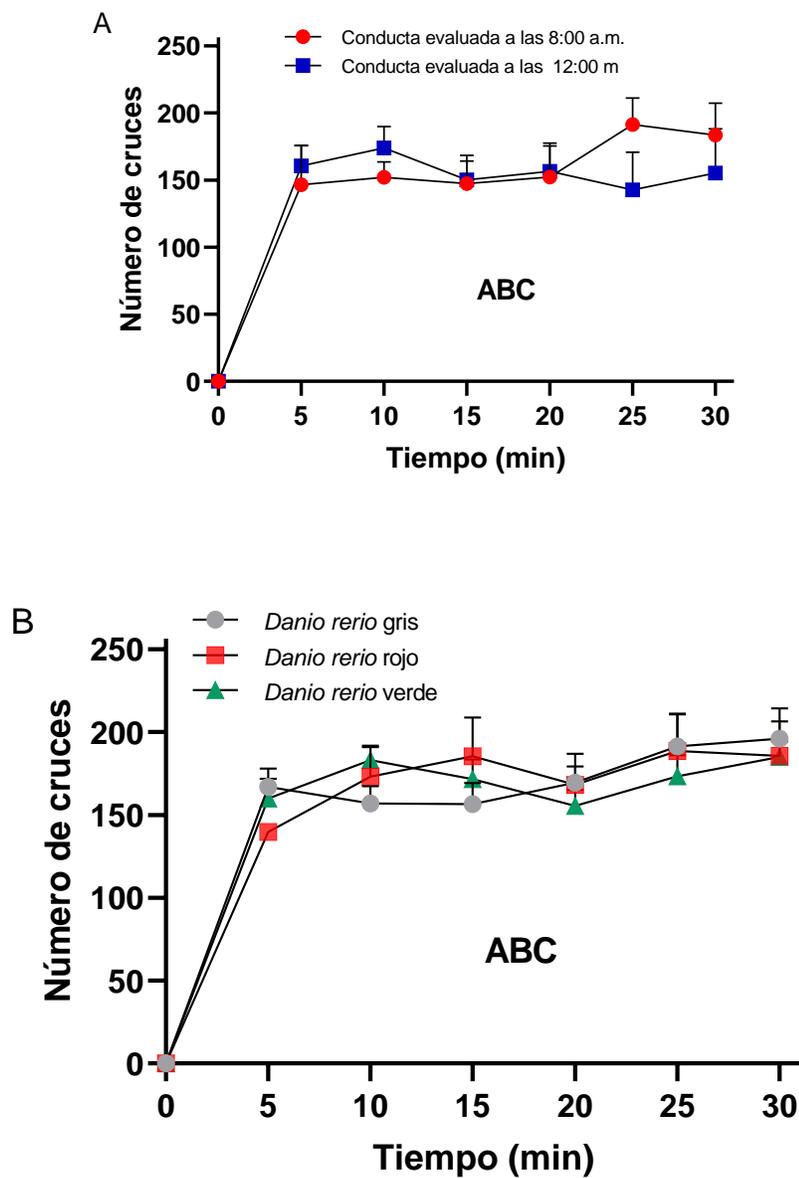
Se realizaron cursos temporales de la conducta observada del pez (número de cuadrantes recorridos) con respecto al tiempo. A partir de los cursos temporales se obtuvo el área bajo la curva (ABC) utilizando el método de los trapecios y los datos se expresaron en unidades de área (ua). Para el análisis estadístico se utilizó un análisis de varianza de una vía seguido de la prueba post-hoc de Dunnett para comparar con respecto al vehículo y una prueba de Tukey para comparar entre los diferentes tratamientos (nivel de significancia  $p < 0.05$ ) empleando paquetería Excel y Prisma.

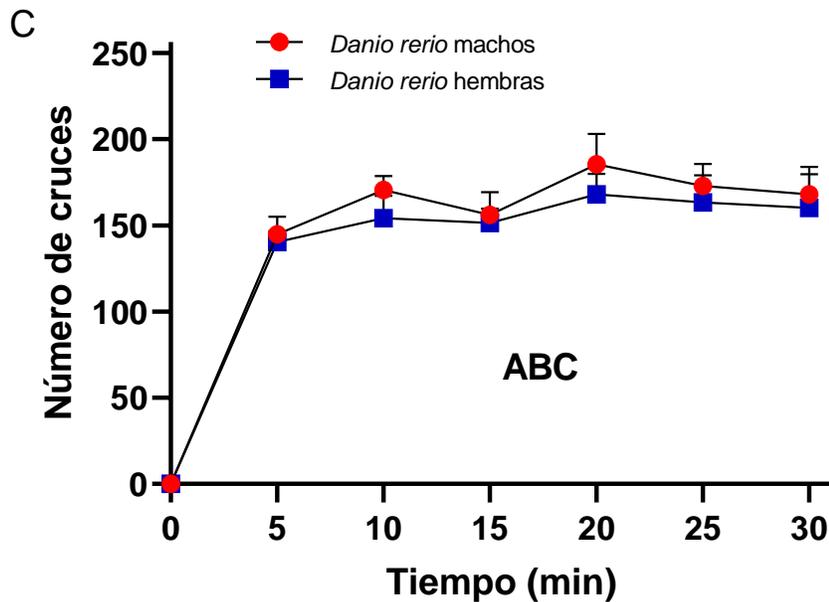
## 9. Resultados

### 9.1 Determinación de la conducta normal de *Danio rerio*

En el curso temporal de la figura 12 (panel A) se observa que los peces *Danio rerio* incrementan su movilidad en promedio 150 unidades del número de cruces y mantienen su conducta durante 30 min. En la misma figura se observa que no hay diferencia estadística entre la evaluación que se realizó a las 8:00 a.m. (ABC=  $4405.4 \pm 403.3$  ua) con respecto a las 12:00 m (*Meridies*=medio día) (ABC=  $4306.7 \pm 483.9$  ua). Los peces son diurnos y a diferencia de los roedores que son nocturnos se puede observar que el horario de evaluación no influye en la conducta del pez. Debido a que los peces se compraron en un criadero, existía la probabilidad de no contar siempre con peces grises como recomienda la literatura. Por lo que se decidió evaluar si influye el color de los peces en la conducta. En la figura 12 (Panel B) se observa que éstos siguen manteniéndose con la misma movilidad y no hay evidencia estadísticamente significativa en la conducta entre los peces grises (ABC=  $4518.3 \pm 340$  ua), rojos (ABC=  $4738.3 \pm 366.5$  ua) o verdes (ABC=  $4680 \pm$

124.4 ua). Lo mismo ocurre cuando se realizó la evaluación con respecto al sexo no se observa diferencia estadística significativa entre la evaluación de *Danio rerio* tanto hembras (ABC= 4569.2 ± 232.9 ua) como machos (ABC= 4287.1 ± 232.9 ua) (Fig. 12, Panel C).





