



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

Departamento de Farmacobiología

“Caracterización de un modelo de dolor ortotópico óseo para determinar las conductas de hiperalgesia, alodinia y dolor espontáneo inducidas por la inoculación de células de glioma en fémur de rata”

Tesis que presenta

Janette Nallely Corona Ramos

para obtener el Grado de

**Doctora en Ciencias en
Neurofarmacología y Terapéutica Experimental**

Directores de Tesis:

Dr. Francisco Javier López Muñoz y Dra. Patricia García López

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio N° 7 “Dolor y Analgesia” del Departamento de Farmacobiología del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (Cinvestav-IPN) Sede Coapa, bajo la dirección de Dr. Francisco Javier López Muñoz, responsable del laboratorio, en co-tutoría con Dra. Patricia García López investigador del Instituto Nacional de Cancerología de la Cd. de México, en el Laboratorio de Farmacología a su cargo.

Este proyecto se llevó a cabo con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Conacyt), siendo becaria de este Consejo durante 4 años continuos, con el becario N° **232644**, se le agradece por todos los recursos.

Agradecimientos

A Dr. Francisco Javier López Muñoz, por su valiosa dirección, apoyo incondicional, tiempo dedicado, entre otros y por haberme permitido trabajar en el laboratorio N° 7 “Dolor y Analgesia” del Departamento de Farmacobiología que se encuentra a su cargo.

A Dra. Patricia García López, por su valiosa dirección, disposición y tiempo dedicado a este proyecto. Por haberme permitido trabajar en el laboratorio de Farmacología del Instituto Nacional de Cancerología, que se encuentra a su cargo.

A Dra. Myrna Déciga Campos por su gran dedicación y empeño para realizar este trabajo, por su por su valiosa dirección, disposición y tiempo, por su gran experiencia y alto grado ético.

A Dra. Minarda De la O Arciniega por su valiosa dirección, disposición y tiempo dedicado a este proyecto.

A Dra. Guadalupe Bravo por su valiosa asesoría, disposición y tiempo dedicado.

A Dra. Mirandeli Bautista Ávila por su valiosa asesoría, tiempo y disposición dedicado.

A Dr. David Centurión por su valiosa asesoría, disposición y tiempo dedicado.

Al Sr. Sabino, Técnico del laboratorio, por su valiosa asesoría técnica, colaboración, disposición y tiempo.

Al Sr. Luis Oliva, Técnico del laboratorio, por su colaboración, disposición y tiempo.

A todos los Profesores del Departamento de Farmacobiología por su gran aporte a mi formación tanto académica como personal.

Dedicatoria

A mi querida madre, Maria Glafira Ramos Guerrero, por ese apoyo incondicional, por su gran valentía, la admiro y te amo demasiado, gracias.

A mi papá, Profe. Luis Domingo Corona Cardaña, por haber sido la causa de mi desvelo en mi trabajo, porque te vi sufrir de dolor por tu cáncer avanzado y no había medicamento alguno que te aliviara tu pesar, te amo.

A mi papa el Ing. José Abel López Domínguez por ser el gran amigo, mi apoyo y mi protección a distancia, por amar a mi mamá incondicionalmente, a mi familia y a mí, lo quiero papa.

A mis queridos hermanos, Jovane Corona Ramos, Linda Jenny Corona Ramos y a mi bella sobrina Joany Corona Ramos, gracias por todo su amor y apoyo, los amo, siempre los llevo en mi corazón.

A mis compañeros (as) del Departamento de Farmacobiología por su gran apoyo y por hacer tan grata mi estancia, en especial: Osmar Jaramillo, Josué Vidal y Rodrigo, gracias mil.

A Gilberto Lamas Juárez y su bella familia, por su gran amistad. Por ser un excelente profesor, y siempre exigirme tener la actitud, por su entrega y dedicación al baile, gracias por todo.

A mi gran entrenador de natación y amigo, Prof. Alfredo López Vargas, por su entrega y lucha a mi lado, por siempre darme la mano cuando me caí, ser ese gran hombre que me ha enseñado a vencer mis miedos, por su entrega al deporte y sobre todo a la amistad.

A mi gran amigo incondicional que siempre me dio grandes lecciones de vida y valentía, fuerza, lealtad y trabajo en equipo, al Lic. Fernando Callejas Castro.

A mis grandes amigos incondicionales: Diego de Jesús, Fabiola Reyes, Gilberto, Álvaro, Gaby Robles, Gyna, Lupita Corona, Karlita, Maricarmen, Nancy, Paco, Villegas, Nuria, Walter, Israel, Sra. Sonia Morales de Ávila, Lic. Magda, Artemisa, entre otros gracias por su presencia en mi camino, siempre me hacen fuerte y muy feliz, gracias, los quiero.

“Las dos torres del cielo, un día cayeron”

Contenido

Lista de abreviaturas, símbolos y acrónimos.....	i
Lista de Figuras	v
Lista de Tablas.....	viii
I. Introducción	1
1.1 El cáncer	1
1.1.1 Tumores del Sistema Nervioso Central (SNC).....	3
1.1.2 Glioblastoma Multiforme (GBM).	4
1.1.3 Evidencias de la Metástasis de GBM	5
1.2 Dolor.....	9
1.2.1 Nocicepción	10
1.2.2 Nociceptores	11
1.2.3 Clasificación de los nociceptores	12
1.2.4 Proceso de nocicepción	14
1.2.5 Tipos de dolor.....	17
1.2.6 Mecanismos que comparten el dolor inflamatorio y dolor neurótico.....	20
1.3 Dolor inducido por cáncer	21
1.3.1 Implicaciones clínicas.....	25
1.3.2 Fisiopatología de dolor óseo.....	26
1.3.3 Tratamiento.....	27
II. Antecedentes	30
2.1 Clasificación de los Modelos de dolor inducidos por cáncer	30
2.1.1 Modelos de dolor por cáncer en hueso	31
2.2 Fármacos administrados	34
2.2.1 Gabapentina	34
2.2.2 Tramadol.....	37
III. Justificación.....	39
IV. Hipótesis	39
V. Objetivo general	39
VI. Objetivos particulares	40
VII. Metodología.....	41

7.1	Animales.....	41
7.2	Cultivo celular	41
7.3	Línea celular	41
7.4	Inoculación de las células de Glioma C6.....	41
7.5	Cirugía para inoculación de las células dentro del fémur.....	42
7.6	Imágenes de tomografía computarizada (CT).	42
7.7	Histología	43
7.8	Pruebas conductuales.....	43
7.8.1	Alodinia mecánica	44
7.8.2	Hiperalgia térmica.....	44
7.8.3	Movimiento ambulatorio horizontal y vertical.....	44
7.8.4	Conducta espontánea	44
7.8.5	Lamida y acicalamiento.....	45
7.9	Administración de Fármacos	45
7.10	Análisis estadístico	46
VIII.	Resultados.....	47
8.1	Uso de diferentes tipos de materiales para sellado de fémur.....	47
8.2	Imágenes de MicroCT	48
8.2.1	Imágenes de MicroCT del grupo inoculado con 6×10^5 células.....	48
8.2.2	Imágenes de MicroCT del grupo inoculado con 3×10^5 células.....	49
8.2.3	Imágenes de MicroCT del grupo inoculado con 1×10^5 células.....	50
8.2.4	Imágenes de MicroCT del grupo inoculado con 5×10^4 células.....	51
8.3	Histología	52
8.3.1	Grupo inoculado con 3×10^5 células.....	52
8.3.2	Grupo inoculado con 1×10^5 células.....	54
8.3.3	Grupo inoculado con 5×10^4 células de glioma.	55
8.4	Pruebas conductuales.....	56
8.4.1	Grupo inoculado con 6×10^5 células.....	57
8.4.2	Grupo inoculado con 3×10^5 células.....	63
8.4.3	Grupo inoculado con 1×10^5 células.....	69
8.4.4	Grupo inoculado con 5×10^4 células.....	75

8.4.5	Comparación conductual; inoculación de 5×10^4 vs 1×10^5 células.	80
8.5	Evaluación del efecto de la administración de fármacos.....	83
8.5.1	Efecto de Anti-alodínico del tratamiento tramadol	83
8.5.2	Efecto de Anti-alodínico del tratamiento gabapentina	85
8.5.3	Efecto anti-hiperalgésico del tratamiento de tramadol	86
8.5.4	Efecto anti-hiperalgésico del tratamiento de gabapentina.....	87
8.5.5	Comparación de tratamientos; tramadol vs gabapentina	88
8.6	Resumen de Resultados	90
IX.	Discusión	94
X.	Conclusiones	103
XI.	Perspectivas	104
XII.	Referencias	105

Lista de abreviaturas, símbolos y acrónimos

%	Porcentaje
°C	Grados centígrados
μl	Microlitro
5-HT	Receptor hidroxitriptamina
A2	Fosfolipasa
AA	Acido araquidónico
ABC	Área bajo la curva
AINEs	Fármacos antiinflamatorios no esteroideos
AM	Mecanociceptores A δ
AMPA	Receptor α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-ácido isoxazolepropiónico
AMPC	Adenosin monofosfato cíclico
ANDEVA	Análisis de varianza
AQP	acuaporinas
ASIC1	Canal iónico sensible a ácido-1
ASIC3	Canal iónico sensible a ácido-3
ATCC	Catálogo del ATCC
ATF-3	Factor de transcripción-3
ATP	Adenosin trifosfato
B2R	Receptor 2 de bradicinina
B ₂ R	Receptor a Bradicinina 2
BDNF	Factor de crecimiento neutrófico derivado
BHE	Barrera Hematoencefálica
BK	Bradicinina
Ca ²⁺	Ion calcio
CCI	Constricción crónica del nervio ciático
CCL-107	Nombre de línea celular de glioma C6 de Rata en el ATCC
CGRP	Péptido relacionado con el gen de la calcitonina
CLT	Fibras C de bajo umbral
CM	Mecanociceptor C

cm	Centímetros
C _{max}	Concentración máxima
CMC	Mecanotermo receptores de frío
CMH	Mecanotermo receptores de calor C
CO ₂	Dióxido de carbono
CTC	Células tumorales circulantes
CV	Velocidad de conducción
CYP2D6	Citrocromo p450 subfamilia 2P6
CYP3A4	Citrocromo p450 subfamilia 3A4
DMEM	Medio de Eagle modificado de Dulbecco
E.E.	Error estándar
EETs	Epoxieicosatrienos
EP2	Receptor de prostaglandina E2
ET-1	Endotelina 1
ETAR	Receptor A de endotelina
EVN	Escala de valoración numérica
FDA	Administración de fármacos y alimentos de E.U
g	Gramos
GABA	Neurotransmisor ácido gamma aminobutírico
GBM	Glioblastoma multiforma
Glu	Glutamato
GRD	Ganglio de la raíz dorsal
h	Hora
H ⁺	Protón
Hz	Hertz
i.p.	Intraperitoneal
IASP	Asociación Internacional para el estudio del Dolor
iH	Canales de corriente catiónico Modulación
IL-1 β	Interleucina-1 β
IL-6	Interleucina-6
K _{ATP}	Canales de potasio sensibles a ATP

Kg	Kilogramo
kvs	Kilovols
L	Litro
LPA	Ácido lisofosfatídico
mAs	Miliamperios
MCP-1	Proteína monocito quimioattractiva 1
mg	Miligramo
MicroCT	Micro tomografía computarizada
min	Minuto
MIP-1a	Proteína macrófaga inflamatoria-1 α
mL	Mililitro
mMol	Milimol
MMP	Metaloproteína
mN	Mili-Newton
ms	Vaina de mielina
MTA	Mineral de trióxido agregado
n	Población estadística
Nav _{1.7-9}	Canales iónicos dependientes de voltaje 1.7-9
NeupSIG	Grupo de especial interés del dolor neuropático
nf	Fibras nerviosas
NGF	Factor de crecimiento nervioso
NKCC2	cotransportador Na ⁺ -K ⁺ -2Cl ⁻
NMDAR	Receptor N-metil-D-aspartato
NO	Óxido nítrico
NT-3	Neurotrofina-3
NY	Nueva York
O ₂	Superóxido
OMS	Organización Mundial de la Salud
ONOO	Peroxinitrato
P ₂ X	Receptor purino inotrópico
P ₂ Y	Receptor pirimidinérgico acoplado a una proteína G

PBS	Buffer fosfato salino
PBS-EDTA	Buffer fosfato salino adicionado con ácido Etilén diamín tetracético
PG	prostaglandinas
PGE ₂	Prostaglandina E2
PL	Fosfolípidos de membrana
R. μ, δ y κ	Receptores opioides mu, delta y kappa
RAM	Mecanorreceptores de adaptación rápida
R α	Receptor adrenérgico α
s.c.	Subcutánea
s/seg	Segundos
SAM	Mecanorreceptores de adaptación lenta
SCID	Inmunodeficiencia combinada severa
SFB	Suero fetal bovino
SI	Sistema inmune
SN	Sistema nervioso
SNC	Sistema nervioso central
SNP	Sistema nervioso periférico
SP	Sustancia P
TGF- β	Factor de crecimiento transformante- β
TNF α	Factor de necrosis tumoral- α
TrkA, B, & C	Receptores tirosin cinasa A, B & C
TRP	Receptores de potencial transitorio
TRPA1	Receptor de potencial transitorio de la subfamilia A1
TRPM8	Receptor de potencial transitorio de la subfamilia M8
TRPV1	Receptor de potencial transitorio de la subfamilia V1 (canal catiónico)
TRPV3	Receptor de potencial transitorio de la subfamilia V3
VFT	Umbral en Von Frey
VGCCs	Canales de Ca ²⁺ dependiente de voltaje
VSCM	Células vasculares del musculo liso

Lista de Figuras

Figura 1. Crecimiento tumoral.....	2
Figura 2. Anatomía del nociceptor.	11
Figura 3. Tipos de fibras cutáneas en mamíferos	14
Figura 4. Diversidad de neuronas somatosensoriales en la piel	15
Figura 5. Modulación de la información nociceptiva en el asta dorsal de la médula espinal.	16
Figura 6. Fisiopatología del dolor.....	16
Figura 7. Dolor nociceptivo, inflamatorio y neuropático	21
Figura 8. Organización general y patrón de inervación sensorial del esqueleto.	23
Figura 9. Mecanismo del dolor inducido por cáncer.....	24
Figura 10. Fórmulas estructurales de GABA (A) y Gabapentina (B).	35
Figura 11. Fórmula estructural del tramadol	37
Figura 12. Esquema de administración de fármacos y aplicación de pruebas conductuales	46
Figura 13. Imágenes de MicroCT del uso de diferentes tipos de materiales para el sellado del fémur.....	47
Figura 14. Imágenes de MicroCT inoculación de 6×10^5 células.....	48
Figura 15. Imágenes de MicroCT inoculación de 3×10^5 células.....	49
Figura 16. Imágenes de MicroCT inoculación de 1×10^5 células.....	50
Figura 17. Imágenes de MicroCT inoculación de 5×10^4 células.....	51
Figura 18. Histología de cabeza distal del fémur derecho.....	52
Figura 19. Histología de hueso liso y trabecular.	53
Figura 20. Histología pulmón de la inoculación 3×10^5 células.....	53
Figura 21. Histología de cabeza de fémur y médula ósea, inoculación de 1×10^5 células. ...	54
Figura 22. Histología de vaso, hígado y riñón, inoculación de 1×10^5 células.....	55
Figura 23. Histología cabeza de fémur y hueso trabecular; inoculación de 5×10^4 células...	56
Figura 24. Alodinia mecánica; inoculación 6×10^5 células	57
Figura 25. Hiperalgnesia térmica; inoculación 6×10^5 células	58
Figura 26. Movimiento voluntario; inoculación de 6×10^5 células.	59

Figura 27. Sacudida de cuerpo completo y extremidades delanteras; inoculación de 6×10^5 células	60
Figura 28. Sacudida de la extremidad posterior; inoculación de 6×10^5 células.	61
Figura 29. Lamida y acicalamiento; inoculación de 6×10^5 células.	62
Figura 30. Alodinia mecánica; inoculado con 3×10^5 células.....	63
Figura 31. Hiperalgnesia térmica; inoculación de 3×10^5 células.....	64
Figura 32. Movimiento voluntario horizontal y vertical; inoculación de 3×10^5 células.	65
Figura 33. Sacudida de cuerpo completo y extremidades delanteras; inoculación de 3×10^5 células.	66
Figura 34. Sacudida de la extremidad posterior; inoculación de 3×10^5 células.	67
Figura 35. Lamida y acicalamiento; inoculación de 3×10^5 células.	68
Figura 36. Alodinia mecánica, inoculación de 1×10^5 células.....	69
Figura 37. Hiperalgnesia térmica; inoculación de 1×10^5 células.....	70
Figura 38. Movimiento ambulatorio horizontal y vertical; inoculación de 1×10^5 células. ..	71
Figura 39. Sacudida de la extremidad delantera; inoculación de 1×10^5 células.....	72
Figura 40. Sacudida de la extremidad posterior ipsilateral y contralateral; inoculación de 1×10^5 células.....	73
Figura 41. Lamida y acicalamiento, inoculación de 1×10^5 células.	74
Figura 42. Alodinia mecánica ipsilateral y contralateral; inoculación de 5×10^4 células.....	75
Figura 43. Hiperalgnesia térmica ipsilateral y contralateral, inoculación de 5×10^4 células..	76
Figura 44. Movimiento ambulatorio horizontal y vertical; inoculación de 5×10^4 células. ..	77
Figura 45. Sacudida de la extremidad delantera; inoculación de 5×10^4 células.....	78
Figura 46. Sacudida de la extremidad posterior; inoculación de 5×10^4 células.	79
Figura 47. Lamida y acicalamiento; inoculación de 5×10^4 células.	80
Figura 48. ABC de alodinia mecánica; inoculación de 5×10^4 vs 1×10^5 células.....	81
Figura 49. ABC de hiperalgnesia térmica; inoculación de 5×10^4 vs 1×10^5 células.	82
Figura 50. Efecto anti-alodínico del tratamiento de tramadol.	84
Figura 51. Efecto anti-alodínico del tratamiento de gabapentina.	85
Figura 52. Efecto anti-hiperalgésico del tratamiento de tramadol.....	86
Figura 53. Efecto anti-hiperalgésico del tratamiento de gabapentina.	87

Figura 54. ABC de efecto anti-alodínico de la administración de tramadol y gabapentina.	88
Figura 55. ABC de efecto anti-hiperalgésico de la administración de tramadol y gabapentina.	89

Lista de Tablas

Tabla 1. Metástasis de medula ósea y hueso por GBM.....	6
Tabla 2. Datos demográficos y los resultados de los casos publicados.....	8
Tabla 3. Canales de traducción mecanosensorial y termosensorial en mamíferos.....	17
Tabla 4. Modelos animales de dolor por cáncer.	30
Tabla 5. Modelos animales de dolor por cáncer en hueso.....	33
Tabla 6. Líneas celulares de uso común de cáncer de próstata y mama para el desarrollo de modelos animales de metástasis ósea.	34
Tabla 7. Resumen de Resultados.....	90

Resumen

El dolor inducido por cáncer se presenta en el 68% de todos los pacientes de cáncer avanzado, metastásico o enfermedad terminal. Es una condición que implica dos mecanismos fisiopatológicos, el dolor neuropático y el dolor inflamatorio, produciendo así una condición única, llamada dolor incidental o irruptivo, que tiene las siguientes características: a pesar de la administración de un tratamiento analgésico, se presenta de manera dolorosa continua, con episodios de dolor con mayor intensidad, dolor espontáneo, parestesia (hormigueo), disestesia, quemante, entre otras, dicha condición generada por cáncer. El glioblastoma multiforme (GBM) es un tumor maligno primario de grado IV que se origina en el Sistema Nervioso Central (SNC) proveniente de astrocitos que puede producir metástasis óseas. El objetivo de este proyecto fue el desarrollo de un modelo de dolor inducido por la inoculación de células de glioma, para lo cual se llevó a cabo una serie de ensayos que consistieron en inocular diferentes cantidades 6×10^5 , 3×10^5 , 1×10^5 y 5×10^4 células del glioma C6 en fémur de rata Wistar, evaluando conductas de hipersensibilidad: alodinia, hiperalgesia y dolor espontáneo, conductas voluntarias: movimiento ambulatorio horizontal y vertical, lamida y acicalamiento. Se tomaron imágenes de MicroCT y se realizó la histología correspondiente en cada grupo. Los resultados demostraron que el desarrollo de un modelo preclínico muestra la presencia de conductas nociceptivas, además se demostró que la línea celular C6 de glioma produce osteolisis, siendo este uno de los posibles factores por los cuales se desarrolló la conducta dolorosa. Se presentó, fractura ósea y metástasis a otros órganos, como pulmón. De acuerdo los resultados, la inoculación de la cantidad de 1×10^5 células produjo el mejor modelo de dolor. Posteriormente, se administraron dos fármacos: tramadol (31.6 mg/kg) y gabapentina (56.23 mg/kg) los cuales fueron administrados una vez al día durante 24 días, a partir de los 15 días post-inoculación, los resultados mostraron un efecto anti-alodínico con los dos fármacos, pero para el alivio de la hiperalgesia térmica solo el tramadol tuvo un efecto anti-hiperalgésico. Se desarrolló un modelo de dolor inducido por cáncer que presentó dolor por el movimiento voluntario, hipersensibilidad y una disminución de la lamida y acicalamiento.

Summary

Pain induced by cancer occurs in 68% of all patients with advanced, metastatic or terminal disease. It is a condition that involves two pathophysiological mechanisms, neuropathic pain and inflammatory pain, thus producing a unique condition, called incidental or breakthrough pain, which has the following characteristics: despite the administration of an analgesic treatment, it presents painfully continuous, with episodes of pain with greater intensity, spontaneous pain, paresthesia (tingling), dysesthesia, burning, among others, said condition caused by cancer. Glioblastoma multiforme (GBM) is a primary grade IV malignant tumor that originates in the Central Nervous System (CNS) from astrocytes that can produce bone metastases. The objective of this project was the development of a pain model induced by the inoculation of glioma cells, for which a series of tests were carried out which consisted of inoculating different amounts 6×10^5 , 3×10^5 , 1×10^5 and 5×10^4 glioma cells in Wistar rat femur, assessing hypersensitivity behaviors: allodynia, hyperalgesia and spontaneous pain, voluntary behaviors: horizontal and vertical ambulatory movement, licking and grooming. MicroCT images were taken and the corresponding histology was performed in each group. The results showed that the development of a preclinical model shows the presence of nociceptive behaviors, in addition it was demonstrated that the C6 cell line of glioma produces osteolysis, this one of the possible factors by which the painful behavior was developed. It presented, bone fracture and metastasis to other organs, such as lung. According to the results, inoculation of the amount of 1×10^5 cells produced the best model of pain. Subsequently, two drugs were administered: tramadol (31.6 mg/kg) and gabapentin (56.23 mg/kg), which were given once daily for 24 days, after 15 days post inoculation, the results showed an anti-alodynic effect with the two drugs, but for the relief of thermal hyperalgesia only tramadol had an anti-hyperalgesic effect. A model of pain induced by cancer was developed that presented pain by the voluntary movement, hypersensitivity and a decrease of licking and grooming.

I. Introducción

El dolor es uno de los síntomas más comunes de los pacientes de cáncer a menudo tiene un efecto negativo sobre el estado funcional y la calidad de vida (NCI, 2017). El dolor del cáncer se relaciona con un aumento del sufrimiento emocional. Tanto la duración del dolor como la intensidad del dolor se correlacionan con el riesgo de presentar depresión. Los pacientes de cáncer se incapacitan durante un promedio de 12 a 20 días por mes; 28 a 55 % no pueden trabajar debido a su cáncer (Brown y cols., 2010). Los sobrevivientes de cáncer pueden experimentar angustia cuando su dolor persiste de forma inesperada después de la finalización de los tratamientos del cáncer (Jim y Andersen, 2007). En un estudio, entre 20 y 50 % de los pacientes de cáncer continuaron experimentando dolor y limitaciones funcionales años después del tratamiento (Harrington y cols., 2010).

El dolor se presenta en 20 a 50 % de los pacientes de cáncer (Fischer y cols., 2010). En un metanálisis en el que se observaron datos conjuntos de 52 estudios, se encontró que más de la mitad de los pacientes tenía dolor (van den Beuken-van Everdingen y cols., 2007). Es más probable que los pacientes más jóvenes experimenten dolor por el cáncer y exacerbación del mismo que los pacientes de más edad (Green y Hart-Johnson, 2010). A menudo, los pacientes sienten dolor en múltiples sitios (Gutgsell y cols., 2007). En un estudio de 100 pacientes de cuidados paliativos se encontró que en 68% el tumor primario era la causa principal del dolor, la mayor parte del dolor fue somático e intermitente. (Gutgsell y cols., 2007).

1.1 El cáncer

El cáncer es una de las causas principales de muerte alrededor del mundo. En 2012, hubo 14 millones de casos nuevos y 8.2 muertes relacionadas con el cáncer. El número de casos nuevos de cáncer aumentará a 22 millones en las siguientes dos décadas. Más de 60 % de los nuevos casos de cáncer en el mundo tienen lugar en África, Asia, Sudamérica y Centroamérica; 70 % de las muertes también ocurren en estas regiones (NCI, 2017).

En Estados Unidos, el índice general de mortalidad por cáncer ha disminuido desde principios de 1990. La Revisión de Estadísticas de Cáncer del Programa de Vigilancia, Epidemiología y Resultados Finales actualizada en septiembre de 2016, muestra que los índices de mortalidad por cáncer disminuyeron en:

- 1.8 % por año en hombres (2004 a 2013).
- 1.4 % por año en mujeres (2004 a 2013).
- 1.4 % por año en niños de 0 a 19 años de edad (2009 a 2013).

Aunque los índices de muerte por muchos tipos individuales de cáncer han disminuido, los índices de algunos de ellos se han estabilizado o hasta han aumentado. A medida que ha disminuido el índice general de muertes esta enfermedad, ha aumentado el número de supervivientes de cáncer. Estas tendencias muestran que se están logrando avances, pero todavía falta mucho trabajo por hacer. Si bien los índices de tabaquismo, una causa principal de cáncer, han disminuido, la población está envejeciendo y los índices de cáncer aumentan con la edad. La obesidad, otro factor de riesgo, también está en aumento (NCI, 2017).

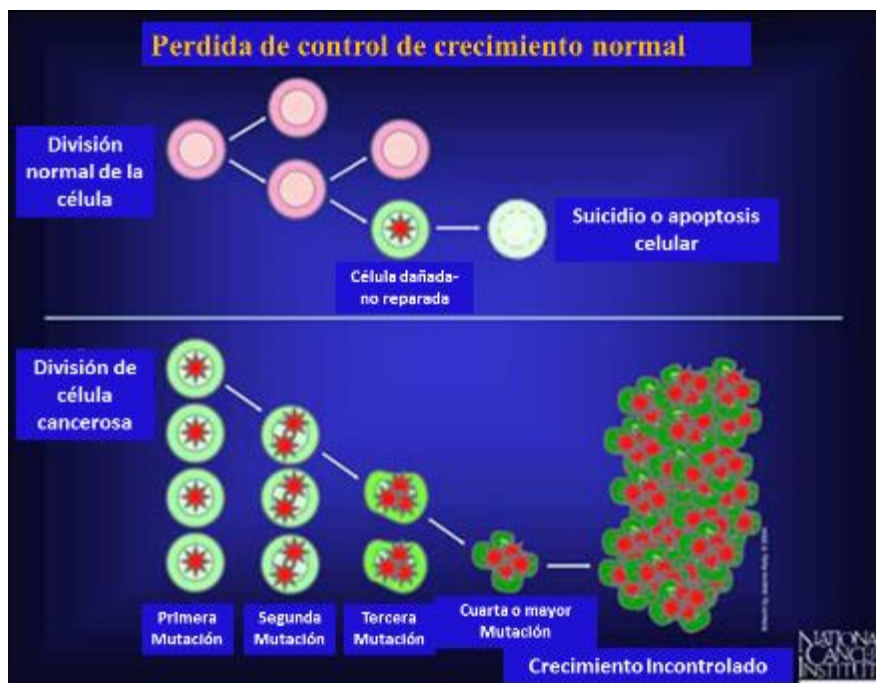


Figura 1. Crecimiento tumoral.

Modificado de National Cancer Institute, NCI (2017).

El cáncer es el nombre de la enfermedad en la cual algunas de las células del cuerpo empiezan a dividirse sin detenerse y se diseminan a los tejidos del derredor. Mientras las células normales se dividen y mueren durante un periodo de tiempo programado, la célula cancerosa “olvida” la capacidad para morir y se divide casi sin límite (Figura 1). Tal multiplicación en el número de células llega a formar masas, denominadas “tumores” o “neoplasias”, que en su expansión destruyen y sustituyen a los tejidos normales. Las células cancerosas son menos especializadas que las células normales, pueden ignorar las señales de división y/o la muerte celular programada (apoptosis). También tienen la capacidad para influir en las células normales, en las moléculas y en los vasos sanguíneos que rodean y alimentan las células de un tumor (microambiente). Con frecuencia, son también capaces de evadir el sistema inmunitario, para seguir vivas y crecer. Hay más de 100 tipos de cáncer. Los tipos de cáncer reciben, en general, el nombre de los órganos o tejidos en donde se forman los cánceres (NCI, 2017).

1.1.1 Tumores del Sistema Nervioso Central (SNC).

Hay diferentes tipos de tumores del SNC. Estos tumores se pueden clasificar dependiendo del grado y el tipo de célula en donde se formaron en el sistema nervioso central (NCI, 2017). Los tumores de cerebro y médula espinal frecuentemente son agresivos y se asocian a un pobre pronóstico. Por ejemplo, aún con la combinación de terapias que consisten, en cirugía, resección, radioterapia y sistema de quimioterapia, algunos cánceres de cerebro permanecen en el organismo, siendo la más fatal la neoplasia de sistema nervioso central en adultos, con una sobrevida de 14.6 meses (Macarthur y cols., 2014).

Clasificación dependiente de célula que forma el tumor

Entre los cánceres más comunes se encuentran (NCI, 2017):

- 1) Tumor astrocítico: es un tumor que comienza en las células del encéfalo con forma de estrella llamados astrocitos y que sirven para ayudar a que las células nerviosas se mantengan sanas. Forman tumores conocidos como gliomas. Los tumores astrocíticos son los siguientes: glioma del tronco encefálico (habitualmente de grado alto), tumor astrocítico pineal (de cualquier grado), astrocitoma pilocítico (grado I), astrocitoma

difuso (grado II), astrocitoma anaplásico (grado III) y glioblastoma multiforme (grado IV).

- 2) Tumor oligodendroglial: comienza en las células del encéfalo que se llaman oligodendrocitos, que ayudan a mantener sanas las células nerviosas. Un oligodendrocito es un tipo de célula neuroglial. Los oligodendrocitos forman tumores que se llaman oligodendrogliomas de grado II y III.
- 3) Glioma mixto: dos tipos de células tumorales: oligodendrocitos y astrocitos. Este tipo de tumor mixto se llama oligoastrocitoma y existen de grado II y III.
- 4) Tumor endimario: habitualmente empieza en las células que revisten los espacios llenos de líquido del encéfalo y los que rodean la médula espinal. Los tumores endimarios son: Ependimoma (grado I o II) y Ependimoma anaplásico (grado III).

1.1.2 Glioblastoma Multiforme (GBM).

El GBM es el tumor cerebral primario del sistema nervioso central SNC más frecuente y más letal en la edad adulta, grado IV ([Castañeda y cols., 2015](#)). Es uno de los tumores malignos del SNC más frecuente, que comprende aproximadamente el 15% de todos los tumores cerebrales primarios y aproximadamente el 45% de los tumores malignos primarios del cerebro. Cada año, cerca de 25,000 estadounidenses se les diagnostica con un glioma maligno. La OMS clasifica a los gliomas en una escala numérica como tumores de grado III-IV categorizados como gliomas malignos, los cuales incluyen los astrocitomas anaplásicos y glioblastomas. El GBM se presenta en un 4-8 por cada 100,000 personas, los gliomas malignos son devastadores para quienes se ven afectados y a los 5 años después del diagnóstico, solo el 33% sobrevive a la enfermedad. En los pacientes diagnosticados con glioblastoma han tenido una supervivencia de 14-16 meses. A pesar de los intentos terapéuticos rigurosos que incluyen resección macroscópica de la masa tumoral, seguida de radioterapia y quimioterapia, el resultado no es suficiente. Por todo lo anterior, es prioritario tratamientos más eficaces, así como el desarrollo de modelos experimentales para el estudio de esta patología ([Ostrom y cols., 2014](#)).

En México, en 2002 fallecieron 58 612 personas por cáncer, lo que correspondió a 12.7% del total de defunciones en ese año y a una tasa de 52.7 % por 100 mil habitantes.

Durante 2002 se identificaron 1547 pacientes fallecidos por tumores de sistema nervioso central, que correspondieron a 2.64 % del total de defunciones, para una tasa de 1.5 por 100 mil habitantes. En ese mismo año se registraron 1426 casos nuevos de neoplasias encefálicas, que representaron 1.32 % del total de neoplasias malignas registradas (CNVECE, 2002). En nuestro país, el glioblastoma multiforme constituye cerca de 30 % de los gliomas y 9 % de las neoplasias intracraneales, con supervivencia media de 16 meses (López-González y cols., 2000). El Consejo Mexicano de Cirugía Neurológica muestra que al año se operan 1,320 tumores en los hospitales de la Ciudad de México. En Guadalajara y Monterrey se realizan 385 y 280 neurocirugías respectivamente. Mientras que en el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, Manuel Velasco Suarez de la Cd. de México de 1998 al 2002 trataron los siguientes tumores intracraneales: gliomas 262, meningiomas 408, adenomas de hipófisis. La incidencia del glioblastoma en el Instituto con respecto al total de consultas es de 5 por 100,000, pero su mortalidad a 24 meses es de 100% y su costo enorme. Por esta razón se requiere llevar a cabo un registro nacional que permita tener el conocimiento exacto del alto grado de incidencia, para incrementar la investigación en este campo y recursos económicos en busca de su resolución (Corona-Vázquez y cols., 2002).

1.1.3 Evidencias de la Metástasis de GBM

Varios informes han reportado metástasis de GBM extraneurales (Kleinschmidt-Demasters, 1996; Lun y cols., 2011; Perryman y Erler, 2014; Müller y cols., 2014; Ostrom y cols., 2014; Goodwin y cols., 2016). Müller C. y cols., (2014) reportaron que 141 pacientes con GBM o astrocitoma de grado IV, determinaron en el 20.6% de los pacientes células tumorales circulantes (CTC) identificados a través de la inmunotinción para la proteína ácida fibrilar glial (GFAP), la cual sirve como un marcador de células de glioma, además encontraron que el número de CTC por paciente variaba de ~ 1 a 22 /2 millones de células mononucleares de sangre. De manera particular la [tabla 1](#) muestra once investigaciones diferentes de casos de pacientes con metástasis en hueso y médula ósea por GBM, presentando síntomas como dolor, trombocitopenia e invasión dural.

Núm. de pacientes	Se presentó con dolor óseo	Biopsia de medula ósea, (+) a tumor	Trombocitopenia	Invasión dural	Referencias
2	sí	sí	sí	Invasión vena dural/no autopsia	Yung y cols., 1983
1	no*	sí	sí	Dural no mencionada	Friedman y cols., 1987
1	sí	sí	no	Sin reporte de autopsia	Haddon y cols., 1989
1	sí	sí	no	Sin reporte de autopsia	Gamis y cols., 1990
1	sí	no	no (anemia)	Infiltración de tumor seno sagital superior y dural	Rubinstein, 1967
1	sí	sí	no	No autopsia	Myers y cols., 1990
1	sí	sí	no (anemia)	No autopsia	Dewar y cols., 1985
1	sí	sí	no	No autopsia	Lampl y cols., 1990
1	no*	no+	no	No autopsia	Tratting y cols., 1990
1	sí	no+	sí	Infiltración dural	Pang y Ashmead, 1982
1	sí	sí	sí	Dural no mencionada	Mousavi, 1980

*Tumor encontrado en estudios radiográficos

+Tumor documentado por un solo estudio radiográfico

Tabla 1. Metástasis de medula ósea y hueso por GBM

Modificado de [Kleinschmidt-Demasters y cols., 1996](#).

En la actualidad el tratamiento estándar de glioblastoma primario que incluyen la cirugía, la quimioterapia y la radiación, la incidencia de metástasis extraneurales sigue en aumento exponencialmente. [Lun y cols., \(2011\)](#) reportan que de 88 casos de metástasis extracraneales de GBM entre 1928 y 2009, el tiempo entre la detección y diagnóstico de metástasis extracraneales fue de 8.5 meses y 1.5 meses después de la metástasis hasta la mortalidad. Por su parte, [Ng y cols., \(2005\)](#) realizaron una revisión de 52 reportes de la literatura que indican metástasis ósea por glioma maligno.

La naturaleza de estos tumores de no hacer metástasis ha sido un tema de debate. Se ha reportado un tiempo de supervivencia muy corto para pacientes con tumores gliales, que no permiten suficiente tiempo para que el tejido metastásico crezca en proporciones sintomáticas. Otras explicaciones incluyen la ausencia de vasos linfáticos que unen el SNC con el resto del cuerpo, de la capacidad del tejido denso dural para retardar la invasión neoplásica, la naturaleza de pared delgada de pequeñas venas cerebrales, que puede colapsar antes de avanzar tumor, y el fracaso de la supervivencia de las células neoplásicas en la neuroglia extraterritorial ([Winkelman y cols., 1952](#)). Sin embargo, el tejido glial ha demostrado que puede sobrevivir fuera del SNC a través de la implantación accidental en el

momento de la cirugía o por medio del trasplante de órganos alogénicos. La capacidad del tejido glial de sobrevivir extraneuralmente depende de las propiedades inmunológicas de los tejidos huésped (Müller y cols., 2014). Al respecto han sido propuesto varias hipótesis, el acceso directo a través de los vasos duros a tejido extrameningeal que se considera el camino más probable en el desarrollo de metástasis extraneural que potencialmente es iniciada por una intervención quirúrgica (Beauchesne y cols., 2000). La evidencia que apoya este mecanismo de diseminación metastásica se basa en el patrón de siembra en los pulmones y ganglios linfáticos, que son los órganos más frecuentemente afectados, lo que sugiere rutas hematológicas o rutas linfáticas. Pero en los casos de metástasis en ausencia de la intervención quirúrgica, se sugieren otras posibles vías de diseminación extracraneal de GBM a través de la invasión directa de la duramadre y del hueso, y la migración celular al drenado ventricular (Maccauro y cols., 2011). Además en apoyo a este mecanismo, recientemente se han encontrado células tumorales circulantes en la sangre de 20% -39% de los pacientes con GBM (Lombard y cols., 2015). Estos nuevos hallazgos indican que estas células tumorales tienen el potencial de extravasación a través de la barrera hematoencefálica y posteriormente sobrevivir en el torrente sanguíneo a través de la evasión del sistema inmune e invadir el sistema esquelético, esto podría ocurrir a través de la diseminación hematológica de estas células (Müller y cols., 2014).

En pacientes diagnosticados con glioblastoma, los órganos afectados por metástasis extraneurales incluyen la pleura y/o de los pulmones (60%), los ganglios linfáticos (51%), huesos (31%), y el hígado (22%) (Beauchesne y cols., 2000; Perryman y Erler, 2014). De los casos de **metástasis óseas**, la columna vertebral (73%), las costillas (23%), esternón (18%), y el cráneo (14%), son los sitios más comunes para que el GBM haga metástasis (Pasquier y cols., 1980; Longee y cols., 1991). La edad media de los pacientes que se presentan con cualquier metástasis extraneurales es de 40 años (Blume y cols., 2013). En la **Tabla 2** se resumen los datos demográficos y los resultados de los casos publicados por Goodwin y cols., (2016) que nos muestra 28 casos que fueron diagnosticados histológicamente con metástasis vertebral por GBM, siendo la proporción hombre/mujer de 19:9, y la edad media de 38.4 años en un rango de 11-63 años; la edad media de los pacientes recién diagnosticados con GBM: 54 años. Además, la supervivencia global media de los casos con metástasis vertebral es

26 meses aproximadamente en un rango de 1-96 meses, después de su primer diagnóstico de glioblastoma. De los 12 casos que se reportaron la sobrevida fue de 10 meses en un rango de 25 días a 48 meses. Siendo el 32% de las metástasis localizada en columna torácica, 28.6% a nivel espinal, 17.9% en columna lumbar y 10.7% en columna vertebral cervical. Un 64.2%, de los pacientes se sometieron a cirugía con terapia adyuvante (radioterapia, quimioterapia, o ambos) para el tumor intracraneal, mientras que el 57.1% de los pacientes no se sometieron a ningún tratamiento para la metástasis espinal o se desconoce.

Número Total con Metástasis Espinal	Glioblastoma (N = 28)
Sexo, masculino, n (%)	19 (67.9)
Edad al primer, años (rango)	38.4 (11–63)
Tiempo medio de metástasis para metástasis espinal, meses (rango)*	26.4 (4–90)
Localización, n (%)	
Cervical	3 (10.7)
Torácica	9 (32.1)
Lumbar	5 (17.9)
Multinivel	8 (28.6)
Desconocido	3 (10.7)
Tratamiento de GBM primario, n (%)	
Sólo cirugía	5 (17.9)
Radioterapia y/o quimioterapia	1 (3.6)
Cirugía y terapia adyuvante	18 (64.2)
Sin tratamiento/ desconocido	4 (14.3)
Tratamiento de metástasis espinal, n (%)	
Sólo cirugía	0 (0)
Radioterapia y/o quimioterapia	3 (10.7)
Cirugía y terapia adyuvante	9 (32.1)
Sin tratamiento/ desconocido	16 (57.1)
Sobrevida, n (%)	
Pacientes con sobrevida conocida	25 (89.3)
Pacientes con sobrevida desconocida	3 (10.7)
<3 meses de sobrevida	1 (4)
3–11 meses de sobrevida	6 (24)
12–23 meses de sobrevida	11 (44)
24–60 meses de sobrevida	4 (16)
>60 meses de sobrevida	3 (12)

Tabla 2. Datos demográficos y los resultados de los casos publicados.

Todos los porcentajes se basan en el número total de pacientes, excepto para el porcentaje de sobrevida se basa en pacientes con sobrevida conocida. Donde, GBM: glioblastoma multiforme y * Tiempo de metástasis espinal no fue reportada en 18 estudios. Modificado de [Goodwin y cols., 2016](#).

1.2 Dolor

Más de la mitad de los casos de metástasis a nivel vertebral por GBM son clínicamente silenciosas y las lesiones se descubren durante la exploración o autopsia. Pero de los casos sintomáticos, los pacientes con metástasis de cuerpos vertebrales por glioblastoma presentan de manera común dolor agudo o insidioso en la región del esqueleto axial afectados por el tumor, y a menudo van acompañados de un grado variable de paresis progresiva. Los pacientes también informan la difusión del dolor a espalda, malestar difuso, rigidez y debilitamiento, donde dichos síntomas, no se alivian con analgésicos (Goodwin y cols., 2016). Como resultado de la infiltración a las vértebras, se puede producir inestabilidad segmentaria, fracturas patológicas, deformidad de la columna, entre otras, dando lugar a un aumento del dolor y/o déficit neurológico. El dolor axial se puede presentar con o sin hiperestesia, dolor radicular o de otro tipo de síntoma neurológico periférico. Otros síntomas incluyen pérdida de peso, disfunción de la vejiga y/o del intestino. Los síntomas generalmente empeoran causando parálisis. En algunos casos los hallazgos incluyen hipercalcemia, creatinina alta, alta cantidad de glóbulos blancos y niveles elevados de nitrógeno (Goodwin y cols., 2016). El dolor por cáncer óseo representa el dolor más común en pacientes humanos con cáncer avanzado, ya que los tumores más comunes, incluyendo cánceres de mama, próstata y pulmón, se presenta una notable propensión a metastatizar hasta el hueso (Guise, T. A., y cols., 2005; Mercadante, S. 1997).

El dolor aunque indeseable, presenta una estrategia adaptativa que protege de las agresiones del medio externo y sin la presencia de las respuestas reflejas ante un estímulo doloroso, se tendría desventaja para la supervivencia. Sin embargo, en algunas circunstancias, el dolor deja de ser una sensación benéfica para el organismo y se convierte en sí mismo en una patología que debe ser suprimida para permitir al organismo sobrevivir (Torres y col., 2003). El dolor es definido por la Asociación Internacional para el estudio del Dolor (IASP, por sus siglas en inglés, International Association for the Study of Pain) como una experiencia sensorial y emocional desagradable asociada con un daño real o potencial al tejido y que es descrita en términos de dicho daño (Merskey, 1979).

Se distinguen 2 modalidades de dolor: 1) dolor interoceptivo que es de origen endógeno o visceral, donde predomina el componente afectivo y la participación emocional y 2) dolor exteroceptivo en el cual el factor predominante es sensitivo y donde el componente emocional no es tan notorio (Jones, 2001).

La experiencia de dolor se ha dividido en dos componentes (Melzack y Casey, 1968): 1) el componente localizante y discriminativo, que informa al paciente sobre la naturaleza, intensidad, duración y localización del dolor, que proporciona claves para el diagnóstico del estado patológico que lo causa y 2) el componente afectivo y de alerta, que demanda la atención del individuo provocando una sensación desagradable que motiva al aprendizaje de la percepción dolorosa, con el fin de suprimir las conductas que lo causaron (Hyman y Cassem, 1995); está asociado con los reflejos motores de evitación (Woolf, 2004).

1.2.1 Nocicepción

La nocicepción es un término neurofisiológico que se refiere a los mecanismos neuronales (detección y transmisión de estímulos nocivos), por los que se detecta la información nociceptiva (Hyman y Cassem, 1995). En tanto que el término dolor involucra la percepción de un estímulo nocivo, lo cual refiere a la capacidad de abstracción y la elaboración de impulsos sensoriales (Millan, 1999).

La nocicepción se origina por la estimulación y activación de los receptores sensoriales de alto umbral (nociceptores) que se encuentran localizados en la periferia y que detectan de manera selectiva estímulos intensos o potencialmente dañinos. La propuesta de que hay aferencias sensoriales que detectan específicamente los estímulos nocivos, se reportó por primera vez por Charles Sherrington, "hay suficientes pruebas que indican que la piel está compuesta de una serie de terminaciones nerviosas cuya especialidad es ser susceptible a los estímulos que provocan las lesiones de la piel... preferiblemente denominados nociceptores" (Millan, 1999).

1.2.2 Nociceptores

Los nociceptores constituyen el sistema nociceptivo, estos son terminaciones nerviosas especializadas (figura 2), conocidas además como fibras aferentes primarias; estas diferencian entre estímulos inocuos y estímulos nocivos, ya que pueden codificar la intensidad del estímulo dentro de un rango de intensidades nocivas y, por otro lado, no responden o lo hacen irregularmente a estímulos de baja intensidad.

Son terminaciones nerviosas libres, que presentan una serie de proteínas, muy variadas y especializadas, que actúan como receptores de esa información nociceptiva y la transmiten al sistema nervioso central (SNC) por fibras nerviosas de tipo A δ y C. Estos receptores pueden ser ionotrópicos (que modifican el tránsito de iones dentro y fuera de la neurona) o metabotrópicos (que ejercen su acción a través de la actuación de cascadas de segundos mensajeros). Por ejemplo, los receptores vaniloides, que codifican la información relacionada con la temperatura y los cambios de pH, pertenecen al grupo de los receptores ionotrópicos, mientras que algunos receptores purinérgicos, es decir sensibles a la unión de adenosintrifosfato (ATP), son metabotrópicos (Goicoechea y Martín, 2006).

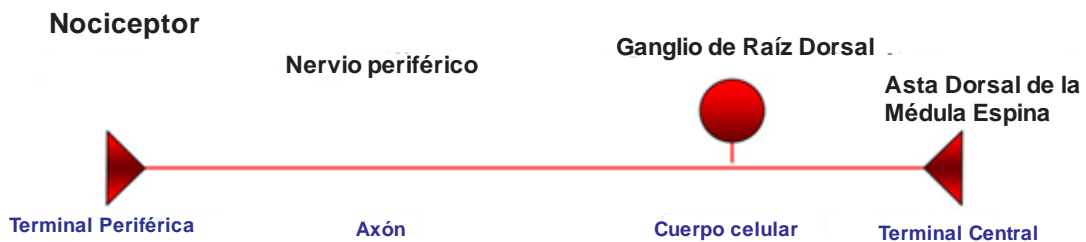


Figura 2. Anatomía del nociceptor.

Los componentes operacionales del nociceptor incluyen una terminal periférica que inerva el tejido diana y transduce los estímulos nocivos, un axón que lleva a cabo los potenciales de acción desde la periferia hasta el sistema nervioso central, un cuerpo de la célula en el ganglio de raíz dorsal y una terminal central, donde la información se transfiere a las neuronas de segunda orden en la sinapsis central (Woolf y Ma, 2007).

