

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE VETERINARIA



TESIS DOCTORAL

**EFFECTO DEL CANNABIDIOL Y SU INTERACCIÓN CON LA MORFINA SOBRE LA
CONCENTRACIÓN ALVEOLAR MÍNIMA DEL SEVOFLURANO EN RATA**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Cristina Orden Quinto

DIRECTOR

Dr. Francisco Javier Tendillo Cortijo

Dr. Martín Santos González

D. Francisco Javier Tendillo Cortijo. Doctor en Veterinaria y Doctor en Medicina y Cirugía, Facultativo Especialista de Área. Veterinario de la Unidad de Investigación Médico- Quirúrgica del Instituto de Investigación Sanitaria Puerta de Hierro/Hospital Universitario Puerta de Hierro-Majadahonda.

D. Martín Santos González. Doctor en Veterinaria. Facultativo Especialista de Área. Veterinario de la Unidad de Investigación Médico- Quirúrgica del Instituto de Investigación Sanitaria Puerta de Hierro/Hospital Universitario Puerta de Hierro-Majadahonda.

CERTIFICAN:

Que **Dña. Cristina Orden Quinto**, Licenciada en Veterinaria, ha realizado bajo nuestra dirección el trabajo experimental titulado: **“Efecto del cannabidiol y su interacción con la morfina sobre la concentración alveolar mínima del sevoflurano en rata”**, que ha sido desarrollado en la Unidad de Investigación Médico-Quirúrgica del IIS Puerta de Hierro/Hospital Universitario Puerta de Hierro-Majadahonda para optar al grado de Doctor en Veterinaria.

Dicho trabajo reúne, a nuestro juicio, las condiciones de originalidad y rigor metodológico necesarias para que pueda ser sometido a su lectura y defensa pública ante la comisión correspondiente.

Madrid, a 10 de julio de 2019

Fdo. Francisco J. Tendillo Cortijo
González

Fdo. Martín Santos

¿Podrías decirme que camino tomar para salir de aquí
- Eso depende del sitio al que quieras llegar
- No me importa mucho el sitio
- Entonces tampoco importa mucho el camino que tomes
- ...siempre que llegue a alguna parte...
- ¡Oh, siempre llegarás a alguna parte si caminas lo suficiente!

Lewis Carrol. Alicia en el país de las Maravillas.

A mi familia,

Agradecimientos

En primer lugar quiero agradecer a mis Directores de Tesis, al Dr. Francisco Tendillo por acogerme en su grupo de investigación e introducirme en el mundo de la anestesia, permitiéndome realizar este proyecto, y al Dr. Martín Santos, porque sin su dedicación, paciencia y esfuerzo este trabajo no se hubiera realizado.

A mi tutor, el Dr. Javier López San Román, por su inestimable ayuda, sin la cual nos hubiéramos perdido en los trámites burocráticos que conlleva una tesis.

Al Grupo de Estudios sobre Cannabinoides en Enfermedades Neonatales, coordinado por el Dr. José Martínez Orgado, por su apoyo logístico en el laboratorio.

Al Dr. Antonio Sánchez, Coordinador del Biobanco del Instituto de Investigación Sanitaria Puerta de Hierro-Segovia de Arana del Hospital Universitario Puerta de Hierro-Majadahonda, por su ayuda desinteresada y aportaciones a esta tesis.

A Lola Molina y a Aitor Martín, del Servicio de Cirugía Experimental del Hospital Universitario Puerta de Hierro, porque sin su ayuda en los procedimientos experimentales y cuidado de los animales este trabajo no hubiera sido posible.

A la Dra. Mercedes Perez Agustín, por su paciencia y ayuda con las numerosas correcciones lingüísticas de la tesis.

Al Dr. José Luis Blanco y a la Dra. Marta Eulalia García por transmitirme su pasión por la investigación al abrirme las puertas de su laboratorio hace ya diez años, pero sobre todo por no haberlas cerrado nunca.

A mis padres, por dejarme la educación como mejor herencia, a mis hermanas por su apoyo constante cualquiera que sea el proyecto en el que me embarco, y por supuesto a Jose, por estar siempre a mi lado.

Índice

Índice de tablas	V
Índice de figuras	VII
Abreviaturas	VII
Resumen	XI
Summary	XIII
I. Introducción	1
1.1 OPIOIDES	1
1.1.1 Historia	1
1.1.2. Farmacología de los opioides	3
a. Péptidos opioides endógenos	3
b. Receptores de opioides	6
c. Mecanismo de la analgesia inducida por opioides	11
d. Clasificación de los analgésicos opioides	12
1.1.3. Propiedades farmacocinéticas de los opioides	15
a. Propiedades fisico-químicas	15
b. Absorción	16
c. Distribución	16
d. Biotransformación	17
d. Eliminación	17
1.1.4. Propiedades farmacodinámicas: acciones de los opioides	18
a. Efectos neurofisiológicos	18
b. Efectos respiratorios	19
c. Efectos cardiovasculares	20
d. Efectos gastrointestinales	20
e. Efectos sobre aparato urinario	21
f. Efectos neuroendocrinos	21
g. Tolerancia, dependencia e hiperalgesia	21
1.1.5. Morfina	22
1.2 CANNABINOIDES	25

1.2.1 Historia	25
1.2.2. Farmacología de los cannabinoides	26
a. Receptores cannabinoides:	26
b. Endocannabinoides	31
c. Mecanismos de acción	33
d. Clasificación de los cannabinoides	34
1.2.3. Propiedades farmacocinéticas de los cannabinoides	38
1.2.4 Propiedades farmacodinámicas: acciones de los cannabinoides	40
a. Acciones sobre la actividad motora	40
b. Acciones sobre el sistema inmunitario	41
c. Acciones analgésicas	42
d. Acciones sobre la memoria y el aprendizaje	43
e. Tolerancia y dependencia	43
1.2.5. Cannabidiol	44
1.3 Anestésicos inhalatorios	47
1.3.1 Historia	47
1.3.2 Farmacología de los anestésicos inhalatorios	48
a. Características físico-químicas	48
b. Concentración alveolar mínima	52
c. Mecanismos de acción	54
1.3.3 Farmacocinética: captación y eliminación	56
1.3.4 Farmacodinamia: acciones de los agentes inhalatorios	59
a. Acciones en el SNC:	59
b. Acciones cardiovasculares	60
c. Acciones respiratorias	61
d. Otras acciones	61
e. Efectos adversos	62
1.3.5 Sevoflurano	63
II. Justificación	69
III. Objetivos	71
IV. Material y Métodos	73
4.1 Animales	73
4.2 Personal	73