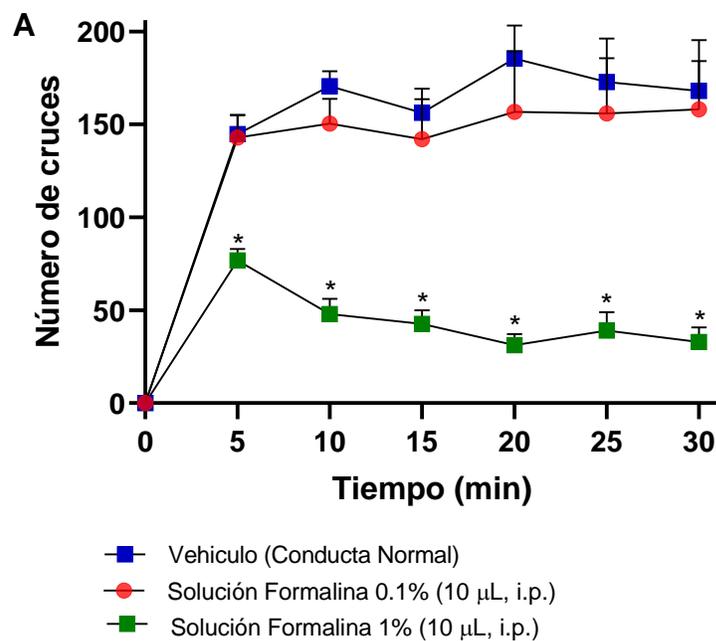
**Figura 12.** Efecto de la conducta normal de *Danio rerio*. Curso temporal del número de cruces con respecto al tiempo que realiza el pez cebrá cada 5 min durante un periodo de 30 min en una pecera dividida en 4 cuadrantes con 5 cm de agua. La conducta se evaluó en dos tiempos: a las 8:00 a.m. y a las 12:00 m (Panel A), en peces de colores grises, verdes y rojos (Panel B) y en hembras y machos (Panel C) cada punto representa el promedio de 6 peces  $\pm$  EEM. Prueba t´Student ( $p \leq 0.5$ ) y ANOVA una vía con una prueba *post-hoc* Tukey ( $p \leq 0.5$ ) en los grupos de peces de colores.

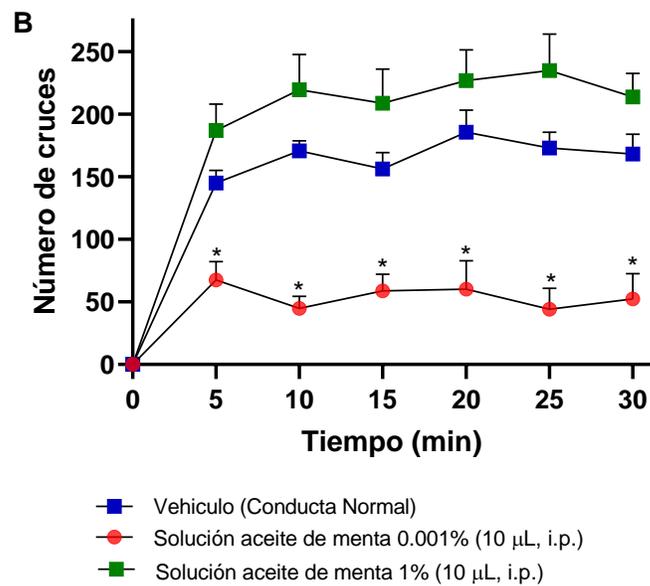
## 9.2 Determinación de la conducta de *Danio rerio* en presencia de sustancias algésicas

En la figura 13 se observa la conducta de *Danio rerio* evaluada mediante la determinación del número de cruces cuando se le administran diferentes sustancias algésicas. En el panel A se muestra que los peces administrados con formalina al 0.1% ( $ABC = 4133.8 \pm 198.4$  ua) mantienen el mismo número de cruces con respecto a la conducta normal ( $ABC = 4518.3 \pm 340$  ua), no se presenta diferencia estadística entre ambos grupos. Al incrementar la concentración al 1% ( $ABC = 1270.4 \pm 164$  ua) decrece su movilidad en 45 cruces en promedio y esta conducta se mantiene durante los 30 min de evaluación, se determinó que a esta concentración hay una diferencia estadísticamente significativa cuando se compara con respecto a la conducta normal (ANOVA una vía, *post-hoc* Dunnett).

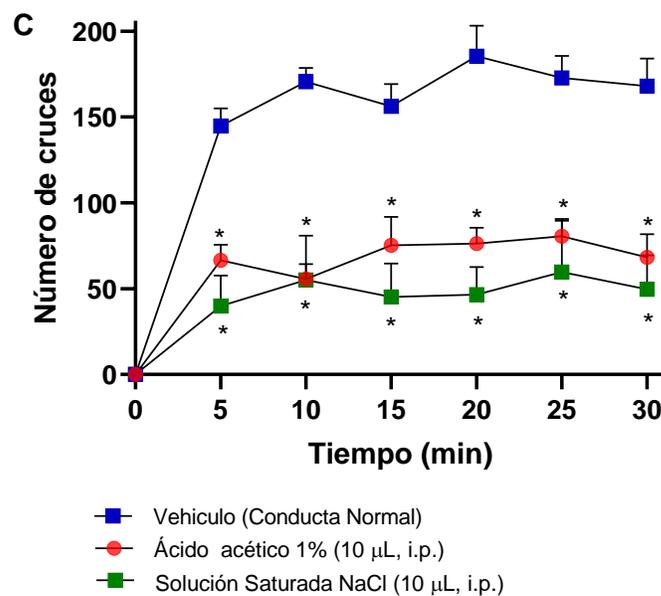
Cuando se administra aceite de menta 1% la movilidad se incrementa hasta 200 cruces a los 5 min y esta conducta se mantiene constante a lo largo de la evaluación, aunque el efecto es mayor ( $ABC= 5917.5 \pm 573.3$  ua) con respecto al grupo de la conducta normal no se determinó diferencia estadísticamente significativa. Por lo anterior, se bajó la concentración hasta 0.001% obteniendo una reducción del número de cruces ( $ABC= 1508.3 \pm 104.3$  ua) hasta un promedio de 80 cruces en los primeros 5 min y manteniéndose constante durante el resto de la evaluación, con esta concentración se genera una respuesta nociceptiva.