Los nociceptores se pueden encontrar extensamente en piel, mucosas, membranas, fascias profundas, tejido conectivo de órganos viscerales, ligamentos, cápsulas articulares, periostio, músculos, tendones y vasos arteriales. Los receptores corresponden a terminales nerviosas libres y representan la parte más distal de las neuronas sensoriales aferentes de primer orden que consisten de fibras de pequeño diámetro, con poca mielina o mielinizadas,

fibras A δ y C, respectivamente. Su campo receptor puede consistir de áreas que se extienden desde regiones puntiformes hasta regiones que midan varios milímetros en diámetro, o en más de un sitio en territorios distales (Lynn, 1992).

Para transmitir la información nociceptiva, los nociceptores tienen la capacidad de distinguir entre estímulos inocuos y nocivos, (Hyman y Cassem, 1995), ya que poseen un alto umbral de estimulación y la capacidad de relacionar de manera directa la frecuencia de descarga con la intensidad de estímulo detectado (Bessou y Perl 1969).

Cuando se presenta un daño tisular o inflamación, se liberan del tejido dañado mediadores químicos del dolor que pueden sensibilizar o activar a los nociceptores. Además de responder, los nociceptores tienen la capacidad de liberar diferentes mediadores químicos por “activación antidrómica” entre ellos: la sustancia P, el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP) y el glutamato (Millan, 1999).

1.2.3 Clasificación de los nociceptores

Los cuerpos celulares de las fibras aferentes cutáneas se encuentran en los ganglios de la raíz dorsal (GRD). Estos se puede dividir en dos grupos principales según el calibre del axón y la mielinización: de gran diámetro, fibras mielinizadas A y de pequeño diámetro, las fibras C amielínicas. Como consecuencia del calibre del axón y el estado de la mielinización, los potenciales de las fibras A realizan una acción mucho más rápida que las fibras C (velocidad de conducción de la fibra A = 1.2-40 m/s; velocidad de conducción de las fibras C = 0.3-1.2 m/s) (Smith y Lewin; 2009).

Fibras A. Las fibras A se dividen en fibras A β y fibras A δ . Las fibras A β tienen un diámetro grande y tiene una vaina de mielina espesa, son fibras que conducen muy rápidamente, implicadas en la detección de **estímulos mecánicos** no nocivos. Las fibras A δ tienen un diámetro del axón algo más pequeño y una vaina de mielina más delgada, estos son los axones de conducción lenta y se clasifican como de bajo umbral (Lewin y Moshourab 2004). Estudios en ratón demostraron que algunos mecanonociceptores A δ son termosensibles, el 12% son sensibles al calor (umbral de ~ 42 °C) y 50% son sensibles a frío (umbral de ~ 8 °C;

Cain y col., 2001). También se ha reportado la activación de mecanonociceptores A δ humanos por temperaturas superiores a 45 °C (Adriaensen y col., 1980).

Las fibras C. Las fibras C no mielinizadas, que como los mecano-nociceptores A δ , terminan en la piel como terminaciones libres, son mucho más abundantes que las fibras A (Lewin y Moshourab 2004). Las fibras C son generalmente activadas por estímulos nocivos, aunque un conjunto de estas fibras se activan de manera inocua con estímulos <0.05 g; el resto de la población de fibras C son polimodales, es decir, que responden a estímulos nocivos de todo tipo: mecánico, térmico y químicos (ácido, por ejemplo), de manera de adaptación lenta (Bessou y Perl 1969).

Aproximadamente el 70% de las fibras C son activadas por calor nocivo con un umbral de aproximadamente 40°C. Mientras que un porcentaje menor de fibras C responden a estímulos nocivos fríos (aprox. 10°C) (Cain y col., 2001; Lewin y Moshourab 2004).

No todas las fibras C que codifican para estímulos nocivos, son polimodales, algunas se activan exclusivamente por estímulos nocivos mecánicos, otras sólo por el calor, algunas por estímulos mecánicos y calor y otros por estímulos mecánicos y fríos, sin embargo, estos son menores en comparación con las fibras C polimodales (figura 3).

El último grupo de las fibras C identificado en los roedores y seres humanos se denomina "*sleeping*" o "*silent*" debido a que estas fibras no son activadas por estímulos mecánicos o térmicos (Weidner y col., 1999).

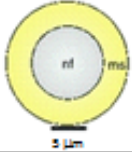










Fibra	Sección en corte Transv.	Tipo de Fibra	Sensación	% *	CV (m/s)	vFT (mN)	Termo-sensibilidad
A β		RAM	Táctil	10	>10	1.0	
		SAM	Táctil	12	>10	1.5	
A δ		D-Hair	Táctil	6	2-10	<0.5	
		AM	Nocicepción	12	2-10	5	
		Polimodal-C	Nocicepción	30	<1.5	10	
C		CM/MH/MC/H	Nocicepción	20	<1.5	6	
		"Silent"	Nocicepción	~5	<1.5	N/A	
		CLT	Táctil	~5	<1.5	<0.5	

Figura 3. Tipos de fibras cutáneas en mamíferos

El % se refiere al número total de las fibras cutáneas. Algunas neuronas expresan canales iónicos, la activación produce sensaciones de calor/frío en lugar de frío/calor doloroso. Representado con un solo color sólo si es posible transducir solo una clase de neurona caliente (*rojo*)/frío (*azul*). nf= fibras nerviosas; ms= vaina de mielina; CV= velocidad de conducción; VFT= Umbral en Von Frey; mN= mili-Newton; RAM= mecanorreceptores de adaptación rápida; SAM= mecanorreceptores de adaptación lenta; AM= mecanonociceptores A δ ; CM= mecanonociceptor C; CMH= mecanotermo receptores de calor C; CMC= mecanotermo receptores de frío; CLT= fibras C de bajo umbral (Modificado de [Smith y Lewin; 2009.](#)).

1.2.4 Proceso de nocicepción

La nocicepción involucra la activación de los nociceptores y comprende (figura 4):

1. Traducción: es la conducción de los estímulos térmicos, químicos y mecánicos en actividad eléctrica por las terminaciones de las fibras aferentes periféricas (nociceptores).
2. Conducción: es la conducción de las señales hasta el sistema nervioso central (SNC).
3. Transmisión: es el relevo de la información desde las fibras primarias sensitivas a través del asta dorsal de la médula espinal, hasta estructuras cerebrales.
4. Modulación: es la actividad neuronal que lleva al control de la vía de transmisión del dolor.
5. Percepción: que se refiere al proceso por el cual los procesos anteriores interactúan con la psique del individuo, para crear la experiencia emocional y; como tal subjetiva que se percibe como dolor ([Woolf, 2004](#)).

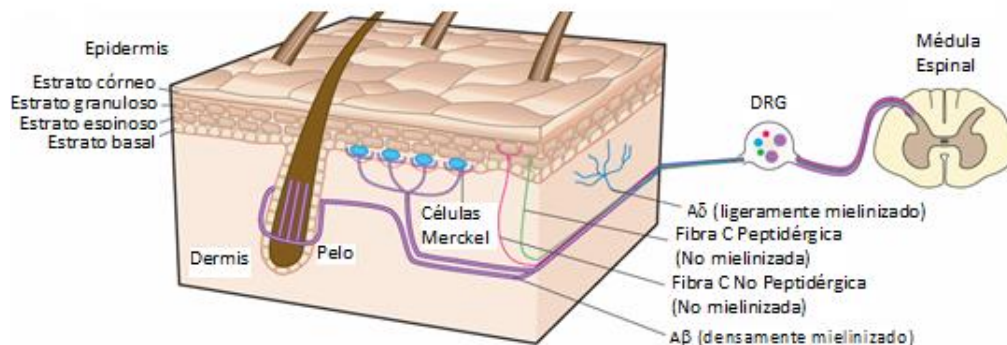


Figura 4. Diversidad de neuronas somatosensoriales en la piel

La piel es inervada por neuronas somatosensoriales que proyectan a la médula espinal. Las fibras A β las cuales inervan células Merkel alrededor del vello, son receptores al tacto. Las fibras A δ y C incluyen termorreceptores y nociceptores. Las fibras terminales A δ se encuentran en la dermis. Las fibras terminales C peptidérgicas y no peptidérgicas en diferentes capas de la epidermis y tienen diferentes patrones de proyección hacia a la médula espinal (Modificado de [Lumpkin y Caterina, 2007](#)).

Una vez estimulados los nociceptores, éstos inducen cambios en la carga eléctrica de la membrana neuronal, lo que resulta en la propagación del estímulo nervioso hasta el asta dorsal de la médula espinal ([figura 5 y 6](#)). Allí se libera glutamato, un aminoácido excitador que se une a un receptor específico, denominado AMPA y localizado en una neurona post-sináptica, que transmite la información hacia los centros superiores del SNC, hasta el tálamo y la corteza cerebral ([Doubell y col., 1999](#)). Desde estos mismos núcleos superiores, se ponen en marcha vías descendentes que llegan de nuevo al asta dorsal de la médula y liberan sustancias endógenas inhibitoras (fundamentalmente opioides y GABA). Estas sustancias inhibitoras actúan modulando la transmisión del estímulo, por un lado disminuyendo la liberación de glutamato y por otra hiperpolarizan la membrana de la neurona post-sináptica. También entran en juego unas interneuronas inhibitoras que, liberando también opioides endógenos, imitan y potencian el efecto inhibitor de las vías descendentes ([Goicoechea y Martín, 2006](#)). En breve, esto explica fisiológicamente la teoría de la compuerta que propusieron Melzack y col., en 1965. En la [tabla 3](#) se muestra una serie de canales de traducción mecanosensorial y termosensorial en mamíferos donde se observa la gran variedad de estos y su forma de activación.

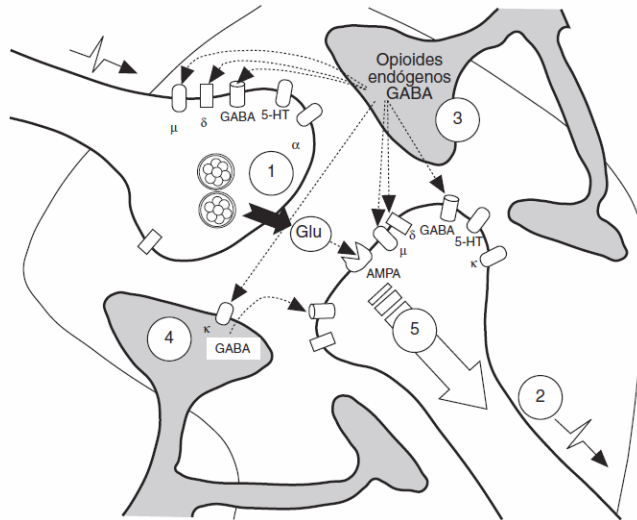


Figura 5. Modulación de la información nociceptiva en el asta dorsal de la médula espinal.

La flecha negra indica liberación y las fechas punteadas indican la unión a receptor. Glu: glutamato; 5-HT: receptor hidroxitriptamina; μ , δ y κ : receptores opioides; α receptor adrenérgico; GABA: ácido gamma aminobutírico; AMPA: receptor de glutamato; 1: liberación de glutamato; 2: transmisión a los centros superiores; 3: liberación de sustancias inhibitoras desde las vías ascendentes; 4: liberación de sustancias inhibitoras desde las interneuronas; 5: transmisión de la señal modulada al SNC.

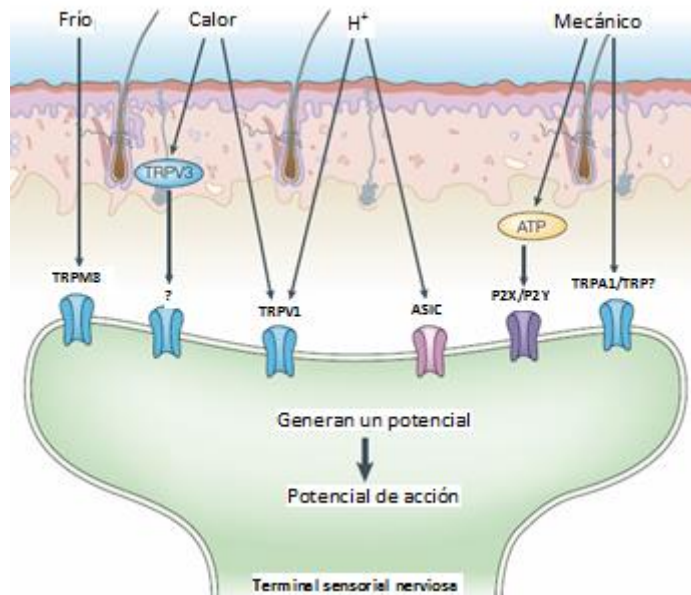


Figura 6. Fisiopatología del dolor.

Respuesta de los nociceptores al daño agudo del tejido (como calentamiento de la piel), mediante la transducción de la energía de los estímulos por los receptores en las terminales nerviosas (como el receptor TRPV1) o indirectamente a través de la activación de los canales TRP en queratocitos (por ejemplo, TRPV3) y/o la liberación de moléculas intermediarias (como ATP), el cual a su vez actúa en receptores neurosensoriales. Se ha observado que células inmunes participan en una parte del proceso. ASIC= canal iónico sensible a ácido;

P2X= receptor purino inotrópico; P2Y= receptor pirimidinérgico acoplado a una proteína G; canales TRP: TRPA1, TRPM8, TRPV3 (Marchand y col., 2005).

Identificación	Familia	Propuesto para la modalidad física:	Activadores adicionales	Rango de temperatura	Neurona sensorial o expresión en piel
TRPA1	TRPA	Térmico y mecánico	Isotiocianatos, Ca ²⁺ , Icilin	<18°C	Fibras C
TRPC1	TRPC	Mecánico	Receptor-procesador	n.a.	Neuronas mecanosensoriales
TRPM8	TRPM	Térmico	Mentol, icilin	<28°C	Fibras C
TRPV1	TRPV	Térmico y osmótico	Capsaisina, protones, endocannabinoides, compuestos difenil	>42°C	Fibras C y Aδ, Queratinocitos
TRPV2	TRPV	Térmico, osmótico y mecánico	Compuestos difenil	>52°C	Fibras C y Aδ, células inmunes
TRPV3	TRPV	Térmico	Alcamfor, carvacrol y compuestos difenil	>34-39°C	queratinocitos y fibras C
TRPV4	TRPV	Térmico y osmótico	PUFAs, 4αPDD, ácidos epoxieicosatrienoicos	>27-34°C	Queratinocitos, células Merkel, fibras C y Aδ
ASIC1	DEG/ENaC	Mecánico (táctil)	Protones	n.a.	Fibras Aβ, Aδ y C
ASIC2	DEG/ENaC	Mecánico (táctil)	Protones	n.a.	Fibras Aβ y Aδ
ASIC3	DEG/ENaC	Mecánico (táctil y nociceptor)	Protones	n.a.	Fibras Aβ y Aδ
TREK-1	Canales de K ⁺ 2P	Térmico y mecánico	Lípidos y protones	n.a.	Fibras Aδ, C y Aβ?

Tabla 3. Canales de traducción mecanosensorial y termosensorial en mamíferos.

(Modificado de Smith y Lewin; 2009) n.a.: no aplica, PUFAs: 4αPDD: DEG/ENaC:

1.2.5 Tipos de dolor

El dolor nociceptivo se produce por una alarma mediada por neuronas sensoriales primarias de alto umbral amielínicas C o mielínicas finas Aδ que alimentan las vías nociceptivas del SNC (Woolf y Ma, 2007). Estas neuronas nociceptivas expresan transductores especializados, canales iónicos principalmente canales de potencial transitorio (TRP, por sus siglas en inglés, Transient receptor potential channel), sintonizados para responder a estímulos intensos térmicos o mecánicos, así como mediadores químicos exógenos y endógenos (Dhaka y col., 2006).

Para que el dolor nociceptivo favorezca su función protectora, la sensación debe ser tan desagradable que no pueda ser ignorada. Este se produce en respuesta a estímulos nocivos y sigue sólo en la presencia sostenida de los estímulos nocivos. Nos alerta a los estímulos externos, como pinchazos o calor excesivo, y los estímulos internos, tales como isquemia del

miocardio en pacientes con enfermedad de la arteria coronaria. Ciertas enfermedades pueden generar estímulos nocivos recurrentes o permanentes que producen el dolor nociceptivo crónico. Un ejemplo es la osteoartritis: la carga de peso normal en presencia de la deformación mecánica de la articulación puede producir la fuerza suficiente para activar los mecanorreceptores de alto umbral sinovial (Torres y col., 2006).

Existe pérdida de la nocicepción como en los trastornos hereditarios asociados con insensibilidad congénita al dolor, que conduce a las lesiones repetitivas y automutilación involuntaria, lo que ilustra la función de gran capacidad de adaptación del dolor nociceptivo (Costigan y col., 2009).

Mientras tanto el **dolor inflamatorio** se produce en respuesta a la lesión tisular y la respuesta inflamatoria posterior. Para ayudar a la cicatrización y reparación de la parte lesionada del cuerpo, el sistema nervioso sensorial se somete a un profundo cambio en su capacidad de respuesta; estímulos normalmente inocuos ahora producen dolor y las respuestas incrementadas a estímulos nocivos y prolongadas (Juhl y col., 2008). En la zona inflamada y en las zonas contiguas no inflamadas se produce intensificación de la sensibilidad como resultado de la plasticidad de los nociceptores periféricos y vías centrales nociceptivas (Huang y col., 2006). Debido a que el sistema del dolor después de la inflamación está sensibilizado, no actúa como un detector de estímulos nocivos, pero sí puede ser activado por estímulos inocuos de bajo umbral. Típicamente, el dolor inflamatorio desaparece después de sanar la lesión tisular inicial. Sin embargo, en trastornos crónicos como la artritis reumatoide, el dolor persiste durante el tiempo que la inflamación está activa (Michaud y col., 2007).

Por otra parte, otros dos grandes tipos de dolor, el dolor neuropático y un grupo de síndromes clínicos que pueden ser llamados dolor disfuncional, son desadaptativos en el sentido de que el dolor no protege ni apoya la curación y reparación (Baliki y col., 2008). En cambio, estos síndromes de dolor son causados por un mal funcionamiento del sistema somatosensorial en sí mismo, y esta anomalía puede ser considerada como una enfermedad (Costigan y col., 2009).

El Grupo de Interés Especial del Dolor Neuropático, por sus siglas en inglés: IASP [*Special Interest Group on Neuropathic Pain* (NeupSIG)] define al **dolor neuropático** como el dolor causado por lesión directa o enfermedad que afecta al sistema somatosensorial. En esta definición la palabra “enfermedad” reemplaza a “disfunción”, con la intención de referirse a procesos patológicos específicos, como por ejemplo, inflamación, condiciones autoinmunes o canalopatías; mientras que la palabra “lesión”, se refiere a un daño micro-o macroscópicamente identificable (Gómez-Barrios, 2007). En este caso el dolor deja de ser una señal fisiológica asociada a la búsqueda de protección, perdiendo su condición adaptativa, para convertirse en un estado patológico, que involucra una serie de elementos que facilitan su generación y persistencia en el tiempo (Gómez-Barrios y cols. 2009). Son ejemplos de dolor neuropático la neuralgia del trigémino (Zakrzewska y Patsalos, 2002), la neuropatía diabética, la neuralgia post-herpética (Mielki y col., 2005), las monorradiculopatías (Jensen y col., 2007), el dolor neuropático inducido por radiación y quimioterapia (Caraceni y col., 2004), el dolor de miembro fantasma (Smith y col., 2005), y el llamado síndrome doloroso regional complejo (van de Vusse y cols., 2004), entre otros.

El **dolor disfuncional** ocurre en situaciones en las que no existe un estímulo nocivo identificable, ni ninguna inflamación detectable o daños en el sistema nervioso. No está claro en la mayoría de los casos, las causas de la manifestación o la persistencia del dolor disfuncional. En condiciones como la fibromialgia, el síndrome del intestino irritable y la cistitis intersticial, el dolor parece ser resultado de una amplificación de las señales nociceptivas autónomas dentro del SNC (Staud y Rodríguez, 2006). Con un balance alterado de la excitación y la inhibición en los circuitos centrales (Julien y col., 2005), donde el procesamiento sensorial alterado puede ser detectado por técnicas de imagen funcional (Staud y col., 2008). Los síndromes disfuncionales del dolor comparten algunas características del dolor neuropático: la sumación temporal con una acumulación progresiva de dolor en respuesta a estímulos repetidos (windup), difusión espacial y reducción de los umbrales del dolor (Staud y col., 2007). La eritemálgia primaria y el trastorno de dolor extremo paroxismal que son causados por mutaciones, por un aumento en la función en el canal de sodio dependiente de voltaje Nav1.7 (Drenth y Waxman, 2007), pueden ser consideradas mediadas por dolor disfuncional. Estas mutaciones son canalopatías

hereditarias del sistema nervioso periférico, que causan dolor por la actividad ectópica de las neuronas sensoriales primarias debido al aumento de excitabilidad de la membrana en ausencia de lesiones axonal o desmielinización.

1.2.6 Mecanismos que comparten el dolor inflamatorio y dolor neurótico

Mientras que el **dolor nociceptivo** presenta las siguientes características: 1) no presenta lesión del sistema nervioso o inflamación, 2) el dolor es evocado por un estímulo de alta intensidad (nocivo), 3) es adaptativo, 4) protege ante un daño potencial, 5) se activa ante estímulos fisiológicos: mecánico, térmicos y daño químico, 6) de manera clínica se detecta en patologías como Osteoartritis, daño de algún órgano, entre otros. El **dolor inflamatorio** se debe a la inflamación: 1) es un dolor evocado por estímulos normales y estímulos nocivos, 2) también se presenta de manera espontánea, 3) debido a estímulos de alta o baja intensidad, se presenta con ampliación sensorial, 4) es reversible y adaptativo, 5) genera protección, 6) produce hiperalgesia durante la curación, 7) presenta amplificación periférica y central, y 8) estimula los componentes del Sistema Inmune (SI) en la periferia: células cebadas, macrófago, granulocitos y neutrófilos.

El **dolor neuropático** se produce por una lesión de sistema nervioso o por enfermedad, generando respuesta neuroinmune. Se presenta el dolor evocado por un estímulo de alta y baja intensidad, también, de manera espontánea. Produce ampliación sensorial, no es adaptativo y persiste regularmente, manteniendo una amplificación periférica y central anormal, dependiente de la lesión o enfermedad, y una interacción neuroinmune en la periferia y en el SNC. Cuando se produce por lesión o enfermedad a nivel SNC se genera algún trauma, o un daño en la médula espinal, entre otros. Cuando se produce lesión o enfermedad a nivel sistema nervioso periférico (SNP) se genera por trauma de nervio, neuropatías metabólicas y tóxicas, herpes Zoster, VIH, entre otros (Costigan y cols., 2009). Todo lo anterior se resume en la [figura 7](#).

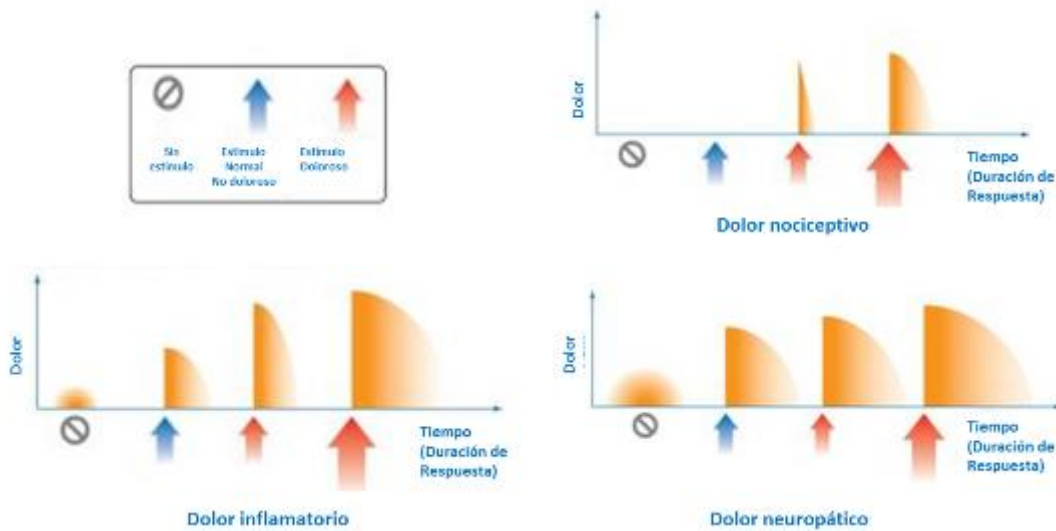


Figura 7. Dolor nociceptivo, inflamatorio y neuropático

Donde en el eje de las ordenadas se muestra la intensidad de dolor, y en el eje de las abscisas la duración de la respuesta, dependiendo del estímulo que se aplicó, modificado de [Costigan y col., 2009](#).

1.3 Dolor inducido por cáncer

El dolor inducido por cáncer es una condición patológica donde prevalecen dos mecanismos de dolor, el dolor inflamatorio y el dolor neuropático, y presenta la unión de varios síntomas resultantes de estas condiciones, además de sus propios signos, es una de las complicaciones más frecuentes en los pacientes con cáncer, de hecho, se presenta en el 68% de todos los pacientes en estado avanzado, metastásico o enfermedad terminal ([van den Beuken-van Everdingen y cols., 2007](#)). Aproximadamente, 60-84% de los pacientes que padecen cáncer con metástasis ósea, desarrollan dolor óseo ([Coleman, 1997](#)).

El dolor óseo inducido por cáncer, es generalmente es descrito de carácter sordo, que se presenta de manera constante y aumenta gradualmente en intensidad con el tiempo ([Dy y col., 2008](#)). Si el cáncer continúa diseminándose dentro de los huesos, puede emerger un segundo tipo de dolor de cáncer conocido como dolor incidental o irruptivo ([Mercadante, 1997](#)). Dolor incidental o irruptivo, se describe como una llamarada transitoria del dolor extremo superpuesto sobre un patrón de dolor estable en los pacientes tratados con analgésicos (por lo general opioides) ([Casuccio y col., 2009](#)). Este dolor puede ocurrir espontáneamente, por el movimiento, la carga de peso del órgano tumoral o por el tejido ([Mercadante y col., 2004](#)). Debido a que el dolor irruptivo es frecuentemente agudo, con

aparición impredecible, éste puede ser grave, debilitante y difícil de controlar totalmente (Coleman, 1997).

El dolor óseo inducido por cáncer representa cambios neuroquímicos únicos de otros estados de dolor crónicos, como dolor inflamatorio o neuropático. El hueso mismo está innervado con fibras A β , A δ y C (Mach y cols., 2002). La mayoría de los tumores humanos que surgen en el hueso carecen de fibras nerviosas detectables dentro de la masa tumoral o hueso periférico en estrecha proximidad (O'Connell y cols., 1998). El ambiente ácido y la secreción de sustancias, tales como factores de crecimiento, citocinas, quimiocinas, de las propias células tumorales estimula a los nociceptores aferentes primarios cercanos y se induce el dolor (Mundy, 1990).

Estudios en humanos indican que el microambiente tumoral causa un remodelado anormal de fibras nerviosas sensoriales cercanas, percibidas como dolorosas por los pacientes (Black y cols., 2008). En un modelo de ratón se observó que el tumor no se inerva (Sevcik y cols., 2005), los cambios ocurren en el periostio que rodea la matriz extracelular del hueso. El periostio expresa péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP) y sustancia P (SP), neuropéptidos expresados por un subgrupo de pequeñas neuronas en DRG, trigeminal y ganglios vagales. Estas pequeñas neuronas que expresan CGRP y SP responden a insumos nocivos, térmicos o viscerales y se describen como peptidérgicas (Stucky y Lewin, 1999). En animales Naive, las fibras de CGRP y SP se encuentran en el hueso mineralizado, en la médula y el periostio. De estos tres tejidos, el periostio contiene las mayores cantidades de CGRP y SP (Sevcik y cols., 2005). El cáncer de sarcoma, próstata y mama inducen el brote ectópico de las fibras nerviosas sensoriales y la formación de neuroma como características en el periostio. Estas fibras nerviosas sensoriales nociceptivas que innervaban el hueso se encuentran reorganizadas y aumentan su densidad en comparación con los de animales control (figura 8) (Mantyh y cols., 2010).

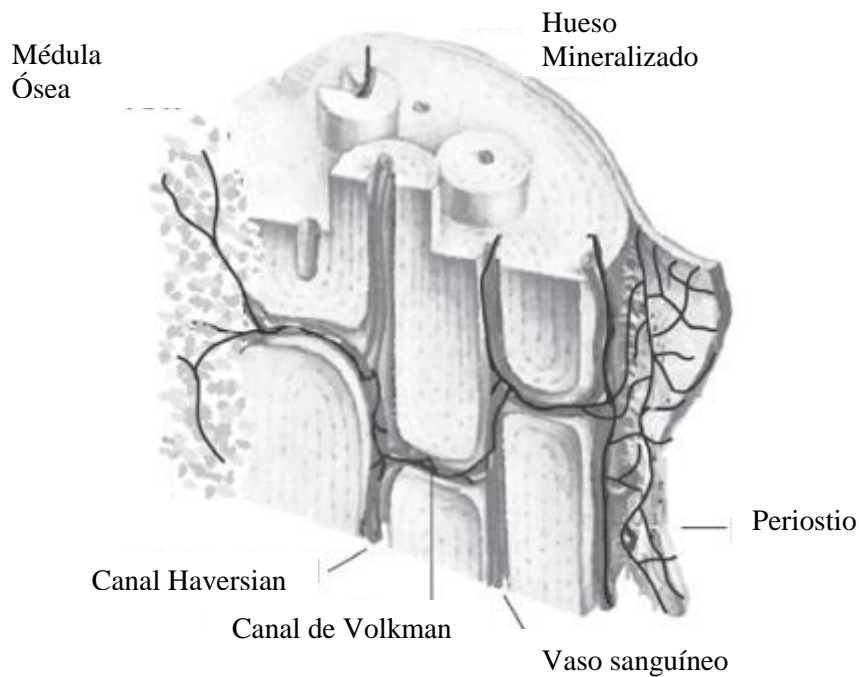


Figura 8. Organización general y patrón de inervación sensorial del esqueleto.
 (Modificado de [Mantyh, 2014](#)).

Los modelos preclínicos han demostrado que los estímulos nociceptivos son liberados de las propias células tumorales o de un número de diferentes células inmunitarias asociadas al tumor dentro del microambiente óseo. Una fuente adicional de protones y proteasas incluye a los osteoclastos. Los modelos preclínicos predicen que tales estímulos nociceptivos pueden actuar directamente para causar dolor a través de canales iónicos sobre las fibras nociceptivas o pueden actuar a través de segundos mensajeros resultando en la sensibilización e incremento de la excitabilidad de la fibra nociceptiva dentro y alrededor del hueso ([figura 9](#)).

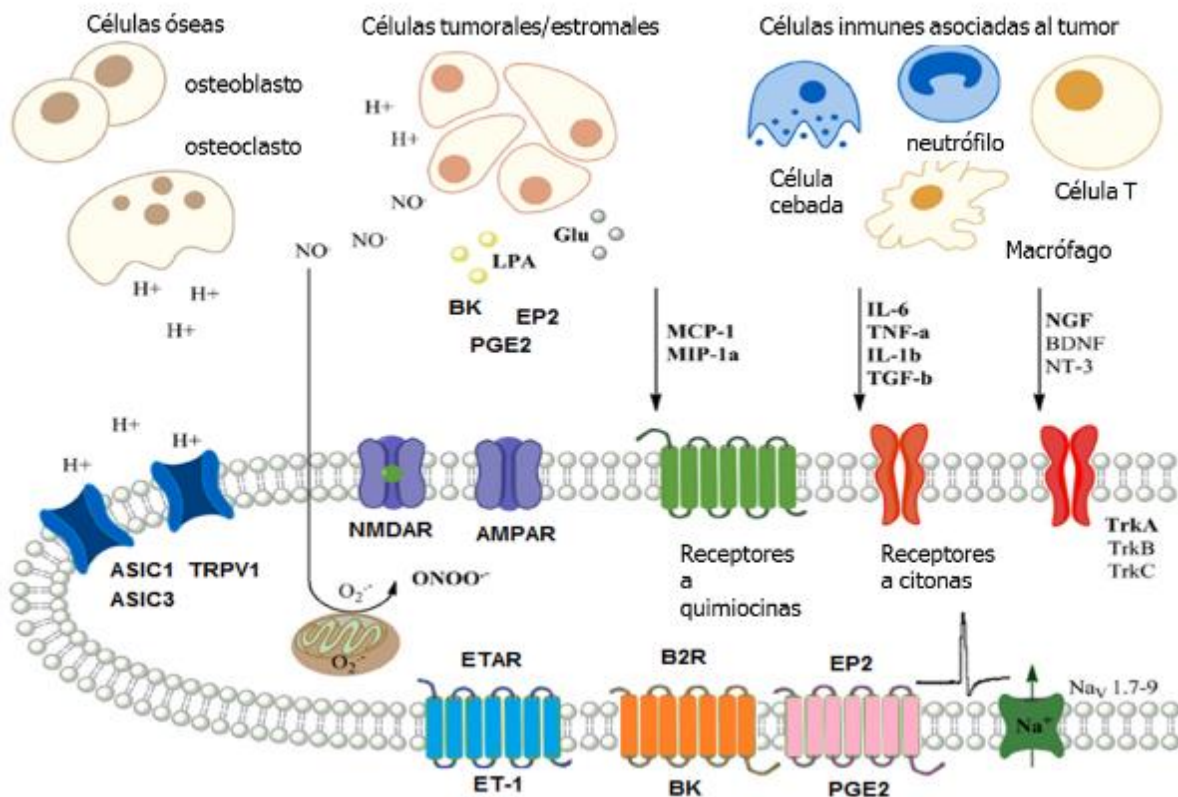


Figura 9. Mecanismo del dolor inducido por cáncer.

Diagrama de una fibra nociceptiva que inerva el microambiente óseo demostrando una serie de estímulos nociceptivos que actúan a través de sus receptores que pueden causar dolor de cáncer óseo. H⁺ = protón; NO = óxido nítrico; O₂⁻ = superóxido; ONOO⁻ = peroxinitrato, LPA = ácido lisofosfatídico; Glu = glutamato; MCP-1 = proteína monocito quimioattractiva 1; MIP-1a = proteína macrófaga inflamatoria-1α; IL-6 = interleucina-6; TNF α = Factor de necrosis tumoral-α; IL-1β = interleucina-1β; TGF-β = Factor de crecimiento transformante-β; NGF= factor de crecimiento nervioso; BDNF = factor de crecimiento neutrófico derivado; NT-3 =neurotrofina-3; ASIC1= canal iónico sensible a ácido-1; ASIC3 = canal iónico sensible a ácido-3; TRPV1 = receptor de potencial transitorio de la subfamilia V1 (canal catiónico); NMDAR = receptor N-metil-D-aspartato; AMPAR = receptor α-amino-3-hidroxi-5-metil-4-ácido isoxazolepropiónico; receptores TrkA, B, & C = receptores tirosin cinasa A, B & C; ETAR = receptor A de endotelina; B2R = receptor 2 de bradicinina; EP2 = receptor de prostaglandina E2; ET-1 = endotelina 1; BK= bradicinina; PGE2= prostaglandina E2; Nav 1.7-9 = canales iónico dependientes de voltaje 1.7-9. Modificado de Jiménez-Andrade y cols., 2010; Lozano-Ondoua y col. 2013.

1.3.1 Implicaciones clínicas

El origen del dolor asociado con los tejidos óseos ha sido un tema polémico. Los estudios iniciales señalaron que la estimulación mecánica directa y nociva del periostio produjo percepciones dolorosas en sujetos humanos (Inman y Saunders, 1944). En la literatura el dolor óseo generalmente no se percibe a menos que el periostio esté implicado (Mach y cols., 2002). El dolor del periostio se describe a menudo como agudo y bien localizado y ocurre por ejemplo con fracturas lo suficientemente significativas como para impactar en el periostio (Santy y Mackintosh, 2001). Sin embargo, la inyección de irritantes en la cavidad medular es también muy dolorosa, al igual que la aspiración con aguja de la médula ósea, y este dolor es distinto al asociado con la disrupción del periostio (Niv y cols., 2003). Además, los pacientes perciben a menudo el dolor óseo en patologías relacionadas principalmente con la médula ósea que no tienen una afectación periostial evidente (Arnoldi, 1990). En estos casos, el dolor se describe a menudo exclusivamente como constante, difuso y difícil de localizar. El dolor inducido por el cáncer de hueso cae dentro de esta última categoría, y por lo general consiste en dolor profundo que se describe como constante, difuso y aumenta en intensidad con el tiempo (Honore y Mantyh, 2000a; Haegerstam, 2001). Además, los pacientes con cáncer de hueso suelen reportar otro dolor más intenso al moverse o soportar peso (dolor de avance) (Portenoy y cols., 1999). Por lo tanto, parece que tanto el periostio como la cavidad medular de los huesos deben ser inervados por neuronas aferentes primarias capaces de transducir y transmitir información nociceptiva. Estas neuronas aferentes de hueso proporcionan al sistema nervioso central información que provoca dolor primario que surge del hueso. La patología en el hueso también puede producir sensibilidad a la estimulación normalmente no dolorosa (alodinia) y/o mayor sensibilidad a la estimulación nociva (hiperalgesia) de la piel alrededor del hueso o huesos involucrados o incluso de la piel en sitios distantes. Esto se describe a menudo como dolor secundario o referido, y probablemente refleja la sensibilización de las neuronas aferentes cutáneas y/o sus proyecciones centrales (Ren y Dubner, 1999). La sensibilización implica una mayor excitabilidad (reducción del umbral de estímulo para la activación y/o una mayor frecuencia de descarga de potencial de acción) de las neuronas sensoriales periféricas y centrales (Nencini y Ivanusic, 2016).

1.3.2 Fisiopatología de dolor óseo

Las células de cáncer interactúan directa o indirectamente con los nociceptores en la médula ósea mediante la secreción de mediadores químicos, tales como prostaglandinas, factor de crecimiento nervioso, endotelinas y bradicinina; las células cancerosas también interactúan con células inflamatorias, tales como macrófagos y células cebadas dentro de la lesión metastásica, así mismo secretan mediadores químicos que conducen al dolor de huesos (Jiménez-Andrade y cols., 2010).

Una vez que las células cancerosas llegan al hueso, interfieren con la homeostasis y la remodelación ósea. Los osteoclastos resultantes pueden desmineralizar y destruir regiones del hueso con inervación del nervio periférico, causando dolor óseo (Peters y cols., 2005). Además, el proceso de destrucción ósea conduce a un ambiente ácido, estimulando más dolor a través de canales de detección de pH (Yoneda y cols., 2015). Por lo tanto, el bloqueo de las interacciones entre los mediadores químicos y sus receptores en los nociceptores periféricos o la osteoclastogénesis puede prevenir el dolor, usando ambas estrategias analgésicas para el dolor óseo inducida por cáncer (Jiménez-Andrade y cols., 2010; Mantyh, 2014).

En cuanto a la detección del estímulo doloroso por el periostio, las grabaciones electrofisiológicas de las neuronas sensoriales tanto en el periostio como en la médula ósea han confirmado que ambos contienen nociceptores que pueden proporcionar al SNC información sobre el dolor óseo. El periostio (pero no la médula ósea) también está inervado por neuronas que tienen propiedades que se sugieren pueden ser receptores de sensibilidad inofensiva (no dolorosa), aunque no está claro si esta última es relevante para los estímulos aplicados al hueso. Sólo hay pruebas limitadas de que las neuronas aferentes del hueso periférico pueden ser sensibilizadas o que pueden ser activadas por múltiples tipos de estímulos y en la actualidad, sólo existe en parte, para las unidades periostiales. En SNC, está claro que las neuronas del asta dorsal de la médula espinal pueden ser activadas por estímulos nocivos aplicados al hueso. Algunos pueden ser sensibilizados en condiciones patológicas y pueden contribuir a hiperalgesia secundaria o dolor referido asociado con patología ósea (Nencini y Ivanusic, 2016).

1.3.3 Tratamiento

El dolor óseo metastásico es el síndrome de dolor más común en los pacientes con cáncer y hasta el 50% de los pacientes reportan que el dolor no ha sido correctamente tratado actualmente (Mantyh y Hunt, 2004). El manejo del dolor óseo con analgesia convencional se basa en los mecanismos que median el dolor óseo son similares a los que median el dolor en otros sistemas tisulares, y por lo tanto, pueden ser dirigidos con terapias similares. Los opiáceos y los fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE) se usan generalmente para tratar el dolor leve a intenso, pero el uso terapéutico para el dolor óseo está limitado por efectos secundarios indeseables incluyendo sedación, depresión respiratoria, tolerancia al uso prolongado, riesgo de adicción, gastrointestinal, efectos adversos y toxicidad renal, entre otros. Todo esto ocurre con el uso prolongado del tipo requerido para tratar el dolor persistente en condiciones tales como osteoartritis, osteoporosis y cáncer de hueso. Los AINEs y el uso de analgesia opiácea en el tratamiento del dolor óseo se complican aún más debido a los efectos no deseados significativos sobre la remodelación/cicatrización ósea (Bove y cols., 2009; Pountos y cols., 2012). Otros agentes que inhiben la actividad de los osteoclastos (por ejemplo, la osteoprotegerina) o que actúan reduciendo los procesos inflamatorios (por ejemplo, los anticuerpos que bloquean la función del factor de crecimiento nervioso) producen una analgesia significativa en modelos animales de dolor inducido por cáncer de hueso y fractura (Jiménez-Andrade y cols., 2007). Estos ejercen principalmente efectos en la periferia y están dirigidos a las causas del dolor óseo. Sin embargo, pueden tener efectos secundarios significativos relacionados con la remodelación ósea y/o destrucción ósea que han limitado su potencial terapéutico (Holmes, 2012; Seidel y cols., 2013). Existe una clara necesidad de encontrar estrategias alternativas para tratar el dolor óseo que no impliquen el uso de AINEs u opioides y están dirigidas más específicamente a los mecanismos neuronales o inflamatorios que generan y/o mantienen el dolor (Nencini y Ivanusic, 2016).

Un objetivo importante de la investigación del dolor asociado a cáncer es el desarrollo de terapias analgésicas que sean eficaces y tengan menos efectos secundarios que los analgésicos actuales, es por esto que es necesario el desarrollo de modelos animales donde dichas terapias puedan ser probadas. Estas herramientas farmacológicas nos ayudan al

estudio de esta patología y sus implicaciones, la incorporación de estos avances en la terapia del cáncer tiene el potencial de mejorar significativamente la calidad de vida y el estado funcional de ambos, el paciente y el cuidador ([Mantyh y col., 2013](#)).

En la actualidad, el dolor por cáncer de hueso se gestiona en gran medida con una escala o “escalera” analgésica que fue reportada originalmente por la OMS en 1986. Esta inicia con: 1) medicamentos AINEs, 2) la transición a AINE más un opiáceo suave, y finalmente, cuando el dolor es severo, 3) un AINE más un opiáceo fuerte. Además de esta escalera de 3 pasos, para controlar el dolor del cáncer son comúnmente utilizadas otras terapias adyuvantes incluyendo radioterapia, radioisótopos, bloqueo nervioso, lesiones nerviosas, antiepilépticos (por ejemplo, gabapentina, carbamazepina), antidepresivos (por ejemplo, amitriptilina, imipramina), y los esteroides ([Desandre & Quest, 2009](#)).

El escalón 1 de la escalera para aliviar el dolor se refiere al dolor suave. Los pacientes en esta categoría reciben, si los necesitan, analgésicos sin opioides, como acetaminofén (paracetamol), medicamentos antiinflamatorios no esteroides o un analgésico adyuvante. En el escalón 2, se trata a los pacientes que experimentan dolor leve a moderado que ya están tomando un analgésico sin opioides, con un analgésico adyuvante o sin este, pero que siguen sintiendo que su analgesia es precaria. Las sustancias en este escalón son tramadol y productos de acetaminofén que contienen hidrocodona, oxycodona y codeína. En el escalón 3 se trata el dolor moderado a intenso con analgésicos fuertes. Los opioides de este escalón son morfina, hidromorfona, fentanilo, levorfanol, metadona, oximorfona y oxycodona. En un ensayo aleatorizado de una dosis baja de morfina versus opioides débiles para tratar el dolor moderado del cáncer, indica que es aceptable eludir los opioides débiles y pasar directamente a los opioides fuertes (sustancias del escalón 3) para los pacientes con dolor de cáncer moderado. Pacientes asignados al azar al grupo de dosis bajas de morfina experimentaron una disminución más frecuente y mayor de la intensidad del dolor; con una tolerancia aceptable y un efecto más rápido ([Bandieria y cols., 2016](#)). Para su uso inocuo y eficaz es necesaria la familiaridad con las características farmacocinéticas de los opioides, su dosificación equianalgésica y sus efectos adversos. La analgesia óptima exige el uso apropiado de las intervenciones farmacológicas adyuvantes y de otro tipo ([NCI, 2017](#)).

La relativa ineficacia de los tratamientos actuales refleja el hecho de que las terapias no han cambiado por décadas. En gran parte debido a los efectos secundarios asociados al tratamiento; por ejemplo, se ha reportado que el 45% de los pacientes con cáncer tienen insuficiente e inadecuado tratamiento farmacológico para controlar el dolor ([Mantyh y col., 2002](#)).

II. Antecedentes

2.1 Clasificación de los Modelos de dolor inducidos por cáncer

Los primeros modelos animales desarrollados para estudiar el dolor inducido por cáncer fueron de tumores óseos primarios y metastásicos. Este avance fue seguido por el desarrollo de modelos de dolor de cáncer no óseo que imitan otros tipos de lesiones malignas, incluyendo cáncer de páncreas y carcinoma de células escamosas, así como neuromas benignos, pero dolorosos. Además, se han desarrollado modelos de dolor inducido por cáncer en animales que replican el dolor causado por la invasión tumoral de los nervios periféricos y el dolor producido por la neuropatía periférica relacionada con la quimioterapia. Finalmente, los tumores naturales que surgen espontáneamente en animales se están utilizando como modelos más naturales de dolor por cáncer (tabla 4) (Pacharinsak y Beitz, 2008).

Modelo de Dolor debido:	Especie (subespecie)	Inducido por:
Invasión de nervios periféricos	Raton macho BALB/c	Implante de: Células de Fibrosarcoma y Sarcoma MethA - Cerca del nervio ciático
Quimioterapia relacionada con neuropatía periférica.	Rata (Sprague Dawley)	Administración de: IV vincristina
	Raton (CD1, ddY, C3H/He, C57BL/6, 129P3, A, AKR, C57BL/10, CBA, DBA/2, RIIS, SM, BDF1)	IP paclitaxel
	Rata (Sprague Dawley, Wistar, Dark Agouti)	IP paclitaxel
	Rata (Sprague Dawley, Wistar, CD1, Dark Agouti)	IP cisplatina
Cáncer espontáneo	Perro Rata (Sprague Dawley) Ratón	Osteosarcoma Otro tipo de cáncer
Cáncer no localizado en hueso	Perros Gatos Ratón transgénico	Tumores localizados Cáncer pancreático: desarrollado por regulación a la alta del antígeno T del virus del simio 40 L.
Cáncer localizado en hueso	Ver tabla 5.	

Tabla 4. Modelos animales de dolor por cáncer.

Modificado de Pacharinsak y Beitz, 2008.

2.1.1 Modelos de dolor por cáncer en hueso

El principal reto en la comprensión del mecanismo del dolor inducido por cáncer fue el desarrollo de un modelo animal de dolor, que mostrara características similares al dolor de hueso inducido por cáncer en humanos. El síntoma más común en el cáncer óseo es el dolor óseo, que se vuelve más grave a medida que crece el tumor y produce remodelación ósea. El tipo de dolor es difícil de tratar con terapias estándar, por lo tanto se requiere de modelos animales que imitan el dolor y la remodelación ósea. Los modelos animales de dolor por cáncer óseo comparten muchas características que se producen en las condiciones de cáncer óseo en humanos, incluyendo el dolor y la remodelación ósea ([Pacharinsak y Beitz en 2008](#)).

Estos modelos de dolor de cáncer de hueso se basan en la inyección intramedular de las células cancerosas directamente en el hueso. En consecuencia la ubicación del tumor óseo resultante puede ser cuidadosamente controlada, a diferencia de la administración sistémica o letal de células tumorales. Además, estos modelos permiten fácil evaluación del crecimiento del tumor en tiempo, así como imágenes radiográficas, observación de destrucción ósea, evaluación de cambios histopatológico, análisis conductuales específicos y evaluación de cambios neuroquímicos y neuroanatómicos que se producen en el sitio del tumor, DRG, dentro de la médula espinal y otros niveles del SNC ([Pacharinsak y Beitz en 2008](#)).

El primer modelo *in vivo* de destrucción ósea inducida por cáncer implicó la inyección de células de leucemia plasmática humana en vena de la cola de ratones con inmunodeficiencia combinada severa (SCID), resultando el desarrollo de enfermedad ósea similar al mieloma múltiple. Encontrando células de mieloma infiltrando en órganos como: hígado, bazo, huesos largos y a nivel vertebral. Causando parálisis de la extremidad trasera. Pero el grado de metástasis en este modelo no permitió una evaluación localizada de los comportamientos nociceptivos ([Alsina y cols., 1996](#)).