4.3 Metodología	74
4.3.1 Procedimientos	74
4.3.1.1. Anestesia	74
4.3.1.2. Monitorización	75
4.3.1.3. Determinación de la CAM	78
4.3.2 Registro de parámetros	80
4.3.3 Grupos de estudio	80
4.3.4 Estudio estadístico	82
4.3.5 Cuantificación de la interacción farmacológica	82
V. Resultados	85
5.1 Reducción en la CAM	85
5.2 Parámetros fisiológicos	89
VI. Discusión	103
6.1 Limitaciones de la metodología	103
6.2 Determinación de la CAM	108
6.3 Determinación de los parámetros fisiológicos	109
6.4 Efecto sobre la CAM	112
VII. Conclusiones	115
VIII. Bibliografía	117

Índice de tablas

Tabla 1: Receptores opioides	9
Tabla 2: Clasificación de los opioides según su naturaleza	14
Tabla 3: Clasificación de los opioides según su estructura química	15
Tabla 4: Clasificación de los opioides en función de su potencia analgésica	15
Tabla 5: Clasificación de los opioides en función de su relación con el receptor	15
Tabla 6: Características fisicoquímicas y farmacocinéticas de los opioides comúnmente utilizados en adultos.	17
Tabla 7: Clasificación de los cannabinoides	37
Tabla 8: Propiedades físico-químicas de los anestésicos volátiles	51
Tabla 9: Algunos factores que afectan a la concentración alveolar mínima (CAM) de los anestésicos inhalatorios (Quasha y col, 1980; Cullen, 1986; Steffey, 1996).	54
Tabla 10: Valores medios \pm desviación estándar (SD) de los valores de MACSEVi y MACSEVf y porcentaje de reducción de la MAC.	86
Tabla 11: Valores medios \pm desviación estándar (SD) de la PAS (mmHg) en el momento de determinación de la MACSEVi y la MACSEVf	89
Tabla 12: Valores medios \pm desviación estándar (SD) de la PAD (mmHg) en el momento de determinación de la MACSEVi y la MACSEVf	90
Tabla 13: Valores medios \pm desviación estándar (SD) de la PAM (mmHg) en el momento de determinación de la MACSEVi y la MACSEVf	91
Tabla 14: Valores medios \pm desviación estándar (SD) de la FC (ppm) en el momento de determinación de la MACSEVi y la MACSEVf	92
Tabla 15: Valores medios \pm desviación estándar (SD) de la FR (rpm) en el momento de determinación de la MACSEVi y la MACSEVf	93
Tabla 16: Valores medios \pm desviación estándar (SD) del pH en el momento de determinación de la MACSEVi y la MACSEVf	94

Tabla 17: Valores medios \pm desviación estándar (SD) de la PaO ₂ (mmHg) en el momento de determinación de la MACSEV _i y la MACSEV _f	95
Tabla 18: Valores medios \pm desviación estándar (SD) de la PaCO ₂ (mmHg) en el momento de determinación de la MACSEV _i y la MACSEV _f	96
Tabla 19: Valores medios \pm desviación estándar (SD) de la T ^a (°C) en el momento de determinación de la MACSEV _i y la MACSEV _f	97
Tabla 20: Valores medios \pm desviación estándar de la FC (ppm) en el momento de la determinación de la MACSEV antes de la inyección de los fármacos (Tiempo 0) y después de la administración intraperitoneal de vehículo, morfina con salino (MOR+saline), morfina con vehículo(MOR+vehicle) y cannabidiol solo (CBD) o en combinación con morfina (MOR+CBD) en ratas Wistar Han.	100
Tabla 21: Valores medios \pm desviación estándar de la PAM (mmHg) en el momento de la determinación de la MACSEV antes de la inyección de los fármacos (Tiempo 0) y después de la administración intraperitoneal de vehículo, morfina con salino (MOR+saline), morfina con vehículo(MOR+vehicle) y cannabidiol solo (CBD) o en combinación con morfina (MOR+CBD) en ratas Wistar Han.	101

Índice de figuras

Figura 1: Correlación estructural entre la Metencefalina y la Morfina	3
Figura 2: Estructura química de N/OFQ	5
Figura 3: Esquema receptor	10
(Fuente: Yan-Lin He y col, 2012. DOI 10.1371/journal.pone.0041303)	10
Figura 4: Estructura molecular de los receptores cannabinoides CB1 y CB2 .	27
Figura 5: Corte sagital de cerebro de rata adulta que muestra la distribución de receptores CB1 (1,caudado-putamen; 2, globo pálido; 3, núcleo entopeduncular; 4, sustancia nigra; 5, cerebelo; 6, hipocampo; 7, corteza cerebral)	28
Figura 6: Acoplamiento del receptor de cannabinoides a través de proteínas G	29
Figura 7: Estructura química de los cannabinoides más relevantes.	38
Figura 8: Relación concentración alveolar (Fa) e inspiratoria (Fi) de los diferentes agentes inhalados en fx del tiempo.	58
Figura 9: Colocación de mascarilla facial para la inducción anestésica	74
Figura 10: Proceso de intubación. (10a: visualización de la laringe; 10b: introducción de la guía de teflón; 10c: colocación del catéter; 10d: conexión al circuito anestésico)	75
Figura 11: Cateterización de la arteria carótida izquierda (11a: lugar de incisión; 11b: abordaje quirúrgico de la arteria; 11c: disección de la carótida con dos suturas de seda; 11d: introducción del catéter)	76
Figura 12: Monitorización de los parámetros cardiovasculares y respiratorios	77
Figura 13: Aplicación del estímulo doloroso supramáximo	79
Figura 14: Reducción de la concentración alveolar mínima (MAC) de sevoflurano producida por la administración intraperitoneal de 5mg/kg de morfina con solución salina (MOR+salino), vehículo (MOR+vehicle) y diferentes dosis de cannabidiol (MOR+CBD). Los datos están expresados como media \pm SD.	87
Figura 15: Representación gráfica de la ecuación de regresión cuadrática. Los datos están expresados como media \pm SD.	88