También se determinó el efecto que genera la punción de una solución saturada de NaCl (pH=3.4) y ácido acético (1%, pH 4.8), en el primer caso el número de cruces disminuye a 40 y en el segundo disminuye a 55 en promedio. Se presentó una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos de peces que recibieron la solución saturada de NaCl ( $ABC= 1355.8 \pm 592.4$  ua) y ácido acético ( $ABC= 1941.3 \pm 45.2$  ua) con respecto a la conducta normal. Se puede concluir que ambas soluciones generan un efecto nociceptivo adecuado para evaluar posibles tratamientos con efecto antinociceptivo.





**Figura 13.** Evaluación de sustancias algésicas en *Danio rerio*. En el curso temporal se muestra el número de cruces vs al tiempo de los peces administrados por vía intraperitoneal con la formalina [1% y 0.1%] (Panel A), el aceite de menta [1% y 0.001%] (Panel B), la solución saturada de NaCl y ácido acético [1%] (Panel C). Cada punto representa el promedio de 6 animales  $\pm$  EEM. La diferencia estadística se determinó con una prueba de ANOVA una vía, seguida de una prueba *post-hoc* de Dunnett (\*,  $p \leq 0.5$ ), la comparación de las soluciones algésicas se realizó vs la conducta normal del pez.

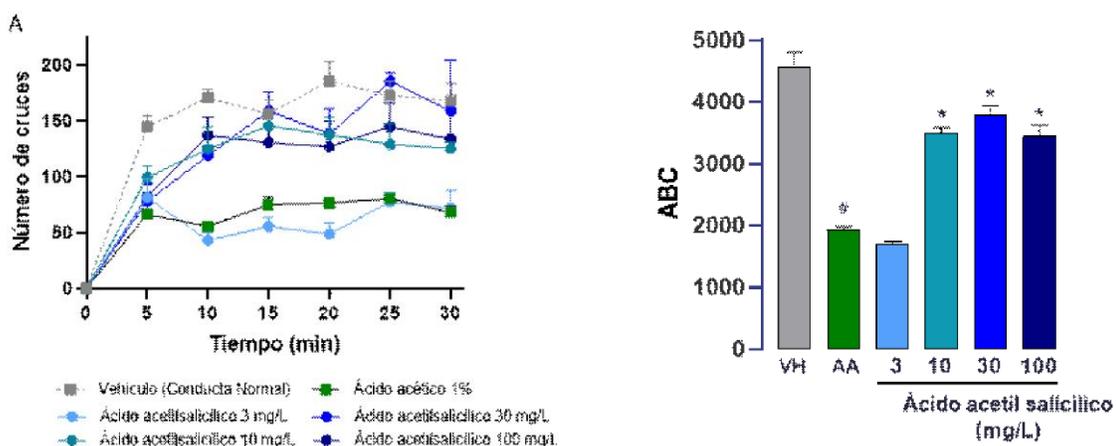


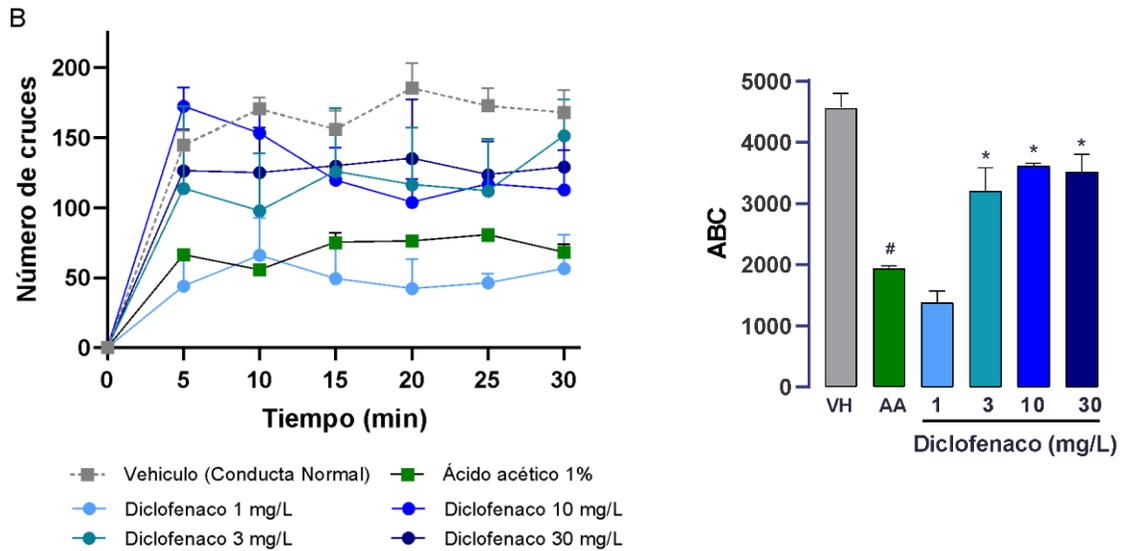
**Figura 13.** Continuación...

### 9.3 Determinación del efecto antinociceptivo de fármacos AINE's en un modelo de nocicepción inducido ácido acético en *Danio rerio*.

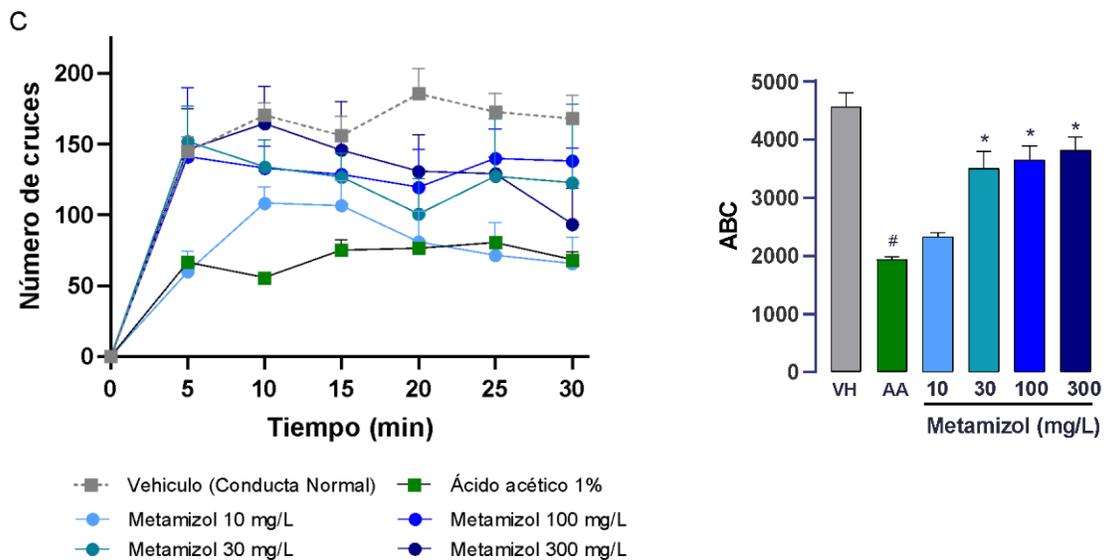
Con la finalidad de establecer que el efecto nociceptivo generado por la administración de ácido acético al 1% puede ser revertido por analgésicos, en el presente proyecto se evaluó el efecto de AINE's y opioides. En la figura 14 se muestran cursos temporales de la conducta de *Danio rerio* después de su inmersión durante 30 min con diferentes concentraciones de ácido acetilsalicílico, diclofenaco y metamizol.