Otro modelo de dolor inducido por inoculación de células de sarcoma en fémur de ratón produjo destrucción ósea, se correlacionaron los signos conductuales del dolor, cambios

neuroquímicos en la médula espinal y las neuronas aferentes primarias. Además de correlacionar el dolor espontáneo y el dolor evocado con la sensibilización de las neuronas aferentes primarias. Encontrándose que la médula espinal se reorganiza de una manera similar a la sensibilización central observada en otros estados de dolor crónico, incluso en la hipertrofia de astrocitos (Sevcik y cols., 2005). Estos datos sugieren que los cambios en la actividad astrocítica en la médula espinal son características únicas del dolor óseo inducido por cáncer (Lozano-Ondoua y col. 2013).

Pacharinsak y Beitz en 2008, publicaron una revisión en la que reportan varios modelos para el desarrollo de modelos animales de dolor inducidos por cáncer. Se han empleado varias especies, subespecies, diferentes líneas celulares: carcinoma de glándula mamaria, próstata, sarcoma, fibrosarcoma, adenosarcoma de colon, entre otros. La inoculación celular en varias partes del sistema óseo: fémur, calcáneo, humero, región intraplantar, tibia, entre otros. Mostrando la investigación de nuevas y mejores herramientas para el alivio de diferentes patologías (Tabla 5).

Espece	Subespece	Tipo de Cáncer	Localización
Ratón	C3H/He; C3H/HeJ; B6C3-Fe-a/a; C3H/HeNCrI; nude (nu/nu)	Sarcoma	Fémur
Ratón	C3H/He; B6C3fe/1	Fibrosarcoma Melanoma	Calcáneo
Ratón	C3H/He; B6C3fe/1)	Fibrosarcoma Melanoma Osteosarcoma	Húmero
Ratón	C3H-SCID; C3H/HeJ	Sarcoma Melanoma Adenosarcoma de colon Células de cáncer de mama 4T1	Fémur
Ratón	Swiss CD1	Virus Rous Sarcoma XC- fibroblastos de rata transformados (células XC)	Región Intraplantar
Ratón	C3H/HeJ	Sarcoma	Tibia
Ratón	C3H/HeJ	Hepatosarcoma Sarcoma	Región intraplantar, musculo y dorso de la pata.
Rata	Sprague Dawley; Wistar	Células de carcinoma de glándula mamaria (MRMT1), Walker 256	Tibia Región intraplantar
Rata	Sprague Dawley	Células de carcinoma de glándula mamaria (MRMT1)	Tibia
Rata	Copenhagen	Células de cáncer de próstata (AT3.1, R3327)	Tibia
Rata	Nude (nu/nu)	Células de cáncer de mama (MDA-MB231) Cáncer de próstata humano (CWR22)	Arteria Femoral

Tabla 5. Modelos animales de dolor por cáncer en hueso

Modificado de [Pacharinsak y Beitz, 2008](#).

De manera importante se ha reportado que las lesiones producidas en los modelos de dolor inducido por cáncer y/o modelos de metástasis óseas también dependen de la línea celular que se inocule. Por ejemplo, no todos los tipos de cáncer generan una misma lesión, ya que pueden producir un lesión de tipo osteolítica, osteoblástica y mixta (Fernandes y cols., 2016) (tabla 6).

Tumor primario	Origen	Línea celular	Tipo de lesión
Mama	Ratón	Met-1	Osteolítica
		4T1	Osteolítica
	Rata	ENU1564	Osteolítica
		MRMT-1	Osteolítica/Osteoblástica
		Humana	MDA-MB-231
	MDA-MB-435		Osteolítica
	MCF-7		Osteolítica/Osteoblástica
	MCF7-Neu		Osteoblástica
	Próstata	Canino	Zr-175-1
DCP-1			Osteolítica/Osteoblástica
Ace-1			Osteolítica/Osteoblástica
Leo			Osteolítica
Rata		Probasco	Osteoblástica
		MATLyLu	Osteolítica
		PA-III	Osteolítica/Osteoblástica
Humana		PC3	Osteolítica
		LAPC-9	Osteoblástica
		MDA PCa 2b	Osteoblástica
		LuCaP 23.1	Osteoblástica

Tabla 6. Líneas celulares de uso común de cáncer de próstata y mama para el desarrollo de modelos animales de metástasis ósea.

Modificado de [Fernandes y cols., 2016](#).

2.2 Fármacos administrados

2.2.1 Gabapentina

La gabapentina es un anticonvulsivante de segunda generación introducido en 1993 como un anticonvulsivo coadyuvante en el tratamiento de crisis parciales refractarias. Posteriormente, se demostró su eficacia en el tratamiento de una variedad de condiciones de dolor crónico. En 2002, fue aprobada por los FDA en E.U. para el tratamiento de la neuralgia post-herpética, mientras que en el Reino Unido, tiene licencia completa para el tratamiento de todos los tipos de dolor neuropático ([Kong y Irwin, 2007](#)).

La gabapentina (ácido 1-[aminometil] ciclohexanacético) es un análogo estructural del neurotransmisor ácido γ -aminobutírico (GABA) (figura 10) con una fórmula $C_9H_{17}NO_2$ y un peso molecular de 171.24 g/mol. Es un sólido cristalino blanco, que es altamente cargado a pH fisiológico. Es muy soluble en agua, tanto en soluciones acuosas ácidas y básicas (Kong y Irwin, 2007).

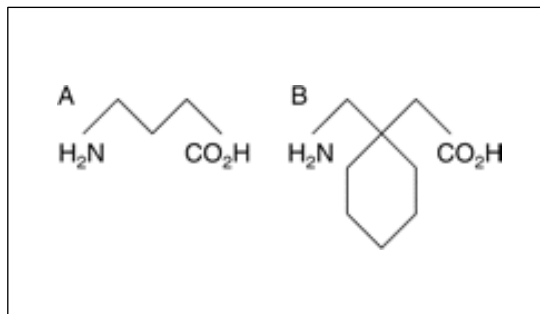


Figura 10. Fórmulas estructurales de GABA (A) y Gabapentina (B).
(Kong y Irwin, 2007).

Su absorción es dependiente de la dosis debido a un mecanismo transportador L-aminoácidos saturable en el intestino (Stewart y col., 1993). Por lo tanto, la biodisponibilidad oral varía inversamente con la dosis. Después de una dosis única de 300 o 600 mg, la biodisponibilidad es aproximadamente del 60% y 40%, respectivamente (Türk y col., 1989); se distribuye ampliamente en tejidos humanos y fluidos. No se une a proteínas plasmáticas (Vollmer y col., 1986) y tiene un volumen de distribución de 0.6-0.8 litros kg^{-1} (Vollmer y col., 1989). Es altamente ionizada a pH fisiológico, y las concentraciones en el tejido adiposo son bajas (Vollmer y col., 1986). Por lo tanto, después de la ingestión de una sola cápsula de 300 mg la concentración plasmática máxima (C_{max}) es de 2.7 mg ml^{-1} en un lapso de 2-3 h. (Türk y col., 1989). La concentración de gabapentina en líquido cefalorraquídeo es aprox. de 5-35% de la concentración plasmática, mientras que la concentración en el tejido cerebral, es de aprox. 80% de la concentración en el plasma (Norton, 2001).

En los seres humanos, la gabapentina no se metaboliza (Vollmer y col., 1992) y no induce enzimas microsomales hepáticas (Shmidt y col., 1989). Se elimina inalterada en la orina y no se absorbe, y se excreta en las heces (Vollmer y col., 1986). En pacientes con

función renal normal. La gabapentina es eliminada en monoterapia es de entre 4.8 y 8.7 h (Rose y Kam, 2002). Generalmente es bien tolerada con un perfil de efectos secundarios favorables. Cuando la seguridad y la tolerabilidad de gabapentina fueron evaluadas en 2,216 pacientes que sufrían convulsiones (McLean y col., 1999 citado en Kong y Irwin, 2007), los efectos adversos informados fueron somnolencia (15.2%), mareos (10.9%), astenia (6%), cefalea (4.8%), náuseas (3.2%), ataxia (2.6%), aumento de peso (2.6%), y la ambliopía (2.1%). Efectos secundarios similares se observaron en pacientes con dolor crónico tratados (Rowbotham y col., 1998).

Varios mecanismos pueden estar involucrados en las acciones de la gabapentina (Kong y Irwin, 2007):

- a) Aumento en la corriente de N-metil-d-aspartato (NMDA) en interneuronas GABAérgicas;
- b) Bloqueo del receptor de α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-ácido isoxazolepropionico (AMPA) mediado por la transmisión de los receptores en la médula espinal;
- c) Unión al transportador L- α -aminoácidos;
- d) Activación de los canales de potasio sensibles a ATP (K_{ATP});
- e) Hiperpolarización activada por los canales de corriente catiónico (iH);
- f) Modulación de corrientes de Ca^{2+} por la unión selectiva de gabapentina-[3H] (un radioligando) a la subunidad $\alpha 2\delta$ del canal de Ca^{2+} dependiente de voltaje (VGCCs).

Actualmente se sabe que el VGCC es la diana antinociceptiva de gabapentina. En consecuencia, éste se une a la subunidad $\alpha 2\delta$ reduciendo la liberación de neurotransmisores y por lo tanto disminuyendo la hiperexcitabilidad neuronal. Se ha demostrado inhibe la liberación de glutamato (Cohen y col., 1994), aspartato (Feng y col., 2003), sustancia P y péptido relacionado con el gen de calcitonina (CGRP) (Fehrenbacher y col., 2003) de la médula espinal en ratas. De manera interesante, estudios recientes han demostrado que en el sistema noradrenérgico descendente, los receptores noradrenérgicos $\alpha 2$ espinales y un circuito intacto espino-bulbo-espinal son elementos cruciales que influyen en sus efectos analgésicos, además de la interacción con la subunidad $\alpha 2\delta$ de los VGCCs. (Tanabe y col., 2005).

2.2.2 Tramadol

El clorhidrato de Tramadol ha mostrado tener baja afinidad por los receptores opioides μ , κ y δ . Esto explica en parte su acción analgésica y antinociceptiva, pues se conoce que estos receptores modulan el dolor a nivel central y espinal respectivamente. Un segundo mecanismo de acción es la de impedir la recaptación de noradrenalina y serotonina en las vías descendentes nerviosas que controlan la percepción de los estímulos dolorosos en la médula espinal. Por lo tanto, las concentraciones de noradrenalina y serotonina se incrementan y activan a sus receptores respectivos.

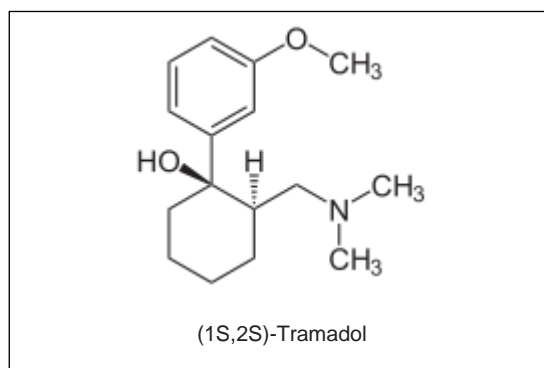


Figura 11. Fórmula estructural del tramadol

(±)-*cis*-2-[(dimetilamino) metil]-1-(3-metoxifenil) ciclohexanol hidrocloreto, (Yera, 2000).

El Tramadol tiene una biodisponibilidad absoluta del 41-84 % lo que es favorable con relación a otros analgésicos de acción central y un tiempo de vida biológica de 6h., el comienzo de acción es de 5 minutos en una aplicación intravenosa y de 10 minutos después de la administración oral. Su metabolismo tiene lugar en el hígado (85 % de una dosis oral es metabolizada por esta vía), a través de las isoenzimas CYP3A4 y CYP2D6. Sufre procesos de O-desmetilación y N-desmetilación así como por la conjugación de los derivados O-desmetilados glucurónicos. Únicamente el O-desmetiltramadol es farmacológicamente activo. Existen considerables diferencias cuantitativas interindividuales entre los demás metabolitos. Hasta ahora se han identificado 11 metabolitos en la orina. Los estudios realizados en animales han demostrado que el O-desmetiltramadol es de 2 a 4 veces más

potente que la sustancia de origen (figura 11). Aproximadamente el 90 % de tramadol y sus metabolitos se eliminan casi completamente por vía renal y un 10 % aparece en las heces fecales (Yera, 2000).

El tramadol es un agonista de los tres receptores opioides: mu, delta, kappa. La proteína G tiene tres subunidades: alpha, beta, gamma. La activación de los receptores opioides resulta en una activación de la subunidad $G_{\alpha i}$ e inhibición de la enzima adenilato ciclasa, con lo cual disminuye significativamente los niveles basales intracelulares del AMPc. Los receptores opioides localizados en las terminales presinápticas de las fibras nociceptivas C y fibras A δ , cuando son activadas por un agonista opioide, indirectamente inhiben los VGCC a través de la disminución del AMPc, bloqueando así la liberación de neurotransmisores tales como glutamato y sustancia P, lo cual resulta en analgesia. A través de los receptores opioides, la subunidad $\beta\gamma$ de la proteína G abre los canales de potasio, lo cual resulta en una disminución de su gradiente de concentración, con carga negativa intracelular. Este mecanismo da lugar a hiperpolarización, la cual disminuye la excitabilidad celular dando lugar a atenuación de la transmisión neuronal (Jordan & Devi y cols., 1998).

El tramadol se emplea para el tratamiento de dolor de tipo tumoral, en infarto del miocardio, dolores posquirúrgicos, postraumáticos, de parto y procedimientos diagnósticos invasivos. A diferencia de la morfina, el tramadol no produce estreñimiento, produce escasa depresión cardiorespiratoria, genera baja tolerancia y dependencia. Adicionalmente la OMS no clasificó a tramadol como narcótico y no es considerado como tal en ningún país donde se comercializa. La dosis siempre dependerá de la intensidad del dolor y de la sensibilidad de cada paciente. Se considera que no debe exceder una dosis máxima de 400 mg en 24 h, no es recomendable (Teixeira y cols., 1999).

III. Justificación

Hasta el momento se desconoce si las conductas hiperalgésicas, alodínicas y de dolor espontáneo se pueden generar mediante la inoculación de células de glioma en el sistema óseo. Por esto, es necesario el desarrollo de un modelo animal que permita evaluar dichas conductas. Todo lo anterior contribuye al desarrollo de una herramienta conductual o modelo experimental adecuado para evaluar mecanismos moleculares y tratamientos para esta patología.

IV. Hipótesis

Las conductas de hiperalgesia, alodinia y dolor espontáneo se presentarán en el modelo ortotópico óseo inducido mediante la inoculación de células de glioma en el fémur de rata.

V. Objetivo general

Estandarizar y caracterizar conductas de hiperalgesia, alodinia y dolor espontáneo en un modelo ortotópico óseo inducido mediante la inoculación de células de glioma en el fémur de rata.

VI. Objetivos particulares

1. Estandarizar y establecer las condiciones óptimas para realizar la cirugía e inoculación de células de Glioma en el fémur de la rata.

2. Establecer y caracterizar pruebas conductuales para determinar; alodinia mecánica, hiperalgesia térmica, movimiento ambulatorio vertical y horizontal, conducta espontánea, conducta de lamido y acicalamiento en los diferentes grupos inoculados con la cantidad de 6×10^5 , 3×10^5 , 1×10^5 y 5×10^4 células de glioma.
 - 2.1. Determinar la inoculación óptima de densidad celular dentro del fémur de la rata para el desarrollo de la patología en este modelo experimental.
 - 2.2. Caracterizar el crecimiento del tumor por medio de imágenes de MicroCT
 - 2.3. Estandarizar las pruebas de hipersensibilidad: hiperalgesia y alodinia.
 - 2.4. Estandarizar las pruebas de conducta espontánea
 - 2.5. Estandarizar las pruebas de movimiento ambulatorio; vertical y horizontal.
 - 2.6. Estandarizar las pruebas de lamido y acicalamiento

3. Determinar el efecto anti-alodínico y anti-hiperalgésico de la administración de tramadol y gabapentina en el modelo.

VII. Metodología

7.1 Animales

Se utilizaron ratas Wistar macho con un peso entre 80-100 g para el día de la implantación de las células de glioma. El agua y alimento fueron *ad libitum*. Los animales permanecieron en cajas de policarbonato bajo condiciones de temperatura y luz controladas, con ciclos de luz/obscuridad de 12 horas, los experimentos fueron realizados en el ciclo de luz. El manejo de los animales fue en base a los lineamientos de la NOM-062-ZOO-1999 (Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio).

7.2 Cultivo celular

El medio de cultivo utilizado fue Medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM; Gibco BRL, Grand Island, NY) 2 mmol/L L-glutamina, 100 unidades/ml penicilina y estreptomina 100 mg/mL a 37 ° C en 50 ml/L CO₂, adicionado con 5% de suero fetal bovino (SFB) inactivado con calor (30 min a 56 °C). Las células fueron incubadas a 37°C y con un ambiente de 5% de CO₂. Para el lavado celular se utilizó una solución de buffer fosfato salino (PBS), y para levantar las células una solución PBS-EDTA que consiste en un buffer fosfato salino (PBS) adicionado con ácido etilén diamín tetracético (EDTA).

7.3 Línea celular

La línea celular utilizada fue C6 (ATCC[®] CCL-107[™]), la cual es una línea inmortalizada de glioma de rata de tipo celular glial inducida químicamente por N-nitrosometilurea en rata.

7.4 Inoculación de las células de Glioma C6

Los animales de experimentación se dividieron en 6 grupos (n=8): 1 grupo Naive, 1 grupo Sham y 4 grupos inoculados con glioma 6x10⁵, 3x10⁵, 1x10⁵ y 5x10⁴ células en un volumen de 50µl de medio DEMEM. Al finalizar la sesión de experimentación los animales fueron sacrificados con dióxido de carbono.

Después que las células alcanzaron una confluencia del 80%, estas fueron despegadas con una solución de PBS-EDTA, lavadas dos veces con solución de PBS, contadas con un

hematocitómetro y concentradas en medio de cultivo sin SFB y sin rojo fenol. Las células fueron colocadas en refrigeración en espera de ser inyectadas dentro del fémur.

La inoculación del grupo Sham consistió en realizar la cirugía, e inocular medio de cultivo sin SFB y sin rojo fenol, en lugar de la concentración celular de glioma.

7.5 Cirugía para inoculación de las células dentro del fémur.

Los animales fueron anestesiados vía intraperitoneal (i.p.) con xilacina (Laboratorios PISA) a una dosis de 12 mg/kg y ketamina (Probiomed) a una dosis de 50 mg/kg en un volumen de 2 ml/kg de peso.

La cirugía se realizó en la extremidad posterior derecha, iniciando con una incisión en la piel (8-10 mm) para exponer *Quadriceps femoris*, después se realizó limpieza para separar el *vastus lateralis* y *vastus intermedius* para exponer los cóndilos del femoral. Se realizó una perforación de 0.5 mm de diámetro, dicha cavidad fue superficial y pequeña entre el epicondilo medial y el tubérculo aductor, no en la fosa intercondiloide, manteniendo el ligamento rotuliano intacto y produciendo el menor daño al músculo y vasos sanguíneos. Se inocularon 50 µl del concentrado celular. Para el grupo Sham se inyectaron solo 50 µl de medio DEMEM y sin SFB dentro de la cavidad del fémur. La jeringa del implante fue retirada después de 1 min y la perforación del hueso se cubrió con cera de hueso (Atramat). El músculo se suturó con sutura quirúrgica absorbible catgut crómico 4-0 (Atramat) y finalmente se suturó la piel utilizando sutura quirúrgica siliconizada no absorbible de seda trenzada 3-0.

7.6 Imágenes de tomografía computarizada (CT).

Para esta prueba los animales fueron anestesiados con 4% isoflurano y 80% oxígeno durante 3 minutos, posteriormente los animales se mantuvieron con 2% isoflurano y 80% oxígeno mientras se obtuvieron las imágenes. Las imágenes fueron adquiridas con el Equipo Albira de Oncovisión con los siguientes parámetros; modalidad Best: 600 proyecciones, con

un voltaje de 35 kvs y 0.6 mAs, resolución especial de 50 micras, y un tiempo de adquisición: 15 min x rata. Las imágenes fueron tomadas los días 0, 8, 12, 18 y 40 post-inoculación.

7.7 Histología

Las imágenes histológicas se realizaron los días 0, 8, 18 y 40 días post-inoculación en los grupos de animales inoculados con 3×10^5 , 1×10^5 y 5×10^4 células llevando a cabo la siguiente metodología para la inclusión de tejidos en parafina y tinción con técnica de hematoxilina y eosina.

Al grupo de animales post-mortem; se les retiraron los dos miembros pélvicos, a los cuales se les retiro la piel y el exceso de músculo con la finalidad de mejorar el contacto del tejido óseo con el fijador utilizado, para el cual se usó de solución de formalina al 10%. La fijación de los tejidos fue realizada por 48 horas en proporción 1:10 (una parte de tejido por 10 de fijador).

Posteriormente los miembros fueron incluidos en una solución descalcificadora conformada por diferentes ácidos orgánicos, en la que permanecieron por 4 días. Después del proceso de descalcificación, los miembros fueron cortados longitudinalmente sobre la línea media y colocados en casetes histológicos, para finalmente ser procesados en un histoquinete e incluidos en parafina. Finalmente las secciones histológicas fueron obtenidas de 3 a 4 micras de grosor, que fueron montadas en portaobjetos y teñidas con la técnica convencional de hematoxilina-eosina.

7.8 Pruebas conductuales

Las pruebas conductuales fueron alodinia mecánica, hiperalgesia térmica, conducta espontánea y movimiento voluntaria y se aplicaron los días, 8, 15, 18, 25, 33 y 39 post-inoculación

7.8.1 Alodinia mecánica

Los animales fueron colocados sobre una malla metálica y limitados de espacio con una caja de acrílico transparente sin piso, permanecieron para su adaptación por lo menos 10 minutos antes de la prueba. Se determinó la respuesta producida en los animales ante un estímulo mecánico dinámico aplicado en la superficie plantar de las extremidades posteriores con el filamento de Von Frey automático (Aestesiómetro). Este estímulo consistió en la aplicación de 1g Fza/seg, la prueba tuvo un tiempo de corte 50 s. El estímulo se aplicó 3 veces a intervalos de 2 min, cuantificando el umbral de retiro (gramos-fuerza) del promedio de las 3 determinaciones ([Honore y cols., 2000a](#); [Jiménez-Andrade y cols., 2011](#)).

7.8.2 Hiperalgnesia térmica

Esta prueba consistió en colocar los animales en el equipo para la prueba de Plantar Test, donde los animales fueron colocados en cajas de acrílico transparente sin piso, sobre una plataforma de cristal transparente por la que incide un haz infrarrojo de 60Hz, que fue direccionado de manera manual para incidir sobre la zona plantar de la extremidad posterior. En dicha prueba se cuantificó la latencia de retiro (seg), donde dicho estímulo fue aplicado 3 veces a intervalos de 2 min, empleando un tiempo de corte de 30 seg ([Hald y cols., 2009](#)).

7.8.3 Movimiento ambulatorio horizontal y vertical

Para determinar el movimiento ambulatorio horizontal y vertical los animales fueron colocados en el campo abierto con las dimensiones 97 cm de diámetro y altura 42cm, dividido en sectores con igual área. Los animales sin previa ambientación y libre actividad ambulatoria fueron mantenidos en el campo abierto y filmados durante 2 minutos. Se cuantificó en dicho lapso de tiempo el número de cuadros recorridos (sectores) que se considera como movimiento horizontal y también se cuantificó el número de levantamientos en ambas extremidades; dichos movimientos se consideran verticales ([Martin y col., 2004](#); [Santos y cols., 2017](#)).

7.8.4 Conducta espontánea

Los animales sin previa ambientación fueron colocados y filmados durante 30 minutos sobre una malla metálica en una caja de acrílico transparente donde permanecieron

durante el tiempo de la prueba. Al término de la prueba, el video fue analizado para cuantificar las conductas. Se reportó el tiempo acumulado de la conducta durante los 30 minutos ([Honore y col., 2000a](#)).

Se determinaron las siguientes conductas:

1. Movimiento espontáneo de la extremidad delantera: cuantificación del número de sacudidas de las dos extremidades delanteras juntas y presentándose de manera espontánea.
2. Movimiento espontáneo de sacudidas de cuerpo completo: se cuantificó el número de sacudidas de cuerpo completo.
3. Movimiento espontáneo de la extremidad posterior ipsilateral y contralateral: se cuantificó el tiempo (seg) que utilizó el animal sacudiendo cada una de las extremidades.

7.8.5 Lamida y acicalamiento

En esta prueba los animales también fueron colocados en las cajas de acrílico transparente sin previa ambientación, y fueron filmados 30 minutos. El tiempo que el animal empleo durante la conducta de lamida y acicalamiento fue medido ([Cheppudira, 2006](#)).

7.9 Administración de Fármacos

El ensayo consistió en administrar los fármacos en dos grupos inoculados con 10^5 células (n=8), con la dosis de 31.6 mg/kg de tramadol y 56.23 mg/kg de gabapentina vía subcutánea respectivamente. Administrados una vez al día durante 24 días a partir del día 15 días post-inoculación y hasta completar los 24 días de tratamiento. Se evaluaron las pruebas para determinar las conductas de alodinia mecánica e hiperalgesia térmica. Los resultados se reportan mediante cursos temporales y área bajo la curva (ABC) de la administración de los fármacos ya mencionados ([figura 12](#)).

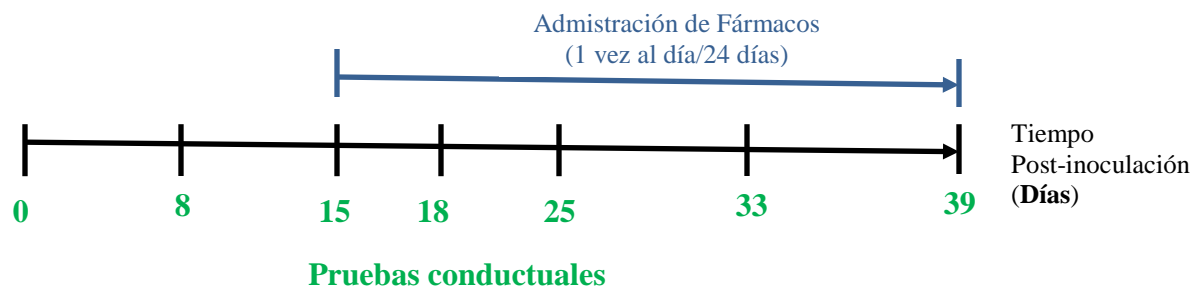


Figura 12. Esquema de administración de fármacos y aplicación de pruebas conductuales

7.10 Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como la media \pm el error estándar (E.E.) de $n=8$ animales por cada grupo. Para determinar la significancia entre más de dos grupos se realizó un análisis de varianza (ANDEVA) de una vía seguida de una prueba de Newman-Keuls. La comparación entre más de dos grupos con datos discontinuos, que no presentaron una distribución normal, se realizó mediante la prueba de Kruskal Wallis, seguido de la prueba Dunn. El análisis se realizó utilizando el programa estadístico Sigma Stat 3.0 (SPSS, USA). Se consideró un nivel de significancia a partir de $p < 0.05$.

VIII. Resultados

8.1 Uso de diferentes tipos de materiales para sellado de fémur.

Para el desarrollo del modelo experimental se probaron diferentes tamaños de perforación de cabeza de fémur (1 mm y 0.5 mm), resultando la perforación de 0.5mm de diámetro la más adecuada; permitiendo mínimo daño al hueso. Además se probaron diferentes tipos de materiales de sellado: amalgama dental, mineral de trióxido agregado (MTA) y cera de hueso. De acuerdo a los resultados, el uso de cera de hueso resulto ser el mejor material; orgánico, de precio bajo y permite un sellado rápido y fácil aplicación a diferencia de los otros materiales. Además cuando se adquirieron las imágenes de microCT este material no produjo ruido, permitiendo imágenes con mayor claridad. En la [figura 13](#) (A-F) se muestra las imágenes tomadas al fémur posterior con el uso de diferentes tipos de material de sellado.

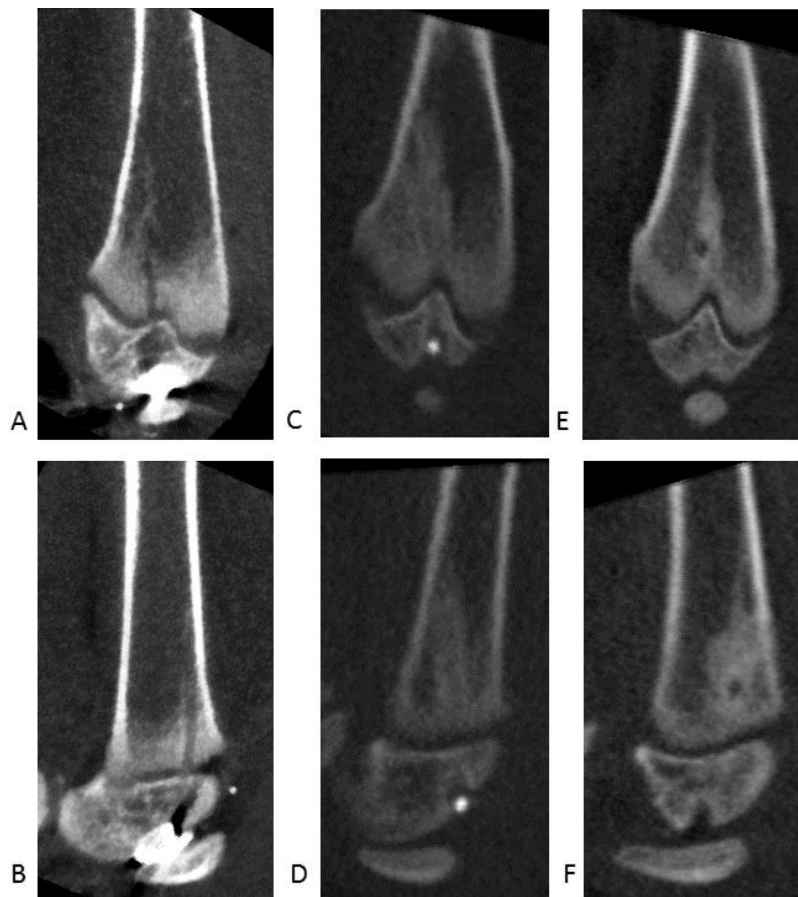


Figura 13. Imágenes de MicroCT del uso de diferentes tipos de materiales para el sellado del fémur.

Panel A, C y E vista frontal, panel B, D y F imagen lateral del fémur. Uso de amalgama dental (A y B), MTA (C y D) y cera de hueso (E y F).

8.2 Imágenes de MicroCT

8.2.1 Imágenes de MicroCT del grupo inoculado con 6×10^5 células.

En la [figura 14 \(A-D\)](#) se muestran imágenes del fémur distal derecho en una posición frontal y lateral, día 0 ([A y C](#)) y 8 ([B y D](#)) post-inoculación. El grupo inoculado con células presentó pérdida de estructura ósea, mayor degradación en la parte distal de la cabeza de fémur, mayor crecimiento de la células de glioma dentro de la cavidades del fémur a diferencia del grupo Sham ([A y B](#)).

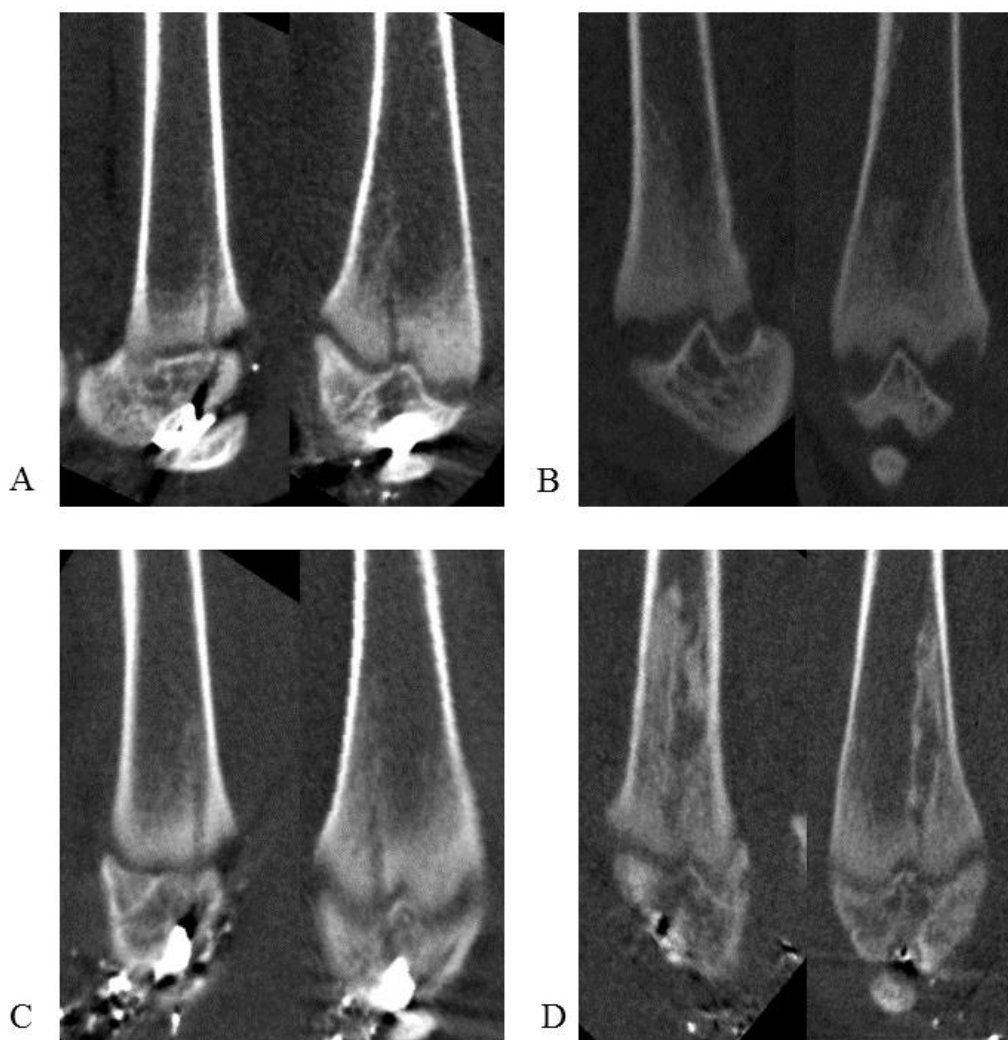


Figura 14. Imágenes de MicroCT inoculación de 6×10^5 células.

Grupo Sham a los 0 (A) y 8 (B) días post-inoculación; grupo inoculado con 6×10^5 células a los 0 (C) y 8 (D) días post-inoculación.

8.2.2 Imágenes de MicroCT del grupo inoculado con 3×10^5 células.

Figura 15 muestra las imágenes lateral y frontal del fémur distal derecho del grupo inoculado con 3×10^5 células, en el día 0 (D), 8 (E) y 18 (F) y grupo Sham en el día 0 (A), 8 (B) y 18 (C) post-inoculación. Donde se puede apreciar que a los 8 días post-inoculación se presentó pérdida de la estructura de la cabeza distal del fémur y crecimiento del glioma dentro de las cavidades del fémur, en comparación con el grupo Sham. Mientras que a los 18 días post-inoculación se presentó mayor pérdida de la estructura ósea y mayor invasión de las células de glioma a diferencia del estadio presente al día 8 post-inoculación.

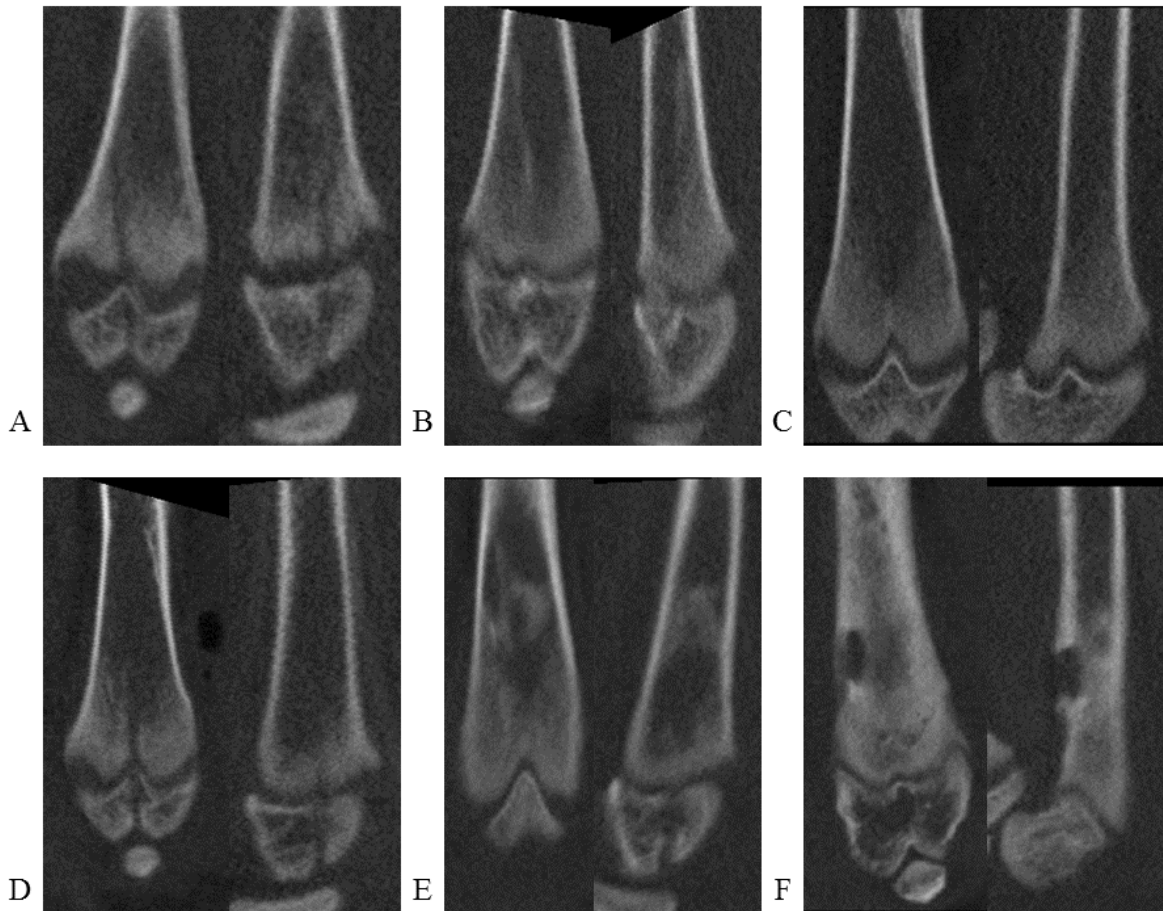


Figura 15. Imágenes de MicroCT inoculación de 3×10^5 células.

Grupo Sham a los 0 (A), 8 (B) y 18 (C) y grupo inoculado con 3×10^5 células a los 0 (D), 8 (E) y 18 (F) días post-inoculación.

8.2.3 Imágenes de MicroCT del grupo inoculado con 1×10^5 células.

La [figura 16](#) muestra las imágenes lateral y frontal del fémur distal derecho del grupo inoculado con 1×10^5 células en el día 0 (D), 18(E) y 40(F) y grupo Sham en el día 0(A), 18(B) y 40(C) post-inoculación. El grupo inoculado con 1×10^5 células mostró pérdida ósea mínima a diferencia del grupo inoculado con 3×10^5 células, de la misma manera que el grupo Sham, el grupo inoculado no presentó crecimiento del glioma en las cavidades del fémur y se mantuvo con integridad ósea.

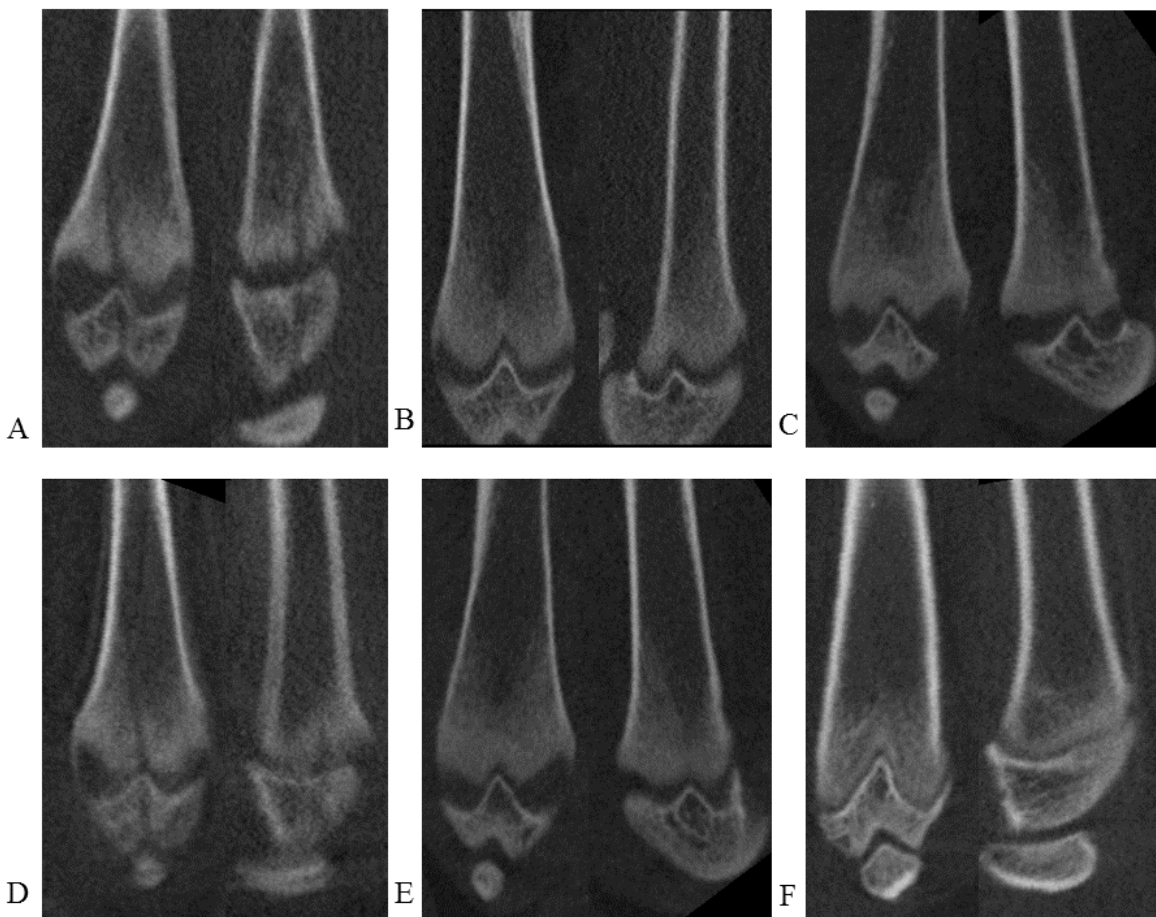


Figura 16. Imágenes de MicroCT inoculación de 1×10^5 células.

Grupo Sham en el día 0 (A), 18 (B) y 40 (C) y grupo inoculado en el día 0 (D), 18 (E) y 40 (F) post-inoculación respectivamente

8.2.4 Imágenes de MicroCT del grupo inoculado con 5×10^4 células.

Figura 17 muestra la imagen lateral y frontal del fémur distal derecho del grupo inoculado con 5×10^4 células a los 0 (D), 18(E) y 40(F) y el grupo Sham a los 0 (A), 18(B) y 40(C) días post-inoculación. En dichas imágenes se observa que en ambos grupos se mantiene estructura ósea íntegra y no se aprecia crecimiento del glioma dentro de las cavidades del fémur.

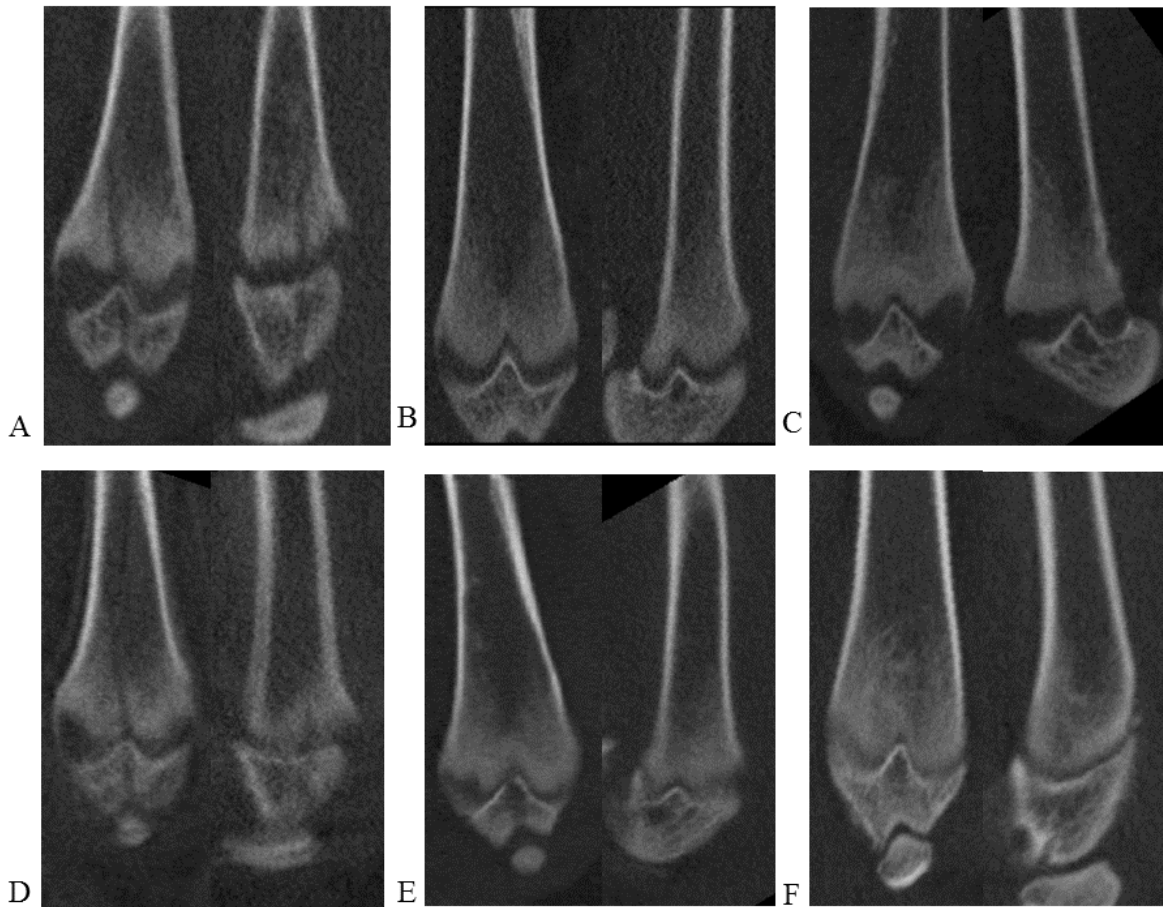


Figura 17. Imágenes de MicroCT inoculación de 5×10^4 células.

Grupo Sham a los 0 (A), 18 (B) y 40 (C) días post-inoculación y grupo inoculado a los 0 (D), 18 (E) y 40 (F) días post-inoculación.

8.3 Histología

Se muestra a continuación una serie de imágenes que ilustran la histología del fémur distal derecho de grupo Sham y grupo inoculado con 3×10^5 , 1×10^5 y 5×10^4 células. Para observar si hubo metástasis de las células de gliomas, se muestran las imágenes de diferentes órganos como pulmón, riñón, bazo e hígado.

8.3.1 Grupo inoculado con 3×10^5 células.

En la [figura 18](#) se muestran las imágenes histológicas de la cabeza del fémur distal derecho a los 18 días post-inoculación. El grupo inoculado con 3×10^5 células (**B y D**) y grupo Sham (**A y C**). El grupo inoculado presentó pérdida el hueso trabecular y reemplazo de las células de la médula ósea por células de glioma, pérdida de vasos sanguíneos y un alto grado de pérdida en la arquitectura del fémur en comparación con el grupo Sham. El panel **D** muestra claramente la pérdida de la placa de crecimiento y su patrón de formación, en comparación con el grupo Sham.