Figura 16: Representación gráfica de la FC (ppm) en el momento de la determinación de la MACSEV antes de la inyección de los fármacos (Tiempo 0) y después de la administración intraperitoneal de morfina (MOR) y cannabidiol solo (CBD) o en combinación con morfina (MOR+CBD) en ratas Wistar Han. Los datos están expresados como media \pm SD. 98

Figura 17: Representación gráfica de la PAM (mmHg) en el momento de la determinación de la MACSEV antes de la inyección de los fármacos (Tiempo 0) y después de la administración intraperitoneal de morfina (MOR) y cannabidiol solo (CBD) o en combinación con morfina (MOR+CBD) en ratas Wistar Han. Los datos están expresados como media \pm SD. 99

Abreviaturas

aC: antes de Cristo

ACTH: hormona adrenocorticotropa

AEA: anandamida

AKt (PKB): proteína kinasa B

AMPA: ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico

AMPc: adenosín monofosfato cíclico

ARNm: ARN mensajero (ácido ribonucleico)

ATP: adenosín trifosfato

α -MSH: hormona estimulante de melanocitos alfa

β -LPH: lipotropina beta

Ca²⁺: calcio

CAM: concentración alveolar mínima

CAM_{sev0}: concentración alveolar mínima de sevoflurano inicial

CAM_{sevf}: concentración alveolar mínima de sevoflurano final

CBD: cannabidiol

CO₂: dióxido de carbono

CP: coeficiente de partición

COX: ciclooxigenasa

DE: desviación estándar

EEG: electroencefalograma

ERKs: señal extracelular regulada por kinasas

ETM: error típico de la media

FC: frecuencia cardiaca

FR: frecuencia respiratoria

FSH: hormona foliculoestimulante

GABA: ácido gamma-aminobutírico

GC: gasto cardiaco

GDP: guanosín difosfato

IFN- α : interferón alfa

IFN- γ : interferón gamma

IL-2: interleucina 2

IL-4: interleucina 4
IL-10: interleucina 10
iNOS: oxido nitrico sintasa inducible
IP: intraperitoneal
IV: intravenoso
K⁺: potasio
kg: kilogramo
LH: hormona luteinizante
MAPK: proteinas quinasas activadas por mitógenos
MEK: proteina quinasa activada por mitógenos
mEq: miliequivalente
m: miligramo
mL: mililitro
mmHg: milímetros de mercurio
MOR: morfina
NK: células natural killer
N₂O: óxido nitroso
N/OFQ: receptor nociceptina/orfanina
NMDA: receptor N-metil D-aspartato
O₂: oxígeno
ORL-1: receptor de opioides huérfano
P_{amb}: presión ambiental
PAD: presión arterial diastólica
PAM: presión arterial media
PAS: presión arterial sistólica
PaO₂: presión parcial de oxígeno
pCO₂: presión parcial de dióxido de carbono
PIC: presión intracraneal
PI₃K: fosfoinositol 3 quinasa
pKa: media logarítmica de la constante de acidez
POMC: proopiomelanocortina
PV: presión de vapor
PVS: presión de vapor saturado
RVS: resistencia vascular sistémica
SAL: solución salina fisiológica

SNC: sistema nervioso central

THC: tetrahidrocannabinol

TRPV1: receptor de potencial transitorio V1

TSH: hormona estimulante tiroidea

UD-GD: UD-glucorinil deshidrogenasa

UD-GT: UD-glucorinil transferasa

2-AG: 2-araquidonilglicerol

5-HT₂A: Receptor de 5-hidroxitriptamina subtipo A.

°C: grados centígrados

Resumen

Introducción: El cannabidiol (CBD) es un componente natural de la planta *Cannabis sativa*, el cual, a diferencia de otros cannabinoides (como por ejemplo el Δ -9 Tetrahydrocannabidiol (THC)) carece de efectos psicoactivos, aunque posee efecto analgésico y se ha demostrado también una potente acción antiinflamatoria e inmunomoduladora. Se sabe que la morfina reduce la concentración alveolar mínima del sevoflurano (CAM_{SEV}) en rata en un 30%, sin embargo, los efectos del CBD en la CAM_{SEV} no se han estudiado. Tampoco se ha investigado la posible interacción entre el CBD y la morfina sobre la CAM_{SEV} . Este trabajo estudia el efecto del CBD sobre la reducción que produce la morfina en la CAM del sevoflurano en rata.

Metodología: Sesenta y ocho ratas Wistar Han macho de un peso de 272 ± 23 gr y una edad de 3 meses fueron distribuidas aleatoriamente en quince grupos que recibieron un bolo intraperitoneal (IP) de 1, 3, 5, 6.5, 7.5 o 10mg/kg de cannabidiol solo (CBD1, CBD3, CBD5, CBD6,5, CBD7,5 and CBD10) y con 5mg/kg de morfina (MOR+CBD1, MOR+CBD3, MOR+CBD5, MOR+CBD6,5, MOR+CBD7,5 y MOR+CBD10); y tres grupos control: MOR+salino, vehículo y MOR+vehículo, recibieron un bolo IP de morfina, vehículo o vehículo con morfina respectivamente. entonces, la CAM_{SEV} se determinó a partir del gas alveolar en el momento de clampar la cola. Los parámetros cardiorespiratorios y gasométricos fueron registrados en el momento de la determinación de la CAM_{SEV} . El porcentaje de reducción de la CAM_{SEV} se analizó usando un análisis unidireccional de la varianza (ANOVA) seguido de la prueba de Tukey. Los datos fisiológicos se analizaron mediante un análisis de dos vías de la varianza (ANOVA) para medidas repetidas y cuando hubo significación se hizo una comparación post hoc mediante la prueba de Tukey para comparaciones múltiples. Todos los datos se presentaron como media \pm desviación estándar. La significación estadística fue aceptada cuando $p < 0,05$.