En el panel A se muestra que la concentración de 3 mg/L de ácido acetilsalicílico no modifica el efecto algésico del ácido acético 1%; al aumentar la concentración a 10 mg/L si se observa una diferencia entre el ABC ( $ABC=3943.8 \pm 84.4$  ua) con respecto al ácido acético 1% ( $ABC= 1711.3 \pm 33.6$  ua). Sin embargo, aunque se incrementa la concentración a 30 mg/L ( $ABC=3797.1 \pm 131.4$  ua) y 100 mg/L ( $ABC=3442.9 \pm 181.1$  ua) no se observa un efecto dependiente de la concentración ya que las tres concentraciones presentan el mismo efecto (ANOVA de una vía post-hoc Tukey).





**Figura 14.** Evaluación del efecto antinociceptivo de fármacos AINE's en *Danio rerio*. Curso temporal del efecto antinociceptivo mediante la evaluación del número de cruces vs el tiempo de los peces inmersos durante 30 min con ácido acetilsalicílico (3, 10, 30 y 100 mg/L) (Panel A), diclofenaco (1, 3, 10 y 30 mg/L) (Panel B) y metamizol (10, 30, 100 y 300 mg/L) (Panel C). Los peces fueron administrados posteriormente al tratamiento con AINE's, con 10  $\mu$ L de ácido acético 1%. Cada punto representa el promedio de 6 animales  $\pm$  EEM. El ABC se determinó por el método de los trapecios y cada barra representa el promedio de 6 animales  $\pm$  EEM. La diferencia estadística se determinó con una prueba de ANOVA una vía, seguida de una prueba post-hoc de Tukey cuando hay comparación entre grupos (\*,  $p \leq 0.5$ ).



**Figura 14.** Continuación...

En el panel B se muestran los grupos de peces evaluados con el tratamiento de diclofenaco, se observa un comportamiento similar al del ácido acetilsalicílico ya que a la concentración de 1 mg/L (ABC=1381.3±188.8 ua) no se encontró diferencia con respecto al grupo de ácido acético 1%. Y al incrementar las concentraciones a 3 mg/L (ABC= 3205± 383.8 ua), 10 mg/L (ABC= 3611.3± 54.2 ua) y 30 mg/L (ABC=3520.8± 290.5 ua) si se observa una diferencia estadística con respecto al grupo de ácido acético, pero no hay diferencia entre los grupos de diclofenaco (ANOVA de una vía post-hoc Tukey)

Con respecto a los tratamientos con metamizol (Panel C), se observa que la primera concentración evaluada de 3 mg/L hay un ligero incremento de la conducta que no es significativo con respecto al grupo algésico de ácido acético (ABC=1941.3± 45.2 ua). Sin embargo, al incrementar la concentración a 10 mg/L (ABC= 2385.8 ua), 30 mg/L (ABC=3506.3±74.3 ua) y 100 mg/L (ABC=3651± 288.9 ua) se va incrementando gradualmente y aunque no hay diferencia entre los grupos si se observa un incremento gradual (ANOVA de una vía post-hoc Tukey).

Los datos anteriores muestran que en este modelo se pueden evaluar compuestos con un efecto semejante al de los AINE's, mediante la inhibición de la COX. Sin embargo, al parecer con ninguno de los fármacos se pudo establecer un efecto dependiente de la concentración y solo se puede observar con cual se requiere más compuesto para alcanzar una disminución de la conducta algésica. Por ejemplo; en el caso del grupo de ácido acetilsalicílico y metamizol se requiere una concentración de hasta 300 mg/L para tener efectos semejantes al diclofenaco con 30 mg/L.

#### **9.4 Determinación del efecto antinociceptivo de fármacos opioides en un modelo de nocicepción inducido ácido acético en *Danio rerio*.**

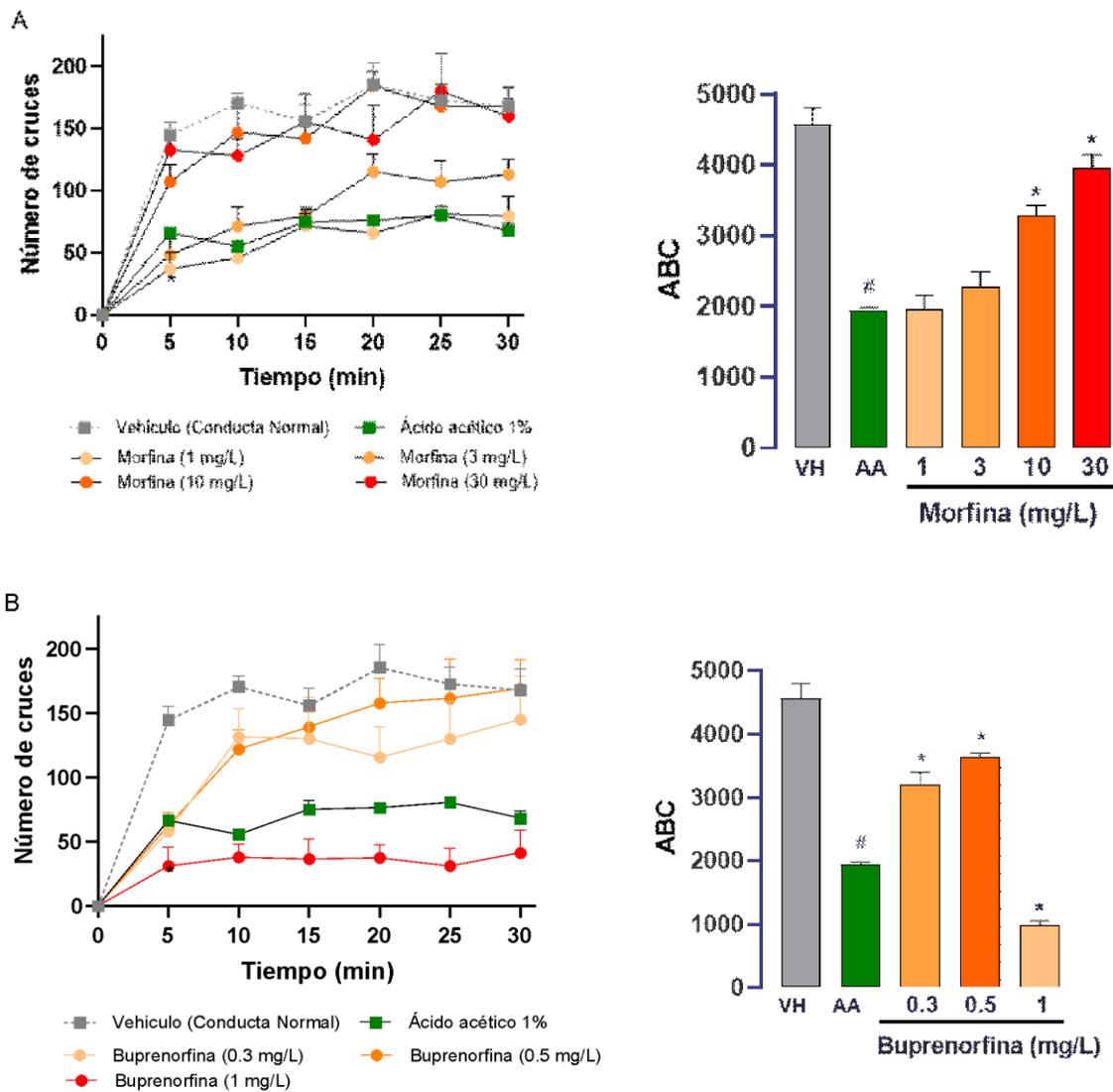
También se seleccionaron fármacos opioides como la morfina, la buprenorfina y el tramadol para establecer que estos fármacos pueden revertir el efecto generado por el ácido acético 1% en *Danio rerio*. En la figura 15 panel A se presentan los datos