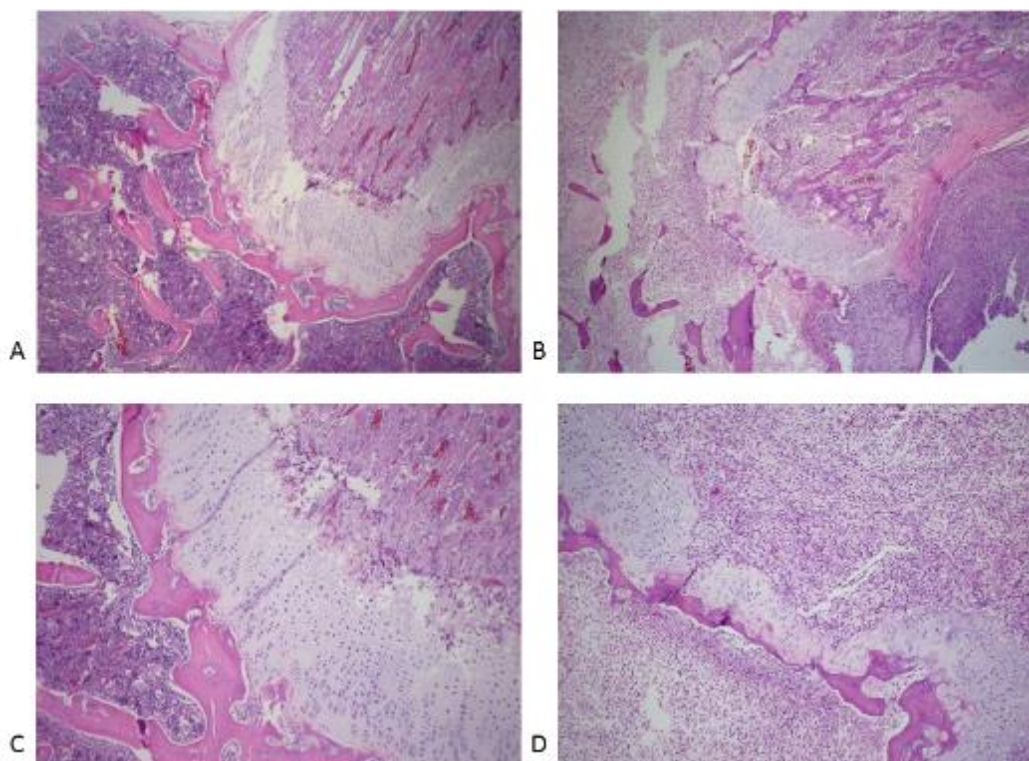


Figura 18. Histología de cabeza distal del fémur derecho.

Grupo Sham A (4X) y C (10X) y grupo inoculado con 3×10^5 células C (4X) y D (10X) a los 18 días post-inoculación.

En la **figura 19** se muestra histología de hueso liso (A) y hueso trabecular (B) del grupo inoculado con 3×10^5 células a los 18 días post-inoculación. En **panel A** se muestra crecimiento del tumor, infiltración de las células cancerosas tanto a hueso liso como medula ósea, pérdida de la estructura ósea, mientras que en el **panel B** se puede apreciar crecimiento de células cancerosas, su flujo de crecimiento y células multinucleadas, características del cáncer.

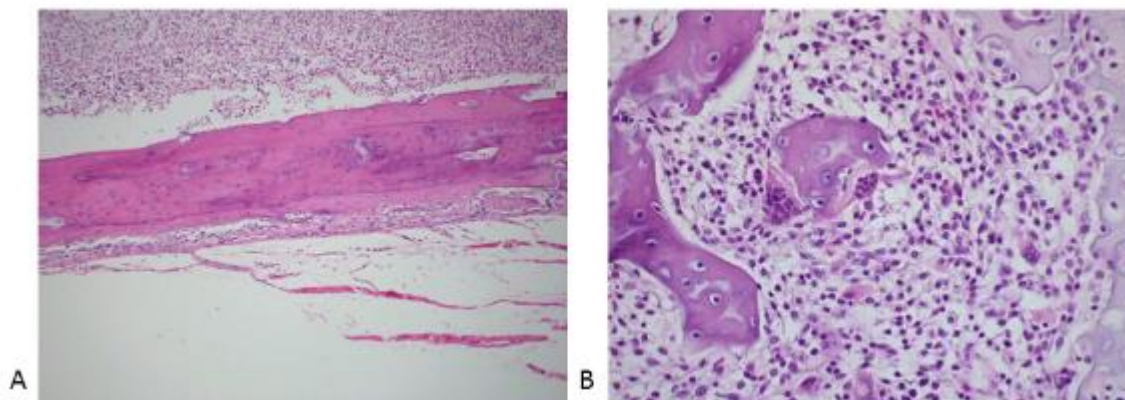


Figura 19. Histología de hueso liso y trabecular.

Hueso liso A (4X) y del hueso trabecular B (40X) del grupo inoculado con 3×10^5 células.

En la **figura 20** se presenta la histología del pulmón a 10X a los 18 días post-inoculación. El panel B muestra el grupo inoculado con 3×10^5 células, presentando pérdida de la estructura de alveolos y bronquiolos, y crecimiento de nuevos vasos sanguíneos en comparación con el grupo control (A). Por lo tanto se confirmó la presencia de metástasis a los 18 días post-inoculación.

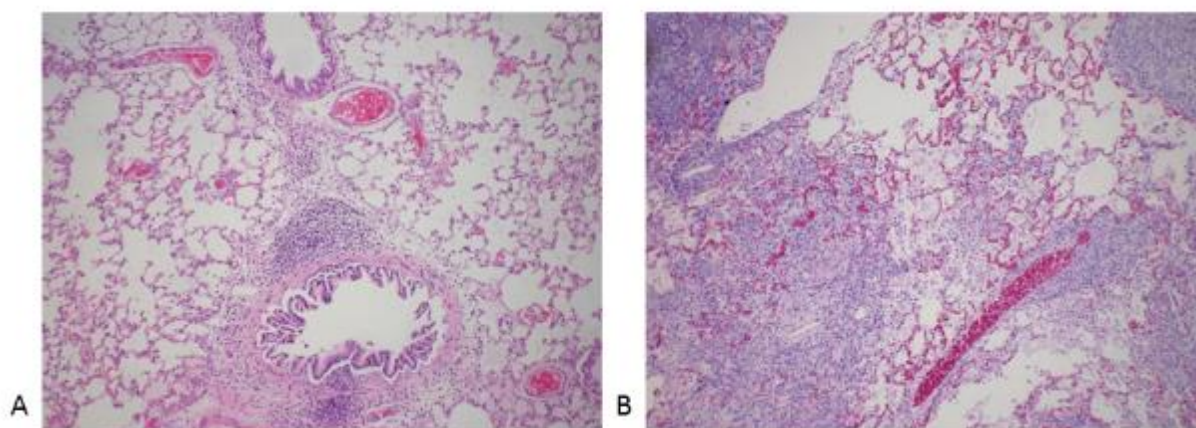


Figura 20. Histología pulmón de la inoculación 3×10^5 células.

Grupo inoculado con 3×10^5 células (B) y grupo control (A) a los 18 días post-inoculación. Imagen de pulmón 10X.

8.3.2 Grupo inoculado con 1×10^5 células.

En la **figura 21** se muestra histología de la cabeza de fémur distal derecho y médula ósea de la inoculación de 1×10^5 células de glioma (B, C, E y F) a los 40 días post-inoculación., observándose que el grupo inoculado con células de glioma presenta poca pérdida de vasos sanguíneos en la médula ósea (a diferencia del grupo inoculado con 3×10^5 células), cambios mínimos en el hueso trabecular y la placa de crecimiento mantiene un patrón de crecimiento estable a diferencia del grupo control (A y D).

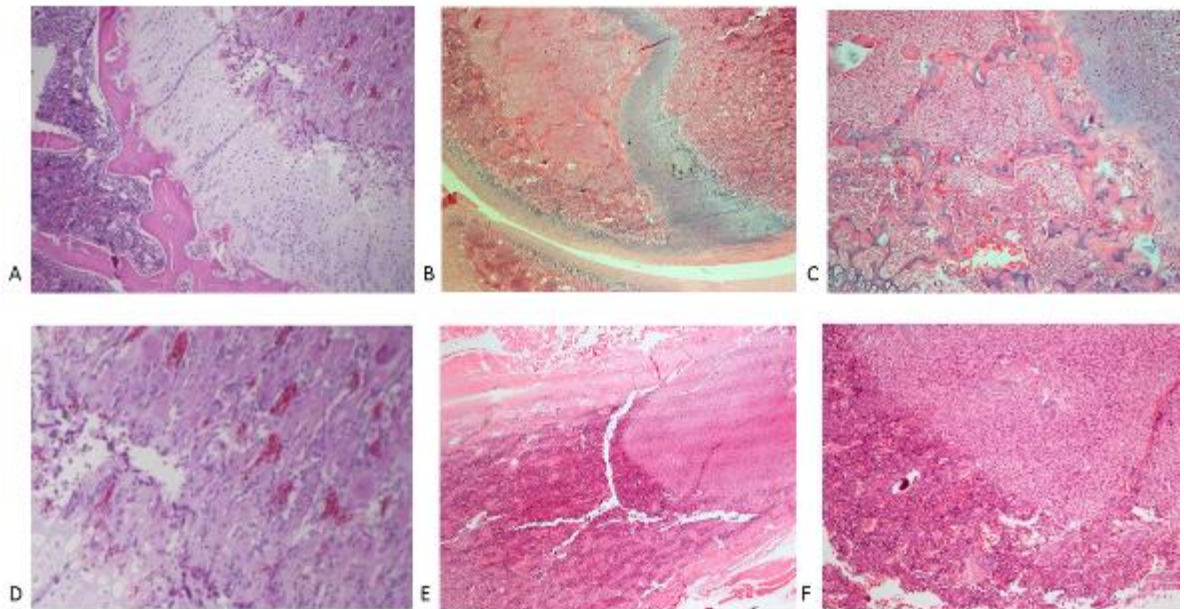


Figura 21. Histología de cabeza de fémur y médula ósea, inoculación de 1×10^5 células.

Cabeza de fémur derecho y hueso trabecular; control 10X (A), glioma 10X (B) y glioma 40X (C) e imagen de médula ósea control 10X (D), glioma 10X (D) y glioma 40X (E) a los 40 días post-inoculación.

A los 40 días post-inoculación se tomaron muestras de bazo (A), hígado (B) y riñón (C), mostrándose que no hay presencia de células cancerosas en ninguno de los casos, descartando la metástasis en dichas condiciones (figura 22).

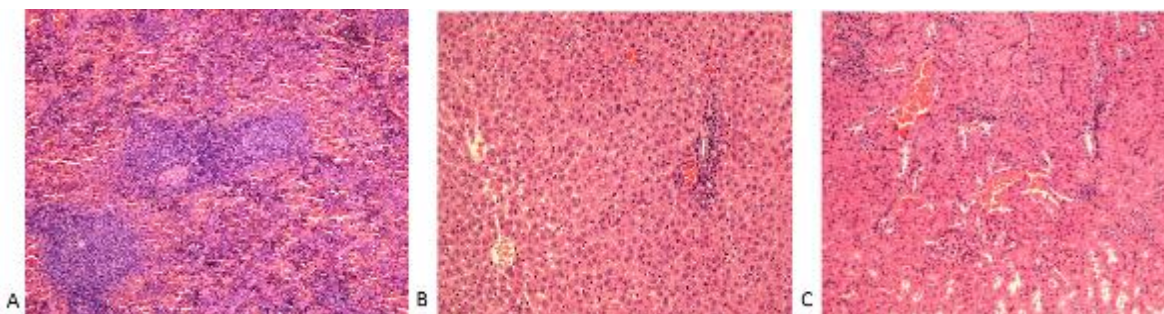


Figura 22. Histología de vaso, hígado y riñón, inoculación de 1×10^5 células.

Imágenes 10X; bazo(A), hígado (B) y riñón (C) de grupo inoculado con 1×10^5 células a 40 días post-inoculación.

8.3.3 Grupo inoculado con 5×10^4 células de glioma.

En la figura 23 se muestra la histología del grupo inoculado con 5×10^4 células (B y D) y grupo control (A y C). En panel B se presentan cambios mínimos en hueso trabecular y médula ósea, manteniéndose el patrón de desarrollo de la placa de crecimiento y el panel D muestra de manera más clara, pérdida mínima de hueso trabecular y vasos sanguíneos, en comparación con el grupo Sham.

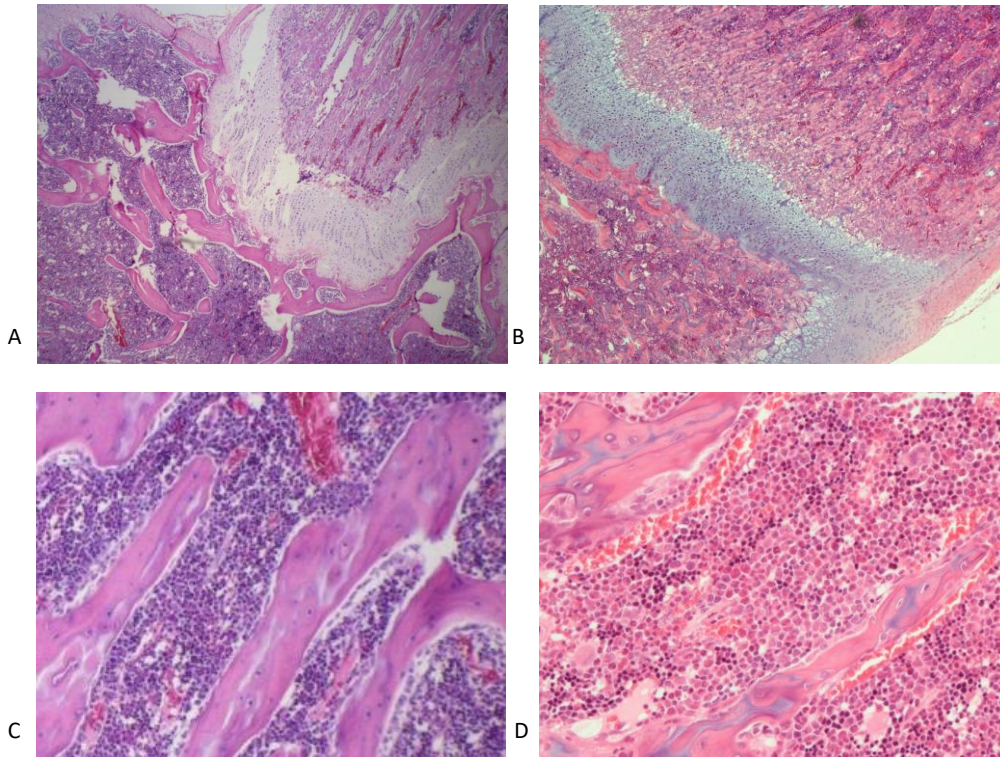


Figura 23. Histología cabeza de fémur y hueso trabecular; inoculación de 5×10^4 células.
 Imágenes cabeza de fémur distal derecho 4X (A y B), hueso trabecular 40X (C y D), el grupo inoculado (B y D) y grupo control (A y C) a 40 días post-inoculación.

8.4 Pruebas conductuales

En las siguientes figuras se muestran los resultados obtenidos de la aplicación de las diferentes pruebas conductuales, los resultados se muestran en cursos temporales, donde en el eje de las abscisas corresponde al tiempo post-inoculación y en el eje de las ordenadas corresponde a la variable evaluada. Se presentó la respuesta ipsilateral y contralateral, donde ipsilateral se refiere a la respuesta obtenida de la extremidad donde se realizó la administración de las células, mientras que contralateral se refiere a la respuesta determinada en la extremidad contraria a la administración.

8.4.1 Grupo inoculado con 6×10^5 células.

El grupo inoculado con 6×10^5 células presentó un tiempo de sobrevida no mayor a los 10 días post-inoculación. Se observó disminución de los umbrales de activación de 20g a 10g para el día 8 post-inoculación (A). El panel B muestra la disminución de los umbrales de activación en 10 unidades para el día 8 post-inoculación (figura 24).

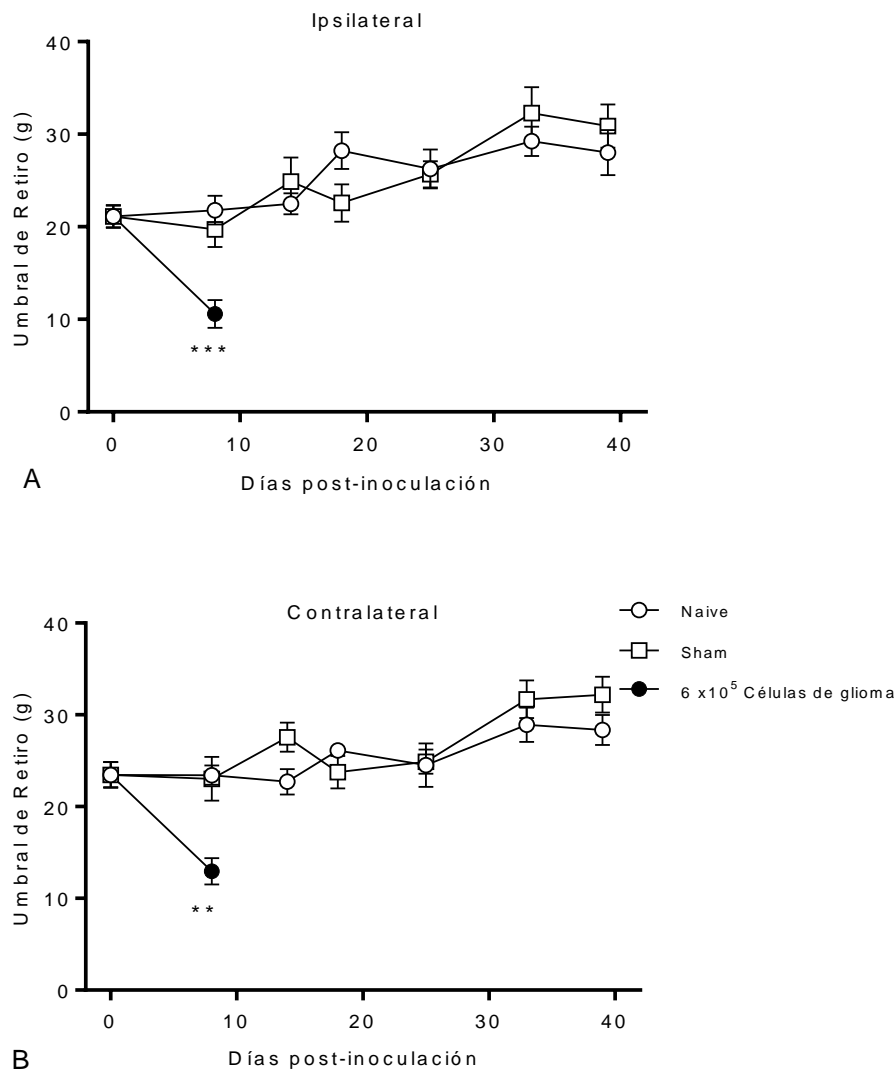


Figura 24. Alodinia mecánica; inoculación 6×10^5 células

Respuesta ipsilateral (A) y respuesta contralateral (B). Los resultados se expresan como la media \pm E.E., $n = 8$.

*** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$ vs Sham.

La **figura 25** muestra el curso temporal de la prueba de hiperalgesia térmica ipsilateral (A) y contralateral (B). Ambos cursos temporales muestran una disminución en la latencia de retiro de la extremidad posterior a los 8 días post-inoculación.

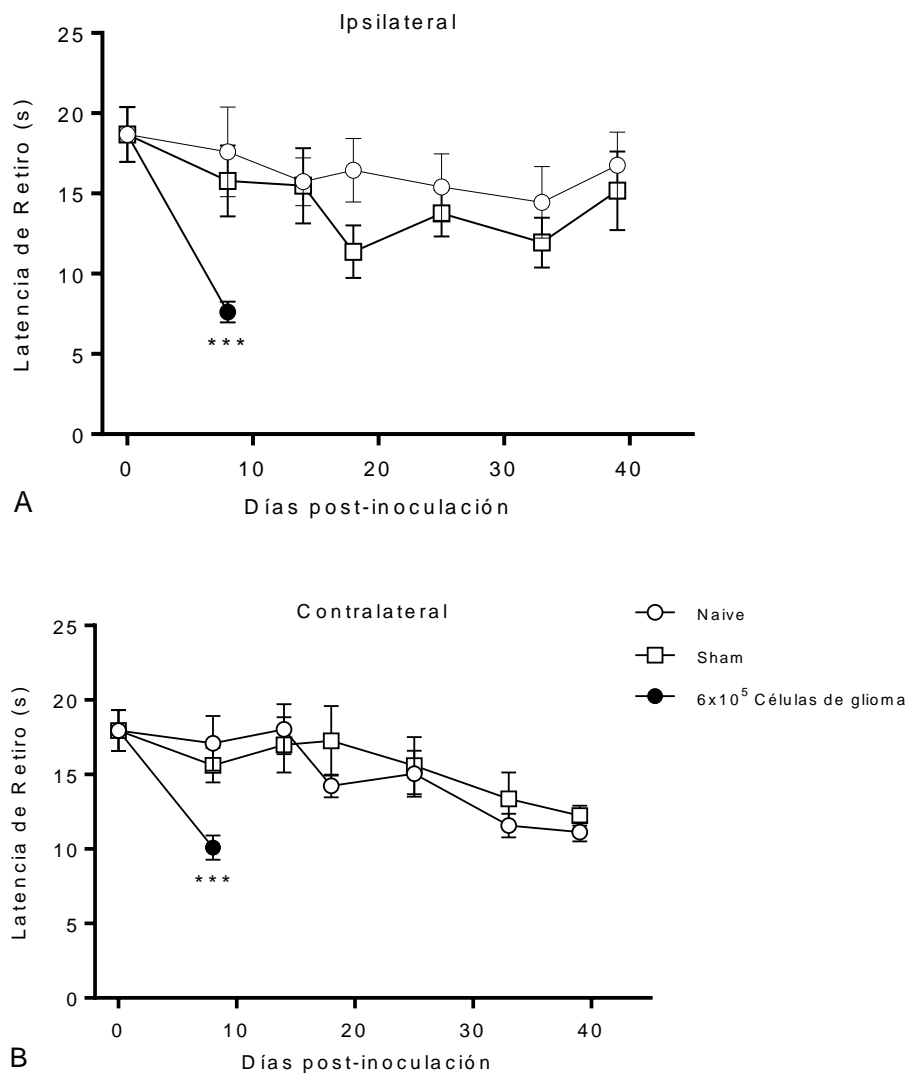


Figura 25. Hiperalgesia térmica; inoculación 6x10⁵ células

Respuesta ipsilateral (A) y respuesta contralateral (B). Los resultados se expresan como la media ± E.E., n =8.

*** $p < 0.001$ vs Sham.

La figura 26 muestra el curso temporal de la prueba de movimiento ambulatorio horizontal (A) y movimiento ambulatorio vertical (B), presentándose una tendencia en la disminución de dichas conductas para ambos casos a partir de los 8 días post-inoculación.

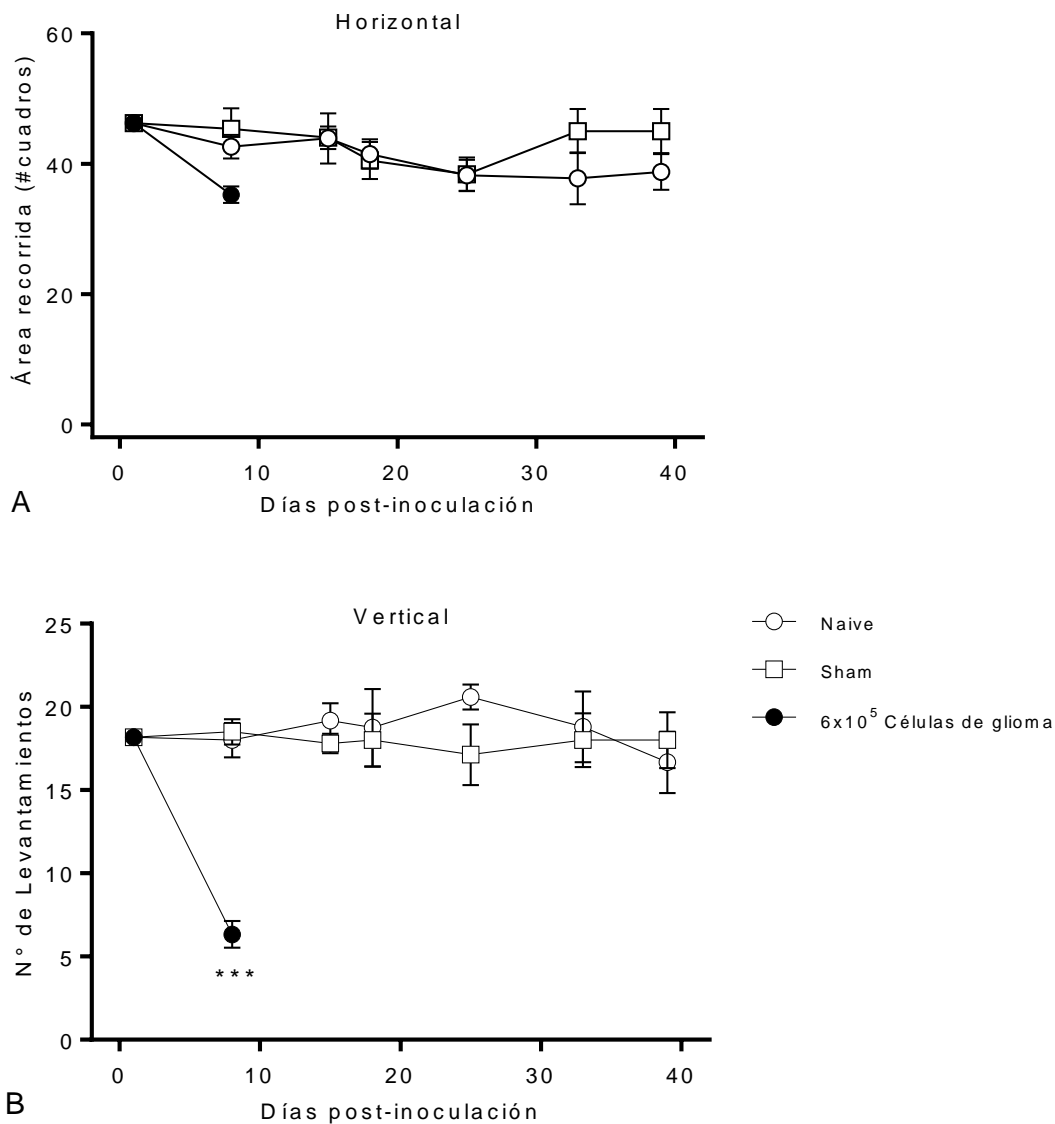


Figura 26. Movimiento voluntario; inoculación de 6x10⁵ células.

Movimiento voluntario horizontal (A) y movimiento voluntario vertical (B). Los resultados se expresan como la media ± E.E., n=8. *** $p < 0.001$ vs Sham.

La figura 27 muestra el curso temporal de la conducta espontánea. Se realizó la detección del número de sacudidas de cuerpo completo (A) y sacudidas de las extremidades

delanteras (B). Los resultados muestran el aumento de dichas conductas en el día 8 post-inoculación.

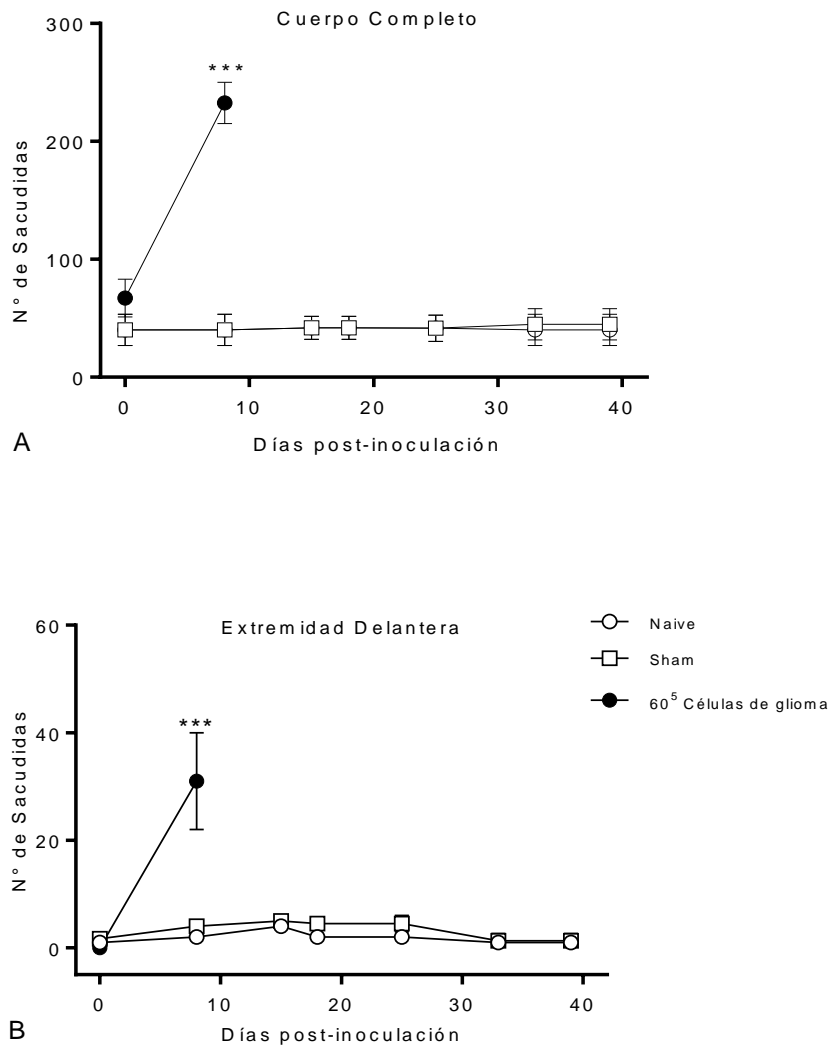


Figura 27. Sacudida de cuerpo completo y extremidades delanteras; inoculación de 6×10^5 células Sacudidas de cuerpo completo (A) y sacudidas de la extremidad delantera (B). Los resultados se expresan como la media \pm E.E., n=8. *** $p < 0.001$ vs Sham.

La **figura 28** muestra la conducta espontánea, se determinan el tiempo de sacudida de la extremidad posterior ipsilateral (**A**) y contralateral (**B**). Los resultados muestran que la conducta no difiere del grupo Naive y Sham.

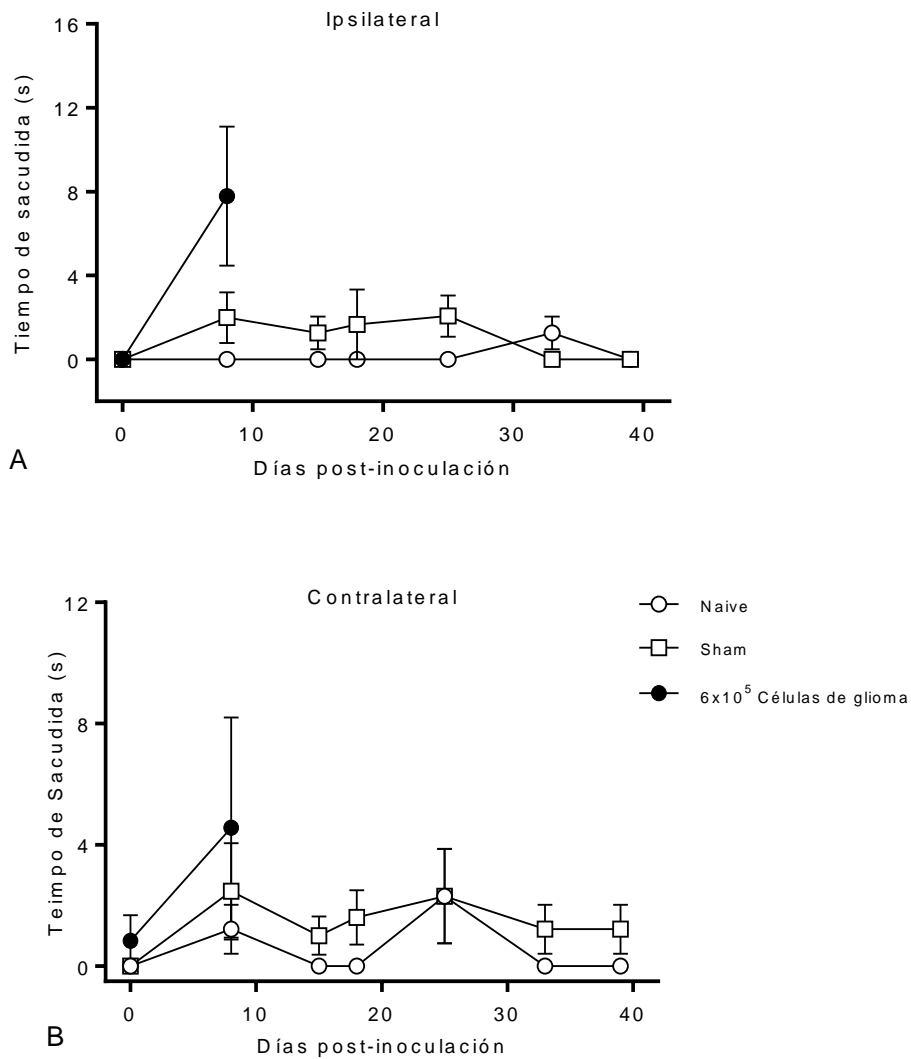


Figura 28. Sacudida de la extremidad posterior; inoculación de 6x10⁵ células.

Respuesta Ipsilateral (A) y Contralateral (B). Los resultados se expresan como la media ± E.E., n =8. Los resultados se expresan como la media ± E.E., n =8.

La **figura 29** muestra el tiempo de lamida y acicalamiento, observándose una disminución significativa de esta conducta, para el día 8 post-inoculación.

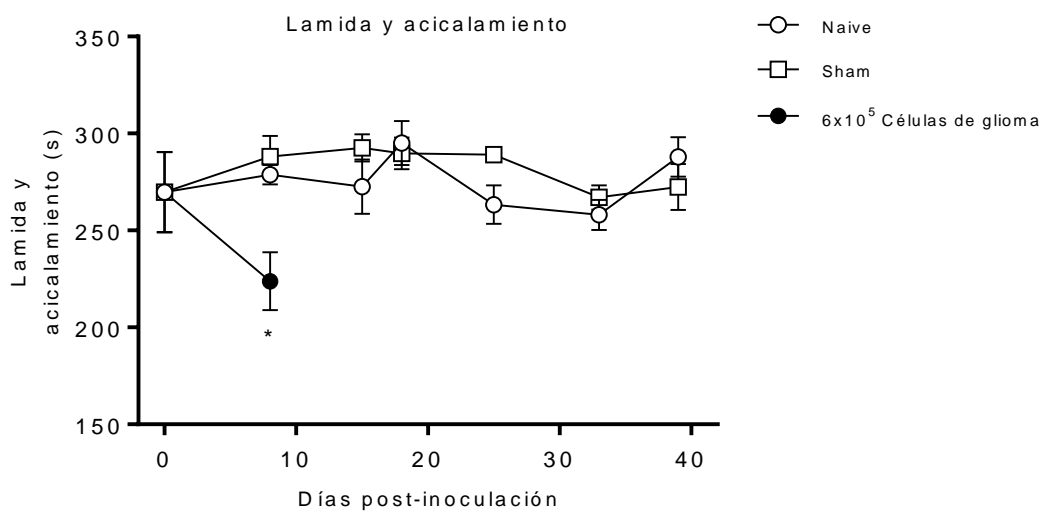


Figura 29. Lamida y acicalamiento; inoculación de 6×10^5 células.
Los resultados se expresan como la media \pm E.E., $n = 8$. * $p < 0.05$ vs Sham.

8.4.2 Grupo inoculado con 3×10^5 células.

La figura 30 muestra el curso temporal de la aplicación de la prueba de alodinia mecánica ipsilateral (A) y contralateral (B), observándose una disminución significativa de los umbrales de activación a partir de los 8 días post-inoculación.

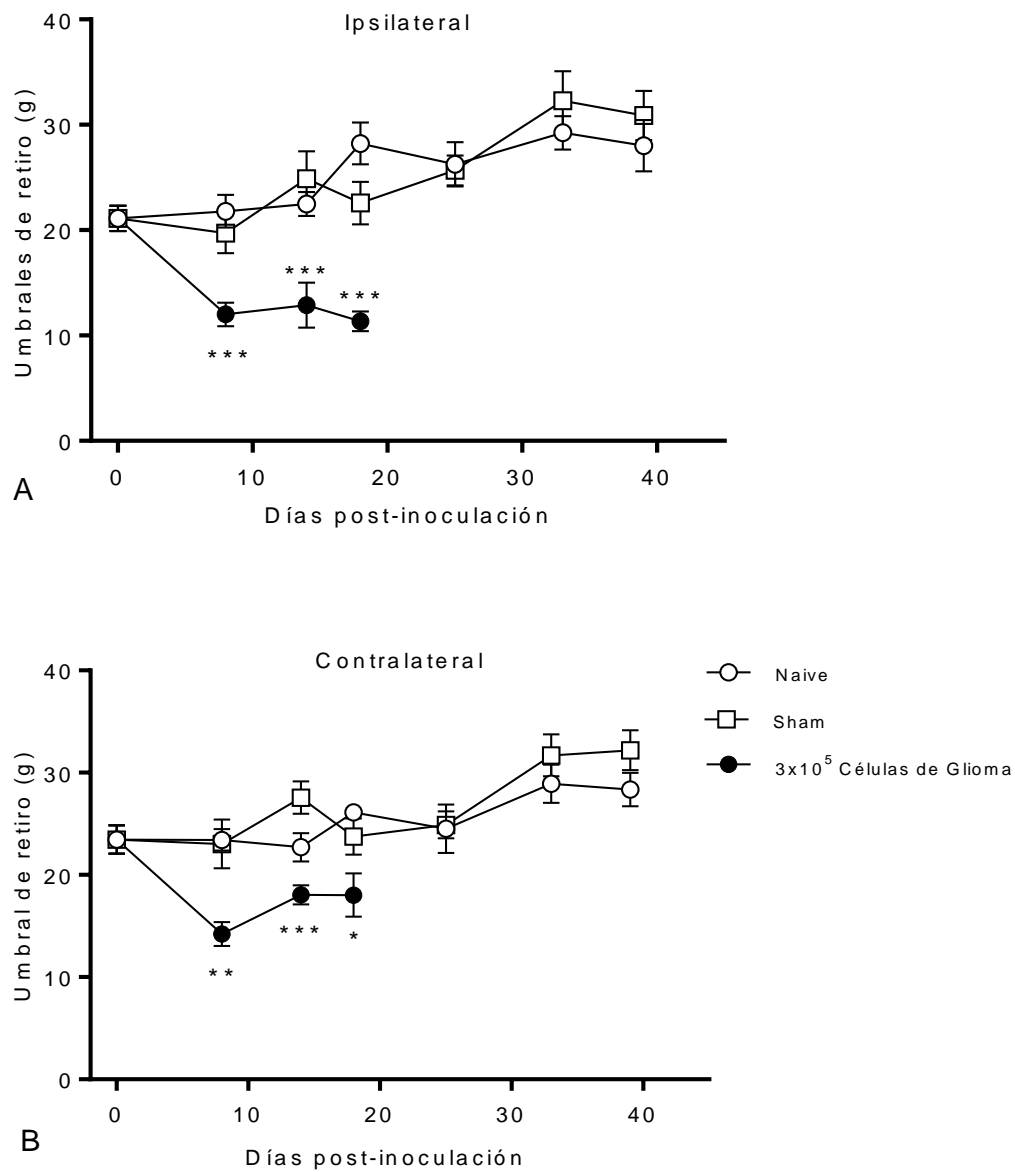


Figura 30. Alodinia mecánica; inoculado con 3×10^5 células.

Alodinia mecánica ipsilateral (A) y contralateral (B). Los resultados se expresan como la media \pm E.E., $n=8$.
*** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ vs Sham.

La **figura 31** muestra el curso temporal de la aplicación de la prueba de hiperalgesia térmica ipsilateral (**A**) y contralateral (**B**). Se presentó una disminución de latencia de retiro de la extremidad posterior a los 8, 15 y 18 días post-inoculación para ambas pruebas.

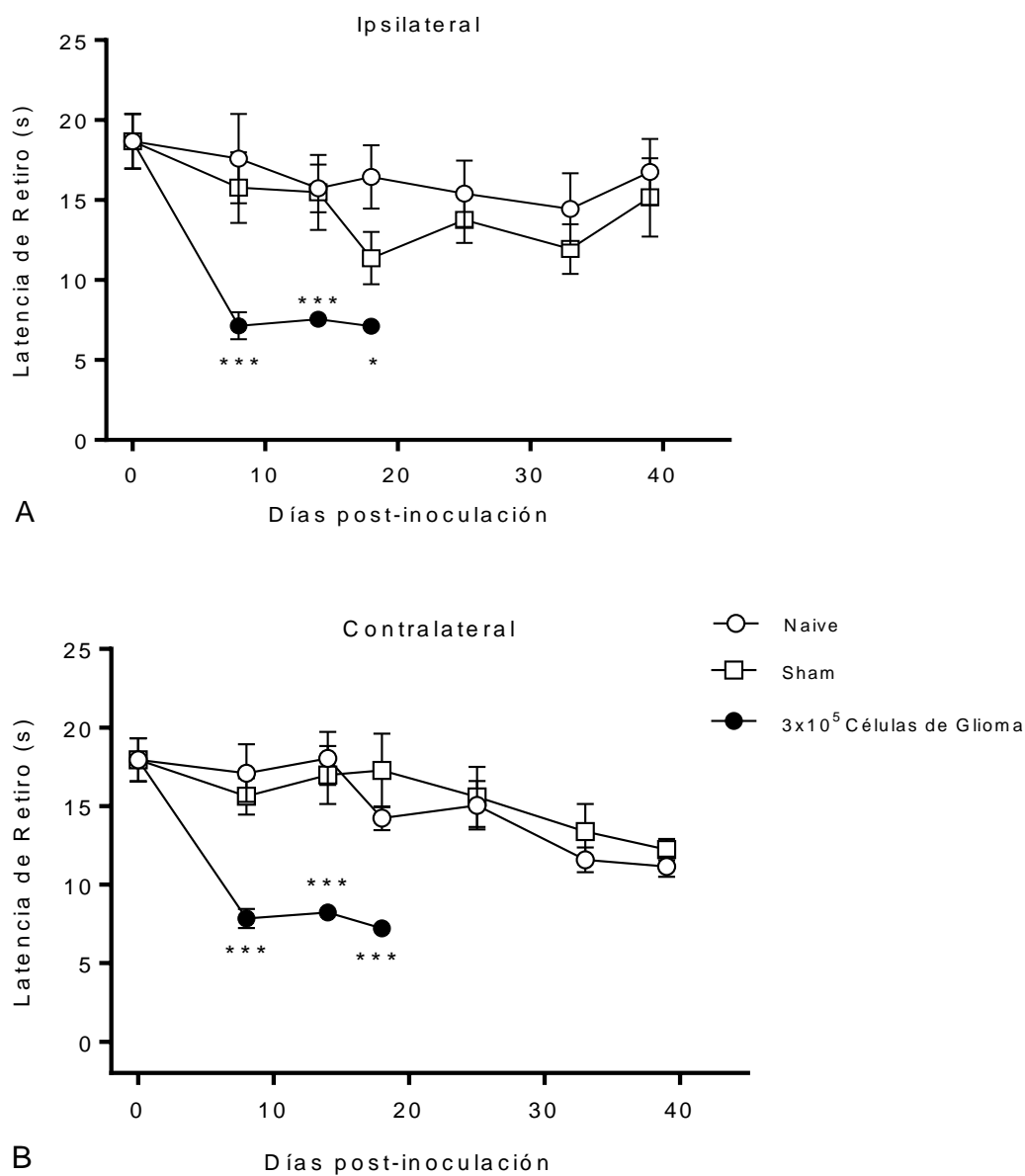


Figura 31. Hiperalgesia térmica; inoculación de 3×10^5 células

Hiperalgesia térmica ipsilateral (A) y contralateral (B). Los resultados se expresan como la media \pm E.E., $n=8$.
 *** $p < 0.001$, * $p < 0.05$ vs Sham.

La [figura 32](#) muestra el curso temporal de la aplicación de la prueba de movimiento ambulatorio horizontal (A) y vertical (B), observándose que a partir del día 15 post-inoculación el movimiento ambulatorio horizontal se disminuyó, mientras que el movimiento ambulatorio vertical disminuyó a partir de los 8 días post-inoculación.

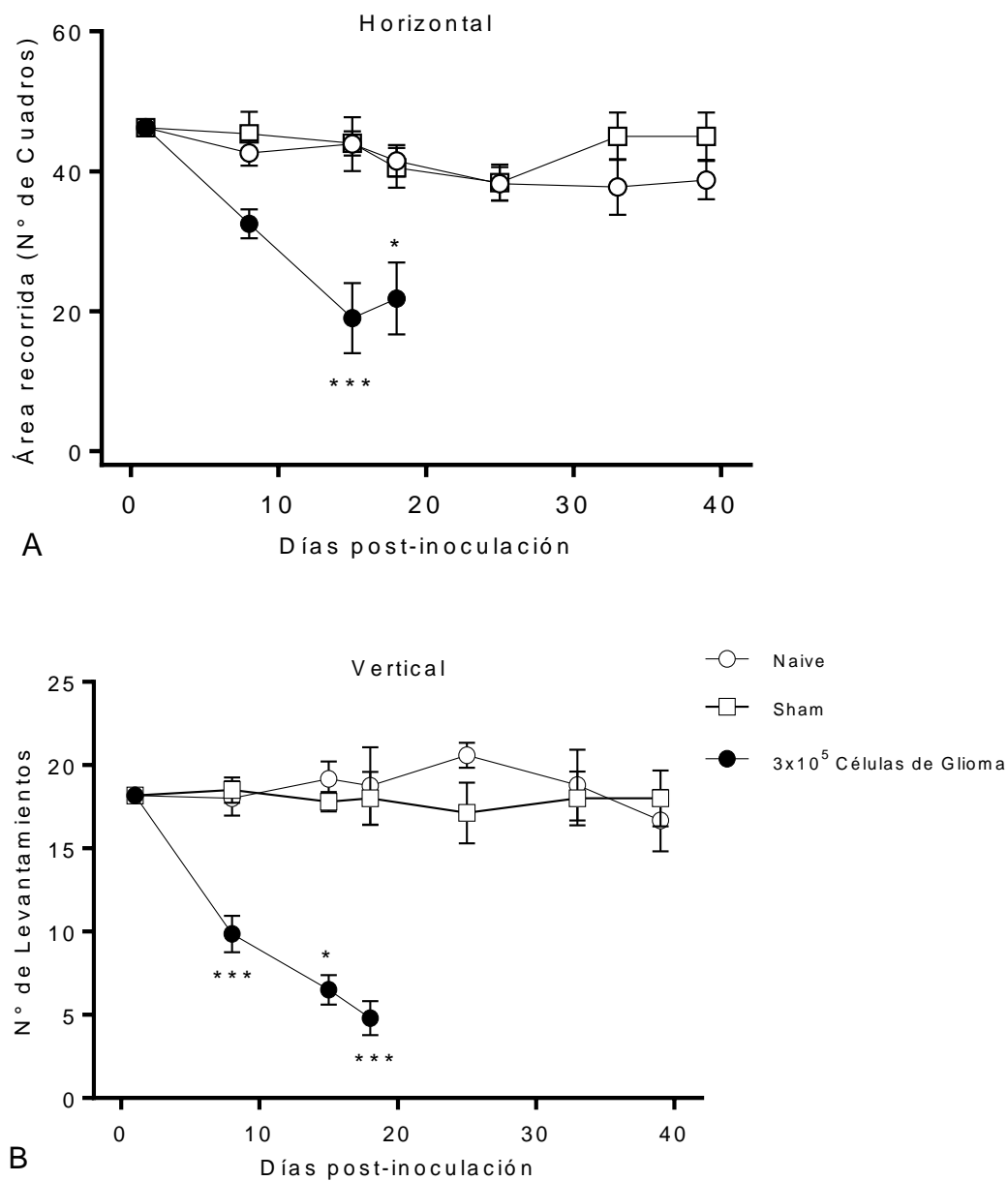


Figura 32. Movimiento voluntario horizontal y vertical; inoculación de 3x10⁵ células.

Movimiento ambulatorio horizontal (A) y vertical (B). Los resultados se expresan como la media ± E.E., n=8. *** $p < 0.001$, * $p < 0.05$ vs Sham.

La figura 33 se muestra el número de sacudidas de la extremidad delantera (A) y sacudidas de cuerpo completo (B), observándose un aumento a partir del día 8 post-inoculación para ambas conductas.