Resultados: La CAM_{SEV} no se ve reducida por la acción del CBD administrado solo; sin embargo, la adición de morfina a las diferentes dosis de CBD si reducen significativamente esta CAM_{SEV} . Esta reducción en la CAM_{SEV} producida por la adición de morfina fue mayor en los grupos de MOR+salino, MOR+vehículo,

MOR+CBD1, MOR+CBD7,5 y MOR+CBD10 ($34\% \pm 4$; $33\% \pm 8\%$, $29\% \pm 5\%$, $32\% \pm 5\%$ and $30\% \pm 6\%$ de reducción en la CAM respectivamente), fue menor en los grupos de MOR+CBD3 y MOR+CBD6,5 ($24\% \pm 3\%$, $26\% \pm 4\%$ respectivamente) y finalmente el menor porcentaje de reducción se produjo en el grupo MOR+CBD5 ($17\% \pm 2\%$). Solo el grupo MOR+CBD5 fue estadísticamente significativo con respecto a los grupos de MOR+salino, MOR+vehículo, MOR+CBD1, MOR+CBD7,5 y MOR+CBD10.

Conclusión: La CAM_{SEV} no se ve reducida por la acción del CBD administrado solo; sin embargo, la adición de morfina a las diferentes dosis de CBD si reducen significativamente esta CAM_{SEV} , aunque esta reducción no fue dependiente de la dosis.

Summary

Introduction: Cannabidiol (CBD) is a natural component of *Cannabis sativa* that, unlike other cannabinoids (for example, Δ -9 Tetrahydrocannabinol (THC)) is devoid of psychotomimetic activity, but produces antinociceptive effects, and also demonstrates potent antiinflammatory and immunomodulatory actions. It is known that morphine produces a 30% reduction on sevoflurane minimum alveolar concentration (MAC_{SEV}) in the rat, but CBD effects on the MAC_{SEV} have not been studied. Nor, possible interaction between CBD and morphine on MAC_{SEV} has been investigated. The present study investigated the effect of CBD on sevoflurane MAC reduction in rats and the change in the effect when added morphine.

Methodology: Sixty-eight male Wistar Han rats weighing 272 ± 23 g and aged three months were randomly divided into fifteen groups that received an intraperitoneal (IP) bolus of 1, 3, 5, 6.5, 7.5 or 10 mg/kg of cannabidiol alone (CBD1, CBD3, CBD5, CBD6,5, CBD7,5 and CBD10) and with 5mg/kg of morphine (MOR+CBD1, MOR+CBD3, MOR+CBD5, MOR+CBD6,5, MOR+CBD7,5 and MOR+CBD10); and three controls groups: MOR+saline, vehicle and MOR+vehicle groups, received an IP bolus of morphine, vehicle alone or with morphine respectively. Then the MAC_{SEV} was determined from alveolar gas samples at the time of tail clamp. Cardiorespiratory and gasometric parameters were recorded at the time of MAC_{SEV} determination. The MAC_{SEV} reduction was analyzed using a one-way ANOVA followed by Tukey's test. Physiological data were analyzed using a two-way ANOVA for repeated measures and when significant post hoc comparison using the Tukey's test for multiple comparisons. Data are presented as mean \pm standard deviation.

Results: The average MAC_{SEV} was not reduced by the action of cannabidiol administered alone, but the addition of MOR to the different doses of CBD significantly reduced the MAC_{SEV} . That reduction in MAC_{SEV} by MOR addition was higher in MOR+saline, MOR+vehicle, MOR+CBD1, MOR+CBD7,5 and MOR+CBD10 groups ($34\% \pm 4\%$, $33\% \pm 8\%$, $29\% \pm 5\%$, $32\% \pm 5\%$ and $30\% \pm 6\%$ reduction in MAC respectively), less in MOR+CBD3 and MOR+CBD6,5 groups ($24\% \pm 3\%$, $26\% \pm 4\%$ respectively) and the lowest in MOR+CBD5 group ($17\% \pm 2\%$). However, only

MOR+CBD5 group was statistically significant respect to MOR+saline, MOR+vehicle, MOR+CBD1, MOR+CBD7,5 and MOR+CBD10 groups.

Conclusion: MAC_{SEV} in rat was not reduced by the action of cannabidiol alone, but the addition of morphine to different doses of cannabidiol significantly reduced MAC_{SEV} in the rat, although this reduction was not dose-dependent.

I. Introducción

1.1 OPIOIDES

1.1.1 Historia

El término opiáceo hace referencia a todos los compuestos relacionados con el opio, del griego opos (jugo), y son aquellas sustancias con propiedades farmacológicas extraídas del jugo de la amapola (*Papaver somniferum*).

Las primeras referencias a los opiáceos las encontramos en los escritos de Teofrasto en el siglo III a.C. Posteriormente, los comerciantes árabes introdujeron los opiáceos en Oriente, donde se utilizó para el tratamiento de la disentería. En Europa, el encargado de extender el uso clínico de los opioides fue Paracelso, y hasta tal punto se hizo habitual su uso en la práctica clínica, que en 1680 Sydenham escribió: “... de todos los remedios que se ha servido el Todopoderoso dar al hombre para aliviar sus sufrimientos, ninguno es tan universal y eficaz como el opio” (Jafe y Martin, 1985).

Pese al uso extendido de los opioides, no fue hasta 1806 cuando Sertüner consiguió aislar una sustancia pura en el opio, la llamó morfina, en honor a Morfeo, dios griego de los sueños (Jafe y Martin, 1985).