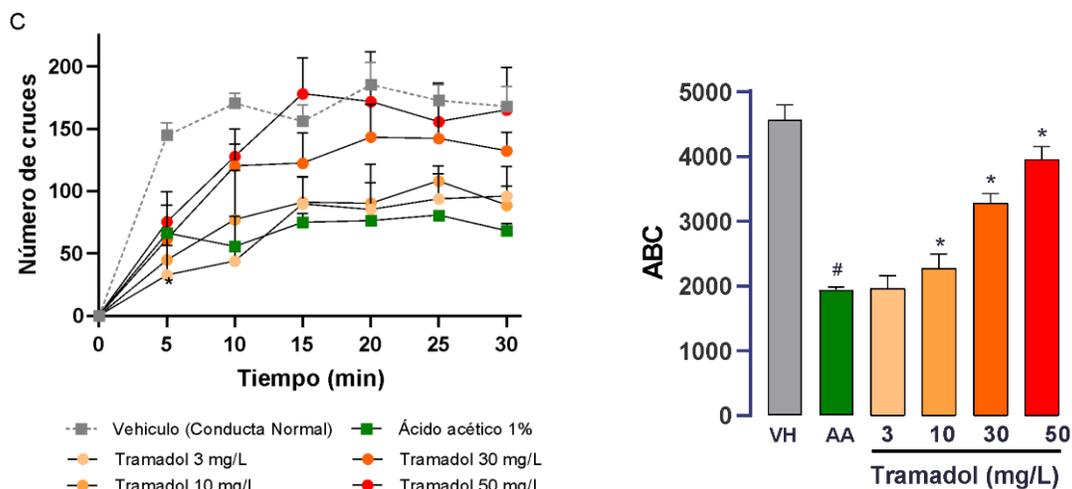
obtenidos de los diferentes grupos de peces con tratamiento de morfina; obteniendo las siguientes datos: con 1 mg/L no se observó diferencia estadística con respecto al grupo de ácido acético ( $ABC=1714.6\pm 49.2$  ua). A la concentración de 3 se observa que a los 15 min después de haber administrado el ácido acético inicia un efecto antinociceptivo ( $ABC=2396.3\pm 145.1$  ua), este efecto se incrementa con la concentración de 10 mg/L ( $ABC=4163.3\pm 68.8$  ua) y el efecto se incrementa un poco más a la concentración de 30 mg/L con un ( $ABC=4091.3\pm 94.7$  ua). En la gráfica de barras se observa que la administración de morfina presenta un efecto dependiente de la concentración en este modelo de nocicepción.

En el caso de la buprenorfina se observa que la concentración de 0.3 mg/L ( $ABC=3187.5\pm 213.5$  ua) y 0.5 mg/L ( $ABC=3636.7\pm 63.2$  ua) incrementan su movilidad considerablemente comparada con el grupo de ácido acético 1%, por lo que se presenta una diferencia estadística significativa. Es importante mencionar que con la concentración de 1 mg/L ( $ABC=976.7\pm 74$  ua) la movilidad disminuyó mucho más que el grupo de ácido acético 1%, de hecho, este grupo se evaluó antes de la concentración de 0.5 y debido a que se encontró que descende el número de cruces se decidió evaluar una concentración intermedia entre 0.3 y 1.0. A diferencia del grupo de morfina con buprenorfina se utilizaron concentraciones más bajas y con la de 1 mg/L se observó que casi no había movimiento por lo que probablemente esta sea una dosis de sedación más que de analgesia.

Por último, en el Panel C se muestran los cursos temporales del número de cruces con respecto al tiempo de los grupos de peces tratados con tramadol, obteniéndose al igual que los grupos de morfina, un efecto dependiente de la concentración ya que el ABC fue aumentando considerablemente: 3 mg/L ( $ABC=1965.4 \pm 199.4$  ua), 10 mg/L ( $ABC=2278.3\pm 217.3$  ua), 30 mg/L ( $ABC=3278.3\pm 152.1$  ua) por último a 50 mg/L ( $ABC= 3957\pm 196.7$  ua). Así la inmersión de los peces en morfina y tramadol generan efectos dependientes de la concentración, a diferencia de los AINE's donde no se pudo establecer este efecto dependiente de la concentración. La evaluación de buprenorfina también indica que probablemente a altas dosis se puedan presentar efectos de sedación y en el caso de tramadol hubo muerte con la concentración de 100 mg/L. Entonces como se puede observar en los resultados

obtenidos, la ventana terapéutica de estos compuestos en el modelo de ácido acético en *Danio rerio* tiene una ventana terapéutica muy estrecha.