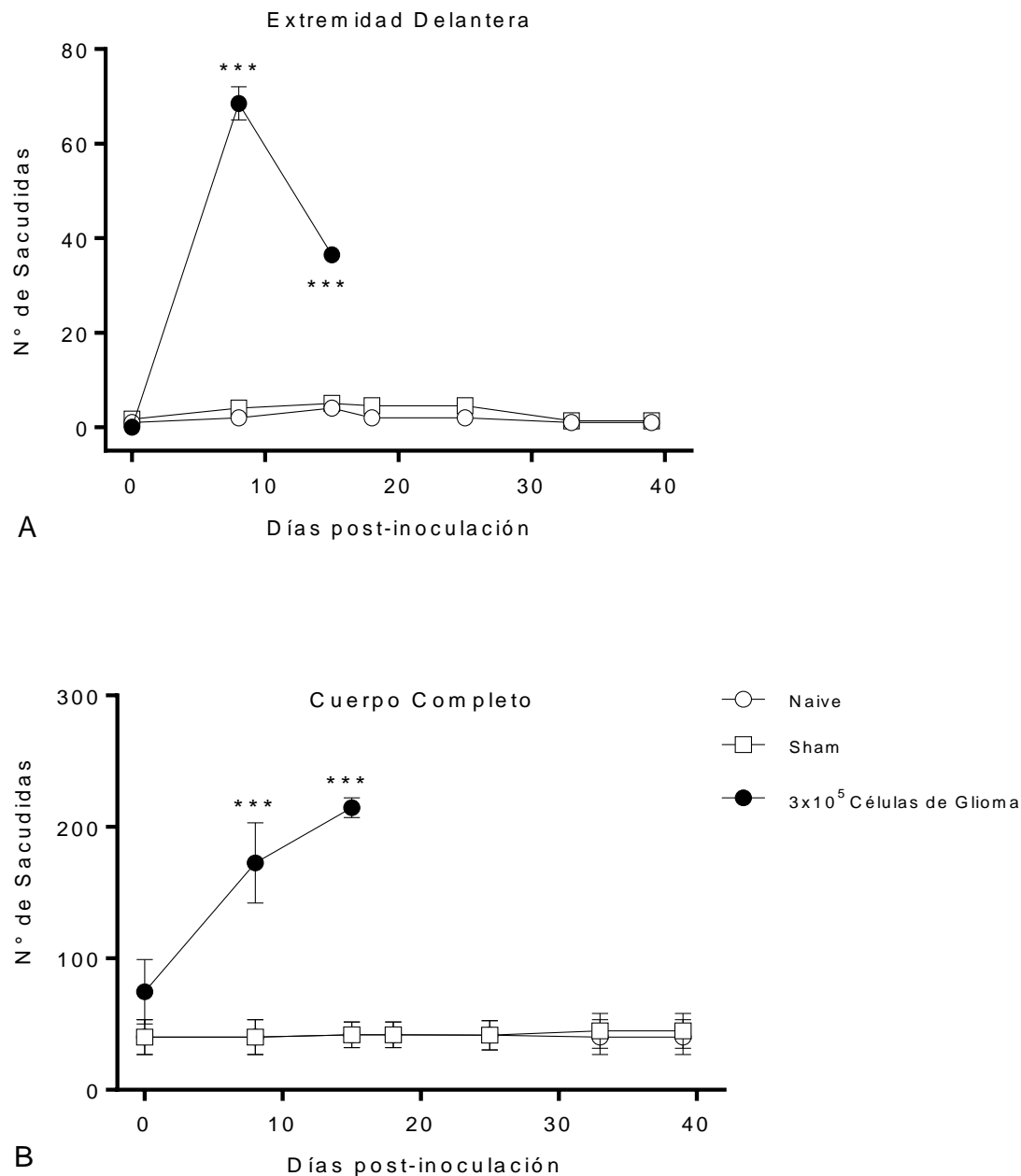


Figura 33. Sacudida de cuerpo completo y extremidades delanteras; inoculación de 3x10⁵ células. Sacudidas de las extremidades delanteras (A) y Sacudidas de cuerpo completo (B). Los resultados se expresan como la media ± E.E., n =8. ****p*<0.001 vs Sham.

La [figura 34](#) se muestra el tiempo de sacudidas de la extremidad posterior ipsilateral (A) y contralateral (B). La respuesta no se modificó, por lo tanto dicha conducta no fue afectada por la inoculación de las células.

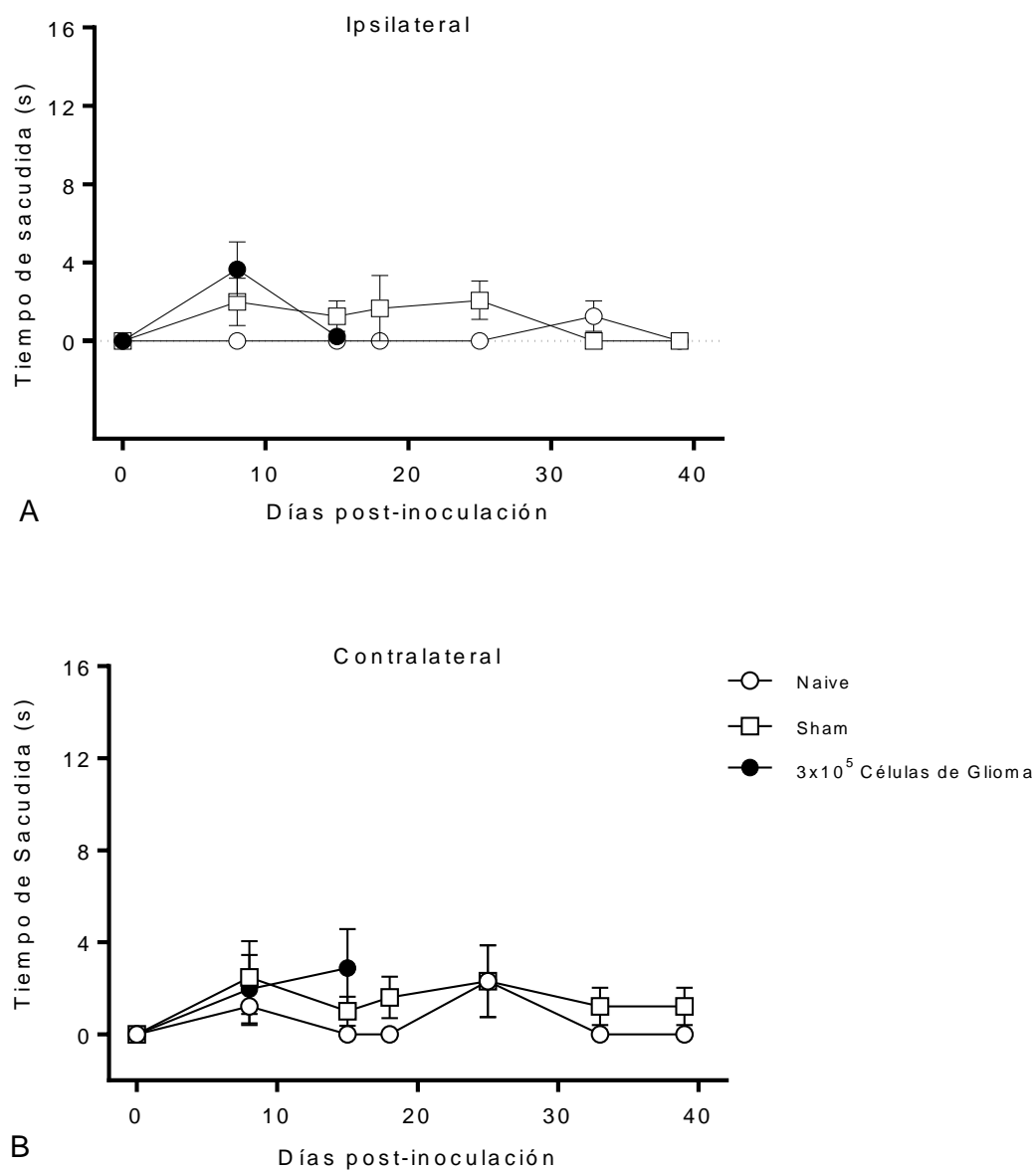


Figura 34. Sacudida de la extremidad posterior; inoculación de 3x10⁵ células.

Tiempo de sacudida de la extremidad posterior ipsilateral (A) y contralateral (B). Los resultados se expresan como la media \pm E.E., n = 8.

En la [figura 35](#) se muestra el tiempo de lamida y acicalamiento. Los resultados nos muestran que dicha conducta disminuyó a partir del día 8 post-inoculación.

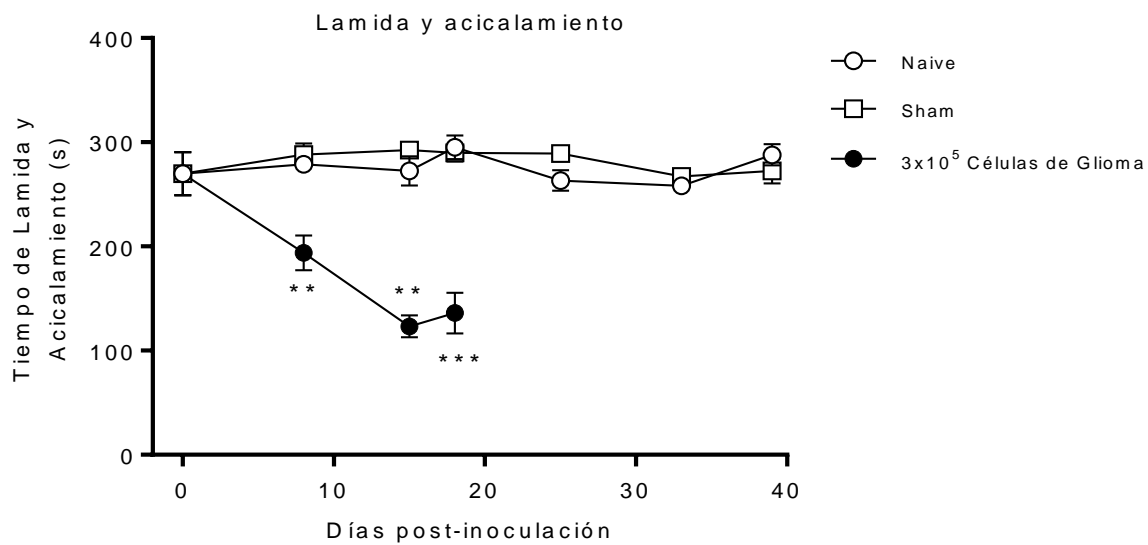


Figura 35. Lamida y acicalamiento; inoculación de 3×10^5 células.

Tiempo de lamida y acicalamiento. Los resultados se expresan como la media \pm E.E., n =8. *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$ vs Sham.

8.4.3 Grupo inoculado con 1×10^5 células.

La siguiente **figura 36** muestra el curso temporal de la aplicación de la prueba de alodinia mecánica ipsilateral (A) y contralateral (B), que muestra que los umbrales se disminuyeron a partir del día 8 post-inoculación para ambas pruebas.

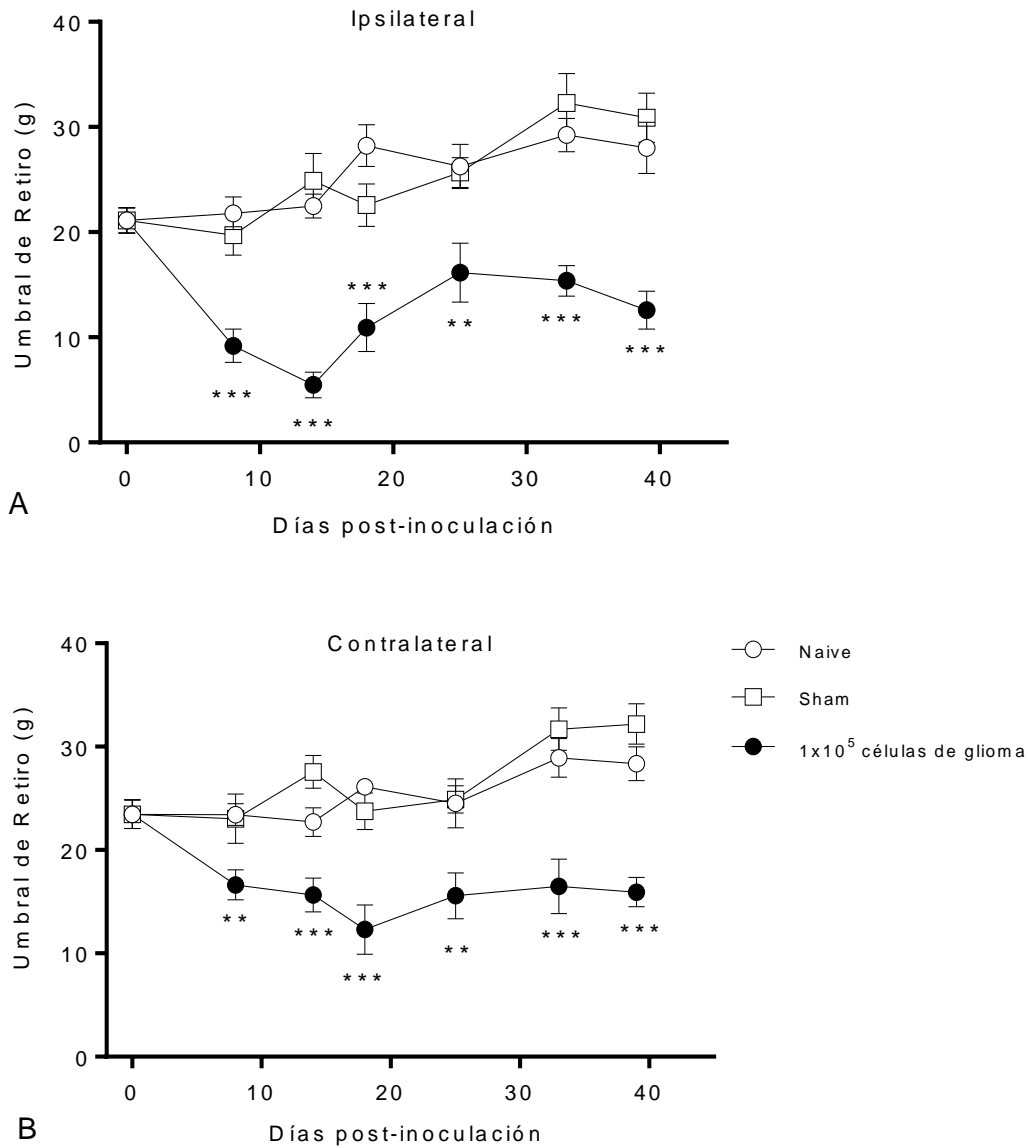


Figura 36. Alodinia mecánica, inoculación de 1×10^5 células

Alodinia mecánica ipsilateral (A) y contralateral (B). Los resultados se expresan como la media \pm E.E., $n = 8$.
*** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$ vs Sham.

La **figura 37** muestra el curso temporal de la prueba de hiperalgesia térmica ipsilateral (A) y contralateral (B). Observándose que la latencia de retiro se disminuyó a partir del día 8 post-inoculación, manteniéndose dicha disminución durante todo el curso temporal.

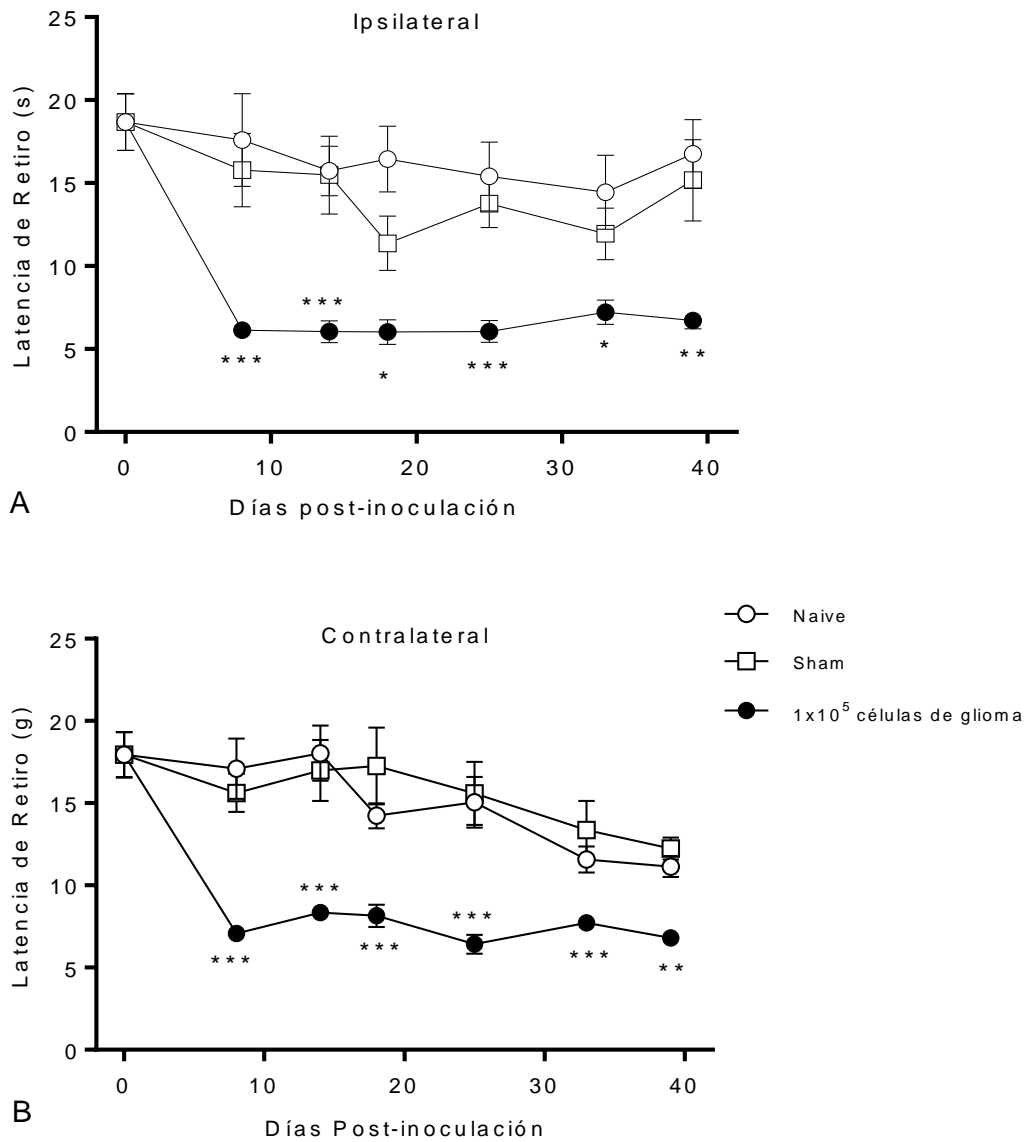


Figura 37. Hiperalgesia térmica; inoculación de 1x10⁵ células.

Hiperalgesia térmica ipsilateral (A) y contralateral (B). Los resultados se expresan como la media \pm E.E., n = 8. *** p <0.001, ** p <0.01, * p <0.05 vs Sham.

La figura 38 muestra el curso temporal de la prueba de movimiento ambulatorio horizontal (A) y vertical (B), donde se observó una disminución del número de cuadros (distancia recorrida) a partir del día 15 post-inoculación. También se observó un decremento del número de levantamientos con las dos extremidades a partir del día 8 post-inoculación.

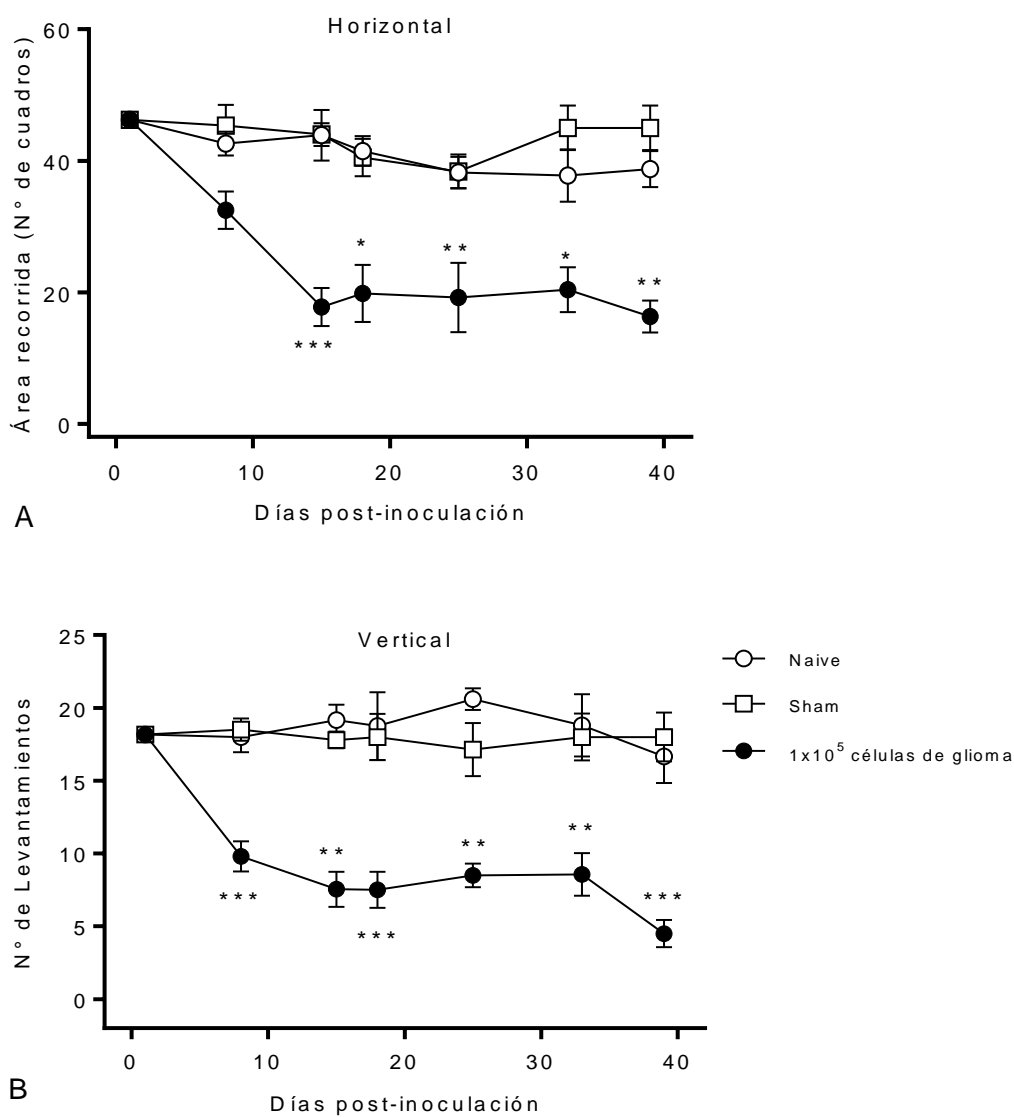


Figura 38. Movimiento ambulatorio horizontal y vertical; inoculación de 1x10⁵ células.

Movimiento ambulatorio horizontal (A) y movimiento ambulatorio vertical (B). Los resultados se expresan como la media \pm E.E., n=8. *** p <0.001, ** p <0.01, * p <0.05 vs Sham.

La [figura 39](#) muestra el número de sacudidas de la extremidad delantera, observándose que el número de sacudidas de las extremidades delanteras aumento a partir del día 18 post-inoculación.

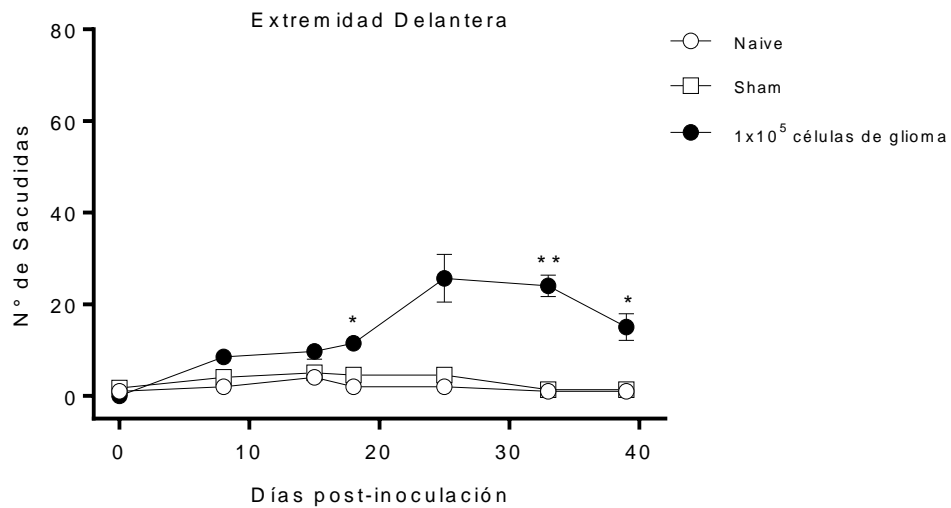


Figura 39. Sacudida de la extremidad delantera; inoculación de 1x10⁵ células.
Los resultados se expresan como la media \pm E.E., n =8. ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ vs Sham.

En la [figura 40](#) se muestra el tiempo de sacudidas de la extremidad posterior ipsilateral (A) y contralateral (B), donde se observó que el tiempo de sacudidas de la extremidad posterior no se ve modificado de manera significativa, excepto a los 33 días post-inoculación de la prueba ipsilateral.

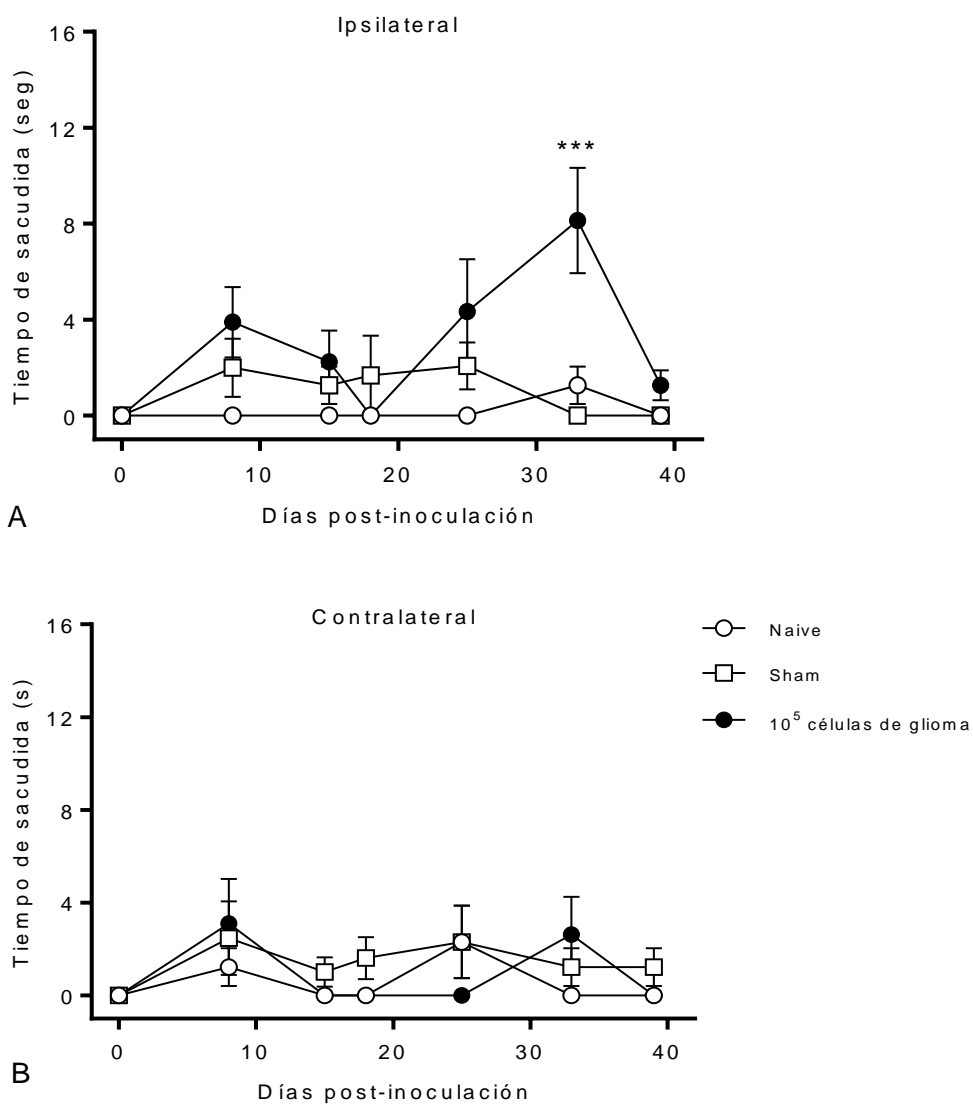


Figura 40. Sacudida de la extremidad posterior ipsilateral y contralateral; inoculación de 1×10^5 células. Sacudida de la extremidad posterior ipsilateral (A) y contralateral (B). Los resultados se expresan como la media \pm E.E., $n = 8$. *** $p < 0.001$ vs Sham.

La figura 41 muestra el tiempo de lamida y acicalamiento, se observó una disminución de dicha conducta a partir de día 8 post-inoculación.

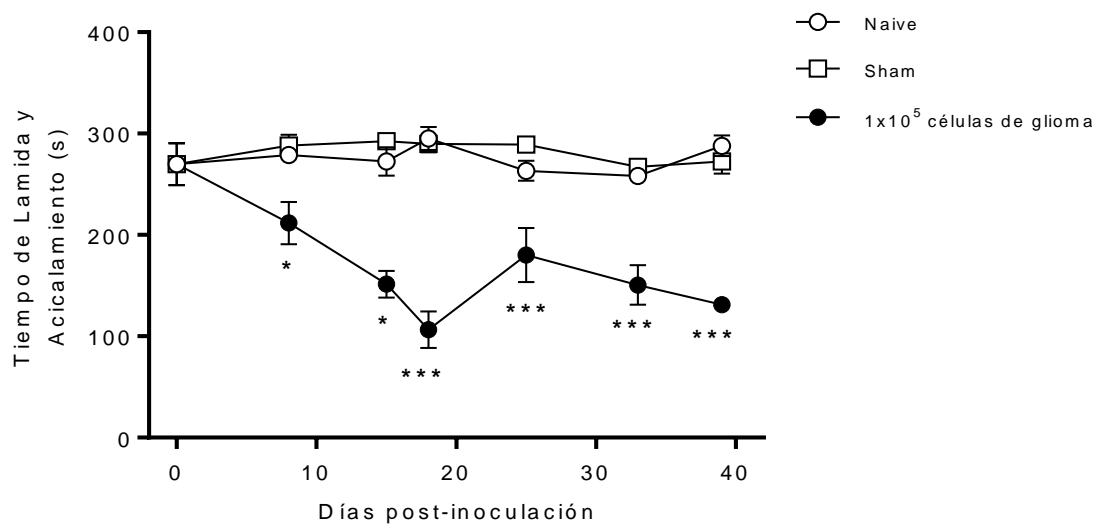


Figura 41. Lamida y acicalamiento, inoculación de 1x10⁵ células.

Los resultados se expresan como la media \pm E.E., n =8. *** p <0.001, * p <0.05 vs Sham.

8.4.4 Grupo inoculado con 5×10^4 células.

Este grupo presentó un tiempo de sobrevida mayor a los 40 días post-inoculación. La figura 42 se muestra el curso temporal de la aplicación de la prueba de alodinia mecánica ipsilateral (A) y contralateral (B), mostrando disminución en los umbrales de activación a partir del día 8 post-inoculación.

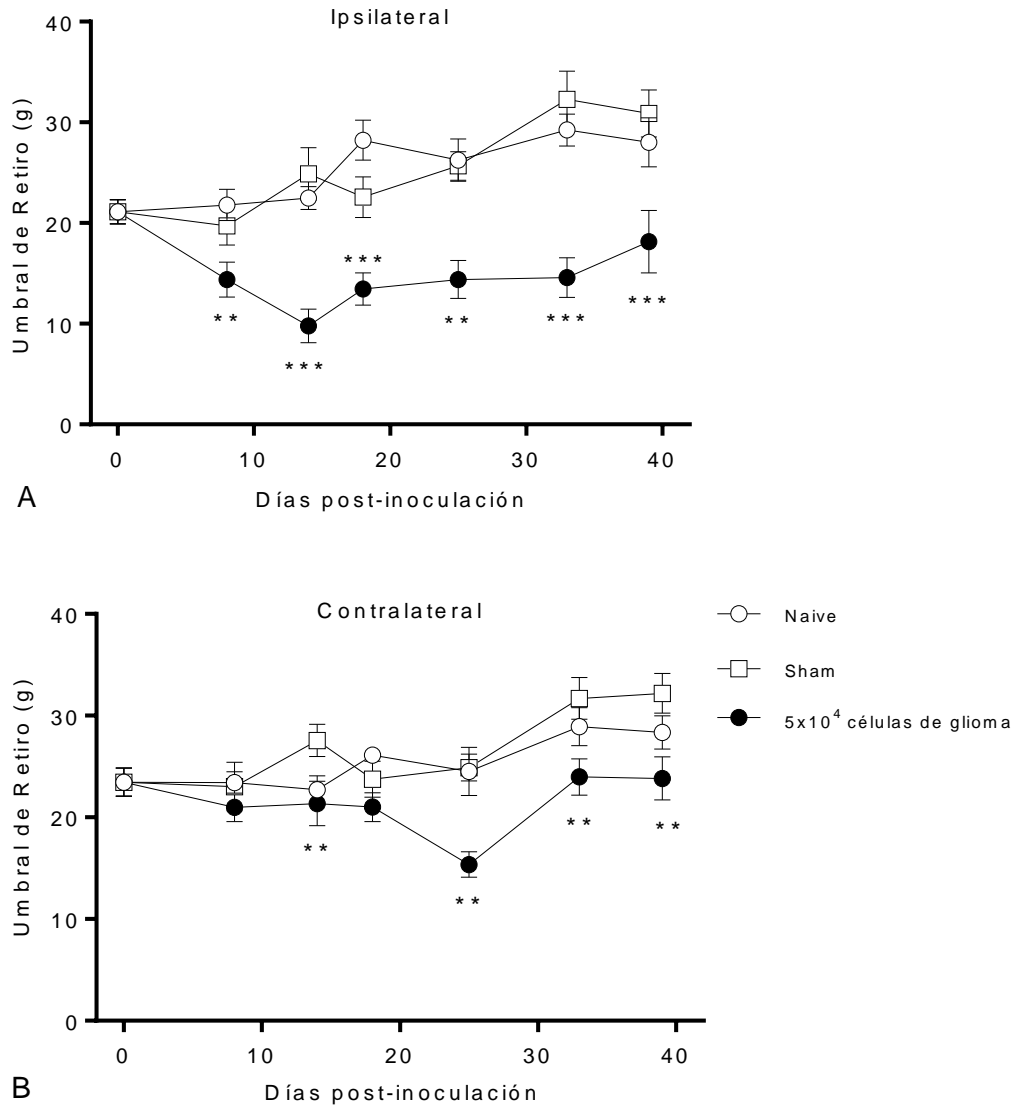


Figura 42. Alodinia mecánica ipsilateral y contralateral; inoculación de 5×10^4 células.

Alodinia mecánica ipsilateral (A) y contralateral (B). Los resultados se expresan como la media \pm E.E., n=8. *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$ vs Sham.

En la siguiente [figura 43](#) se muestra el curso temporal de la aplicación de la prueba de hiperalgesia térmica ipsilateral (A) y contralateral (B), presentándose una disminución de la latencia de retiro a partir del día 8 post-inoculación.

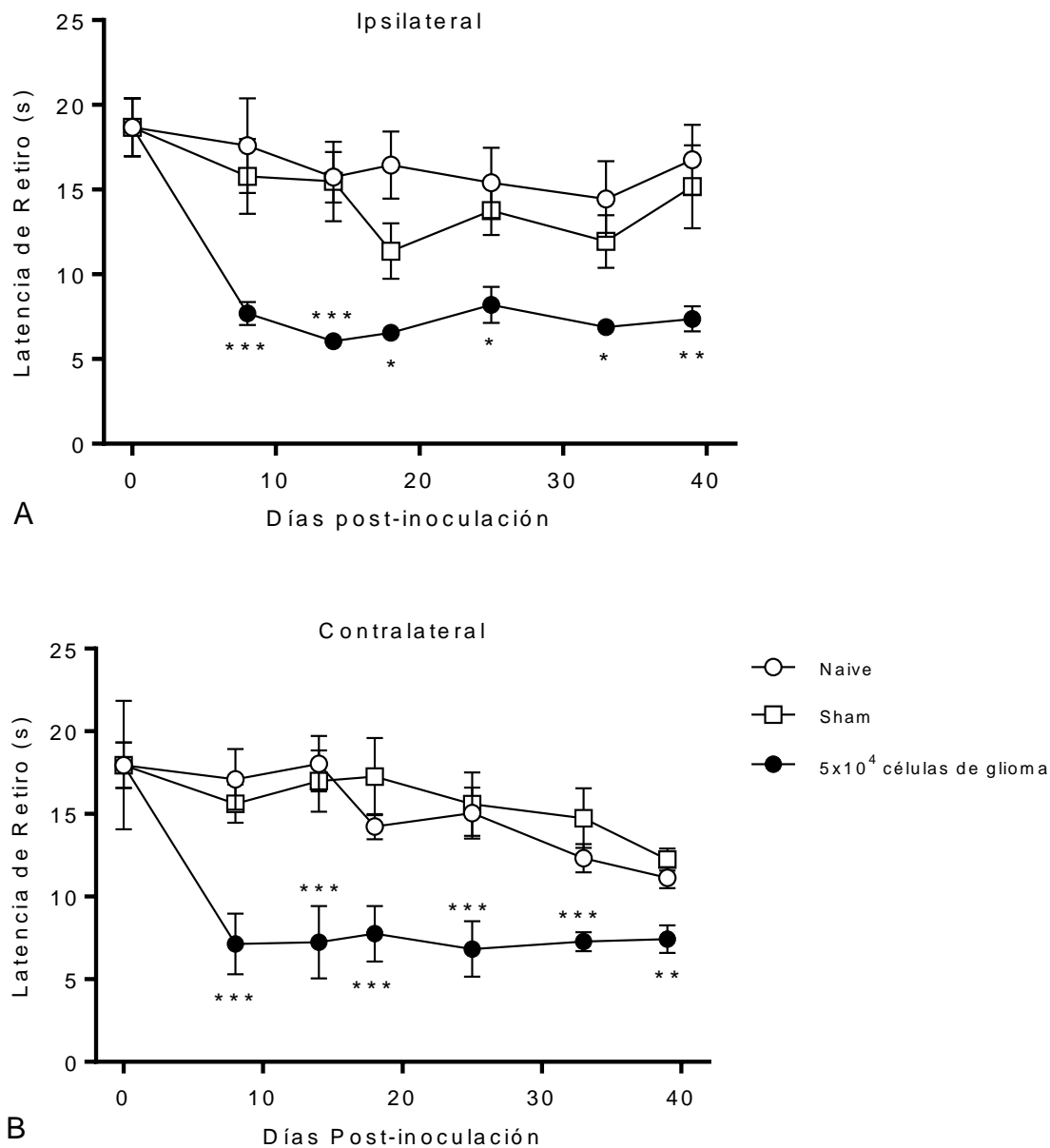


Figura 43. Hiperalgesia térmica ipsilateral y contralateral, inoculación de 5x10⁴ células.

Hiperalgesia térmica ipsilateral (A) y contralateral (B). Los resultados se expresan como la media ± E.E., n=8.

*** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ vs Sham.

En la [figura 44](#) se muestra el curso temporal de la aplicación de la prueba de movimiento ambulatorio horizontal (A) y vertical (B), donde se observó una disminución del número de cuadros (distancia recorrida) a partir del día 15 post-inoculación y del número de levantamientos a partir del día 8 post-inoculación.

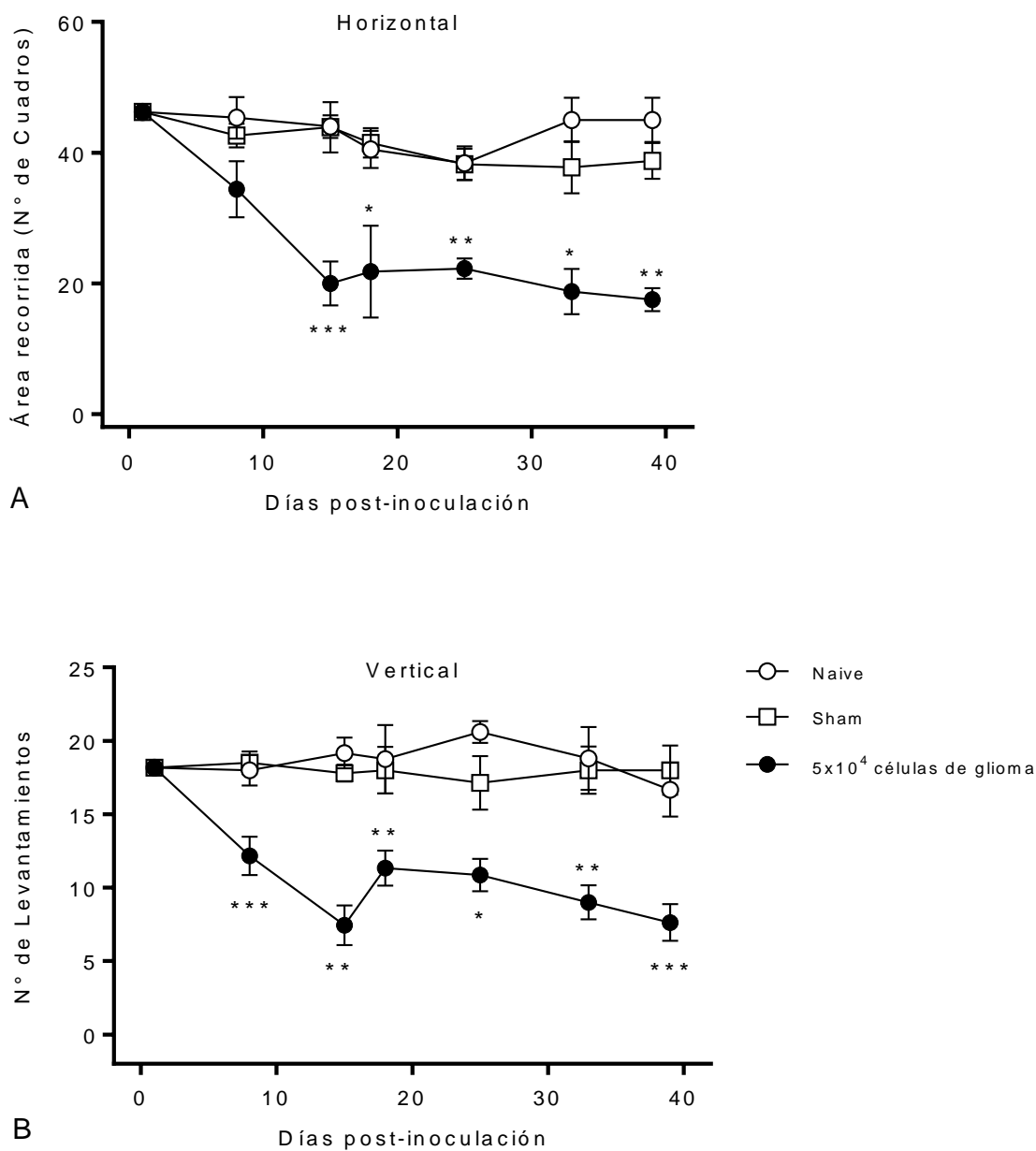


Figura 44. Movimiento ambulatorio horizontal y vertical; inoculación de 5x10⁴ células.

Número de cuadros recorridos (A) y el número de levantamiento verticales (B). Los resultados se expresan como la media \pm E.E., n=8. *** p <0.001, ** p <0.01, * p <0.05 vs Sham

La figura 45 muestra el número de sacudidas de la extremidad delantera, donde se observó un aumento de la conducta a partir del día 8 post-inoculación.

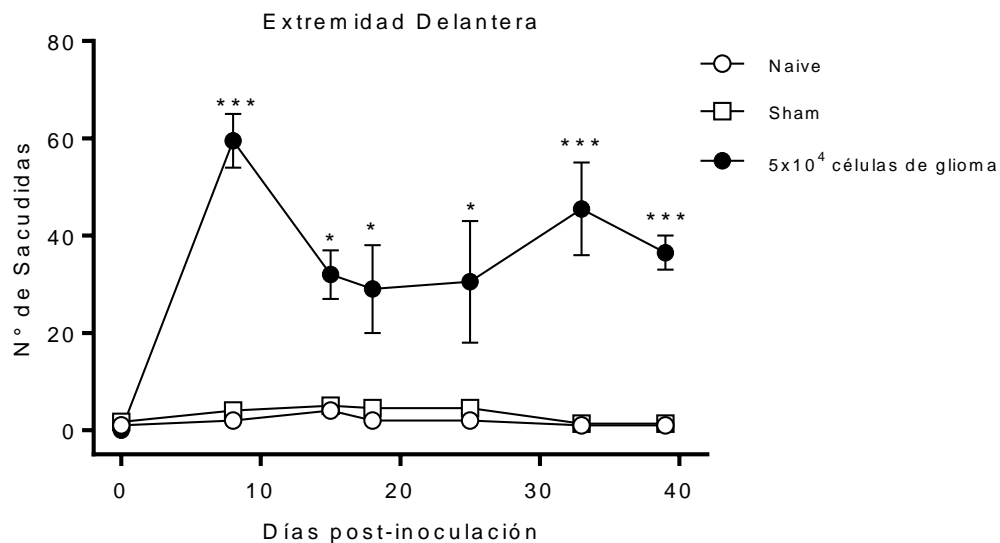


Figura 45. Sacudida de la extremidad delantera; inoculación de 5x10⁴ células.
Los resultados se expresan como la media ± E.E., n =8. ***p<0.001, *p<0.05 vs Sham

En la [figura 46](#) se muestra la conducta espontánea al determinar el tiempo de sacudidas de la extremidad posterior ipsilateral (A) y contralateral (B), donde se observó que dicha conducta no fue modificada por la inoculación de las células.

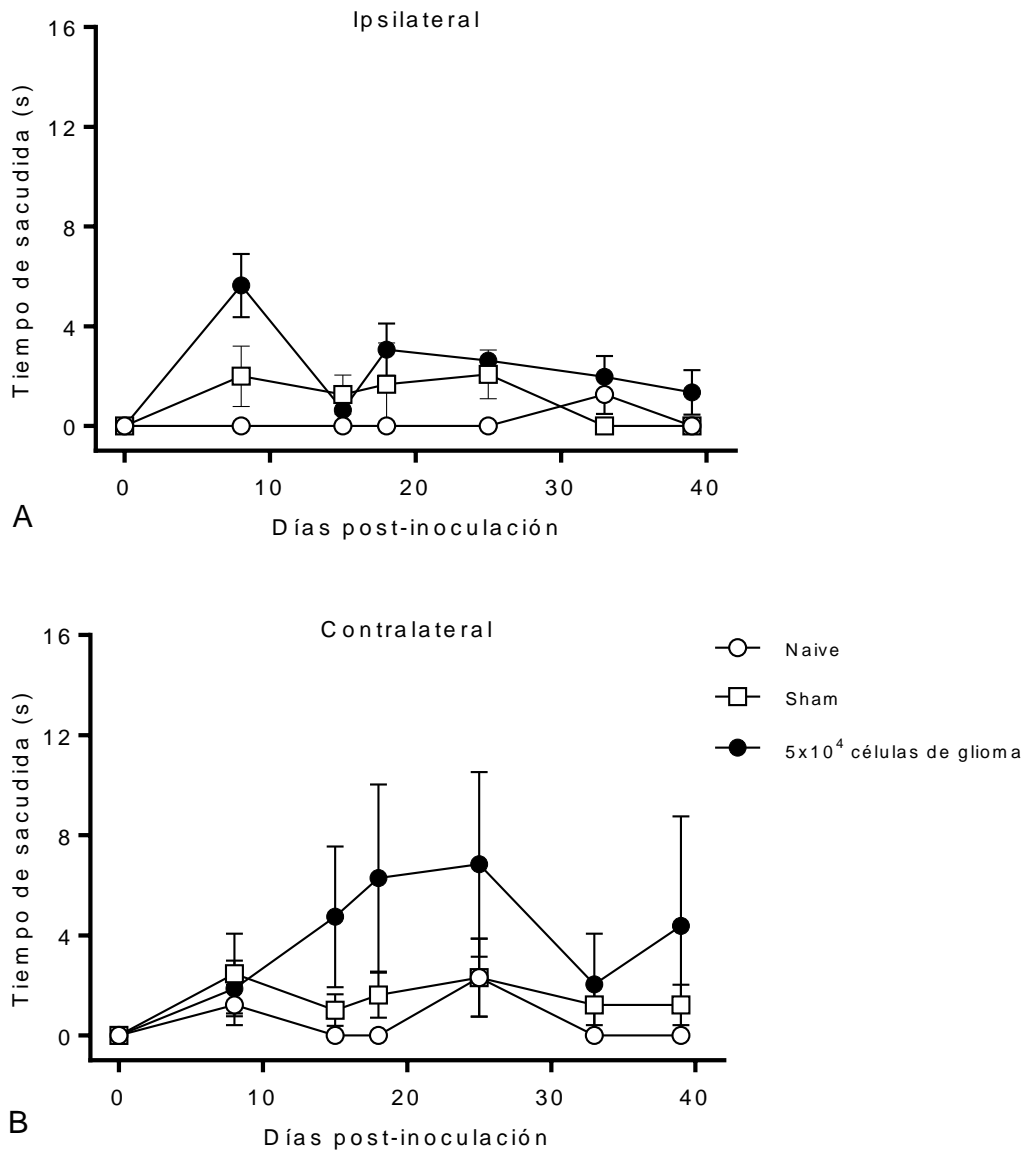


Figura 46. Sacudida de la extremidad posterior; inoculación de 5x10⁴ células.

Sacudida de la extremidad posterior ipsilateral (A) y contralateral (B). Los resultados se expresan como la media \pm E.E., n=8.

En la [figura 47](#) se muestra la conducta de lamida y acicalamiento, se determinó el tiempo de lamida y acicalamiento del cuerpo completo, observándose la disminución de dicha conducta a partir de los 15 días post-inoculación.