No tardaron en descubrirse otros alcaloides en el opio, como la codeína en 1832 por Robiquet o la papaverina en 1848 por Merck, y a mediados del siglo XIX ya era práctica habitual en todo el mundo médico el uso de estos alcaloides puros en lugar de las preparaciones de opio brutas.

Posteriormente se acuñó el término opioide para hacer referencia a todos los análogos sintéticos de estos fármacos que actúan de forma similar a la morfina.

Desde que se evidenciaron los efectos tóxicos de los opiáceos se han querido desarrollar nuevas generaciones de analgésicos opioides con propiedades agonistas, antagonistas parciales, agonistas-antagonistas mixtos y antagonistas puros para poder disponer de agentes con menos efectos indeseables, y en definitiva, mas seguros y eficaces (Colasanti, 1990).

En 1938 Schaumann y Eisleb sintetizan el primer analgésico opioide completamente sintético, la meperidina. Los primeros antagonistas se introducen en 1940, son la naloxona y naltrexona. En 1961, Paul Janssen sintetiza el citrato de fentanilo.

Los opioides han sido, y continúan siendo, la piedra angular del tratamiento del dolor. A pesar de la cantidad de analgésicos opioides con los que contamos en la actualidad, la morfina y el fentanilo a día de hoy se siguen considerando el “gold standard” en anestesia, utilizándose como modelo para comparar el resto de analgésicos opioides (Glass y col, 1999).

En 1973 investigadores de tres laboratorios diferentes, Pert y Snyder, Simon y Terenius demostraron la presencia de sitios de unión a los opiáceos en el encéfalo (Feldman y col, 1997; Resigne y Pasternak, 1996), lo cual permitió abrir la puerta a una nueva era en el conocimiento de la forma de actuación de estos fármacos.

El hecho de que en el encéfalo hubiera sitios de unión específicos sugería la necesidad de que hubiera también un ligando endógeno capaz de ejercer su actividad a través de ese receptor, es decir, que previsiblemente este ligando tendría una estructura similar a la morfina. Esta teoría cobro mayor fuerza al descubrir que, al administrar naloxona, el efecto analgésico inducido por el estrés o por un estímulo eléctrico en el encéfalo no se producía.

Finalmente, en 1975, Hughes identificó un factor similar a un opiáceo pero endógeno, lo denominó encefalina (*de la cabeza*) (Hughes y col, 1975).

Tras el descubrimiento de la encefalina no tardaron en llegar más descubrimientos, y así se consiguieron aislar la dinorfina y la endorfina, otras dos clases de opioides endógenos. En esta búsqueda se hallaron además nuevas clases de receptores opioides.

Sin embargo, no fue hasta 1976 que se confirmó el concepto de multiplicidad de receptor por Martin y col (Martin y col, 1976) a partir de sus estudios realizados con perros sometidos a sección medular, en los que se comprobó que los diferentes ligandos descubiertos presentaban diferente actividad analgésica, además de no presentar tolerancia cruzada entre ellos.

1.1.2. Farmacología de los opioides

a. Péptidos opioides endógenos

El sistema de opioides endógeno es complejo y delicado, con una gran diversidad de ligandos endógenos agrupados en tres familias distintas: encefalinas, endorfinas y dinorfinas. (Chauvin, 1995)

La explicación de por qué la morfina puede activar los receptores opioides del encéfalo como si se tratase de un ligando endógeno más, radica en su estructura, concretamente en el extremo amino terminal. Además, esta similitud estructural se observa en la mayoría de los péptidos opioides endógenos descritos, presentando todos ellos los mismos cuatro residuos en el extremo N-terminal. (Figura 1) (Flórez, 1992)

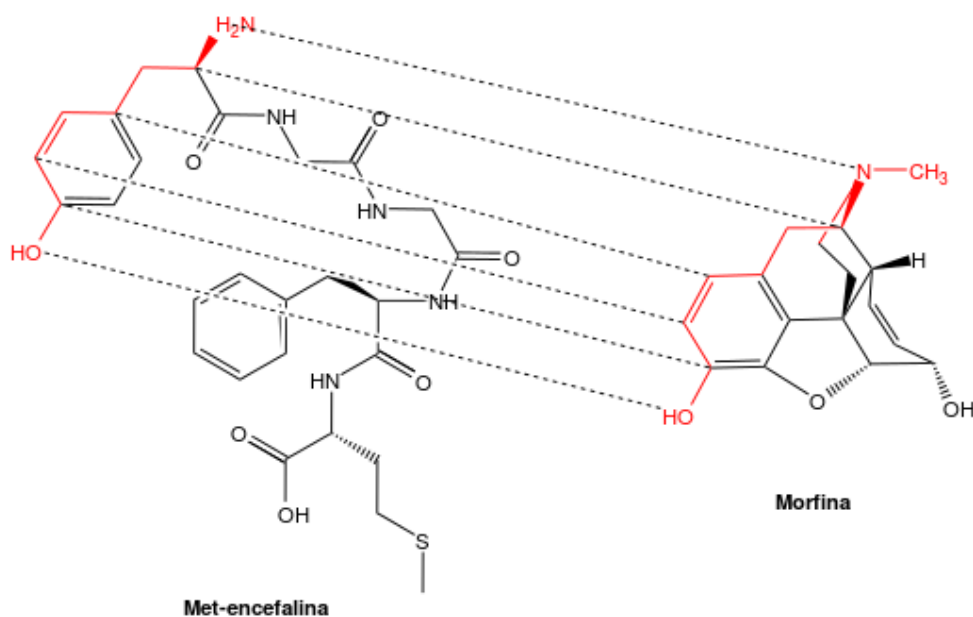


Figura 1: Correlación estructural entre la Metencefalina y la Morfina

Cada una de estas familias deriva de un polipéptido precursor distinto, los cuales a su vez están codificados por tres genes correspondientes diferentes. Estos precursores son la prepropiomelanocortina (POMC) para las endorfinas, la proencefalina para las encefalinas y la prodinorfina para las dinorfinas (Villarejo y col, 2000).