**Figura 15.** Evaluación del efecto antinociceptivo de fármacos opioides en *Danio rerio*. Curso temporal del efecto antinociceptivo mediante la evaluación del número de cruces vs el tiempo de los peces inmersos durante 30 min con morfina (1, 3, 10 y 30 mg/L) (Panel A), buprenorfina (0.3, 0.5 y 1 mg/L) (Panel B) y tramadol (3, 10, 30, y 50 mg/L) (Panel C). Los peces fueron administrados posteriormente al tratamiento con opioides con 10  $\mu$ L de ácido acético 1%. Cada punto representa el promedio de 6 animales  $\pm$  EEM. El ABC se determinó por el método de los trapecios y cada barra representa el promedio de 6 animales  $\pm$  EEM. La diferencia estadística se determinó con una prueba de ANOVA una vía, seguida de una prueba post-hoc de Tukey (\*,  $p \leq 0.5$ ).

## 10. Discusión

En el presente proyecto se muestran los resultados de la implementación de un modelo de nocicepción en *Danio rerio*, con la finalidad de establecer las condiciones adecuadas para que en un futuro se puedan evaluar compuesto de interés farmacológico en el área de dolor. El objetivo del presente proyecto fue implementar un modelo de nocicepción en *Danio rerio* para evaluar compuestos con potencial utilidad analgésica. En los últimos años investigaciones demuestran que los peces teleósteos poseen nociceptores, es decir los receptores encargados de la percepción de estímulos potencialmente dolorosos, los cuales son muy similares a los receptores que se encuentran presentes en mamíferos (Sneddon,2002). Dentro

---

de este grupo de peces, una gran variedad de estos ha demostrado tener respuestas fisiológicas y de comportamiento adversas causadas por un estímulo potencialmente doloroso. Debido a estas razones la utilización de peces en estudios de dolor y nocicepción se ha incrementado de manera considerable en los últimos años (Eckroth et al., 2014; Prober et al., 2008; Sneddon et al., 2003a). La evidencia apunta a que el desarrollo y organización del procesamiento nociceptivo es similar entre los peces teleósteos como el pez cebra y otros vertebrados desde sus etapas larvarias.

Los resultados del presente estudio muestran que el empleo de *Danio rerio* es de gran utilidad como modelo experimental, la conducta de movilidad en los cuadrantes no se vio modificada por el tiempo de evaluación, esto se debe a que a diferencia de los mamíferos los peces son diurnos y el horario en el que se evalúan no influye en la conducta observada. Este resultado coincide con lo reportado en la literatura, en donde se evaluó la velocidad de nado de la actividad locomotora en diferentes horarios y tampoco se encontró cambios en la conducta (Krylov et al., 2022). Establecer las condiciones adecuadas para evaluar conducta es importante para obtener resultados óptimos sin que sean influenciados por efectos inherentes al animal, por lo que se sugiere que en estudios posteriores se evalúen otros factores como la alimentación, el cambio de luz/oscuridad, la posición de la pecera (vertical/horizontal) el envejecimiento de los peces y variaciones inducidas químicamente. En el caso del sexo y los diferentes colores del pez en el presente estudio se determinó que no existe tampoco diferencia en la conducta, hasta el momento no se encontró en la literatura experimentos relacionados al respecto, por lo que no se pueden contrastar los resultados obtenidos.

Las sustancias algésicas seleccionadas se consideraron debido a que en la literatura ya se han propuesto como herramientas farmacológicas; por ejemplo se ha propuesto el aceite de mentol fue utilizado a la concentración de 1.2 mM (Soares et al., 2019), esta sustancia ha sido seleccionada debido a que se ha demostrado que actúa en receptores TRPM8 que están vinculados al proceso nociceptivo (Liu

---

et al., 2013), además de que se ha demostrado que los peces tienen este tipo de receptores (Malafiglia et al., 2013) otros aceites que se han evaluado son el de semillas de mostaza y cinamaldehído (Taylor et al., 2017). La formalina se ha utilizado a la concentración de 0.1% para generar nocicepción (Magalhães et al., 2017), este dato es contradictorio a los resultados presentados en este trabajo ya que esa concentración no fue suficiente para generar nocicepción y por ello se incrementó la concentración a 1%. Por otra parte, los resultados del presente estudio muestran que la administración de ácido acético al 1% puede ser de utilidad para generar un efecto nociceptivo en el pez y que el empleo de varios analgésicos tanto del grupo de los AINE's como los opioides puede disminuir el efecto nociceptivo generado por ácido acético. En el estudio se probaron distintas sustancias algésicas con la finalidad de determinar cuál de estas es la mejor sustancia para evaluar nocicepción en el pez cebra, los resultados obtenidos demuestran que cualquiera puede ser utilizada para la evaluación de dicho comportamiento, sin embargo se decidió utilizar ácido acético, ya que se muestra una disminución en la locomoción y velocidad de la misma, evidenciando un cambio en el comportamiento demostrando conductas de nocicepción, este resultado coincide con lo reportado en la literatura en peces administrados vía i.p. con concentraciones de 2.5-5% de ácido acético (Taylor et al., 2017; Fabiano et al., 2019).

Posteriormente al administrarse fármacos de tipo AINE u opioide como pretratamiento y la administración de ácido acético de manera i.p. se encontró el aumento de la locomoción (Magalhaês et al., 2017; Taylor et al, 2017; Fabiano et.al,2019), entre los fármacos comúnmente evaluados destacan diclofenaco, el cual no muestra cambios en el comportamiento de los peces, pero sí reduce el índice de curvatura provocado por un agente algogenico (Fabiano et al.,2019), indometacina (Alves Magalhaês et al., 2017), ibuprofeno (Curtright et al., 2015) y ácido acetil salicílico son fármacos que también tiene un efecto antinociceptivo tras la exposición al estímulo nocivo (Ellis et al., 2018).

---

Con respecto a los fármacos opioides, estos se utilizaron porque se sabe que actúan en receptores de tipo opioide principalmente para generar antinocicepción, existen datos reportados de éstos fármacos de manera aislada, en el presente trabajo se muestra la evaluación de al menos 3 concentraciones de éstos y no se ha encontrado en la literatura ejemplos dosis respuesta de éste tipo de analgésicos en *Danio rerio*, por lo que esta es la primera vez que se muestran resultados dependiente de la concentración. Se ha documentado que la buprenorfina disminuye el efecto nociceptivo sin afectar la locomoción del pez, considerando que este fármaco tiene efectos sedantes a concentraciones altas e incluso produce la muerte de los animales (Curtright et al., 2015). Con respecto al tramadol se encontró en la literatura que este fármaco presenta también efecto antinociceptivo, de hecho se menciona que es mejor el empleo de éste para prevenir efectos adversos generados por fármacos más potentes como la morfina que produce alteración en la locomoción del pez (Taylor et al., 2017; Ellis et al., 2018; Khor et al., 2011).