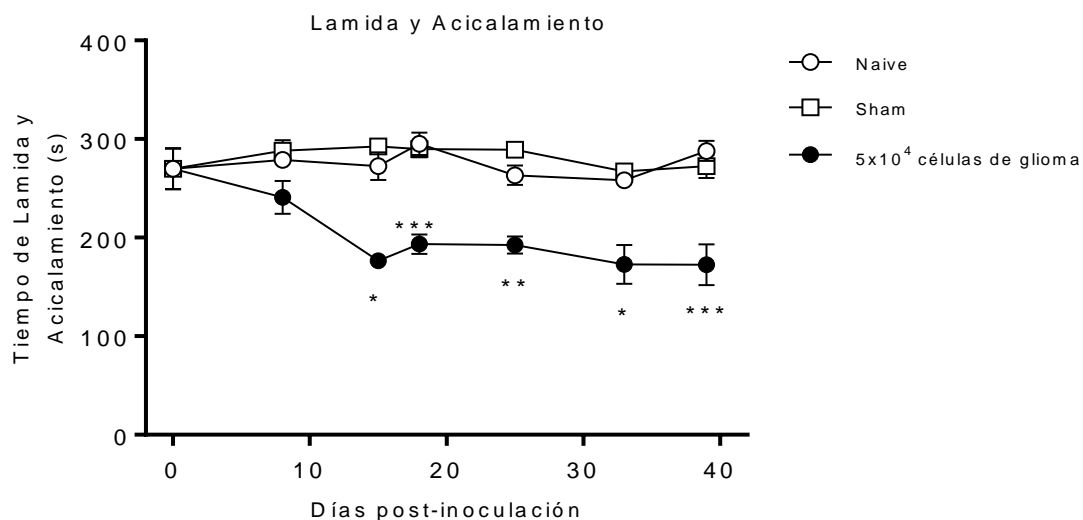


Figura 47. Lamida y acicalamiento; inoculación de 5×10^4 células.

Los resultados se expresan como la media \pm E.E., n =8. *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ vs Sham.

8.4.5 Comparación conductual; inoculación de 5×10^4 vs 1×10^5 células.

En la [figura 48](#) se muestra el área bajo la curva (ABC) de la conducta de alodinia mecánica ipsilateral (A) y contralateral (B), se observó que en ambos grupos los umbrales de activación se disminuyeron en la prueba ipsilateral y contralateral, presentando la conducta de alodinia mecánica en comparación con el grupo Sham.

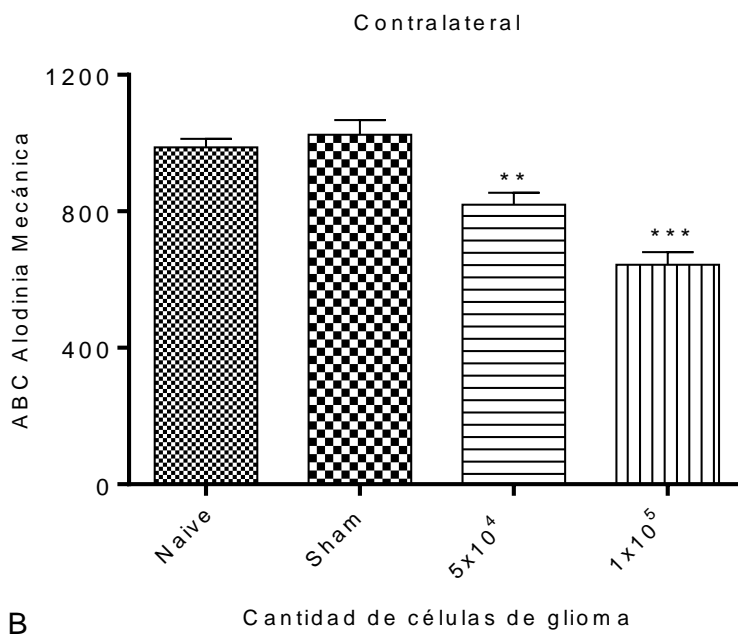
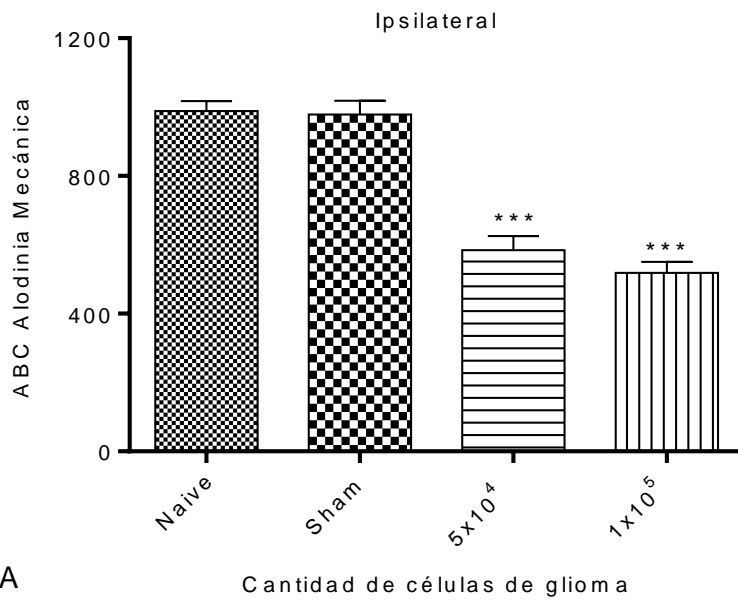


Figura 48. ABC de alodinia mecánica; inoculación de 5×10^4 vs 1×10^5 células.

Alodinia mecánica ipsilateral (A) y contralateral (B). Los resultados se expresan como la media del ABC \pm E.E., n=8. *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$ vs Sham.

En la **figura 49** se muestra el ABC de la conducta de hiperalgesia térmica ipsilateral (A) y contralateral (B). Se observó que ambos grupos presentan una disminución en la latencia de retiro, presentando la conducta de hiperalgesia térmica en la prueba ipsilateral y contralateral en comparación con el grupo Sham.

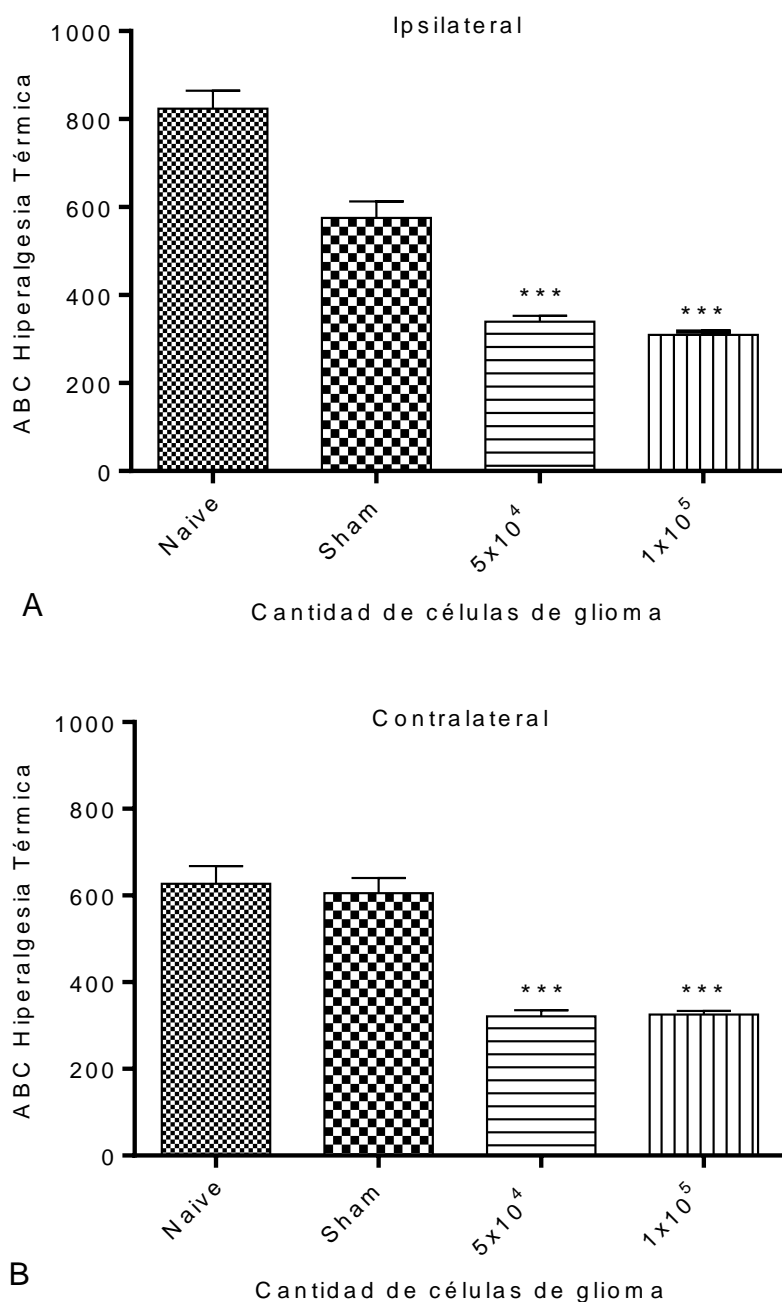


Figura 49. ABC de hiperalgesia térmica; inoculación de 5x10⁴ vs 1x10⁵ células.

Hiperálgesia ipsilateral (A) y contralateral (B). Los resultados se expresan como la media del ABC ± E.E., n=8.

*** $p < 0.001$ vs Sham.

En esta sección se mostró un análisis de la comparación de las conductas resultantes entre la inoculación de 1×10^5 y 5×10^4 células para las conductas de alodinia mecánica e hiperalgesia térmica, donde se decidió utilizar para validar nuestro modelo la cantidad de 1×10^5 células.

8.5 Evaluación del efecto de la administración de fármacos

La respuesta farmacológica en el modelo experimental se presenta a continuación con los cursos temporales correspondientes de alodinia mecánica e hiperalgesia térmica, ipsilateral y contralateral, de la administración de tramadol en la dosis de 31.6 mg/kg y gabapentina en la dosis de 56.23 mg/kg, vía subcutánea, una vez al día durante 24 días, a partir de los 15 días post-inoculación, en el grupo inoculado con 1×10^5 células.

8.5.1 Efecto anti-alodínico del tratamiento de tramadol

La [figura 50](#) muestra la respuesta de la administración de tramadol (31.6 mg/kg) al realizar la prueba de alodinia mecánica ipsilateral (A) y contralateral (B). Observándose que el tramadol produce una respuesta anti-alodínica ipsilateral y contralateral a partir de los 3 primeros días de tratamiento (18 días post-inoculación).

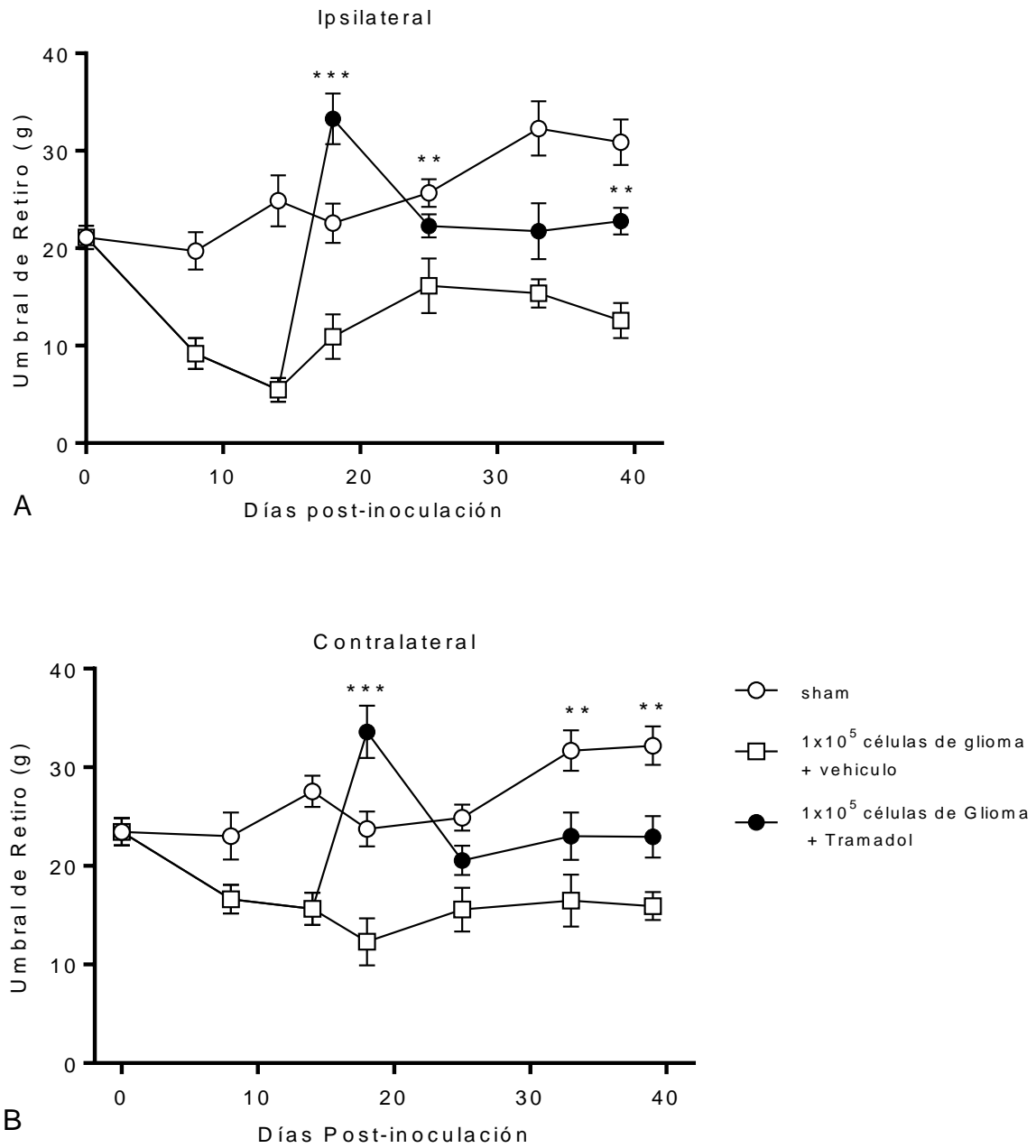


Figura 50. Efecto anti-alodínico del tratamiento de tramadol.

Efecto anti-alodínico ipsilateral (A) y contralateral (B) de la administración crónica de tramadol (31.6 mg/kg). Los resultados se expresan como la media (g) ± E.E., n =8. ***p<0.001, **p<0.01 vs vehículo.

8.5.2 Efecto anti-alodínico del tratamiento de gabapentina

En la figura 51 se muestra la respuesta de la administración de gabapentina (56.23 mg/kg) al realizar la prueba de alodinia mecánica ipsilateral (A) y contralateral (B), observándose que la gabapentina produce un efecto anti-hiperalgésico ipsilateral y contralateral a partir del tercer día de tratamiento (18 días post-inoculación).

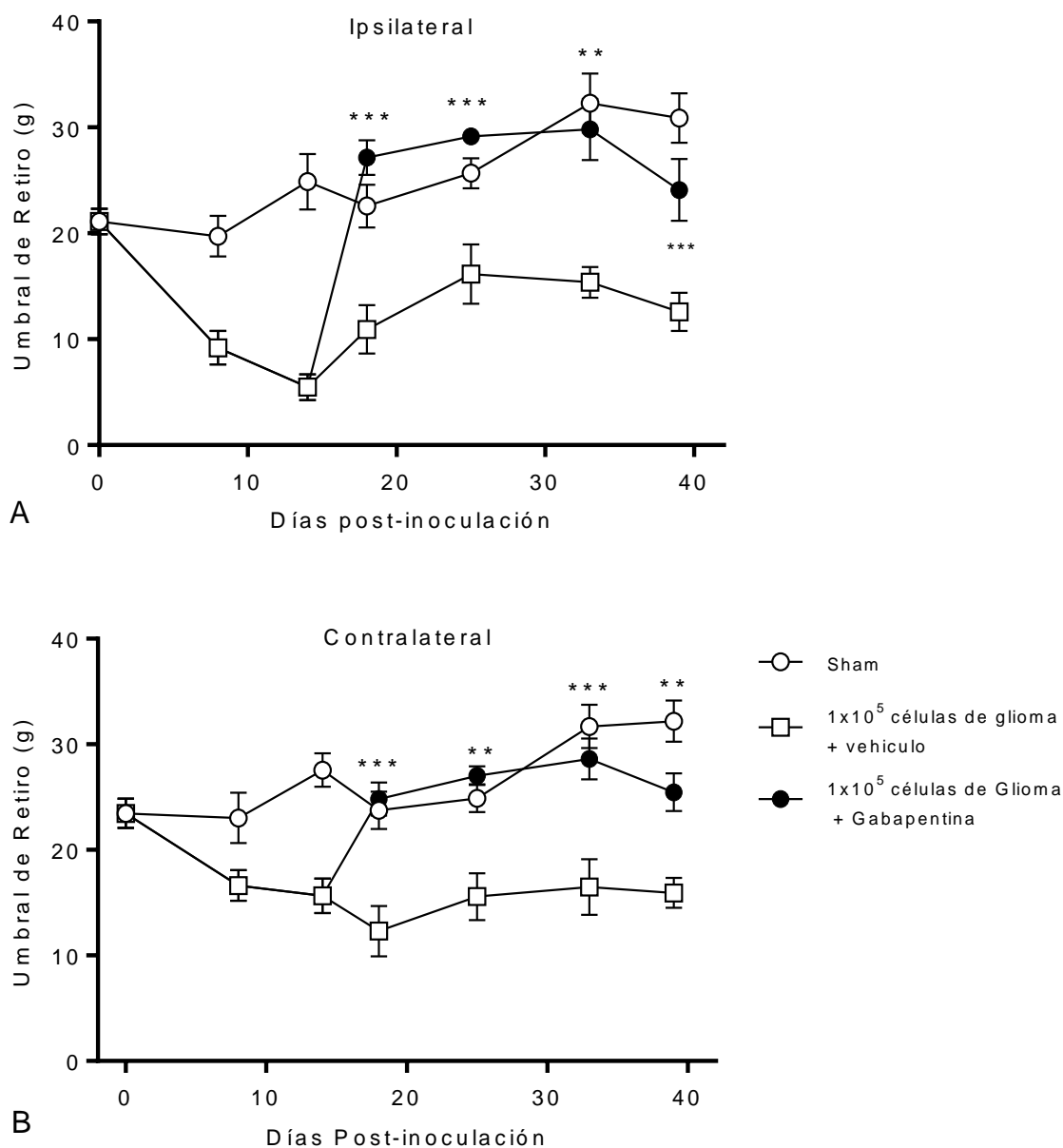


Figura 51. Efecto anti-alodínico del tratamiento de gabapentina.

Efecto anti-alodínico ipsilateral (A) y contralateral (B) de la administración crónica de gabapentina (56.23 mg/kg). Los resultados se expresan como la media (g) ± E.E., n = 8. ***p<0.001, **p<0.01 vs vehículo.

8.5.3 Efecto anti-hiperalgésico del tratamiento de tramadol

En la [figura 52](#) se muestra la respuesta de la administración de tramadol (31.6 mg/kg) al realizar la prueba de hiperalgesia térmica ipsilateral (A) y contralateral (B), donde se puede observar que se produce un efecto anti-hiperalgésico ipsilateral y contralateral a partir del tercer día de administración del tramadol (18 días post-inoculación).

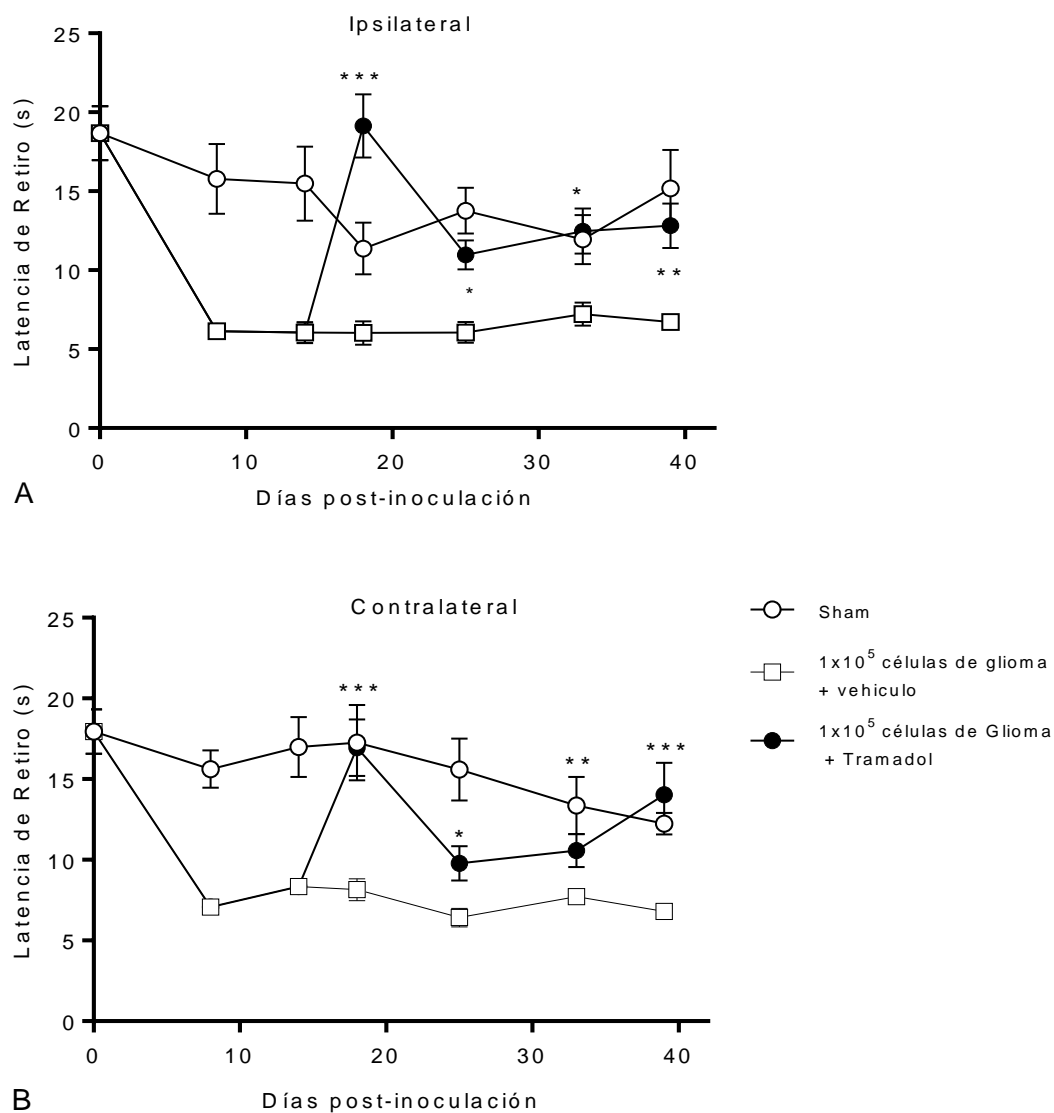


Figura 52. Efecto anti-hiperalgésico del tratamiento de tramadol.

Efecto anti-hiperalgésico ipsilateral (A) y contralateral (B) de la administración crónica de tramadol (31.6 mg/kg). Los resultados se expresan como la media (s) \pm E.E., n = 8. ***p < 0.001, **p < 0.01, *p < 0.05 vs. vehículo.

8.5.4 Efecto anti-hiperalgésico del tratamiento de gabapentina

En la [figura 53](#) se muestra la respuesta de la administración de gabapentina al realizar la prueba de hiperalgesia térmica ipsilateral (A) y contralateral (B), observándose que la gabapentina no produce un efecto anti-hiperalgésico ipsilateral y contralateral, excepto a los 40 días post-inoculación que presentó un aumento en el efecto anti-hiperalgésico.

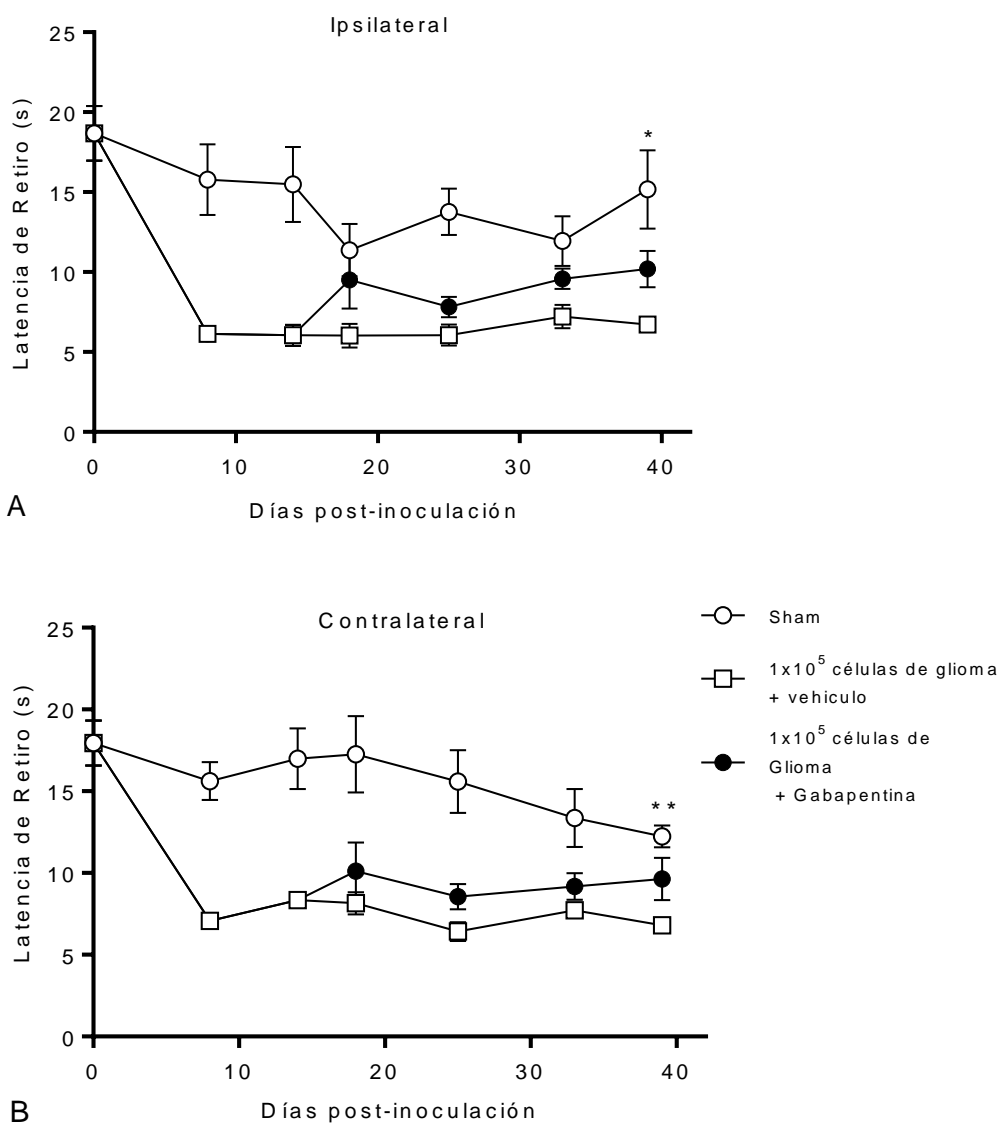


Figura 53. Efecto anti-hiperalgésico del tratamiento de gabapentina.

Efecto anti-hiperalgésico ipsilateral (A) y contralateral (B) de la administración crónica de gabapentina (56.23 mg/kg). Los resultados se expresan como la media (s) \pm E.E., n =8. **p<0.01, *p<0.05 vs vehículo.

8.5.5 Comparación de tratamientos; tramadol vs gabapentina

En la [figura 54](#) se muestra el ABC de la respuesta de la administración de tramadol (31.6 mg/kg) y gabapentina (56.23 mg/kg) de la prueba de alodinia mecánica ipsilateral (A) y contralateral (B), observándose que ambos grupos presentan un efecto anti-alodínico ipsilateral y contralateral en comparación con el vehículo. El tratamiento con tramadol y gabapentina no fue estadísticamente significativo.

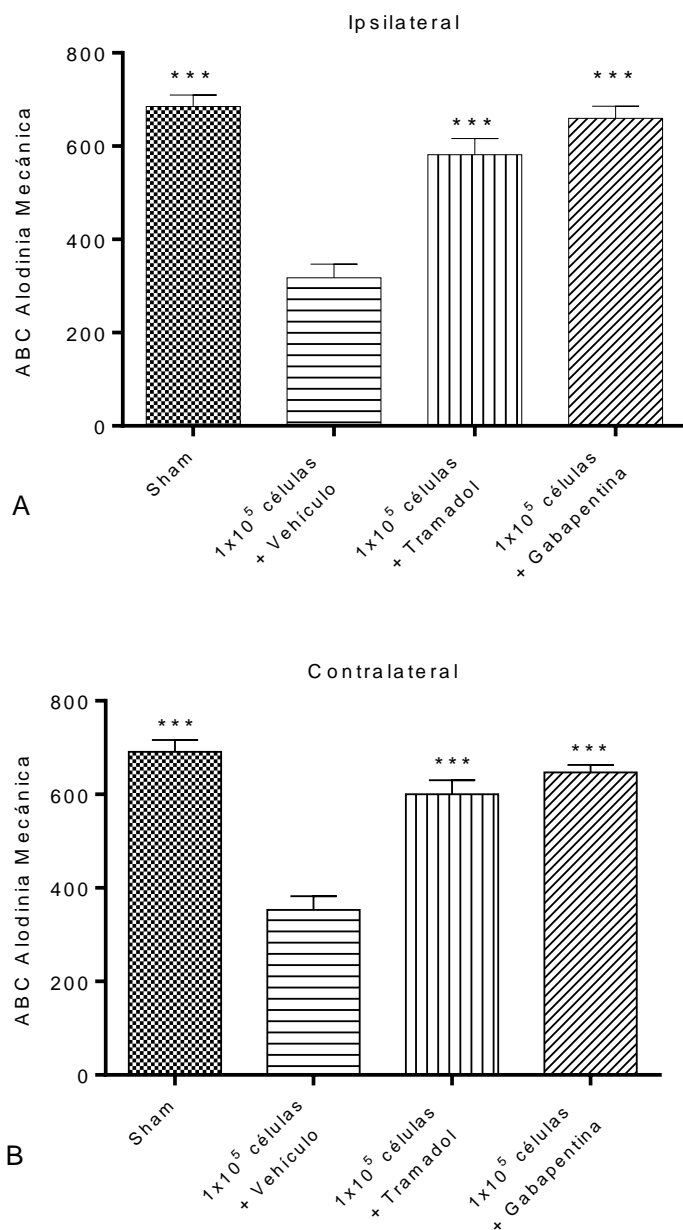


Figura 54. ABC de efecto anti-alodínico de la administración de tramadol y gabapentina.

Se muestra el ABC del efecto anti-alodínico ipsilateral (A) y contralateral (B). Los resultados se expresan como la media del ABC \pm E.E., n =8. *** $p < 0.001$ vs vehículo.

La **figura 55** muestra el ABC de la respuesta de la administración de tramadol (31.6 mg/kg) y gabapentina (56.23 mg/kg) de la prueba de hiperalgia térmica ipsilateral (**A**) y contralateral (**B**), observándose que el tramadol produce un efecto anti-hiperalgésico ipsilateral y contralateral. Además que la gabapentina no produce un efecto anti-hiperalgésico ipsilateral y contralateral en comparación con el vehículo.

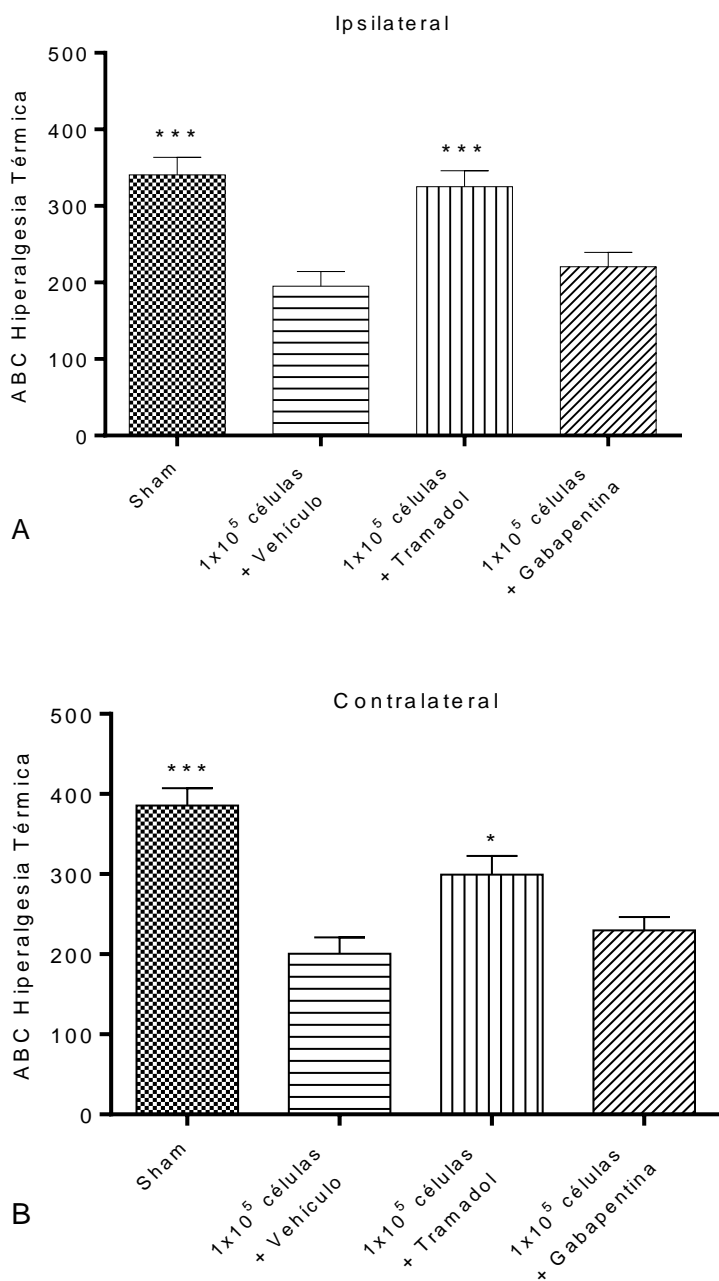


Figura 55. ABC de efecto anti-hiperalgésico de la administración de tramadol y gabapentina.

Efecto anti-hiperalgésico ipsilateral (A) y contralateral (B). Los resultados se expresan como la media del ABC \pm E.E., n =8. *** $p < 0.001$, * $p < 0.05$ vs vehículo.

8.6 Resumen de Resultados

Conducta	Parámetro	Bilateralidad	6x10 ⁵	3x10 ⁵	1x10 ⁵	5x10 ⁴	1x10 ⁵ Tram.	1x10 ⁵ Gbp.
Alodinia Mecánica	Umbral de Retiro (g)	Ipsilateral	↓	↓	↓	↓	↑	↑
		Contralateral	↓	↓	↓	↓	↑	↑
Hiperalgnesia Térmica	Latencia de Retiro (seg)	Ipsilateral	↓	↓	↓	↓	↑	X
		Contralateral	↓	↓	↓	↓	↑	X
Movimiento Ambulatorio	# Cuadros	Horizontal	X	↓	↓	↓		
	# Levantamientos	Vertical	↓	↓	↓	↓		
Lamida y Acicalamiento	T. Lamida y Acicalamiento (seg)	Cuerpo completo	↓	↓	↓	↓		
Movimiento Espontáneo	# Sacudidas de Cuerpo Completo	Cuerpo completo	↑	↑				
	# Sacudidas de Extremidades delanteras	Delantera	↑	↑	↑	↑		
	T. Sacudidas de Extremidad Posterior (seg)	Ipsilateral	X	X	X	X		
		Contralateral	X	X	X	X		
Sobrevida global (días)			8	18	40	46-50		

Tabla 7. Resumen de Resultados

Tram= Tramadol; Gbp= Gabapentina; ↑ = Incremento; ↓ = Decremento.

Los datos de la [tabla 7](#) se describen a continuación.

Al realizar la inoculación de 6x10⁵ células dentro de la cavidad del fémur se presentó una sobrevida entre 9-12 días post-inoculación. Las imágenes de microCT mostraron el crecimiento del tumor y destrucción ósea. Se presentó fractura ósea y reabsorción ósea en fémur, peroné y tibia. Durante dicho tiempo observó ligera disminución del peso. Los animales presentaban pelo frizado a los 8 días post-inoculación

En cuanto a las pruebas conductuales aplicadas para este grupo se observó lo siguiente:

- Decremento en los umbrales de activación (g), latencia de retiró (g), lamida y acicalamiento y movimiento voluntario horizontal y vertical.
- Incremento de la actividad espontánea: sacudidas de cuerpo completo, sacudidas de las extremidades delanteras.
- No se presentó cambio en la actividad de sacudidas de las extremidades posteriores.

De acuerdo a estos resultados y el tiempo de sobrevida corto, fue necesaria la inoculación de una menor cantidad de células para realizar la evaluación de las conductas en un periodo mayor.

Al realizar la inoculación de 3×10^5 células dentro de la cavidad del fémur, se presentó una sobrevida entre los 19-21 días post-inoculación.

De las pruebas conductuales realizadas se observó lo siguiente:

- Un decremento de los umbrales activación, latencia de retiro, lamida y acicalamiento y movimiento ambulatorio horizontal y vertical.
- Un incremento en la actividad espontánea: sacudidas de cuerpo completo y sacudida de extremidades delanteras.
- No se presentó cambio en la actividad de sacudidas de las extremidades posteriores.

De lo anterior se concluye que la cantidad de células de glioma a utilizar debe de ser menor, ya que el tiempo de sobrevida no fue suficiente para la observación de la pruebas conductuales, la mayoría de los animales presentó metástasis a órganos distantes.

El grupo de animales inoculados con la cantidad 1×10^5 células presentó un tiempo de sobrevida entre 41 a 45 días post-inoculación, permitiendo el tiempo suficiente para llevar a cabo el estudio de las conductas. Las imágenes de microCT mostraron mínimo crecimiento de las células cancerosas y mínima destrucción ósea en comparación con el grupo inoculado con 3×10^5 células.

De las pruebas conductuales realizadas se observó lo siguiente:

- Un decremento de los umbrales activación, latencia de retiro, lamida y acicalamiento y movimiento ambulatorio horizontal y vertical.

- Un incremento en la actividad espontánea: sacudidas de cuerpo completo y sacudida de extremidades delanteras.
- No se presentó cambio en la actividad de sacudidas de las extremidades posteriores.

De acuerdo a los resultados, se presentó un tiempo de observación y aplicación de las pruebas conductuales adecuado, un tiempo de sobrevida mayor en comparación con los grupos inoculados con 6×10^5 y 3×10^5 células. Tratando de optimizar dichas condiciones, se disminuyó la cantidad a 5×10^4 células.

La inoculación de 5×10^4 células presentó un tiempo de sobrevida entre 46 a 50 días post-inoculación. Presentando tiempo suficiente para la observación y aplicación de las pruebas conductuales. Las imágenes de microCT mostraron poco crecimiento de células cancerosas y mínima destrucción ósea en comparación con los grupos inoculados con 3×10^5 y 6×10^4 .

- Un decremento de los umbrales activación, latencia de retiro, lamida y acicalamiento y movimiento ambulatorio horizontal y vertical.
- Un incremento en la actividad espontánea: sacudidas de cuerpo completo y sacudida de extremidades delanteras.
- No se presentó cambio en la actividad de sacudidas de las extremidades posteriores.

Por todo lo anterior y analizando las conductas de hipersensibilidad de alodinia e hiperalgia, producidas por las cantidades de 1×10^5 y 5×10^4 células, se observó que ambas cantidades muestran las condiciones necesarias para la estandarización del modelo de dolor inducido por inoculación de células de gliomas. Debido una mejor manipulación de la cantidad de 1×10^5 células y un ligero incremento de hipersensibilidad, se consideró que dicha cantidad de células es adecuada para estandarizar el modelo.

El modelo de dolor inducido por la inoculación de células de glioma dentro del fémur se estandarizó por lo tanto con el uso de 1×10^5 células, donde se probaron los fármacos de tramadol en una dosis de 31.6 mg/kg y gabapentina en una dosis de 56.23 mg/kg, donde dicha administración 1 vez al día durante 24 días, produjo un efecto anti-alodínico para ambos fármacos y un efecto anti-hiperalgésico solo para tramadol.

IX. Discusión

Varios estudios post-mortem en seres humanos han reportado metástasis extracraneal en órganos como páncreas, pleura, intestino delgado, riñón, pulmones, nódulos linfoides, hígado, entre otros (Pasquier, B. y cols., 1980; Mujic, A. y cols., 2004). Además, varias publicaciones de estudios clínicos (Kleinschmidt-Demasters y cols., 1996; Demeulenaere y cols., 2016) mostraron el desarrollo de metástasis extracraneal en el sistema óseo por Glioblastoma Multiforme (GBM). Al respecto, Ng y cols. (2005) hicieron una revisión en la literatura en la cual mostraron 52 casos de pacientes en los que se ha presentado metástasis extracraneal, reportando como tumor primario al glioblastoma multiforme, en sitios como el lóbulo; parietal, frontal-lateral, frontal, parietal, temporal, parieto-occipital, temporo-parietal, tálamo, cerebelo, entre otros, que produjo metástasis hacia médula espinal, médula torácica, diferentes niveles de la médula, diferentes partes de la vertebras, astas espinales, hueso iliaco, entre otros. Además, ensayos experimentales demuestran que en el torrente sanguíneo de 141 pacientes con glioma maligno, GBM o astrocitoma de grado IV se encontraron células tumorales circulantes (CTC) (Müller C. y cols., 2014). También se ha reportado el desarrollo de diferentes técnicas para el diagnóstico de metástasis por glioma (Macarthur y cols., 2014) e identificar el cáncer primario y poder llevar a cabo un mejor tratamiento. Sin embargo, existen varias hipótesis donde el glioma atraviese la barrera hematoencefálica (BHE) e invade partes adyacentes al tumor primario (Goodwin y cols., 2016). Thompson y Sontheimer (2016) publicaron una nueva teoría donde explican cómo es que el glioma puede atravesar la BHE. En este sentido, donde las células de glioma se enfrentan a barreras espaciales durante la invasión perivascular con enzimas proteolíticas, metaloproteinas (MMPs), las cuales degradan componentes de la base de la membrana. Además, las células de glioma expresan canales iónicos los cuales permiten cambios volumétricos. También los astrocitos regulan el tono vascular por medio de la liberación de moléculas vasoactivas que activan células vasculares del musculo liso (VSCM). Se ha reportado que la sobrevivencia por metástasis extracraneal de pacientes con metástasis extracraneal después su primer diagnóstico es de 1.5 meses (Lun y cols. 2011). En una revisión de casos clínicos se indicó que de 28 casos clínicos estudiados, se tuvo el conocimiento del tiempo de sobrevivencia de 25

personas, de los cuales el mayor número de pacientes tuvo un tiempo de supervivencia de 12 a 23 meses ([Goodwin y cols., 2016](#)).

El objetivo de nuestro proyecto fue desarrollar un modelo de dolor inducido por la inoculación de células de glioma C6 en el fémur de la rata, para mimetizar dicha patología y demostrar que es posible el crecimiento de células de glioma en el sistema óseo. Además, el cáncer ya instalado puede producir metástasis a otros órganos. Otro de nuestros objetivos fue caracterizar nuestro modelo de dolor inoculando diferentes cantidades de células de glioma, donde se tuvo que la mejor cantidad de células impladas fue 1×10^5 . Además, se caracterizaron las respuestas nociceptivas como alodinia e hiperalgesia en ratas inoculadas con 1×10^5 células y se evaluaron los posibles efectos anti-nociceptivos de Tramadol y Gabapentina en estas condiciones. Se presentó un tiempo de supervivencia mayor a los 40 días post-inoculación para los grupos inoculados con 1×10^5 y 5×10^4 células, mientras que los grupos inoculados con 3×10^5 y 6×10^5 células tuvo un tiempo de supervivencia entre 10 y 20 días post-inoculación. De lo anterior se puede observar que el GBM si es un cáncer agresivo, que crece rápidamente y es instalación rápida.

En nuestros ensayos se presentaron conductas nociceptivas como alodinia, hiperalgesia y dolor espontáneo, donde la presencia de dichas conductas se presentaron a los 8 días post-inoculación y aumentaron de manera gradual hasta mantenerse casi constantes a partir de 15 días post-inoculación, como lo reportado por [Dy y cols. \(2008\)](#), el estudio describe a este tipo de dolor que se produce de forma constante y aumenta gradualmente en intensidad con el tiempo. También, [Mercadante y cols. \(2004\)](#) reportaron que el continuo crecimiento de células cancerosa dentro de los huesos puede producir un segundo tipo de dolor conocido como incidental o severo. Este dolor irruptivo o incidental agudo e impredecible, severo, debilitante y difícil de controlar ([Coleman, 1997; Ke y cols., 2013](#)).

Referente al desarrollo de modelos animales de dolor inducidos por cáncer [Pacharinsak y Beitz \(2008\)](#) realizaron una revisión de investigaciones en el desarrollo de modelos de dolor óseo inducido por la inoculación de diferentes tipos de cáncer, cantidades de células, especies e inoculación en diferentes partes del sistema óseo. También en la publicación de [Dong y cols. \(2016\)](#), reportaron el desarrollo de un modelo de dolor inducido

por la inoculación de células de carcinoma de glándula mamaria Walker 256. Los autores reportaron la inoculación de las cantidades de 3×10^5 , 3.5×10^5 y 4×10^5 células. Demostrando que el desarrollo de la conducta nociceptiva es dependiente de la cantidad de células inoculadas, donde la cantidad de 3.5×10^5 presentó el mayor grado de conducta dolorosa, con baja mortalidad, mientras que las dosis de 3.5×10^5 y 4×10^5 presentó progresiva destrucción del hueso. Todo lo anterior fue similar a lo que se presentó en nuestro modelo. La intensidad de la conducta nociceptiva es directamente proporcional al número de células inoculadas (figuras 24, 25, 30 y 31).

Nuestro estudio demostró que es posible desarrollar un modelo de dolor inducido cáncer, crear un microambiente en el cual células de glioma crezcan en el sistema óseo y produzcan una lesión de tipo osteolítica, como lo reportado por [Sadik y cols. \(1984\)](#) y [Wisio y cols. \(1962\)](#) donde ellos indicaron metástasis extracraneal en estudios post-mortem con una producción de lesiones de tipo osteolítica. Así, nuestro estudio es el primero en reportar que las células de Glioma C6 de Rata produce este tipo de lesión en el sistema óseo. Cabe mencionar que dicha lesión, ya sea osteolítica u osteoblástica, se producen dependiendo del tipo de célula cancerosa inoculada. [Fernandes y cols., \(2016\)](#) realizaron una revisión en la literatura reportando que las líneas de cáncer de mama y próstata de especies como canino, rata, ratón o humano; producen diferentes tipos de lesiones.

Las imágenes de microCT tomadas en los grupos inyectados con diferentes cantidades de células confirmaron la destrucción ósea. La inoculación de 6×10^5 y 3×10^5 células produjo destrucción ósea (figuras 15 y 16) y por medio de la disección post-mortem en dichos grupos se verificó fractura ósea, reabsorción ósea en fémur, peroné y tibia. Mientras que en lo grupos inoculados con 1×10^5 y 5×10^4 células (para el tiempo de observación), estos mostraron integridad ósea (figuras 17 y 18). Durante dicho tiempo no se observó pérdida de peso considerable ninguno de los diferentes. De la misma manera [Jimenez y cols., \(2010\)](#) reportaron una revisión de dolor por cáncer óseo, mostrando de la misma manera que nosotros una serie de imágenes de MicroCT de la degradación o crecimiento del fémur, según sea el caso, para la inoculación de células de carcinoma de próstata ACE-1. Las imágenes mostraron una lesión osteoblástica y para la inoculación de sarcoma 2472 mostraron una lesión

de tipo osteolítica. Varias investigaciones similares también han publicado imágenes de microCT en las cuales además cuantificaron el grado de daño producido en el sistema óseo, entre otras características (Honore y Mantyh, 2000; Lozano-Ondoua y cols., 2010; Schwei y cols., 2010; Duan y cols., 2012). También Muralidharan y cols., (2013) publicaron que imágenes a los 21 días post-inoculación de la línea de cáncer de próstata AT3B produjo un claro crecimiento de células cancerosas dentro de la tibia, de la misma manera que se mostró en las nuestras imágenes de 6×10^5 células.