Después de la traducción los precursores sufren complejas divisiones y modificaciones que dan lugar a la síntesis de múltiples péptidos activos. Estos péptidos están ampliamente distribuidos en el cerebro y médula espinal, aunque siguiendo patrones diferentes (Villarejo, 1998).

El principal péptido opioide derivado de la POMC es la endorfina- β , pero este precursor también es capaz de transformarse hacia péptidos no opioides, como la hormona adrenocorticotrópica (ACTH), la hormona estimulante de los melanocitos α (α -MSH) y la lipotropina β (β -LPH). Esta relación indica una estrecha conexión entre el eje del estrés y los sistemas de opioides (Villarejo y col, 2000).

Dentro del SNC, la distribución de péptidos a partir de la POMC es relativamente limitada, encontrando densidades altas en el núcleo arqueado, el área límbica, el tallo encefálico y la médula espinal (Snyder, 1977). Esta distribución se corresponde con zonas del encéfalo donde la estimulación eléctrica puede presentar actividad analgésica (Kuhar y col, 1973).

Aunque en el SNC se pueden localizar péptidos derivados de la prodinorfina y la proencefalina ampliamente distribuidos, estos suelen estar en mayor densidad en la lámina I y II de la médula espinal, núcleo trigémino espinal y sustancia gris periacueductual, es decir en las áreas relacionadas con la nocicepción. (McPherson y col, 1991). También en las áreas implicadas en la modulación de la respuesta afectiva (amígdala, hipocampo, locus ceruleus y la corteza cerebral), así como en las implicadas en la regulación del control motor (núcleo caudado y globo pálido), en la regulación del sistema nervioso autónomo (bulbo raquídeo) y en la regulación de funciones neuroendocrinas (eminencia media) (Czlonkowski y col, 1983).

Generalmente las familias de péptidos se localizan en grupos diferentes de neuronas, pero, en ocasiones se puede expresar más de una familia dentro de la misma neurona (McPherson y Feldman, 1991).

En 1995 se descubrió un nuevo péptido opioide endógeno que, debido a una leve modificación del centro opioide aminoterminal, no interaccionaba con los tres receptores clásicos de opioides endógenos. Un grupo de investigadores lo denominó orfanina FQ (OFQ), mientras que otro grupo lo llamó nocioceptina (N) porque disminuía el umbral del dolor en ciertas circunstancias (Reinscheid y col, 1995; Meunier y col, 1995).

El sistema N/OFQ representa un nuevo avance en el estudio de los opioides, este receptor, también llamado receptor de opioide “huérfano” presenta una gran similitud estructural con la dinorfina, y sin embargo su actividad sobre la modulación de la conducta y sobre la respuesta al dolor es diferente de las que presentan los tres receptores de opioides clásicos (Mogil y Pasternak, 2001).

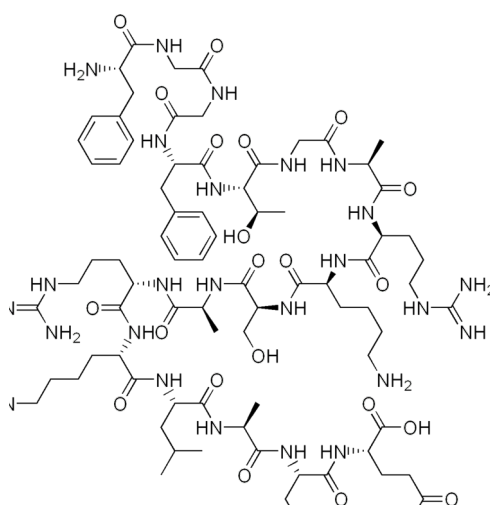


Figura 2: Estructura química de N/OFQ

La peculiar distribución en el organismo del precursor N/OFQ parece ser indicativo de importantes funciones en el hipocampo, la corteza y otras localizaciones sensitivas. Además a través de N/OFQ se desarrolla un complejo perfil conductual, con efectos también en la recompensa y refuerzo respecto a fármacos así como interacciones con el sistema del estrés, procesos comportamentales y de memoria (Nishi y col, 1997).

Biosíntesis, transporte, liberación y metabolismo de los péptidos opioides:

Los precursores de los péptidos se sintetizan en los cuerpos neuronales, y se almacenan en vesículas a nivel de la terminación axonal. Se liberan en respuesta a ciertos estímulos, ejerciendo una acción inhibitoria sobre su propia liberación (retroalimentación negativa) (Feldman y col, 1997).

b. Receptores de opioides

Los receptores opioides son sitios específicos de unión para los agonistas opioides endógenos y exógenos, así como para sus antagonistas, a través de los cuales ejercen sus efectos fisiológicos.

En un primer momento, según la existencia del ligando selectivo se describieron los tres tipos de receptores opioides. Así, por la morfina, se habló de receptor Mu (μ) o MOR, por la ketociclazocina, el receptor Kappa o KOR (κ), y por SKF10.047, el receptor Sigma (σ) (Martin y col, 1976). Sin embargo, este último hoy en día no se considera un receptor opioide, pues la naloxona, antagonista, no bloquea su actividad (Snyder y Pasternak, 2003).

El tercer tipo de receptor opioide denominado Delta (δ) o DOR, se descubrió al analizar la acción de las encefalinas en el vaso deferente del ratón, al observarse una actividad mayor que la que presenta la morfina (Lord y col, 1977).

Los receptores Kappa, Mu y Delta comprenden respectivamente el 50%, 40% y 10% de los receptores opioides espinales. Estudios posteriores han demostrado la existencia de diferentes subtipos dentro de cada clase, así se han descrito 3 subpoblaciones para el MOR (MOR1, MOR2 y MOR3) (Pasternak, 1982; Gintzler y Pasternak, 1983; Pasternak y Wood, 1986; Stefano y col., 1993; Makman y col., 1995), 2 para el DOR (DOR1 y DOR2) (Jiang y col., 1991; Sofuoglu y col., 1991; Stewart y Hammond, 1993) y 3 para el KOR (KOR1, KOR2 y KOR3) (Morre y col., 1983; Castanas y col., 1984; Clark y col., 1989).