## **11. Conclusión**

El pez cebra es una de las especies de peces más populares utilizadas en la experimentación debido a un conjunto de características (tiempo de generación corto, embriones transparentes, información genómica detallada disponible, alta homología con los humanos, entre otras) que los hacen muy deseables como especie modelo para una amplia gama de disciplinas científicas. Esto permite adoptar a esta especie como un modelo de nocicepción. Se sabe que estos animales presentan un efecto nociceptivo similar a los humanos y expresan cambios moleculares y fisiológicos durante la estimulación potencialmente dolorosa en áreas superiores del cerebro por lo que se considera que los resultados obtenidos en el presente proyecto permiten establecer que el empleo de ácido acético al 1% es de utilidad para evaluar compuestos nuevos de origen natural o sintético ya que se demostró que tanto AINE's como Opioides pueden disminuir el efecto nociceptivo generado por esta sustancia algésica.

---

## 12. Referencias

1. Ahmadi J, Jahromi MS, Ehsaei Z. The effectiveness of different singly administered high doses of buprenorphine in reducing suicidal ideation in acutely depressed people with co-morbid opiate dependence: a randomized, double-blind, clinical trial. *Trials*. 2018 Aug 29;19(1):462. doi: 10.1186/s13063-018-2843-9.
2. Altman, R., Bosch, B., Brune, K. et al. Advances in NSAID Development: Evolution of Diclofenac Products Using Pharmaceutical Technology. *Drugs* 75, 859–877 (2015).
3. Alves Magalhães F. E., a Bezerra de Sousa, C. A., Rodrigues Santos, S. A. A., Barbosa Menezes, R., Alves Batista, F. L., Oliveira Abreu, A. ngela, Vital de Oliveira, M., Gonçalves Moura L. F., da Silva Raposo, R., & Rolim Campos, A. (2017). Adult Zebrafish (*Danio rerio*): An Alternative Behavioral Model of Formalin-Induced Nociception. *Zebrafish*, 00, 422–429.
4. Angst MS, Clark JD. Opioid-induced hyperalgesia: a qualitative systematic review. *Anesthesiology*. 2006 Mar;104(3):570-87. doi: 10.1097/00000542-200603000-00025.
5. Atzeni, F., Masala, I.F. & Sarzi-Puttini, P. A Review of Chronic Musculoskeletal Pain: Central and Peripheral Effects of Diclofenac. *Pain Ther* 7, 163–177 (2018).
6. Ayoub SS, Botting RM, Joshi AN, Seed MP, Colville-Nash PR. Activation of macrophage peroxisome proliferator-activated receptor-gamma by diclofenac results in the induction of cyclooxygenase-2 protein and the synthesis of anti-inflammatory cytokines. *Mol Cell Biochem*. 2009 Jul;327(1-2):101-10. doi: 10.1007/s11010-009-0048-y.
7. Beakley BD, Kaye AM, Kaye AD. Tramadol, Pharmacology, Side Effects, and Serotonin Syndrome: A Review. *Pain Physician*. 2015 Jul-Aug;18(4):395-400.
8. Bindu, S., Mazumder, S., & Bandyopadhyay, U. (2020). Antiinflamatorios No Esterioideos (AINE) y daño orgánico: Una Perspectiva Actual, 3–7.
9. Bonkowsky JL, Frazer JK, Buchi KF, Byington CL. Metamizole use by Latino immigrants: a common and potentially harmful home remedy. *Pediatrics*. 2002 Jun;109(6):e98. doi: 10.1542/peds.109.6.e98.
10. Boyi Liu, Lu Fan, Shrilatha Balakrishna, Aiwei Sui, John B. Morris, Sven-Eric Jordt, TRPM8 is the principal mediator of menthol-induced analgesia of acute and inflammatory pain, *PAIN*, Volume 154, Issue 10, 2013, Pages 2169-2177.

11. Castañeda G., (2020). Perspectiva biopsicosocial del dolor. *Ciencia*, 71, 8–15.
12. Consalvi S, Biava M, Poce G. COX inhibitors: a patent review (2011 - 2014). *Expert Opin Ther Pat*. 2015;25(12):1357-71. doi: 10.1517/13543776.2015.1090973.
13. Corder G, Castro DC, Bruchas MR, Scherrer G. Endogenous and Exogenous Opioids in Pain. *Annu Rev Neurosci*. 2018 Jul 8;41:453-473. doi: 10.1146/annurev-neuro-080317-061522.
14. Curtright A, Rosser M, Goh S, Keown B, Wagner E, Sharifi J, et al. (2015) Modeling Nociception in Zebrafish: A Way Forward for Unbiased Analgesic Discovery.
15. Desborough MJR, Keeling DM. The aspirin story - from willow to wonder drug. *Br J Haematol*. 2017 Jun;177(5):674-683. doi: 10.1111/bjh.14520.
16. Dureja G., Iyer R., Das G., Ahdal J., Narang P., (2017). Evidence and consensus recommendations for the pharmacological management of pain in India. *Journal of Pain Research*. Volume 10.
17. Fabiano V. Costa, Luiz V. Rosa, Vanessa A. Quadros, Adair R.S. Santos, Allan V. Kalueff, Denis B. Rosemberg, Understanding nociception-related phenotypes in adult zebrafish: Behavioral and pharmacological characterization using a new acetic acid model, *Behavioural Brain Research*, Volume 359, 2019,
18. Guevara U. Dolor mixto, cambiando paradigmas. *Anestesia en México*; 2005 (17) Sup 1 12-20.
19. Hamamoto DT, Forkey MW, Davis WL, Kajander KC, Simone DA. The role of pH and osmolarity in evoking the acetic acid-induced wiping response in a model of nociception in frogs. *Brain Res*. 2000 Apr 17;862(1-2):217-29
20. Hawkey CJ. COX-2 inhibitors. *Lancet*. 1999 Jan 23;353(9149):307-14. doi: 10.1016/s0140-6736(98)12154-2.
21. Hunt S, Mantyh P. The molecular dynamics of pain control. *Nature reviews neuroscience*; 2001 (2):83-91.
22. IASP 2020: <https://www.iasp-pain.org/resources/terminology/#pain>
23. J. Christopher Taylor, L. Savannah Dewberry, Stacie K. Totsch, Lindsey R. Yessick, Jennifer J. DeBerry, Stephen A. Watts, Robert E. Sorge, A novel zebrafish-based model of nociception, *Physiology & Behavior*, Volume 174, 2017, Páginas 83-88,
24. Khor, B. S., Jamil, M. F., Adenan, M. I. and Shu-Chien, A. C. (2011). Mitragynine attenuates withdrawal syndrome in morphine-withdrawn zebrafish. *PLoS ONE* 6, 1-8.