Varias investigaciones en el dolor inducido por cáncer muestran imágenes histológicas que aplican la técnica de hematoxilina-eosina, donde dicha técnica nos permite observar los tres tipos de lesiones tanto osteoblásticas, osteoclasticas y mixtas (Schwei y cols., 1999; Jimenez-Andrade y cols., 2010, Doré-Savard y cols., 2010). Mientras tanto, nuestras imágenes histológicas de los diferentes grupos mostraron que los grupos inoculados con 1×10^5 y 5×10^4 células se mantuvieron con integridad ósea hasta los 40 días post-inoculación (figuras 21 y 23), además sin metástasis en bazo, hígado y riñón (figura 22), pero el grupo inoculado con 3×10^5 células mostró, pérdida de arquitectura ósea tanto del hueso trabecular, como liso, pérdida de placa de crecimiento ósea, sustitución de médula ósea por células de glioma (figura 18), de la misma forma Duan y cols. (2012) reportaron imágenes histológicas tomadas en animales inoculados con células de carcinoma de glándula mamaria Walker 256 mostrando características similares a nuestras imágenes histológicas, sustitución de células normales por células cancerosas, pérdida ósea, entre otras características. Además, los autores publicaron que el tratamiento durante 10 días, una vez al día de 0.5 mg/kg de diclofenaco vía i.p., produce un efecto de protección y recuperación ósea. De manera adicional, nosotros presentamos imágenes de cortes de pulmón del grupo inoculado con 3×10^5 células, donde dichas imágenes nos mostraron pérdida de arquitectura (bronquiolos y alveolos), crecimiento de nuevos vasos sanguíneos y sustitución de células sanas por células de glioma, lo que indica una clara metástasis a los 18 días post-inoculación (figura 20).

Nuestros ensayos mostraron la presencia de conductas nociceptivas, la alodinia mecánica y la hiperalgesia térmica, dichas conductas fueron determinadas en todos los grupos que fueron inyectados con las diferentes cantidades de células, dicha conducta se presentó

generalmente entre los 8 y 15 días post-inoculación, mostrando un aumento conductual dependiente de la cantidad de células inoculadas, es decir a mayor cantidad, mayor hipersensibilidad, de la misma manera en cuanto a la presencia de alodinia mecánica e hiperalgesia térmica, [Muralidharan y cols. \(2013\)](#) reportaron la presencia de alodinia mecánica e hiperalgesia térmica, mostrando una reducción de dichas conductas a diferencia del grupo Sham, donde dicha reducción se observó a partir del día 9 post-inoculación y hasta el día 80 post-inoculación, dichas conductas determinadas en un modelo de dolor inducido por la inoculación de 4×10^4 células de cáncer de próstata AT3B dentro de la tibia de rata Wistar macho. También, [Duan y cols. \(2012\)](#) publicaron un trabajo en el cual desarrollaron un modelo de dolor inducido por la inoculación de Carcinoma de Glándula mamaria Walker 256 dentro de la tibia de ratas Wistar hembra, en el cual determinaron las conductas de alodinia mecánica e hiperalgesia térmica, observando que a partir de los 14 días post-inoculación la presencia de alodinia mecánica e hiperalgesia térmica se presentaba claramente, ellos también demostraron que la administración de 0.5 mg/kg de diclofenaco vía intraperitoneal, una vez al día durante 10 días, reduce de manera significativa dichas conductas para el día 17 post-inoculación, demostrando entonces la participación de un mecanismo activado por liberación de prostaglandinas, inhibido por la administración de dicho AINE. [Shenoy y cols. \(2017\)](#) publicaron la modulación central que implica el dolor inducido por cáncer, que tiene como resultado la producción de conductas nociceptivas tanto del lado ipsilateral como contralateral, como resultaron nuestros ensayos, donde en todas mediciones contralaterales nociceptivas se presentaron, implicando la presencia entonces no solo de mecanismos periféricos, sino la participación de mecanismos centrales. Como lo reportado en mecanismos fisiopatológicos del dolor neuropático que implica modulación a nivel central y periférico (De la O-Arciniega y cols., 2007). Hasta este momento no se había demostrado que la inoculación de glioma produjera conductas nociceptivas periféricas y centrales, fractura del sistema óseo y un proceso de osteolisis, como lo ha demostrado nuestros resultados.

Por todo lo anterior, nosotros establecimos un modelo de dolor inducido por la inoculación de 10^5 células de glioma (línea celular glioma C6) dentro de la cavidad del fémur, dicho modelo mimetiza la metástasis en sistema óseo producida por cáncer de SNC, que se realizó mediante una artrotomía para exponer los cóndilos del fémur e inocular células dentro

de esta cavidad. Y ya con la instalación de la células dentro del fémur se determinaron diferentes conductas nociceptivas. Dicho modelo mostró un amplio tiempo de estudio con una sobrevida mayor a los 40 días.

Para determinar el efecto de algunos fármacos en la patología de dolor inducido por la inoculación de células, de manera específica en estas condiciones y de manera muy importante para que nuestro modelo fuera validado, fueron administrados dos grupos de animales con las dosis de 31.6 mg/kg de tramadol y 56.23 mg/kg de gabapentina, de lo cual se observó que ambos fármacos tienen un efecto anti-alodínico mecánico, pero no un efecto anti-hiperalgésico térmico para el caso de la gabapentina, pero si para el tramadol. De la misma manera estudios previos en el laboratorio han mostrado que la gabapentina produce efectos anti-nociceptivos en el modelo de constricción crónica del nervio ciático (CCI), administrada por vía oral. También que la dosis de 10 mg/kg de gabapentina en combinación con meloxicam y tramadol, reduce de manera exitosa la hiperalgesia y alodinia ([Corona-Ramos y cols., 2016](#)). Además se ha reportado que la asociación de opioides con gabapentina también producen un efecto anti-nociceptivo en el modelo de CCI del nervio ciático en rata ([De la O-Arciniega y cols., 2009](#)).

Los comportamientos como la alodinia y la hiperalgesia son parámetros que se han utilizado previamente para estudiar la farmacología y la modulación del dolor del cáncer óseo ([Muralidharan y cols., 2013](#); [Yuan y cols., 2014](#)). Nuestro modelo presenta muchas de las propiedades fisiopatológicas del dolor neuropático crónico, que también ha sido referida en sujetos humanos, como la alodinia y la hiperalgesia ([Bennett y Xie, 1988](#); [De Vry y cols., 2004](#)). También se ha reportado que comportamientos como la disminución en la protección de las extremidades, el uso de los miembros mientras se realiza movilización voluntaria en un campo abierto y un incremento de la actividad espontánea produjeron un dolor continuo, también estos comportamientos producidos por el mismo mecanismo, incremento de la actividad osteoclástica y un medio ácido ([Honore y cols., 2000a](#)).

El presente estudio demostró que Tramadol y Gabapentina tienen actividad anti-alodínica y sólo Tramadol produce una respuesta anti-hiperalgésica. Nuestros hallazgos están

respaldados por resultados similares obtenidos por otras investigaciones que demuestran que la gabapentina y el tramadol produjeron alivio del dolor de cáncer de hueso tanto en modelos de roedores como en humanos (Caraceni y cols., 2004, 2008; Donovan-Rodríguez y cols., 2005; Peters y cols., 2005; Muralidharan y cols., 2013; Yuan y cols., 2014). Debe hacerse hincapié en que los mecanismos subyacentes del dolor inducido por cáncer no se conocen claramente. Sin embargo, la evidencia reciente sugiere que la destrucción ósea, los espasmos musculares, la concentración sanguínea de los iones de calcio y la liberación de mediadores inflamatorios por parte de las células tumorales están implicados en la etiología del dolor inducido por cáncer (Mercadante y Fulfuro, 2007; Jiménez-Andrade y cols., 2010). Estudios en seres humanos y animales han sugerido que el dolor inducido por el cáncer es una condición patológica, donde predomina tanto el dolor inflamatorio como los mecanismos de dolor neuropático (Honore y cols., 2000a, b). La unión de ambos mecanismos es lo que produce los comportamientos hiperalgésicos y alodínicos (Jiménez-Andrade y cols., 2010).

Múltiples mecanismos están implicados en la reducción de los comportamientos tanto alodínicos como hiperalgésicos, en este sentido, los opiáceos y los antidepresivos tricíclicos son ampliamente utilizados para el alivio del dolor de cáncer óseo. Además, se ha reportado que Tramadol, un analgésico opioide, tiene afinidad débil por los receptores opioides (Jiménez-Andrade y cols., 2010; Schneider y cols., 2012). Esto se relaciona con un efecto anti-alodínico en el modelo de dolor por la ligadura parcial del nervio ciático y la mialgia inducida por reserpina (Kaneko y cols., 2014), se ha informado de que los mecanismos implicados son activados por canales K⁺ rectificadores recíprocos acoplados a proteína G. Esta inhibición indirecta de la afluencia de Ca²⁺ inhibe los impulsos nociceptivos (Frink y cols., 1996). La vía L-arginina/óxido nítrico se ha relacionado con el efecto antinociceptivo producido por Tramadol en un modelo de dolor neuropático en ratas (Okuducu y Onal, 2005) e inhibe la activación inducida por ligadura nerviosa de astrocitos espinales (Sakakiyama y cols., 2014). Nuestro grupo de trabajo ha demostrado que gabapentina produce una respuesta anti-alodinia. Los efectos anti-alodínicos de este fármaco implican acciones en muchos sitios: colinérgicos, adrenérgicos (Takuchi y cols., 2007), gabaérgicos (Yoshizumi y cols., 2012), calcio inhibidor del óxido nítrico (Moalem y Tracey, 2006), modulación de la subunidad $\alpha 2\delta$ del canal de Ca²⁺ dependiente de voltaje (Cohen y col., 1994) y posteriormente, la inhibición de la liberación de neurotransmisores excitadores (por ejemplo, sustancia P, gen relacionado

con el péptido de la calcitonina, glutamato, aspartato y norepinefrina) de las fibras nerviosas aferentes primarias en la vía del dolor (Feng y col., 2003; Taylor y cols., 2007; Quintero y cols., 2011; Yang y cols., 2012). Por lo tanto, el efecto anti-nociceptivo de Gabapentina y Tramadol puede deberse a su inhibición de estos mecanismos fisiopatológicos implicados en el dolor inducido por cáncer.

Otros comportamientos relacionados en la patología fueron detectados y cuantificados. Se observó que en esta patología disminuye la actividad voluntaria horizontal y vertical, además de un aumento en el comportamiento espontáneo y una disminución de lamida y acicalamiento. Sugerimos que la actividad locomotora voluntaria, tanto horizontal (área cruzada) como vertical (levantamiento sobre dos patas) disminuye debido a la actividad nociceptiva que ocurre. Lo anterior nos sugiere que la presencia de alodinia, esto nos indica que ante un estímulo de presión no-nocivo produce un comportamiento doloroso. Del mismo modo, Honore y cols. (2000a) han reportado disminución del movimiento involuntario en el uso de la extremidad en la prueba de campo abierto indicando que la principal causa principal de esta conducta, se debe a un aumento en la actividad de los osteoclastos, que tiene como resultado la producción de un medio ácido y degradación de los huesos. Estas dos condiciones resultantes producen una regulación a la alta de canales iónicos sensibles a ácido (ASIC) y de receptores de potencial transitorio (TRP), esta actividad de los receptores desempeña un papel en el mecanismo del dolor en curso.

Respecto a la conducta de lamido y acicalamiento, estudios realizados por Sasamura y cols. (2002) y Cheppurida (2006) reportaron la cuantificación de lamido de la extremidad lesionada, mostrando que este comportamiento aumento con el estado patológico. Estos resultados son diferentes a los nuestros, ya que nosotros reportamos la disminución de lamida y acicalamiento, y sugerimos que dicha disminución en el comportamiento se debe a la presencia de la alodinia en el proceso patológico. Sasamura y cols. (2002) y Fujita y cols. (2010) informaron el comportamiento de lamida como un parámetro en el aumento del dolor espontáneo en un modelo de dolor, donde inocularon células de melanoma en la región plantar de la pata trasera. Mientras que Cheppurida (2006) reportó un aumento de la conducta de lamida producida por la aplicación de un estímulo térmico nocivo en un modelo de

inflamación crónica. Nosotros reportamos que la conducta de lamida y acicalamiento disminuye indicando un decremento del movimiento voluntario debida a la presencia de alodinia y hiperalgesia, pero no como un aumento en el dolor espontáneo, detectamos el dolor espontáneo mediante la cuantificación del número de sacudidas de cuerpo completo y de extremidades superiores, y no por la aplicación de algún estímulo. De forma similar, se ha detectado un aumento en la actividad espontánea en varios estudios sobre modelos de dolor inducido por cáncer, por ejemplo [Honore y cols. \(2000a\)](#) y [Jiménez-Andrade y cols. \(2010\)](#) han cuantificado el número de retiro espontánea de la extremidad trasera como un comportamiento del dolor espontáneo.

X. Conclusiones

La inoculación de la cantidad de 1×10^5 células dentro de la cavidad del fémur derecho de rata Wistar hacen posible el desarrollo de un modelo preclínico de dolor inducido por cáncer que permite la evaluación de alodinia mecánica, hiperalgesia térmica, y dolor espontáneo.

Se demostró que el Tramadol y Gabapentina producen efectos anti-nociceptivos en este modelo de cáncer. Por lo tanto, es importante considerar estos resultados para la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas para prevenir y aliviar el dolor, mejorando la calidad de vida de las personas que sufren de cáncer.

XI. Perspectivas

Evaluar opciones terapéuticas para el dolor en cáncer utilizando el modelo desarrollado.

Evaluar con nuestro modelo varios fármacos entre ellos los AINEs, antidepresivos, anticonvulsivantes, opiáceos, combinaciones de todos estos, entre otros.

Llevar a cabo la detección de mediadores inflamatorios (interleucinas, quimiocinas, $\text{TNF}\alpha$, entre otros) y correlacionarlos con la conducta dolorosa.

XII. Referencias

- Adriaensen, H., Gybels, J., Handwerker, H. O., y Van Hees, J. (1980). Latencies of chemically evoked discharges in human cutaneous nociceptors and of the concurrent subjective sensations. *Neuroscience Letters*, 20(1):55–59.
- Alsina, M., Boyce, B., Devlin, R. D., Anderson, J. L., Craig, F., Mundy, G. R. y Roodman, G. D. (1996). Development of an in vivo model of human multiple myeloma bone disease. *Blood*, 87(4):1495–1501.
- Arnoldi, C. C. (1990). Intraosseous engorgement-pain syndromes. The pathomechanism of pain, in bone circulation and bone necrosis. *Springer-Verlag Berlin Heidelberg*, 253–259.
- Baliki, M. N., Geha, P.Y., Apkarian, A.V. y Chialvo, D. R. (2008). Beyond feeling: chronic pain hurts the brain, disrupting the default-mode network dynamics. *Journal Neuroscience*, 28(6):1398–1403.
- Bandieri, E., Romero, M., Ripamonti, C. I., Artioli, F., Sichetti, D., Fanizza, C., Santini, D., Cavanna, L., Melotti, B., Conte, P. F., Roila, F., Cascinu, S., Bruera, E., Tognoni, G. y Luppi, M. (2016). Randomized trial of low-dose morphine versus weak opioids in moderate cancer pain. *Journal of clinical oncology*, 34(5):436-442.
- Beauchesne, P., Soler, C. y Mosnier, J. F. (2000). Diffuse vertebral body metastasis from a glioblastoma multiforme: a technetium-99m sestamibi single-photon emission computerized tomography study. *Journal of neurosurgery*, 93(5):887–890.
- Bennett, G. J. y Xie, Y. K. (1988). A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain*, 33(1):87-107.
- Bessou, P. y Perl, E. R. (1969). Response of cutaneous sensory units with unmyelinated fibers to noxious stimuli. *Journal Neurophysiology*, 32(6):1025–1043.
- Black, J. A., Nikolajsen, L., Kroner, K., Jensen, T. S. y Waxman, S. G. (2008). Multiple sodium channel isoforms and mitogen-activated protein kinases are present in painful human neuromas. *Annals of neurology*, 64(6):644–653.
- Blume, C., von Lehe, M., van Landeghem, F., Greschus, S. y Bostrom, J. (2013). Extracranial glioblastoma with synchronous metastases in the lung, pulmonary lymph nodes, vertebrae, cervical muscles and epidural space in a young patient—case report and review of literature. *BMC Research Notes*, 6:290.
- Bove, S. E., Flatters, S. J., Inglis, J. J. y Mantyh, P. W. (2009). New advances in musculoskeletal pain. *Brain Research Reviews*. 60(1): 187–201.
- Brown, L. F., Kroenke, K., Theobald, D. E., Wu, J. y Tu, W. (2010). The association of depression and anxiety with health-related quality of life in cancer patients with depression and/or pain. *Psychooncology*, 19(7):734-741.

- Cain, D. M., Khasabov, S. G. y Simone, D. A. (2001) Response properties of mechanoreceptors and nociceptors in mouse glabrous skin: an in vivo study. *Journal Neurophysiology*, 85(4):1561–1574.
- Caraceni, A., Zecca, E., Bonezzi, C., Arcuri, E., Yaya Tur, R., Maltoni, M., Visentin, M., Gorni, G. Martini, C., Tirelli, W., Barbieri, M. y De Conno, F. (2004). Gabapentin for neuropathic cancer pain: a randomized controlled trial from the gabapentin cancer pain study group. *Journal Clinical Oncology*, 22(14):2909-2917.
- Caraceni, A., Zecca, E., Martini, C., Pigni, A., y Bracchi, P. (2008). Gabapentin for breakthrough pain due to bone metastases. *Palliative Medicine Journal*, 22(4):392-393.
- Castañeda, C. A., Casavilca, S., Orrego, E., García-Corrochano, P., Deza, P., Heinike, H., Castillo, M., Belmar-Lopez, C. y Ojeda, L. (2015). Glioblastoma: análisis molecular y sus implicancias clínicas. *Revista peruana de medicina experimental y salud pública*, 32(2):316-325.
- Casuccio, A., Mercadante, S. y Fulfaro, F. (2009). Treatment strategies for cancer patients with breakthrough pain. *Expert opinion on pharmacotherapy*, 10(6):947-953.
- Cheppudira, B. P. (2006). Characterization of hind paw licking and lifting to noxious radiant heat in the rat with and without chronic inflammation. *Journal of Neuroscience Methods*, 15;155(1):122-125.
- CNVECE (2002). Centro Nacional de Vigilancia Epidemiológica y Control de Enfermedades. Registro histopatológico de neoplasias malignas en México, 2002. México: Secretaría de Salud.
- Coleman, R. E. (1997). Skeletal complications of malignancy. *Cancer*, 80(8):1588–1594.
- Corona-Ramos, J. N., De la O-Arciniega, M., Déciga-Campos, M., Medina-López, J. R., Domínguez-Ramírez, A. M., Jaramillo-Morales, O. A., Espinosa-Juárez, J. V. y López-Muñoz, F. J. (2016). The antinociceptive effects of tramadol and/or gabapentin on rat neuropathic pain induced by a chronic constriction injury. *Drug development research*, 77(5):217-226.
- Corona-Vázquez, T., Campillo-Serrano, C., López, M., Mateos-G, J. H. y Soto-Hernández, J. L. (2002). Las enfermedades neurológicas. I. Su dimensión y repercusión social. *Gaceta Médica Mexicana*, 138(6):533-546.
- Costigan, M., Scholz, J. y Woolf, C. J. (2009). Neuropathic pain: a maladaptive response of the nervous system to damage. *Annual Review Neuroscience*, 32:1–32.
- De la O-Arciniega, M., Godínez-Chaparro, B., Guevara-López, U., Cortéz-Arroyo, A. R. y López-Muñoz, F. J. (2007). Anti-hyperalgesic effect of one combination of morphine and gabapentin in neuropathic pain induced by chronic constriction injury in rat. *Cirugía y cirujanos*, 75(5):363-369.

- De Vry, J., Kuhl, E., Franken-Kunkel, P., y Eckel, G. (2004). Pharmacological characterization of the chronic constriction injury model of neuropathic pain. *European Journal of Pharmacology*, 491(2-3):137-148.
- Demeulenaere, M., Duerinck, J., Du four, S., Fostier, K., Michotte, A. y Neyns, B. (2016). Bone marrow metastases from a 1p/19q co-deleted oligodendroglioma - a case report. *Anticancer Research*, 36(8): 4145-4150.
- Desandre, P. L. y Quest, T. E (2009). Management of cancer-related pain. *Emergency Medicine Clinics North America*, 27(2):179-194.
- Dhaka, A., Viswanath, V. y Patapoutian, A. (2006). TRP ion channels and temperature sensation. *Annual Review Neuroscience*, 29:135–161.
- Dong, C., Wu, R., Wu, J., Guo, J., Wang, F., Fu, Y., Wang, Q., Xu, L. y Wang, J. (2016). Evaluation of Bone Cancer Pain Induced by Different Doses of Walker 256 Mammary Gland Carcinoma Cells. *Pain Physician*, 19(7):E1063-77.
- Donovan-Rodríguez, T., Dickeson, A. H., y Urch, C. E. (2005). Gabapentin normalizes spinal neuronal responses that correlate with behavior in a rat model of cancer-induced bone pain. *Anesthesiology*, 102(1):132-140.
- Doré-Savard, L., Otis, V., Belleville, K., Lemire, M., Archambault, M., Tremblay, L., Beaudoin, J. F., Beaudet, N., Lecomte, R., Lepage, M., Gendron, L. y Sarret, P. (2010). Behavioral, medical imaging and histopathological features of a new rat model of bone cancer pain. *PLoS One*, 5(10):e13774.
- Doubell, T. P., Mannion, R. J. y Woolf, C. J (1999). The dorsal Horn: state-dependent sensory processing, plasticity and the generation of pain. In: Wall, P. D., Melzack, R. (eds) *Textbook of pain*. 4ta Ed. Philadelphia: Churchill Livingstone, London, 165-182.
- Drenth, J. P. y Waxman, S.G. (2007). Mutations in sodium-channel gene SCN9A cause a spectrum of human genetic pain disorders. *The Journal of Clinical Investigation*, 117(12):3603–3609.
- Duan, K. Z., Xu, Q., Zhang, X. M., Zhao, Z. Q., Mei, Y. A., y Zhang, Y. Q. (2012). Targeting A-type K⁺ channels in primary sensory neurons for bone cancer pain in rat model. *Pain*, 153(3):562-574.
- Dy, S. M., Asch, S. M., Naeim, A., Sanati, H., Walling, A. y Lorenz, K. A. (2008). Evidence-based standards for cancer pain management. *Journal of clinical oncology*, 26(23):3879–3885.
- Fernandes, R. S., Dos Santos Ferreira, D., De Aguiar Ferreira, C., Giammarile, F., Rubello, D. y De Barros, A. L. (2016). Development of imaging probes for bone cancer in animal models. A systematic review. *Biomedicine & pharmacotherapy*, 83:1253-1264.
- Fischer, D. J., Villines, D., Kim, Y. O., Epstein, J. B. y Wilkie, D. J. (2010). Anxiety, depression, and pain: differences by primary cancer. *Support Care Cancer*, 18(7):801-810.

- Frink, M. C., Hennies, H. H., Englberger, W., Haurand, M., y Wilffert, B. (1996). Influence of tramadol on neurotransmitter systems of the rat brain. *Arzneimittelforschung*, 46(11):1029-1036.
- Fujita, M., Andoh, T., Sasaki, A., Saiki, I., y Kuraishi, Y. (2010). Involvement of peripheral adenosine 5'-triphosphate and P2X purinoceptor in pain-related behavior produced by orthotopic melanoma inoculation in mice. *European Journal of Neuroscience*, 31(9):1629-1636.
- Goicoechea, C. y Martín, M. I. (2006). Mecanismos periféricos y centrales del dolor. *Rheumatology Clinical*, 1(2):S5-9
- Gómez-Barrios, J. V. (2007). Dolor neuropático focalizado: del origen al diagnóstico. *Review Iberoamericano Dolor*, 2(4):19-24.
- Gómez-Barrios, J. V. y Tortorici, V. (2009). Mecanismos del dolor neuropático: Del laboratorio a la clínica. *Archivos Venezolanos de Farmacología y Terapéutica*, 28:1.
- Goodwin, C. R., Lydia Liang, L., Abu-Bonsrah, N., Hdeib, A., Elder, B. D., Kosztowski, T., Bettogowda, C., Latterra, J., Burger, P., y Sciubba, D. M. (2016). Extranural glioblastoma multiforme vertebral metastasis. *World Neurosurgery*, 89:578–582.
- Green, C. R. y Hart-Johnson, T. (2010). Cancer pain: an age-based analysis. *Pain Medical*, 11(10):1525-1536.
- Guise, T. A., Kozlow, W. M, Heras-Herzig, A., Padalecki, S. S., Yin, J. J. y Chirgwin, J. M. (2005). Molecular mechanisms of breast cancer metastases to bone. *Clinical breast cancer*, 5(2):S46–53
- Gutgsell, T., Walsh, D., Zhukovsky, D. S., Gonzales, F. y Lagman, R. (2003). A prospective study of the pathophysiology and clinical characteristics of pain in a palliative medicine population. *The American journal of hospice & palliative care*, 20(2):140-148.
- Haegerstam, G. A. (2001). Pathophysiology of bone pain: a review. *Acta orthopaedica Scandinavica*, 72:308–317.
- Harrington, C. B., Hansen, J. A., Moskowitz, M., Todd, B. L. y Feuerstein, M. (2010). It's not over when it's over: long-term symptoms in cancer survivors--a systematic review. *International journal of psychiatry in medicine*, 40(2):163-181.
- Holmes, D. (2012). Anti-NGF painkillers back on track? *Nature reviews Drug Discovery*, 11(5):337–338.
- Honore, P. y Mantyh, P. W. (2000). Bone cancer pain: from mechanism to model to therapy. *Pain medicine*. 1(4):303–309.
- Honore, P., Luger, N. M., Sabino, M. A., Schwei, M. J., Rogers, S. D., Mach, D. B., O'Keefe, P. F., Ramnaraine, M. L., Clohisy, D. R., y Mantyh, P. W. (2000a). Osteoprotegerin blocks bone cancer-induced skeletal destruction, skeletal pain and pain-related neurochemical reorganization of the spinal cord. *Nature Medicine*, 6(5):521-528.

Honore, P., Rogers, S. D., Schwei, M. J., Salak-Johnson, J. L., Luger, N. M., Sabino, M. C., Clohisy, D. R., y Mantyh, P. W. (2000b). Murine models of inflammatory, neuropathic and cancer pain each generates a unique set of neurochemical changes in the spinal cord and sensory neurons. *Neuroscience*, 98(3):585-598.

Huang, J., Zhang, X. y McNaughton, P. A. (2006). Inflammatory pain: the cellular basis of heat hyperalgesia. *Current Neuropharmacology*, 4(3):197-206.

Hyman, S.E. y Cassem N.H. (1995). Dolor. En: Neurología. *Ed. Científica Médica*, 1-20.

Inman, V. y Saunders, J. (1944). Referred pain from skeletal structures. *Journal of Nervous & Mental Disease*, 99(5):660-667.

Jensen, M. P., Chodroff, M. J. y Dworkin, R. H. (2007). The impact of neuropathic pain on health-related quality of life: review and implications. *Neurology*, 68(15):1178-1182.

Jim, H. S. y Andersen, B. L. (2007). Meaning in life mediates the relationship between social and physical functioning and distress in cancer survivors. *British journal of health psychology*, 12(Pt 3):363-381.

Jiménez-Andrade, J. M., Mantyh, W. G., Bloom, A. P., Ferng, A.S., Geffre, C. P. y Mantyh, P. W. (2010). Bone cancer pain. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1198:173-181.

Jones, J. B. (2001). Pathophysiology of acute pain: implications for clinical management. *Emergence Medicine Journal*, 13(3):288-292.

Jordan, B. y Devi, L. A. (1998). Molecular mechanisms of opioid receptor signal transduction. *British journal of anaesthesia*, 81(1):12-19.

Juhl, G. I., Jensen, T. S., Norholt, S. E. y Svensson, P. (2008). Central sensitization phenomena after third molar surgery: a quantitative sensory testing study. *European Journal of Pharmacology*, 12(1):116-127.

Julien, N., Goffaux, P., Arsenault, P. y Marchand, S. (2005). Widespread pain in fibromyalgia is related to a deficit of endogenous pain inhibition. *Pain*, 114(1-2):295-302.

Kaneko, K., Umehara, M., Homan, T., Okamoto, K., Oka, M., y Oyama, T. (2014). The analgesic effect of tramadol in animal models of neuropathic pain and fibromyalgia. *Neuroscience Letters*, 562:28-33.

Ke, C., Li, C., Huang, X., Cao, F., Shi, D., He, W., Bu, H., Gao, F., Cai, T., Hinton, A. O., y Tian, Y. (2013). Protocadherin20 promotes excitatory synaptogenesis in dorsal horn and contributes to bone cancer pain. *Neuropharmacology*, 75:181-190.

Kleinschmidt-Demasters, B. K. (1996). Diffuse bone marrow metastases from glioblastoma multiforme: the role of Dural Invasion. *Human pathology*, 27(2):197-201.

Lewin, G. R. y Moshourab, R. (2004) Mechanosensation and pain. *Journal Neurobiology*, 61(1):30-44.

- Lombard, A., Goffart, N. y Rogister, B. (2015). Glioblastoma circulating cells: reality, trap or illusion?. *Stem cells international*, 2015:ID182985.
- Longee, D. C., Friedman, H. S., Phillips, P. C., Burger, P. C., Oakes, W. J., Heffez, D., Wharam, M., Strauss, L., Fuller, G. N. y Schold, S. C. (1991). Osteoblastic metastases from astrocytomas: a report of two cases. *Medical and pediatric oncology*. 19(4):318–324.
- López-González, M. A. y Sotelo, J. (2000). Brain tumors in Mexico: characteristics and prognosis of glioblastoma. *Surgical neurology*, 53(2):157-162.
- Lozano-Ondoua, A. N., Symons-Liguori, A. M. y Vanderah, T. W. (2013). Cancer-induced bone pain: Mechanisms and models. *Neuroscience Letters*, 557PtA: 52–59.
- Lozano-Ondoua, A. N., Wrigth, C., Vardanyan, A., King, T., Largent-Milnes, T. M., Nelson, M., Jimenez-Andrade, J. M., Mantyh, P. W. y Vanderah, T. W. (2010). A cannabinoid 2 receptor agonist attenuates bone cancer-induced pain and bone loss. *Life Sciences*, 86(17-18): 646–653.
- Lumpkin, E. A. y Caterina, M. J. (2007) Mechanisms of sensory transduction in the skin. *Review Nature*, 445(7130): 858-865.
- Lun, M., Lok, E., Gautam, S., Wu, E., y Wong, E. T. (2011). The natural history of extracranial metastasis from glioblastoma multiforme. *Journal Neurooncogyl*, 105(2):261-273.
- Lynn, R. B. (1992). Mechanisms of esophageal pain. *American Journal Medicine*, 92(5):S11-S19.
- Macarthur, K. M., Kao G. D., Chandrasekaran, S., Alonso-Basanta, M., Chapman, C., Lustig, R. A., Wileyto, E. P., Hahn, S. M. y Dorsey J. F. (2014). Detection of brain tumor cells in the peripheral blood by a telomerase promoter-based assay. *Cancer Research*, 74(8): 2152-2159.
- Maccauro, G., Spinelli, M. S., Mauro, S., Perisano, C., Graci, C., y Rosa, M.A. (2011). Physiopathology of spine metastasis. *International Journal of Surgical Oncology*, 2011:ID107969.
- Mach, D. B., Rogers, S. D., Sabino, M. C., Luger, N. M., Schwei, M. J., Pomonis, J. D. Keyser, C.P., Clohisy, D. R., Adams, D. J., O’Leary, P. y Mantyh, P. W. (2002). Origins of skeletal pain: sensory and sympathetic innervation of the mouse femur. *Neuroscience*, 113(1):155–166.
- Mantyh, P. (2013). Bone cancer pain: Causes, consequences, and therapeutic opportunities. *Pain*, 154(1):S54-62.
- Mantyh, P. W. (2014). Bone cancer pain: from mechanism to therapy. *Current Opinion in Supportive and Palliative Care*, 8(2):83–90.
- Mantyh, P. W. (2014). The neurobiology of skeletal pain. *European Journal of Neuroscience*, 39:508–519.

- Mantyh, P. W. y Hunt, S. P. (2004). Mechanisms that generate and maintain bone cancer pain. *Novartis Foundation symposium*, 260:221–238; discussion 238-240, 277–279.
- Mantyh, P. W., Clohisy, D. R., Koltzenburg, M. y Hunt, S. P. (2002). Molecular mechanisms of cancer pain. *Nature Reviews Cancer*, 2(3):201-209.
- Mantyh, W. G., Jimenez-Andrade, J. M., Stake, J. I., Bloom, A. P., Kaczmarek, M. J., Taylor, R. N., Freeman, K. T., Ghilardi, J. R., Kuskowski, M. A. y Mantyh, P. W. (2010). Blockade of nerve sprouting and neuroma formation markedly attenuates the development of late stage cancer pain. *Neuroscience*. 171(2):588–598.
- Martin, T. J., Buechler, N. L., Kahn, W., Crews, J. C. y Eisenach, J. C. (2004). Effects of laparotomy on spontaneous exploratory activity and conditioned operation responding in the rat: a model for postoperative pain. *Anesthesiology*, 101(1):191–203.
- Melzack, R. y Casey, K.L. (1968). Sensory, motivational and central control determinants of pain: a new conceptual model. *Springfield III*. Ed. Charles C Thomas, 423-443.
- Mercadante, S. (1997). Malignant bone pain: pathophysiology and treatment. *Pain*, 69(1-2):1–18.
- Mercadante, S., Villari, P., Ferrera, P. y Casuccio, A. (2004). Optimization of opioid therapy for preventing incident pain associated with bone metastases. *Journal of Pain and Symptom Management*, 28(5):505–510.
- Mercadante, S., y Fulfuro, F. (2007). Management of painful bone metastases. *Current Opinion in Oncology*, 19(4):308-314.
- Merskey H. (1979). Pain terms: a list with definitions and notes on usage recommended by the IASP subcommittee on taxonomy. *Pain*, 6(3):249.
- Michaud, K., Bombardier, C. y Emery, P. (2007). Quality of life in patients with rheumatoid arthritis: Does abatacept make a difference?, *Clinical and Experimental Rheumatology*, 25(5):S35–S45.
- Mielke, J. (2005). Neurological complications of human immunodeficiency virus infection in Zimbabwe-2005. *Journal Neurovirology*, 11(3):23-25.
- Mielke, S., Sparreboom, A., Steinberg, S. M., Gelderblom, H., Unger, C., Behringer, D. y Mross, K. (2005). Association of paclitaxel pharmacokinetics with the development of peripheral neuropathy in patients with advanced cancer. *Clinical Cancer Research*, 11(13):4843-4850.
- Millan, M. J (1999). The induction of pain: an integrative review. *Progresses in Neurobiology*, 57(1):1–164.
- Moalem, G., y Tracey, D. J. (2006). Immune and inflammatory mechanisms in neuropathic pain. *Brain Research Reviews*, 51(2):240-264.

Mujic, A, Hunn, A., Taylor, A. B. y Lowenthal, R.M. (2004). Extracranial metastases of a glioblastoma multiforme to the pleura, small bowel and pancreas. *Journal of Clinical Neuroscience*, 13(6):677–681.

Müller, C., Holtschmidt, J., Auer, M., Heitzer, E., Lamszus, K., Schulte, A., Matschke, J., Langer-Freitag, S., Gasch, C., Stoupiac, M., Mauermann, O., Peine, S., Glatzel, M., Speicher, M. R., Geigl, J. B., Westphal, M., Pantel, K. y Riethdorf, S. (2014). Hematogenous dissemination of glioblastoma multiforme. *Science Translational Medicine*, 6(247):247ra101.

Mundy, G. R. (1990). Pathophysiology of cancer-associated hypercalcemia. *Seminars in Oncology*, 17(2):10–15.

Muralidharan, A., Wyse, B. D. y Smith, M. T. (2013). Optimization and characterization of a rat model of prostate cancer-induced bone pain using behavioral, pharmacological, radiological, histological and immunohistochemical methods. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*, 106:33-46.

NCI (2017), National Cancer Institute, <https://www.cancer.gov/> consultado: Mayo, 2017.

Nencini, S. y Ivanusic, J. J. (2016). The physiology of bone pain. how much do we really know?. *Frontiers in physiology*, 7:157.

Ng, W. H., Yeo, T. T. y Kaye, A. H. (2005). Spinal and extracranial metastatic dissemination of malignant glioma. *Journal of Clinical Neuroscience*, 12(4):379–382.

Niv, D., Gofeld, M. y Devor, M. (2003). Causes of pain in degenerative bone and joint disease: a lesson from vertebroplasty. *Pain*, 105(3):387–392.

O’Connell, J. X., Nanthakumar, S. S., Nielsen, G. P. y Rosenberg, A. E. (1998). Osteoid osteoma: the uniquely innervated bone tumor. *Modern pathology*, 11(2):175–180.

Okuducu, H, y Onal, S. A. (2005). Is nitric oxide involved in the antinociceptive activity of tramadol? Findings in a rat model of neuropathic pain. *The journal of the Turkish Society of Algology*, 17(4):31-40.

Ostrom QT, Gittleman H, Liao P, Rouse C, Chen Y, Dowling J., Wolinsky, Y., Kruchko, C. y Barnholtz-Sloan, J. (2014). CBTRUS statistical report: primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2007–2011. *Neuro-oncology*, 16(4):iv1–iv63.

Pacharinsak, C. y Beitz, A. (2008). Animal Models of Cancer Pain. *Comparative medicine*, Jun; 58(3): 220–233.

Pasquier, B., Pasquier, D., N’golet, A., Panh M. H., y Couderc, P, (1980). Extraneural Metastases of Astrocytomas and Glioblastomas Clinicopathological Study of Two Cases and Review of Literature. *Cancer*, 45(1):112-125.

Perryman, L. y Erler, J. T. (2014). Brain cancer spreads. *Science Translational Medicine*, 6(247):247fs28.

Peters, C. M., Ghilardi, J. R., Keyser, C. P., Kubota, K., Lindsay, T. H., Luger, N. M., Mach, D. B., Schwei, M. J., Sevcik, M. A., y Mantyh, P. W. (2005). Tumor-induced injury of primary afferent sensory nerve fibers in bone cancer pain. *Experimental neurology*, 193(1):85-100.

Portenoy, R. K., Payne, D., y Jacobsen, P. (1999). Breakthrough pain: characteristics and impact in patients with cancer pain. *Pain*, 81(1-2):129–134.

Pountos, I., Georgouli, T., Calori, G. M. y Giannoudis P. V. (2012). Do nonsteroidal anti-inflammatory drugs affect bone healing? A critical analysis. *Scientific World Journal*, 2012:ID606404.

Quintero, J. E., Dooley, D. J., Pomerleau, F., Huettl, P., y Gerhardt, G. A. (2011). Amperometric measurement of glutamate release modulation by gabapentin and pregabalin in rat neocortical slices: role of voltage-sensitive Ca²⁺ $\alpha_2\delta$ -1 subunit. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 338(1):240-245.

Ren, K. y Dubner, R. (1999). Central nervous system plasticity and persistent pain. *Journal of Orofacial Pain*, 13(3):155–163; discussion 164–171.

Sadik, A. R., Port, R., Garfinkel, B. y Bravo, J. (1984). Extracranial metastasis of cerebral glioblastoma multiforme: case report. *Neurosurgery*, 15(4):549–551.

Sakakiyama, M., Maeda, S., Isami, K., Asakura, K., So, K., Shirakawa, H., Nakagawa, T., y Kaneko, S. (2014). Preventive and alleviative effect of tramadol on neuropathic pain in rats: roles of α_2 -adrenoceptors and spinal astrocytes. *Journal of pharmacological sciences*, 124(2):244-257.

Santos, J. A., Piccinelli, A. C., Formagio, M. D., Oliveira, C. S., Santos, E. P., Alves Stefanello, M. É., Lanza Junior, U., Oliveira R. J., Sugizaki, M. M. y Kassuya, C. A. (2017). Antidepressive and antinociceptive effects of ethanolic extract and fruticuline A from *salvia lachnostachys benth* leaves on rodents. *PLoS One*, 21(2):e0172151.

Santy, J. y Mackintosh, C. (2001). A phenomenological study of pain following fractured shaft of femur. *Journal of clinical nursing*, 10(4):521–527.

Sasamura, T., Nakamura, S., Iida, Y., Fujii, H., Murata, J., Saiki, I., Nojima, H., y Kuraishi, Y. (2002). Morphine analgesia suppresses tumor growth and metastasis in a mouse model of cancer pain produced by orthotopic tumor inoculation. *European Journal Pharmacology*, 441(3):185-191.

Schneider, G., Voltz, R., y Gaertner J. (2012). Cancer pain management and bone metastases: an update for the clinician. *Breast care (Basel, Switzerland)*, 7(2):113-120.

Schwei, M. J., Honore, P., Rogers, S. D., Salak-Johnson, J. L., Finke, M. P., Rammaraine, M. L., Clohisy, D. R. y Mantyh, P. W. (1999). Neurochemical and cellular reorganization of the spinal cord in a murine model of bone cancer pain. *The Journal of Neuroscience*, 19(24):10886–10897.

Seidel, M. F., Wise, B. L. y Lane, N. E. (2013). Nerve growth factor: an update on the science and therapy. *Osteoarthritis and cartilage*, 21(9):1223–1228.

Sevcik, M. A., Ghilardi J. R., Peters, C. M., Lindsay, T.H., Halvorson, K. G., Jonas, B. M., Kubota, K., Kuskowski, M. A., Boustany, L., Shelton, D. L. y Mantyh, P. W. (2005). Anti-NGF therapy profoundly reduces bone cancer pain and the accompanying increase in markers of peripheral and central sensitization. *Pain*, 115(1-2):128–141.

Shenoy, P., Kuo, A., Vetter, I. y Smith, M. T. (2017). Optimization and *in vivo* profiling of a refined rat model of walker 256 breast cancer cell-induced bone pain using behavioral, radiological, histological, immunohistochemical and pharmacological methods. *Frontiers in pharmacology*, 8:442.

Smith E. S. y Lewin G. R. (2009). Nociceptors: a phylogenetic view. *Journal Comparative Physiology, A. Neuroethology, Sensory, Neural and Behavioral Physiology*, 195(12):1089–1106.

Smith, D. G., Ehde, D. M., Hanley, M.A., Campbell, K. M., Jensen, M. P., Hoffman, A. J., Awan, A. B., Czerniecki, J. M. y Robinson, L. R. (2005). Efficacy of gabapentin in treating chronic phantom limb and residual limb pain. *Journal of Rehabilitation Research and Development*, 42(5):645-654.

Staud, R., Craggs, J. G., Perlstein, W. M., Robinson, M. E. y Price, D.D. (2008). Brain activity associated with slow temporal summation of C-fiber evoked pain in fibromyalgia patients and healthy controls. *European Journal Pain*, 12(8):1078–1089.

Staud, R., Robinson, M. E. y Price, D. D. (2007). Temporal summation of second pain and its maintenance are useful for characterizing widespread central sensitization of fibromyalgia patients. *Journal of Pain*, 8(11):893–901.

Staud, R., y Rodriguez, M. E. (2006). Mechanisms of disease: pain in fibromyalgia syndrome. *Nature Clinical Practice Rheumatology*, 2(2):90–98.

Stucky, C. L. y Lewin, G. R. (1999). Isolectin B(4)-positive and -negative nociceptors are functionally distinct. *Journal of Neuroscience*, 19(15):6497–6505.

Takeuchi, Y., Takasu, K., Honda, M., Ono, H., y Tanabe, M. (2007). Neurochemical evidence that supraspinally administered gabapentin activates the descending noradrenergic system after peripheral nerve injury. *European journal of pharmacology*, 556(1-3):69-74.

Taylor, C. P., Angelotti, T. y Fauman, E. (2007). Pharmacology and mechanism of action of pregabalin: The calcium channel $\alpha 2\delta$ (alpha2-delta) subunit as a target for antiepileptic drug discovery. *Epilepsy research*, 73(2):137-150.

Teixeira, M. J., Okada, M, y Texeira, W. (1999). Analgesic efficacy and tholerability of tramadol. *Revista Brasileira de Medicina*, 56(4):287-293.

Thompson, E. G. y Sontheimer, H. (2016). A role for ion channels in perivascular glioma invasion. *European Biophysics Journal*, 45(7):635-648.

- Torres, L., Dunlop, D. D., Peterfy, C., Guermazi, A., Prasad, P., Hayes, K. W., Song, J., Cahue, S., Chang, A., Marshall, M. y Sharma, L. (2006). The relationship between specific tissue lesions and pain severity in persons with knee osteoarthritis. *Osteoarthritis and cartilage*, 14(10):1033–1040.
- Torres, O., Ramos, M. L., Zamora, A. L. y Saenz, A. (2003). Consideraciones bioéticas en la investigación del dolor en animales de experimentación.- *Investigación en salud*, 001, Guadalajara, México.
- van de Vusse, A. C., Stomp-van den Berg, S. G., Kessels, A. H. y Weber, W. E. (2004). Randomised controlled trial of gabapentin in complex regional pain syndrome type 1 [ISRCTN84121379]. *BMC Neurology*, 4:13.
- Van den Beuken-van Everdingen, M. H., De Rijke, J. M., Kessels, A. G., Schouten, H. C., van Kleef, M. y Patijn, J. (2007). Prevalence of pain in patients with cancer: a systematic review of the past 40 years. *Annual Oncology*, 18(9):1437–1449.
- Weidner, C., Schmelz, M., Schmidt, R., Hansson, B., Handwerker, H. O. y Torebjork, H. E. (1999). Functional attributes discriminating mechano-insensitive and mechano-responsive C nociceptors in human skin. *Journal of Neuroscience*, 19(22):10184–10190.
- Winkelman, N. W., Cassel, C. y Schlesinger, B. (1952). Intracranial tumors with extracranial metastases. *Journal of neuropathology and experimental neurology*, 11(2):149–168.
- Wisniol, E. S, Handler, S. y French, L.A. (1962). Extracranial metastases of a glioblastoma multiforme. *Journal of neurosurgery*, 19:186–194.
- Woolf, C. J. y Ma, Q. (2007). Nociceptors—noxious stimulus detectors. *Neuron Review*, 55(3):353-364.
- Woolf, CJ. (2004). Pain: Moving from symptom control toward mechanism-specific pharmacologic management. *Annals of Internal Medicine*, 140(6):441-451.
- Yang, J. L., Xu, B., Li, S. S., Zhang, W. S., Xu, H., Deng, X. M., y Zhang, Y. Q. (2012). Gabapentin reduces CX3CL1 signaling and blocks spinal microglial activation in monoarthritic rats. *Molecular brain*, 5:18.
- Yera, J. L. (2000). Valoración del tramadol en el dolor oncológico. Conferencia Internacional del Dolor. La Habana: *Centro Ortopedico*.
- Yoneda, T., Hiasa, M., Nagata, Y., Okui, T., y White, F. (2015). Contribution of acidic extracellular microenvironment of cancer-colonized bone to bone pain. *Biochimica Et Biophysica Acta*. 1848(10Pt B):2677–2684.
- Yoshizumi, M., Parker, R. A., Eisenach, J. C., y Hayashida, K. (2012). Gabapentin inhibits γ -amino butyric acid release in the locus coeruleus but not in the spinal dorsal horn after peripheral nerve injury in rats. *Anesthesiology*, 116(6):1347-1353.

Yuan, X., Wu, J., Wang, Q., y Xu, M. (2014). The antinociceptive effect of systemic administration of a combination of low-dose tramadol and dexmedetomidine in a rat model of bone cancer pain. *European Journal Anaesthesiology*, 31(1):30-34.

Zakrzewska, J. M. y Patsalos, P. N. (2002). Long-term cohort study comparing medical (oxcarbazepine) and surgical management of intractable trigeminal neuralgia. *Pain*, 95(3):259-266.

Research Article

The Effect of Gabapentin and Tramadol in Cancer Pain Induced by Glioma Cell in Rat Femur

Janette Nallely Corona-Ramos,¹ Myrna Déciga-Campos ,² Mario Romero-Piña,³ Luis A. Medina,⁴ Issac Martínez-Racine,⁵ Osmar A. Jaramillo-Morales,¹ Patricia García-López,^{6*} and Francisco Javier López-Muñoz ^{1*}

¹Departamento de Farmacobiología, Cinvestav-Sede Sur, C.P. 14330, Delegación Tlálpán, México, D.F., México

²Sección de Estudios de Posgrado e Investigación de la Escuela Superior de Medicina del IPN, C.P. 11340, México, D.F., México

³Departamento de Imagenología, Instituto Nacional de Cancerología, C.P. 14080, México, D.F., México

⁴Instituto de Física, Universidad Nacional Autónoma de México/Unidad de Investigación Biomédica en Cáncer INCan-UNAM, C.P. 14080, México, D.F., México

⁵Departamento de Patología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM, Ciudad de México, 04510, México

⁶Laboratorio de Farmacología, Subdirección de Investigación Básica, Instituto Nacional de Cancerología, C.P. 14080, México, D.F., México

Strategy, Management and Health Policy				
Enabling Technology, Genomics, Proteomics	Preclinical Research	Preclinical Development Toxicology, Formulation Drug Delivery, Pharmacokinetics	Clinical Development Phases I-III Regulatory, Quality, Manufacturing	Postmarketing Phase IV

ABSTRACT The presence of pain as part of the cancer process is variable. Glioblastoma multiform (GBM) can produce bone metastasis, a condition that involves other pathological phenotypes including neuropathic and inflammatory pain. Tramadol and gabapentin are drugs used in the treatment of neuropathic pain. However, there are no studies evaluating their analgesic effects in bone metastasis. We produced a pain model induced by the inoculation of glioma cells (10^5) into the rat femur, by perforating the intercodiloid fossa. Painful behavior was evaluated by measuring mechanical allodynia using the Von Frey test while thermal hyperalgesia was assessed in the plantar test. Histopathological features were evaluated and antinociceptive responses were compared using tramadol and gabapentin. The inoculation of cells inside the right femur produced nociceptive behaviors. Tramadol and gabapentin produced an anti-allodynic effect in this condition, but tramadol did not produce an anti-hyperalgesic response. The development of this model will allow us to perform tests to elucidate the pathology of

Funding: This study was partially funded with CONACYT No. 232644. Corona-Ramos thanks fellowship by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), Mexico.