Además se sabe que presentan perfiles de selectividad diferentes, así como localizaciones únicas dentro del encéfalo y la médula espinal (Villarejo, 1998; Feldman y col, 1997; Resigne y Pasternak, 1996).

Más recientemente, se descubrió el receptor N/OFQ, denominándolo “opioid-receptor-like 1” (ORL-1) o “receptor de opioide huérfano”. Este receptor ha supuesto un nuevo paso en el estudio de los opioides (Mollereau y col, 1994; Fukuda y col, 1994).

Cada uno de los receptores opioides se distribuye en el encéfalo, medula espinal y periferia de una manera particular, que se relaciona con las funciones que van a desarrollar.

La manera en la que se distribuyen en el sistema nervioso central no es uniforme, por lo tanto tampoco lo es su concentración en cada localización. Pese a ese hecho, no se puede demostrar la relación entre la densidad de receptores activados en una zona determinada con su potencia analgésica (Chauvin, 1995). En la médula espinal, los receptores opioides se localizan en mayor proporción en zonas superficiales de la misma, mientras que en zonas más profundas la densidad es mucho menor. Su localización es tanto pre- como postsináptica.

A esta localización espinal hay que añadir una localización supraespinal, de modo que existen receptores μ a nivel de la sustancia periacueductual, núcleo dorsal y medio del rafe, corteza, tálamo e hipocampo (Mansour y col, 1988; Arvidsson y col, 1995; Mansour y col, 1995a; Akil y col, 1998), receptores δ en la corteza, putamen y globo pálido, y receptores κ en el hipocampo y en el tálamo (Mansour y col, 1988). A nivel de sistema nervioso periférico se localizan en el plexo mioentérico y submucoso, vejiga urinaria y conductos deferentes (Stein, 1993; Puig y Montes, 1998).

La síntesis posterior de agonistas y antagonistas selectivos para cada receptor ayudó al estudio de sus funciones biológicas *in vivo*. Los antagonistas sintetizados fueron CTOP (análogo cíclico de la somatostatina) para el receptor μ , el naltrindol (derivado de la naloxona) para el receptor delta, y nor-BNI (derivado de la naltrexona) para el receptor kappa.

Receptor mu:

Los receptores μ se definieron por su afinidad con la morfina, de hecho, la mayor parte de los opioides utilizados en clínica son relativamente selectivos para los receptores μ . En cuanto a los péptidos endógenos, las encefalinas y endorfinas se fijan con gran avidéz a este receptor, mientras que la dinorfina lo hace en menor medida (Reisine y Pasternak, 1997).

Hay que tener en cuenta que los fármacos relativamente selectivos para este receptor cuando se aplican a dosis estándar pueden presentar cambios en el perfil farmacológico, pues se ha visto que son capaces de interactuar también con otros tipos de receptores cuando se aplican a dosis elevadas (Reisine y Pasternak, 1996; Bodnard y col, 1991).

La activación de los receptores μ produce analgesia, depresión respiratoria, miosis, reducción de la motilidad gastrointestinal y euforia. Dentro de la clase de receptores μ encontramos tres subtipos: μ_1 , μ_2 y μ_3 (Fukuda, 2005).

La morfina administrada por vía parenteral va a ejercer su función analgésica mediada por la unión a receptores μ_1 , localizados a nivel suprarraquídeo. Aunque, esta analgesia también puede ser inducida, en otros casos, por la unión a receptores μ_2 , localizados a nivel raquídeo (Villarejo y col, 2000).

Algunos de los efectos adversos de la morfina y los fármacos morfinomiméticos en general, como son la depresión respiratoria y la reducción de la motilidad intestinal se considera que están mediados por los receptores μ_2 (Villarejo y col, 2000).

Receptor kappa:

Los receptores kappa producen analgesia a nivel raquídeo. Las dinorfinas son los ligandos endógenos mas selectivos para estos receptores (Reisine y Pasternak 1996).

Como ocurre con los receptores μ , los receptores κ presentan tres subtipos diferentes: κ_1 , κ_2 y κ_3 . Mientras que todavía no se han dilucidado las propiedades farmacológicas de κ_2 , se sabe que κ_1 produce analgesia a nivel raquídeo y κ_3 a nivel suprarraquídeo (Villarejo y col, 2000).

Aunque se desarrolle tolerancia frente a los agonistas μ , los fármacos que actúan como agonistas selectivos de receptores kappa no pierden potencia analgésica. Estos receptores están localizados principalmente a nivel de la médula espinal, y dan lugar a miosis, depresión respiratoria y disforia (Villarejo y col, 2000).

Receptor delta

Los ligandos endógenos para estos receptores son las encefalinas. Al igual que en los dos receptores anteriores se han identificado por subtipos de receptores delta: $\delta 1$ y $\delta 2$ (Reisine y Pasternak, 1996; Bodnard y col, 1991).

La activación de los receptores delta produce analgesia y efectos de refuerzo positivo a nivel suprarraquídeo, y antinociocepción para los estímulos térmicos a nivel raquídeo.

Tabla 1: Receptores opioides

	MU	DELTA	KAPPA
Ligando endógeno	Endorfinas	Encefalinas	Dinorfinas
Ligando sintético	Morfina Fentanilo Metadona	DPDPE DTLET DSTBULET	U50488H U69893 Pentazocina
Antagonista	Naloxona	Naloxona	Naloxona
Subtipos	1,2	1,2	1,2,3

Mecanismos de trasducción de la señal intracelular:

Los receptores opioides pertenecen a la familia de receptores acoplados a proteína G. La proteína G presenta un dominio extracelular que facilita la unión e introducción en la célula de sustancias hidrosolubles, y un dominio intracelular catalítico y acoplado a GDP (Minami y Satoh, 1995).

La unión del agonista a su receptor desencadena un cambio estructural que facilita la unión entre la proteína G y el receptor. La subunidad alfa se disocia de la beta y la gamma y se acopla al efector.