25. Kötter T, da Costa BR, Fässler M, Blozik E, Linde K, Jüni P, Reichenbach S, Scherer M. Metamizole-associated adverse events: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One*. 2015 Apr 13;
26. Kötter T, da Costa BR, Fässler M, Blozik E, Linde K, Jüni P, Reichenbach S, Scherer M. Metamizole-associated adverse events: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One*. 2015 Apr 13;10(4):e0122918. doi: 10.1371/journal.pone.0122918. eCollection 2015.
27. Krylov VV, Izvekov EI, Pavlova VV, Pankova NA, Osipova EA. Circadian rhythms in zebrafish (*Danio rerio*) behavior and the sources of their variability. *Biol Rev Camb Philos Soc*. 2021 Jun;96(3):785-797.
28. L.D. Ellis, F. Berrue, M. Morash, J.C. Achenbach, J. Hill, J.J. McDougall, Comparison of cannabinoids with known analgesics using a novel high throughput zebrafish larval model of nociception, *Behavioural Brain Research*, Volume 337, 2018, Páginas 151-159,
29. Lázaro-Ibáñez GG, Torres-López JE, Granados-Soto V. Participation of the nitric oxide-cyclic GMP-ATP-sensitive K(+) channel pathway in the antinociceptive action of ketorolac. *Eur J Pharmacol*. 2001 Aug 24;426(1-2):39-44. doi: 10.1016/s0014-2999(01)01206-7.
30. Le Bars D, Gozariu M, Cadden SW. *Animal Models of Nociception*. 1.<sup>a</sup> ed. The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics; 2001.
31. López F, Granados V. Emplear o no fármacos para el alivio del dolor. *Avance y perspectiva*; México 1998 219-225.
32. Martínez A, *Aceites esenciales*. 2001:1-34
33. Mellon RD, Bayer BM. Evidence for central opioid receptors in the immunomodulatory effects of morphine: review of potential mechanism(s) of action. *J Neuroimmunol*. 1998 Mar 15;83(1-2):19-28. doi: 10.1016/s0165-5728(97)00217-8.
34. Mercadante S, Bruera E. Opioid switching: a systematic and critical review. *Cancer Treat Rev*. 2006 Jun;32(4):304-15. doi: 10.1016/j.ctrv.2006.03.001.
35. Na HK, Surh YJ. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) ligands as bifunctional regulators of cell proliferation. *Biochem Pharmacol*. 2003 Oct 15;66(8):1381-91. doi: 10.1016/s0006-2952(03)00488-x
36. Ohnesorge N, Heini C, Lewejohann L. *Métodos actuales para investigar la nocicepción y dolor en pez cebra*. 1.<sup>a</sup> ed. *Neurociencia frontal*; 2021.

37. Ortega A, Roca A and Mico JA. Animal models of pain. A critical view. *Rev Soc Esp Dolor* 2002; 9: 447-453.
38. Richetti SK, Blankb M, Capiottia K, Piatoa A, Bogob M, Viannab M, Bonana C. Quercetin and rutin prevent scopolamine-induced memory impairment in zebrafish. 1.ª ed. *Behavioural Brain Research* 217; 2011.
39. Rocha Arrieta LL, Granados Soto V. *Models of Neuropharmacology*. 1.ª ed. Ciudad de México; 2009.
40. Rodríguez C, Vidrio H, Campos S. *Guía de farmacología y terapéutica*. 2a ed. Ed. Mc Graw Hill; México; 2009
41. Schaloske RH, Dennis EA. The phospholipase A2 superfamily and its group numbering system. *Biochim Biophys Acta*. 2006 Nov;1761(11):1246-59. doi: 10.1016/j.bbalip.2006.07.011.
42. Sneddon L, Braithwaite V, Gentle M, Novel object test: examining nociception and fear in the rainbow trout *J. Pain*, 4 (8) (2003), pp. 431-440.
43. Subedi M, Bajaj S, Kumar M, Mayur Y. An overview of tramadol and its usage in pain management and future perspective. , *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2019.
44. T. *Pain Med*. 2020 Apr 1;21(4):714-723. doi: 10.1093/pm/pnz356.
45. Tonussi CR, Ferreira SH. Mechanism of diclofenac analgesia: direct blockade of inflammatory sensitization. *Eur J Pharmacol*. 1994 Jan 14;251(2-3):173-9. doi: 10.1016/0014-2999(94)90398-0
46. Trescot A.M, Datta S, Lee M, Hansen H. *Farmacología de los opioides*. 1.ª ed. *Pain physician journal*; 2008.
47. Vane JR, Botting RM. The mechanism of action of aspirin. *Thromb Res*. 2003 Jun 15;110(5-6):255-8. doi: 10.1016/s0049-3848(03)00379-7.
48. Villanueva L. Asta dorsal medular ¿Cuál es su rol en el procesamiento de los impulsos que generan la sensación dolorosa? *Rev. Soc. Esp. Dolor*; 1998 (5): 52-69.
49. Wang X, Copmans D, A.M. de Witte P. Using Zebrafish as a Disease Model to Study Fibrotic Disease *Int. J. Mol. Sci*. 2021, 22(12), 6404; <https://doi.org/10.3390/ijms22126404>
50. Webster L, Gudín J, Raffa R, Kuchera J, Rauck R, Fuddin J, Addler J, Mallick T. *Understanding Buprenorphine for Use in Chronic Pain: Expert Opinion*. 1.ª ed. *Pain Medicine*; 2020.

- 
51. Webster L, Gudín J, Raffa RB, Kuchera J, Rauck R, Fudin J, Adler J, Mallick-Searle  
Understanding Buprenorphine for Use in Chronic Pain: Expert Opinion.
  52. Webster L. The Relationship between the Mechanisms of Action and Safety Profiles  
of Intrathecal Morphine and Ziconotide: A Review of the Literature. 1.<sup>a</sup> ed. Pain  
medicine; 2015.
  53. Wicks C, Hudlicky T, Rinner U. Morphine alkaloids: History, biology, and synthesis.  
Alkaloids Chem Biol. 2021;86:145-342. doi: 10.1016/bs.alkal.2021.04.001
  54. Yamamoto T, Shono K, Tanabe S. Buprenorphine activates mu and opioid receptor  
like-1 receptors simultaneously, but the analgesic effect is mainly mediated by mu  
receptor activation in the rat formalin test. J Pharmacol Exp Ther. 2006  
Jul;318(1):206-13. doi: 10.1124/jpet.105.100859.
  55. Zegarra J. Bases fisiopatológicas del dolor. Acta Med Per; 2007 24 (2):105-108.