[†]The authors declare no conflict of interests.

*Correspondence to: Francisco Javier López-Muñoz, Departamento de Farmacobiología, Cinvestav-Sede Sur, Calz. de los Tenorios No. 235 Col. Granjas Coapa, Deleg. Tlálpán, México D.F., C.P. 14330, México. E-mail: flopezm2@gmail.com; flopez@cinvestav.mx and Patricia García-López, Laboratorio de Farmacología, Subdirección de Investigación Básica, Instituto Nacional de Cancerología (INCan). Av. San Fernando #22, Tlálpán 14080. Apartado Postal 22026, México D.F., México. E-mail: pgarcia_lopez@yahoo.com.mx

Received 18 May 2017; Accepted 19 May 2017

Published online in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com). DOI: 10.1002/ddr.21389

bone metastasis, cancer pain, and in particular the pain produced by glioma. *Drug Dev Res* 78 : 173–183, 2017. © 2017 Wiley Periodicals, Inc.

Key words: gabapentin; tramadol; allodynia; hyperalgesia; cancer

INTRODUCTION

The World Cancer Report 2014 [Stewart and Wild, 2014] estimated that the annual number of cases worldwide would rise from 14 million in 2012 to 22 million by 2032. It is estimated that 40% of people with early or intermediate stage cancer and 90% with advanced cancer may have moderate to severe pain [Paley et al., 2015]. In several categories of cancer, this pain is associated with bone metastasis. That pathology is difficult to manage clinically due to complex mechanism that involve neuropathic and inflammatory pain [Honore et al., 2000a; Mantyh et al., 2002].

When tumor cells like sarcoma, breast, prostate, thyroid, lung, and renal cancers begin to grow in the bone, they produce bone formation and/or bone absorption resulting in considerable pain, skeletal fractures, and hypercalcemia. In this continuous peripheral nerve stimulation, patients manifest allodynia and hyperalgesia [Honore et al., 2000b; Lipton, 2005; Sabino and Mantyh, 2005; Kumar, 2011].

Glioblastoma multiform (GBM) remains the most frequent primary type of CNS tumor in adults (17.1%) [Stupp et al., 2005]. Despite advances in operative and adjuvant therapies, the prognosis remains dismal, with a survival rate of less than 12% within 2 years after initial diagnosis [Stupp et al., 2005]. Extra-cranial metastasis of glioblastoma is still a rare occurrence but the incidence has increased, probably due to the improvement in survival among these patients and better imaging techniques. The mechanisms for extra-cranial dissemination of glioblastoma are not entirely known, as several theories exist in this regard [Undabeitia et al., 2015].

There are many techniques for developing nocifensive responses in animals injected with tumor cells [Jiménez-Andrade and Mantyh, 2010; Duan et al., 2012]. However, to date it is not known whether allodynic or hyperalgesic effects are generated by glioma cell inoculation in the skeletal system; for this reason, the development of an animal model is important to evaluate the behaviors that may contribute to the development of adequate pharmacological treatments, as well as the molecular mechanisms of this condition.

The objective of this study was to induce a bone metastasis by inoculation of glioma cells into

the femur of Wistar rats, and to analyze the possible anti-allodynic and anti-hyperalgesic responses from tramadol and gabapentin in this pain condition. Although it has been reported that these drugs are ineffective in clinical pain-induced cancer, we used them as a reference to demonstrate the utility in this model by glioma cell injection.

MATERIALS AND METHODS

In Vitro

Cell culture

The Glioma-C6 cell line was obtained commercially from the American Type Culture Collection Biological Resource Center (Rockville, Maryland, USA) and cultured at the Instituto Nacional de Cancerología (INCan). The cell line was routinely maintained as a monolayer in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) and supplemented with 5% fetal bovine serum, 100 UI mL⁻¹ penicillin, and 100 µg/mL streptomycin. Cells were incubated at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere at high humidity. Cells were harvested with 1 mM EDTA. The protocol that involves a commercial cell line was approved according to the ethics guidelines of INCan.

Cellular viability assay

Cellular viability was estimated by the MTT assay as previously described [Pérez-Rojas et al., 2016]

In Vivo

Animals

All procedures were approved by the ethical committee of Centro de Investigación y Estudios Avanzados Sede Sur (Cinvestav-Sede Sur) and conformed to both the Guidelines of the Official Mexican Norm [NOM-062-ZOO-1999] and the International Association for the Study of Pain [Zimmerman, 1983]. Male Wistar rats [CrI(WI)fBR] (Cinvestav-Sede Sur, Mexico City) weighing 110–120 g prior to surgery were used in this study. Rats were maintained in a room under standardized conditions on a 12-hour light/dark cycle with food and water available ad libitum. All behavioral tests were performed during the morning light phase. Rats were euthanized by CO₂ at the end of the experiment.

Femoral glioma cell implantation

For the inoculation of the glioma cells we considered the arthrotomy process previously suggested in a rodent model produces tumors [Schwei et al., 1999; Honore et al., 2000a,b], as well as the modifications described in rats by Doré-Savard et al. [2010]. This method was similar, but the cell line was changed. Afterward, we completely anesthetized the animal (50/7.5 mg/kg ketamine/xylazine mixture, i.p.). Each rat was laid in the supine position and their right paw was shaved and disinfected with 70% v/v ethanol. A small skin incision (8–10 mm) exposed the *quadriceps femoris*. The *vastus lateralis* and *vastus intermedius* were incised (5–7 mm in length) to expose the femoral epicondyle, while the patellar ligament remained untouched in order to minimize damage. A small and superficial cavity was established between the medial epicondyle and the adductor tubercle (approximately 1 mm in depth).

The intramedullary canal of the distal femur was inoculated with a suspension of 10^5 glioma cells in 50 μ L of DMEM (cancer group) and DMEM (sham group). In both the sham group and the naïve group, an identical surgical procedure was performed without cells. The syringe was left in place for 1 min to allow cell dispersion in the bone marrow. The needle was then removed and the cavity was sealed with bone wax (Atramat). The site was thoroughly washed with sterile, deionized water. The muscle and the conjunctive tissue were closed with a discontinuous suture made with synthetic absorbable sutures 4-0 (Atramat), and the skin was closed with a continuous suture from a non-absorbable surgical suture 3-0 (Atramat). An additional control consisted of naïve rats.

Tumor Growth by Imaging

In order to evaluate tumor growth we used a computerized, microtomography (microCT) scanner (Albira ARS, Oncovision Spain). Animals were anesthetized with isoflurane (1–3% isoflurane in 100% oxygen) and the microCT images were acquired an hour after injection (basal) and 40 days after implantation of the 10^5 glioma cells. The following parameters were used: 600 projections with a voltage of 35 kvs and 0.6 mAs, a resolution of 50 μ m, and an acquisition time of 15 minutes per rat.

Histological Analysis

At the end of the study the rats were euthanized, the right pelvic member was removed, and excess skin and muscle were eliminated in order to improve the contact of bone tissue by using a fixative solution

(paraformaldehyde 10%). Femurs were immersed for 48 hours in this solution. After that, the femurs were decalcified for 4 days, pieces of bone were cut longitudinally on the middle line, and then inserted in paraffin. Paraffin blocks were cut (3–4 μ m thick) with microtome equipment and the tissue slices were stained using the hematoxylin-eosin method.

Measurement of Nociceptive Activity

We evaluated the nociceptive response of allodynia and hyperalgesia in rats with glioma cells in the femur. Our group previously evaluated the allodynic and hyperalgesic effects in both normal rats and neuropathic pain rats [De la O-Arciniega et al., 2009; Carballo-Villalobos et al., 2016]. To determine allodynic behavior, we established that the application of 1 g force/sec, using a cut-off time of 50 seconds, applied three times at 2-min intervals, produces allodynia in neuropathic rats [De la O-Arciniega et al., 2009; Carballo-Villalobos et al., 2016]. This is the first time that the same procedure was used in rats with glioma cells injected into the femur. Allodynia was reported as gram force on withdrawal of the paw. To determine anti-hyperalgesia the Hargreaves method was used, (UGO-BASILE, Varese, Italy) [Hargreaves et al., 1988] which followed the method described by Jaramillo-Morales et al. [2016]. We reported the latency of withdrawal in seconds, as defined by the time at which the paw of the animal had initial contact with the beam of light until removal of the paw from the beam of light. Three readings were made per animal.

Experimental Design

First, the allodynic and the hyperalgesic response of rats with implantation of glioma cells were demonstrated. Thus, naïve rats, sham rats and rats implanted with 10^5 glioma cells were evaluated to determine allodynic and hyperalgesic behaviors. Second, drug treatments were administered 15 day post-surgery. Tramadol (31.6 mg/kg,s.c.) and gabapentin (56.23 mg/kg, s.c.) were administered once a day for 24 days and their anti-allodynic and anti-hyperalgesic effects tested on days 18, 25, 33, and 39 post-inoculation. The allodynic and hyperalgesic effects of tramadol and gabapentin in pain produced by inoculation of the glioma cells are shown as time courses and areas under the curve (AUC).

Determination of Other Model-Specific Behaviors

Freedom of movement, both horizontal and vertical, were also determined. Animals were placed in Open Field equipment (97 cm diameter, 42 cm height), and divided into sectors with the same area.

The animals without previous acclimation and freedom to roam were kept in the Open Field Equipment and filmed for 2 minutes. Quantifying in this time span, the number of squares traversed (sectors) was considered to be a horizontal movement, while the number of times the animal lifted itself up on both limbs were considered to be vertical movements. [Martin et al., 2004; Santos et al. 2017].

The behavior of spontaneous movement (spontaneous pain) in animals without previous acclimation to the environment was determined by placing them on wire mesh in a transparent acrylic box and filmed for 30 minutes. They remained in this environment for the duration of the test and the number of spontaneous shakes of the front limbs was quantified [Honore et al., 2000a]. Additionally, the behavior exhibited during the licking and grooming test was also determined by placing the non-acclimated animals in transparent, acrylic boxes, where they were filmed for 30 minutes. The time that the animal used for licking and grooming any part of its body was quantified in seconds [Cheppudira, 2006].

Statistical Analyses

All data were expressed as the mean \pm S.E.M. and compared by analysis of variance followed by the Newman Keuls test for multiple comparisons. In all of statistical analyses, a value of $p < 0.05$ was considered significant. Analyses were performed using GraphPad Prism 6.0 software (GraphPad Software, La Jolla, CA).

RESULTS

To assess whether the tumor-injected femoral limb was extended because of destruction (osteolysis), microCT images were used. Forty days after injection, bone destruction was not observed in animals that received sham injection into the femur (Fig. 1A) or in animals inoculated with 10^5 glioma cells (Fig. 1B).

We previously assayed 30^5 and 60^5 glioma cell injections; bone destruction was observed at 18 and 8 days respectively, post-injection (MicroCT images not shown). We consider the optimal amount of cells for this cancer pain model to be 10^5 cells, which produced clear behaviors, the least damage, and more time to observe the behaviors because bone destruction was absent for 40 days. Figure 2 shows the histological images at 18 days post-surgery with 10^5 glioma cells injection. The region of the distal epiphysis of the femur, as well as in the diaphysis, showed an hypercellular area composed of polyhedral and fusiform neoplastic cells that were organized in a solid pattern and infiltrated between the trabecular bone tissue (Fig. 2B and 2D), in contrast to the healthy structures in the

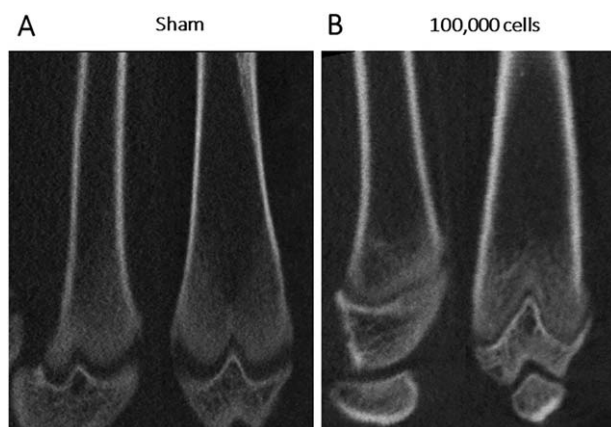


Fig. 1. MicroCT images (computed tomography) frontal left femur. A) Sham animal, B) Animal inoculated with 10^5 glioma cells (A and B at 40 days post inoculation).

sham-operated group (Fig. 2A and 2C). The neoplastic cells have moderate eosinophilic cytoplasm with partially defined edges and an oval nuclei with fine, granular chromatin. It can be observed that neoplastic cells replaced the different hematopoietic cell lines in the region.

Behavioral Analysis

To characterize nociceptive behavior, allodynia and hyperalgesia were quantified during 40 days, post-inoculation. Figure 3 shows the time course of the nociceptive behavior, produced by the inoculation of 10^5 glioma cells into the right femur. No difference is observed between the sham and naive groups; both showed similar paw withdrawal threshold (allodynia) and paw withdrawal latency (hyperalgesia). These responses were constant throughout the experiment. When the animals were inoculated with 10^5 glioma cells in the right femur, they showed a significant decrease in both mechanical latency (Fig. 3A) and thermal latency (Fig. 3B) at days 8, 15, 18, 25, and compared to the naive and sham group ($p < 0.05$) conducted by ANOVA.

To verify if this allodynic and hyperalgesic behavior was changed by tramadol and gabapentin treatment, these drugs were administered chronically once a day for 24 days, 15 days after cell inoculation. Figure 4 shows the temporal course of the anti-allodynic (Fig. 4A) and anti-hyperalgesic (Fig. 4B) effect of tramadol (31.6 mg/kg, s.c.). Additionally, we used a vehicle group to compare that tramadol has, in both cases, the maximum anti-allodynic and anti-hyperalgesic effect 3 days after administration (day 18, post-inoculation). The antinociceptive response was maintained over the last 14 days. In the case of gabapentin administration (56.23 mg/kg, s.c.), it only presented an anti-allodynic

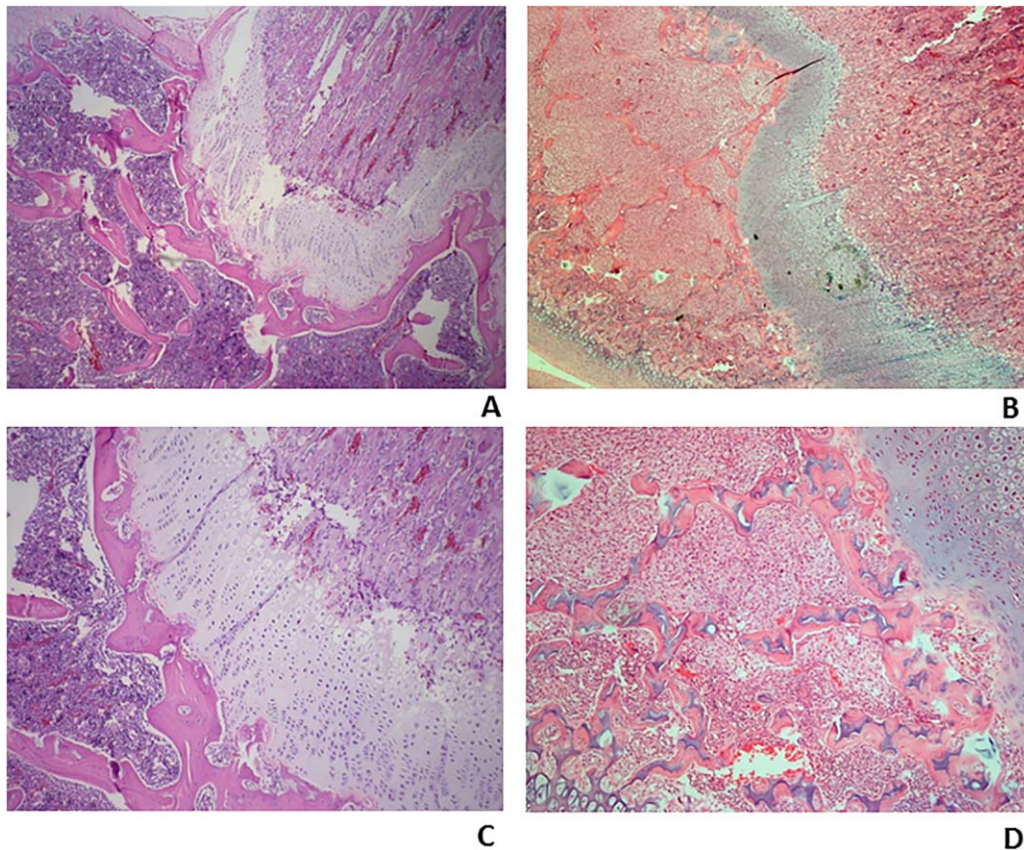


Fig. 2. Histology images of the femurs of rats at 18 days post-implantation: (A) sham group (animals without inoculation of glioma cells), (B) Animals inoculated with 10^5 cells, at $4\times$ resolution; C and D corresponding to the same groups at $10\times$ resolution. [Color figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

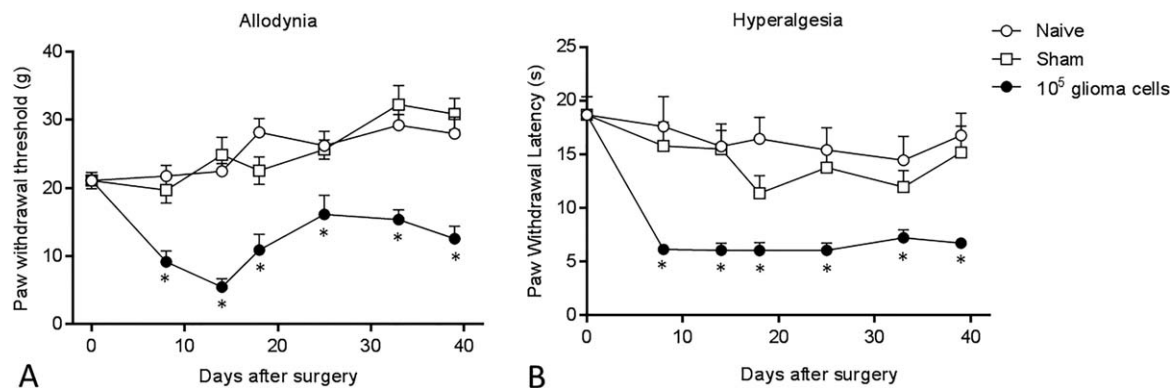


Fig. 3. Temporal course of the nociceptive behavior produced by the inoculation of 10^5 glioma cells into the left femur: (A) Allodynic Response and (B) Hyperalgesic Response. The results are shown as average of behavior ($n = 8$ rats) \pm SEM. ANOVA one way, $*p < 0.05$ vs. Sham.

response at 18, 25, 33, and 39 days post-glioma cell inoculation (Fig. 5A), but did not produce an anti-hyperalgesic effect (Fig. 5B). Figure 6A and 6B show the area under the curve (AUC) for the tramadol and gabapentin treatment, and their respective anti-

allodynic and anti-hyperalgesic effects. Tramadol has both an anti-allodynic and anti-hyperalgesic effect, whereas Gabapentin only has an anti-allodynic effect.

Horizontal and vertical ambulatory movements were quantified. In both cases, they showed a

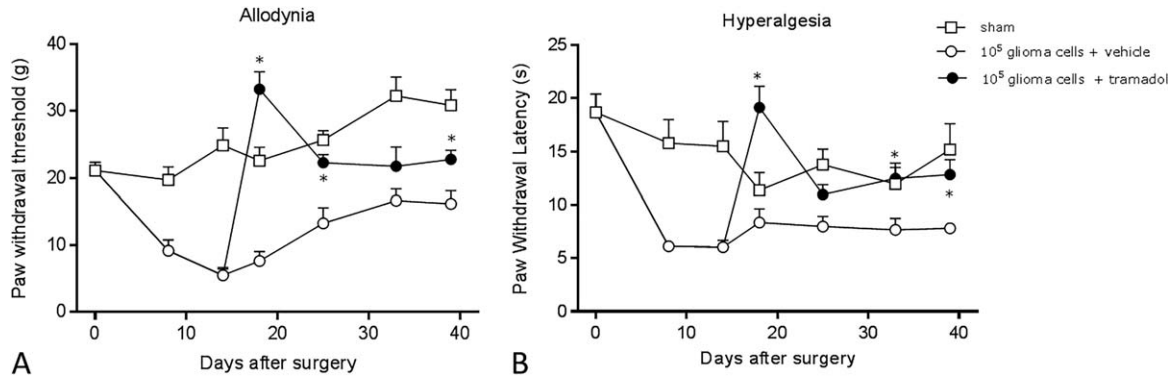


Fig. 4. Temporal course of treatment with Tramadol: (A) Time course of the anti-allodynic and (B) Anti-hyperalgesic effects of Tramadol (dose of 31.6 mg/kg, s.c. administered once daily for 24 days) in animals inoculated with 10⁵ glioma cells. Data are means (n = 8 rats) ± S.E.M. ANOVA one way, *p < 0.05 vs. Vehicle.

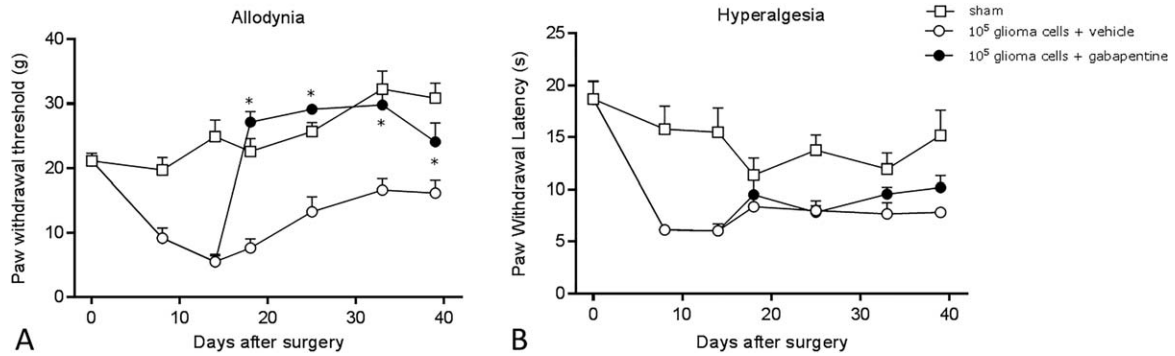


Fig. 5. Temporal course of treatment with Gabapentin: (A) Time course of the anti-allodynic and (B) anti-hyperalgesic effects of Gabapentin (dose of 56.23 mg/kg, s.c. administered once daily for 24 days) in animals inoculated with 10⁵ glioma cells. Data are means (n = 8 rats) ± S.E.M., ANOVA one way, *p < 0.05 vs. Vehicle.

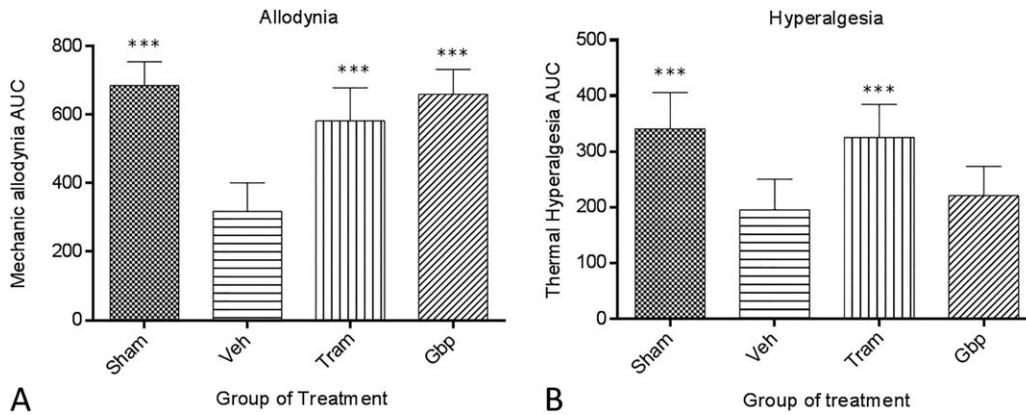


Fig. 6. Area under the curve (AUC) response of different treatments: (A) Allodynia and (B) Hyperalgesia. Data are means (n = 8 rats) ± S.E.M., ANOVA one way, *p < 0.05 vs. Vehicle.

significant decrease in behavior, from day 15 until day 40, post-inoculation (Fig. 7A and 7B). Figure 7C shows the quantification of spontaneous behavior of the frontal limbs, which show a significant increase in

behavior from day 18 until day 40, post-inoculation. Figure 7D shows a decrease in licking and grooming behavior that was significant from day 8 until day 40, post-inoculation. No difference in behavior was

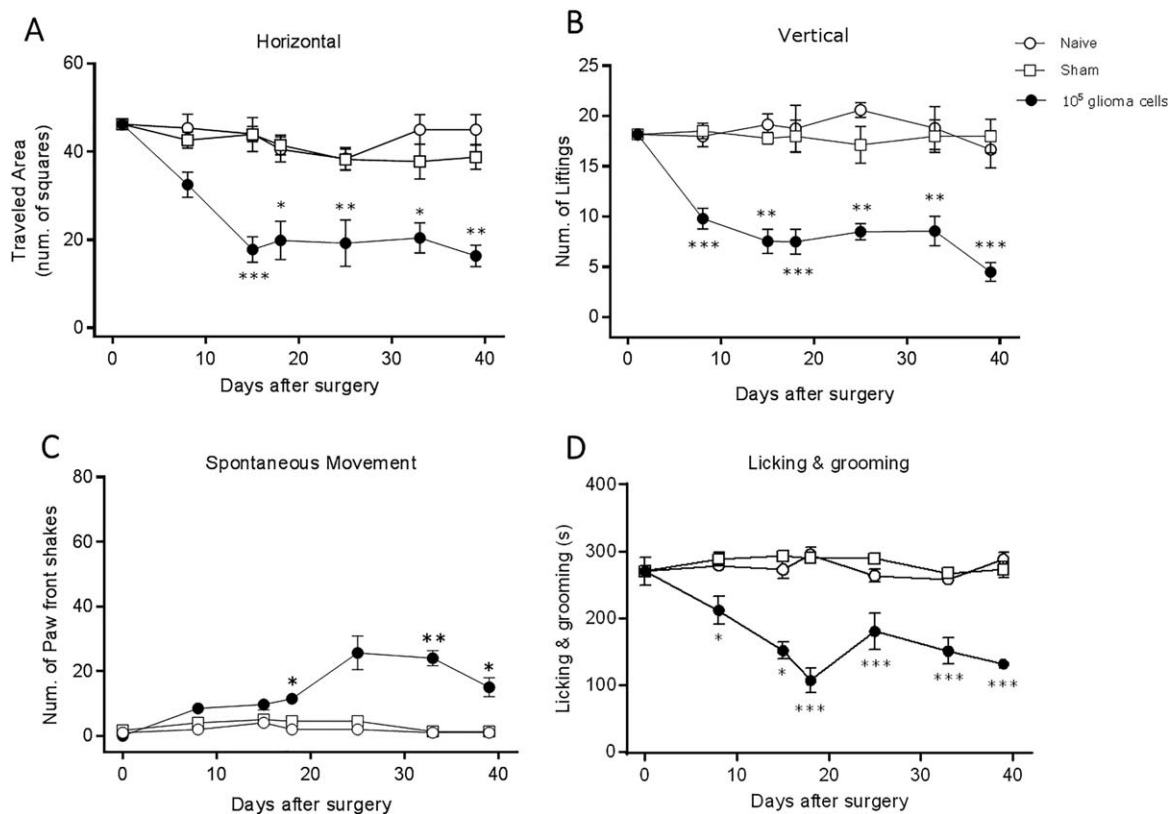


Fig. 7. Temporal course of specific behavior: (A) Time course of Horizontal movement, (B) vertical voluntary movement, (C) Spontaneous pain, and (D) Licking and grooming behaviors. Data are means ($n = 8$ rats) \pm S.E.M., ANOVA one way, $*p < 0.05$ vs. Vehicle.

recorded when compared to the naive group and the sham group.

DISCUSSION

The aims of this study were: to characterize the allodynic and hyperalgesic response in rats implanted with 10^5 glioma cells; to evaluate the potential antinociceptive effects of tramadol and gabapentin in this model, and to characterize this pain model of pain-induced by glioma cell inoculation through other specific pathological behaviors.

Pain induced by cancer is a pathological condition that involves inflammatory and neuropathic pain. This type of pain is present in about 68% of patients with advanced cancer, whether metastatic or terminal [Van den Beuken-van Everding et al., 2007]. The initial presentation of bone pain induced by cancer occurs steadily and gradually increases in intensity over time [Dy et al., 2008]. If cancer continues to spread within the bones, a second type of pain known as incidental or severe can emerge [Mercadante et al., 2004]. The breakthrough pain is often both acute and unpredictable. This pain can be

severe, debilitating, and difficult to control [Coleman, 1997; Ke et al., 2013].

Several reports demonstrated an extra-cranial metastasis of glioma [Kleinschmidt-Demasters, 1996; Undabeitia et al., 2015]. The majority of patients with this condition do not survive beyond six months from diagnosis of the metastatic spread of a primary, intracranial tumor [Ng et al., 2005]. In addition, glioma can produce bone metastasis [Rajagopalan et al., 2005; Didelot et al., 2006]. Using a preclinical model of pain induced by glioma cell infusion, we show that glioma can remain in the bone marrow and has the capacity to produce osteolysis, bone fractures, and peripheral and central pain. Similar bone metastasis symptoms have been reported in prostate, breast, and lung cancer.

When inoculated with 10^5 glioma cells, survival between 41 and 45 days post-inoculation can be observed, allowing sufficient time assess nociceptive activity. CT images taken 40 days post-inoculation show tumor growth, but without visible bone destruction. During the observation period, the animals maintained a good quality of life. Histological images show destruction of both smooth bone and trabecular

bones, loss of the growth plate, and infiltration of cancer cells into the marrow. This indicates that the growth of cancer within rat femur coinciding with evidence reported by Duan et al. [2012] and Song et al. [2016]. They developed a cancer-induced pain model by inoculating Walker 256 rat mammary gland cells into the rat tibia. Histological images with cancer growth were reported in both the smooth bone and the trabecular bone of the tibia, as well as bone degradation and infiltration of these cells. The measurement of nociceptive activity showed the following: the activation threshold decreased significantly with respect to the sham group, which indicates mechanical allodynia. Also, thermal hyperalgesia was reported, determined as the decreasing of the latency of retirement in seconds with respect to the sham group. With the inoculation of 10^7 glioma cells into rat femur, the development of a preclinical model of pain associated with cancer, shows that either thermal hyperalgesia or mechanical allodynia is possible. This model shows many of the pathophysiological properties of chronic neuropathic pain in human subjects, e.g., allodynia and hyperalgesia [Bennett and Xie, 1988; De Vry et al., 2004]. Behaviors such as allodynia and hyperalgesia are parameters that have been previously used to study the pharmacology and modulation of bone cancer pain [Muralidharan et al., 2013; Yuan et al., 2014]. In addition, behaviors such as decrement of guarding, limb use while ambulating in an open field and an increment of spontaneous activity produced an ongoing pain that is produced by the same mechanism, an increment of osteoclastic activity and acidic medium [Honore et al., 2000a].

The present study revealed, for the first time, that tramadol and gabapentin showed anti-allodynic activity. However, only tramadol demonstrated an anti-hyperalgesic response. The present findings are supported by similar results obtained by other investigations demonstrating that gabapentin and tramadol alleviate bone cancer pain in both rodent models and in humans [Caraceni et al. 2004, 2008; Donovan-Rodríguez et al., 2005; Peters et al., 2005; Muralidharan et al., 2013; Yuan et al., 2014]. It should be stressed that mechanisms underlying bone cancer pain are unknown. However, recent evidence suggests that bone destruction, reactive muscle spasms, blood concentration of the calcium ions, and also the release of inflammatory mediators by tumor cells are implicated in the etiology of bone cancer pain [Mercadante and Fulfuro, 2007; Jiménez-Andrade et al., 2010]. Studies in both humans and animals also suggest that pain induced by cancer is a pathological condition, where both inflammatory pain and neuropathic pain mechanisms prevail [Honore et al., 2000a,b]. The

combination of both mechanisms results in the hyperalgesic and allodynic behaviors observed [Jiménez-Andrade et al., 2010].

Multiple mechanisms are involved in the reduction of both allodynic and hyperalgesic behaviors. In this sense, and also in a clinical setting, opioids and tricyclic antidepressants are widely used for the relief of bone cancer pain [Jiménez-Andrade et al., 2010; Schneider et al., 2012]. Furthermore, tramadol, an opioid analgesic, has weak opioid receptor affinity that is related to an anti-allodynic effect on partial sciatic nerve ligation and reserpine-induced myalgia [Kaneko et al., 2014], effects that involve activation by G protein-coupled inward rectifier K^+ channels. This indirect inhibition of the influx of Ca^{2+} inhibits nociceptive impulses [Frink et al., 1996]. The L-arginine/nitric oxide pathway has been related to the antinociceptive effect produced by tramadol in a rat model of neuropathic pain [Okuducu and Onal, 2005] and inhibits the nerve ligation-induced activation of spinal astrocytes [Sakakiyama et al., 2014].

Gabapentin presents an anti-allodynic response when assessed in the present glioma-induced pain model that potentially involve actions at many sites: cholinergic, adrenergic [Takeuchi et al., 2007], gabaergic [Yoshizumi et al., 2012], nitric oxide-inhibiting, calcium [Moalem and Tracey, 2006], and, subsequently, the inhibition of the release of excitatory neurotransmitters (e.g., substance P, calcitonin gene-related peptide, glutamate, and norepinephrine) from the primary afferent nerve fibers in the pain pathway [Taylor et al., 2007; Quintero et al., 2011; Yang et al., 2012].

Other related behaviors in the pathology were detected and quantified. Glioma-induced pain decreases horizontal and vertical voluntary activity, in addition to increasing spontaneous behavior and a decrease of licking and grooming. We suggest that the voluntary locomotive activity, both horizontal (crossed area) and vertical (lifting up on two paws), is decreased due to the nociceptive activity that occurs with the presence of allodynia indicating that a non-noxious pressure stimulus produces a painful behavior. Similarly, Honore et al. [2000a] reported decreased involuntary movement in limb use in the Open Field Test an effect involving an elevation in osteoclast activity. The result of this elevation in activity is both bone degradation and an acidic environment. These two conditions produce a high activity of acid-sensing ion (ASIC) and transient receptor potential (TRP) channels that play a role in the mechanism of ongoing pain.

The studies carried out by Sasamura et al. [2002] and Cheppudira [2006] only quantified the licking of the damaged paw in conjunction with the pathological state. In contrast, we observed a decrease in licking

and grooming behavior that involves allodynia. Sasamura et al. [2002] and Fujita et al. [2010] reported licking behavior as a response to spontaneous pain when they inoculated melanoma cells in the plantar region of the hind paw, while Cheppudira [2006] reported an increase in licking activity when a noxious thermal stimulus was applied in chronic inflammation conditions. These results differ from ours because, in contrast, we quantified the licking and grooming that occurred throughout the whole body. We also reported this activity as a decrease in voluntary movement, but not as an increase in spontaneous pain. Similarly, an increase in spontaneous activity was observed in studies in cancer-induced pain models. Honore et al. [2000a] and Jiménez-Andrade et al. [2010] have quantified the number of spontaneous withdrawal of the hind leg as spontaneous pain behavior.

The present preclinical model of cancer pain with the inoculation of glioma cells into the femur is an important tool demonstrating that the glioma can be maintained by the skeletal system, that produces changes in mechanical and thermal hypersensitivity. Additionally, the present study shows that tramadol and gabapentin have antinociceptive effects in this model of cancer. Therefore, it is important to consider these results when looking for new therapeutic alternatives to prevent pain and improve the quality of life of people with cancer.

ACKNOWLEDGMENTS

JN Corona-Ramos (No. 232644) thanks fellowship by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), Mexico.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

All the authors are responsible for the data reported and all of them participated in the discussion on the manuscript. The authors declare no conflicts of interest.

REFERENCES

- Bennett G, Xie YK. 1988. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain* 33:87–107.
- Caraceni A, Zecca E, Bonezzi C, Arcuri E, Yaya Tur R, Maltoni M, Visentin M, Gorni G, Martini C, Tirelli W, et al. 2004. Gabapentin for neuropathic cancer pain: a randomized controlled trial from the Gabapentin Cancer Pain Study Group. *J Clin Oncol* 22:2909–2917.
- Caraceni A, Zecca E, Martini C, Pigni A, Bracchi P. 2008. Gabapentin for breakthrough pain due to bone metastases. *Palliat Med* 22:392–393.
- Carballo-Villalobos AI, González-Trujano ME, Pellicer F, López-Muñoz FJ. 2016. Antihyperalgesic effect of hesperidin improves with diosmin in experimental neuropathic pain. *Bio Med Res Int* ID:8263463.
- Cheppudira BP. 2006. Characterization of hind paw licking and lifting to noxious radiant heat in the rat with and without chronic inflammation. *J Neurosci Meth* 155:122–125.
- Coleman RE. 1997. Skeletal complications of malignancy. *Cancer* 80:1588–1594.
- De la O-Arciniega M, Díaz-Reval MI, Cortés-Arroyo AR, Domínguez-Ramírez AM, López-Muñoz FJ. 2009. Anti-nociceptive synergism of morphine and gabapentin in neuropathic pain induced by chronic constriction injury. *Pharmacol Biochem Behav* 92:457–464.
- De Vry J, Kuhl E, Franken-Kunkel P, Eckel G. 2004. Pharmacological characterization of the chronic constriction injury model of neuropathic pain. *Eur J Pharmacol* 491:137–148.
- Didelot A, Taillandier L, Grignon H, Vespignani P, Beauchesne 2006. Concomitant bone marrow metastasis of a glioblastoma multiforme revealed at the diagnosis. *Acta Neurochir (Wien)* 148:997–1000.
- Donovan-Rodríguez T, Dickeson AH, Urch CE. 2005. Gabapentin normalizes spinal neuronal responses that correlate with behavior in a rat model of cancer-induced bone pain. *Anesthesiol* 102:132–140.
- Doré-Savard L, Otis V, Belleville K, Lemire M, Archambault M, Tremblay L, Beaudoin JF, Beaudet N, Lecomte R, Lepage M, et al. 2010. Behavioral, medical imaging and histopathological features of a new rat model of bone cancer pain. *PLoS One* 5: 1–15.
- Duan KZ, Xu Q, Zhang XM, Zhao ZQ, Mei YA, Zhang YQ. 2012. Targeting A-type K(+) channels in primary sensory neurons for bone cancer pain in a rat model. *Pain* 153:562–574.
- Dy SM, Asch SM, Naeim A, Sanati H, Walling A, Lorenz KA. 2008. Evidence-based standards for cancer pain management. *J Clin Oncol* 26:3879–3885.
- Frink MC, Hennies HH, Englberger W, Haurand M, Wilffert B. 1996. Influence of tramadol on neurotransmitter systems of the rat brain. *Arzneimittelforschung* 46:1029–1036.
- Fujita M, Andoh T, Sasaki A, Saiki I, Kuraishi Y. 2010. Involvement of peripheral adenosine 5'-triphosphate and P2X purinoceptor in pain-related behavior produced by orthotopic melanoma inoculation in mice. *Eur J Neurosci* 31:1629–1636.
- Hargreaves K, Dubner R, Brown F, Flores C, Joris J. 1988. A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. *Pain* 32:77–88.
- Honore P, Luger NM, Sabino MA, Schwei MJ, Rogers SD, Mach DB, O'Keefe PF, Ramnaraine ML, Clohisey DR, Mantyh PW. 2000a. Osteoprotegerin blocks bone cancer-induced skeletal destruction, skeletal pain and pain-related neurochemical reorganization of the spinal cord. *Nat Med* 6:521–528.
- Honore P, Rogers SD, Schwei MJ, Salak-Johnson JL, Luger NM, Sabino MC, Clohisey DR, Mantyh PW. 2000b. Murine models of inflammatory, neuropathic and cancer pain each generates a unique set of neurochemical changes in the spinal cord and sensory neurons. *Neurosci* 98:585–598.
- Jaramillo-Morales OA, Espinosa-Juárez JV, Corona-Ramos JN, López-Muñoz FJ. 2016. Nociceptive Alteration by High Sucrose Diet in Hypoestrogenic Wistar Rats. *Drug Dev Res* 77:258–266.
- Jiménez Andrade JM, Mantyh P. 2010. Cancer pain: From the development of mouse models to human clinical trials. In:

- Kruger L, Light AR, editors. Translational pain research: from mouse to man". Boca Raton, FL: CRC Press/Taylor & Francis; Chapter 4.
- Jiménez-Andrade JM, Mantyh WG, Bloom AP, Ferng AS, Geffre C, Mantyn PW. 2010. Bone cancer pain. *Ann N Y Acad Sci* 1198:173–181.
- Kaneko K, Umehara M, Homan T, Okamoto K, Oka M, Oyama T. 2014. The analgesic effect of tramadol in animal models of neuropathic pain and fibromyalgia. *Neurosci Lett* 562:28–33.
- Ke C, Li C, Huang X, Cao F, Shi D, He W, Bu H, Gao F, Cai T, Hinton AO, Jr, Tian Y. 2013. Protocadherin20 promotes excitatory synaptogenesis in dorsal horn and contributes to bone cancer pain. *Neuropharmacol* 75:181–190.
- Kleinschmidt-Demasters BK. 1996. Diffuse bone marrow metastases from glioblastoma multiforme: the role of dural invasion. *Human Pathol* 27:197–201.
- Kumar SP. 2011. Cancer pain: A critical review of mechanism-based classification and physical therapy management in palliative care. *Indian J Palliat Care* 17:116–126.
- Lipton A. 2005. Management of bone metastases in breast cancer. *Curr Treat Options Oncol* 6:161–171.
- Manthylh PW, Clohisy DR, Koltzenburg M, Hunt SP. 2002. Molecular mechanisms of cancer pain. *Nat Rev Cancer* 2:201–209.
- Martin TJ, Buechler N, Kahn W, Crews JC, Eisenach JC. 2004. Effects of laparotomy on spontaneous exploratory activity and conditioned operation responding in the rat. A model for post-operative pain. *Anesthesiol* 101:191–203.
- Mercadante S, Fulfuro F. 2007. Management of painful bone metastases. *Curr Opin Oncol* 19:308–314.
- Mercadante S, Villari P, Ferrera P, Casuccio A. 2004. Optimization of opioid therapy for preventing incident pain associated with bone metastases. *J Pain Symptom Manage* 28:505–510.
- Moalem G, Tracey DJ. 2006. Immune and inflammatory mechanisms in neuropathic pain. *Brain Res Rev* 51:240–264.
- Muralidharan A, Wyse BD, Smith MT. 2013. Optimization and characterization of a rat model of prostate cancer-induced bone pain using behavioral, pharmacological, radiological, histological and immunohistochemical methods. *Pharmacol Biochem Behav* 106:33–46.
- Ng WH, Yeo TT, Kaye AH. 2005. Spinal and extracranial metastatic dissemination of malignant glioma. *J Clin Neurosci* 12:379–382.
- Okuducu H, Onal SA. 2005. Is nitric oxide involved in the antinociceptive activity of tramadol? Findings in a rat model of neuropathic pain. *Agri* 17:31–40.
- Paley CA, Johnson MI, Tashani OA, Bagnall AM. 2015. Acupuncture for cancer pain in adults. *Cochrane Database of Syst Rev* 10:1–35.
- Pérez-Rojas JM, González-Macías R, González-Cortés J, Jurado R, Pedraza-Chaverri J, García-López P. 2016. Synergic effect of α -mangostin on the cytotoxicity of cisplatin in a cervical cancer model. *Oxid Med Cell Longev* 7981397
- Peters CM, Ghilardi JR, Keyser CP, Kubota K, Lindsay TH, Luger NM, Mach DB, Schwei MJ, Seycik MA, Mantyh PW. 2005. Tumor-induced injury of primary afferent sensory nerve fibers in bone cancer pain. *Exp Neurol* 193:85–100.
- Quintero JE, Dooley DJ, Pomerleau F, Huettl P, Gerhardt GA. 2011. Amperometric measurement of glutamate release modulation by gabapentin and pregabalin in rat neocortical slices: role of voltage-sensitive Ca²⁺ α 2 δ -1 subunit. *J Pharmacol Exp Ther* 338:240–245.
- Rajagopalan V, El Kamar FG, Thayaparan R, Grossbard ML. 2005. Bone marrow metastases from glioblastoma multiforme—A case report and review of the literature. *J Neurooncol* 72:157–161.
- Sabino MA, Mantyh PW. 2005. Pathophysiology of bone cancer pain. *J Support Oncol* 3:15–24.
- Sakakiyama M, Maeda S, Isami K, Asakura K, So K, Shirakawa H, Nakagawa T, Kaneko S. 2014. Preventive and alleviative effect of tramadol on neuropathic pain in rats: roles of α ₂-adrenoceptors and spinal astrocytes. *J Pharmacol Sci* 124:244–257.
- Santos JA, Piccinelli AC, Formagio MD, Oliveira CS, Santos EP, Alves Stefanello MÉ, Lanza Junior U, Oliveira RJ, Sugizaki MM, Kassuya CA. 2017. Antidepressive and antinociceptive effects of ethanolic extract and fruticuline A from *Salvia lachnostachys* Benth leaves on rodents. *PLoS One* 12:e0172151.
- Sasamura T, Nakamura S, Iida Y, Fujii H, Murata J, Saiki I, Nojima H, Kuraishi Y. 2002. Morphine analgesia suppresses tumor growth and metastasis in a mouse model of cancer pain produced by orthotopic tumor inoculation. *Eur J Pharmacol* 441:185–191.
- Schneider G, Voltz R, Gaertner J. 2012. Cancer pain management and bone metastases: an update for the clinician. *Breast Care (Basel)* 7:113–120.
- Schwei MJ, Honore P, Rogers SD, Salak-Johnson JL, Finke MP, Ramnaraine ML, Clohisy DR, Mantyh PW. 1999. Neurochemical and cellular reorganization of the spinal cord in a murine model of bone cancer pain. *J Neurosci* 19:10886–10897.
- Song ZP, Xiong BR, Guan XH, Cao F, Manyande A, Zhou YQ, Zheng H, Tian YK1. 2016. Minocycline attenuates bone cancer pain in rats by inhibiting NF- κ B in spinal astrocytes. *Acta Pharmacologica Sinica* 37:753–762.
- Stewart BW, Wild CP. 2014. World Cancer Report 2014. IARC/WHO.
- Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJ, Belanger K, Brandes AA, Marosi C, Bogdahn U, et al. 2005. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *New England J Medicine* 352:987–996.
- Takeuchi Y, Takasu K, Honda M, Ono H, Tanabe M. 2007. Neurochemical evidence that supraspinally administered gabapentin activates the descending noradrenergic system after peripheral nerve injury. *Eur J Pharmacol* 556:69–74.
- Taylor CP, Angelotti T, Fauman E. 2007. Pharmacology and mechanism of action of pregabalin: The calcium channel α 2 δ (alpha2-delta) subunit as a target for antiepileptic drug discovery. *Epilepsy Res* 73:137–150.
- Undabeitia J, Castle M, Arrazola M, Pendleton C, Ruiz I, Úrculo E. 2015. Multiple extraneural metastasis of glioblastoma multiforme. *An Sist Sanit Navar* 38:157–161.
- Van den Beuken-van Everdingen MH, de Rijke JM, Kessels AG, Schouten HC, van Kleef M, Patijn J. 2007. Prevalence of pain in patients with cancer: a systematic review of the past 40 years. *Ann Oncol* 18:1437–1449.
- Yang JL, Xu B, Li SS, Zhang WS, Xu H, Deng XM, Zhang YQ. 2012. Gabapentin reduces CX3CL1 signaling and blocks

- spinal microglial activation in monoarthritic rats. *Mol Brain* 30:5–18.
- Yoshizumi M, Parker RA, Eisenach JC, Hayashida K. 2012. Gabapentin inhibits γ -amino butyric acid release in the locus coeruleus but not in the spinal dorsal horn after peripheral nerve injury in rats. *Anesthesiology* 116:1347–1353.
- Yuan X, Wu J, Wang Q, Xu M. 2014. The antinociceptive effect of systemic administration of a combination of low-dose tramadol and dexmedetomidine in a rat model of bone cancer pain. *Eur J Anaesthesiol* 31:30–34.
- Zimmerman M. 1983. Ethical guidelines for investigation of experimental pain in conscious animals. *Pain* 16:109–110.