Con esta activación del receptor se inhibe la adenilato ciclasa y se reduce la concentración de AMPc. Los canales de K^+ de rectificación interna se activan, mientras que los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje se inhiben. Todo esto deriva en una reducción de la excitabilidad neuronal. Además se ha demostrado que los receptores opioides promueven la entrada de Ca^{2+} en la célula (Wandless y col, 1997).

Los mecanismos de adaptación celular que conducen a la tolerancia, la dependencia y los síntomas de privación, podrían ser consecuencia de la exposición crónica de los receptores opioides a los agonistas (Mestek y col, 1995).

Se considera que, tras la administración aguda de opioides, el aumento de la actividad de la adenilato ciclasa que se produce en contraposición al descenso de los niveles de AMPc, es la responsable del desarrollo de tolerancia a largo plazo de los opioides (Avidor y col, 1996).

El receptor opoide, como cualquier otro receptor acoplado a proteína G, puede sufrir una internalización rápida a través de la vía endocítica clásica mediada por el agonista (Trapaidze y col, 1996; Guadriault y col, 1997). En función del ligando en cuestión del que se trate, este proceso se realizará de una manera u otra. Por ejemplo, la etorfina y las encefalinas producen una internalización rápida del receptor μ , mientras que la morfina, aunque disminuye la actividad de la adeniliciclasa, no causa internalización del receptor μ (Keith y col, 1996).

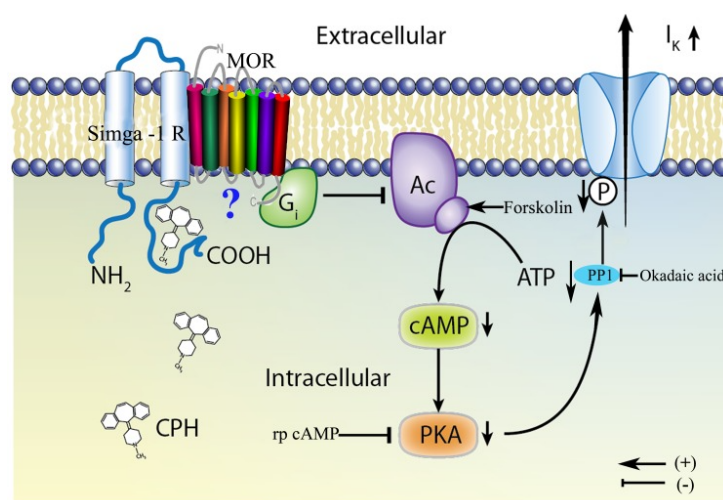


Figura 3: Esquema receptor
(Fuente: Yan-Lin He y col, 2012. DOI 10.1371/journal.pone.0041303)

c. Mecanismo de la analgesia inducida por opioides

Se ha establecido que el efecto analgésico de los opiodes deriva de su capacidad para inhibir de forma directa la transmisión ascendente de la información nociceptiva desde el asta dorsal de la médula espinal (Gutstein y Akil, 2001) y su capacidad para activar los circuitos de control del dolor que descienden desde el tallo encefálico a través de la parte rostral ventromedial del bulbo raquídeo hasta el asta dorsal de la médula espinal (Minami y Satoh, 1995).

En los circuitos descendentes del control del dolor el receptor μ provoca analgesia, pues elimina la inhibición que ejerce GABA en las neuronas que se proyectan desde la médula espinal a la sustancia gris periacueductual y desde las neuronas medulares que proyectan a la porción rostral ventromedial de la médula (Fields y col, 1991).

La unión del receptor μ a su agonista produce un efecto analgésico, sin embargo el efecto producido tras la unión del receptor κ a su agonista puede ser analgésico o antianalgésico. Este fenómeno se debe a la superposición anatómica existente entre los receptores μ y κ , pues las acciones antianalgésicas mediadas por receptores κ parecen estar mediadas por el antagonismo funcional de las acciones de los agonistas de receptores μ (Pan y col, 1997).

Además de la actuación inhibitoria en los sistemas descendentes, los opioides también ejercen su acción analgésica mediante mecanismos locales en la médula espinal, donde actúan a nivel sináptico, tanto en la presinapsis como en la postsinapsis (Fukuda, 2005).

El papel de la N/OFQ y su receptor en la modulación del dolor:

El ARNm precursor de la N/OFQ y el péptido se encuentran en los circuitos descendentes del control del dolor, hay neuronas que contienen N/OFQ en la sustancia gris periacueductual, el rafe mediano, la parte rostral de la medula ventromedial y el asta dorsal superior (Fukuda, 2005).

Al igual que con los receptores clásicos se observa una desproporción entre la expresión de ARNm y la unión a ligando, ya que aunque la expresión de ARNm es mayor en el asta ventral de la médula espinal, la unión a ligando es superior en el asta dorsal (Nishi y col, 1997; Koster y col, 1999).

La distribución anatómica de N/OFQ se superpone con la distribución de los péptidos opioides, sin embargo, el grado de localización concomitante no está definido.

La función del sistema N/OFQ todavía no está clara, pese a las pruebas anatómicas que demuestran su participación en la regulación del dolor (Nishi y col, 1997; Koster y col, 1999). La inyección intradural de N/OFQ produce efecto analgésico (Yamamoto y col, 1997), sin embargo la inyección supraespinal produce el efecto contrario, hiperalgesia, o una respuesta bifásica hiperalgesia/analgesia (Grisel y col, 1996). Se sabe que N/OFQ inhibe tanto las neuronas que inician el dolor como las que promueven la analgesia en la porción rostral de la médula ventromedial (Pan y col, 2000)

Parece ser que dependiendo del estado de dolor previo del individuo, y de los circuitos neuronales específicos inhibidos por N/OFQ, su efecto ante la respuesta al dolor será diferente (Yamamoto y col, 1997).

d. Clasificación de los analgésicos opioides

Las sustancias opioides se pueden clasificar en función de su naturaleza, en función de su estructura química, según su potencia analgésica, y por último, en función de su relación con el receptor (Fukuda, 2005).

En función de su naturaleza:

Pueden ser naturales, es decir derivados de los alcaloides, sintéticos, creados a partir de la modificación de los compuestos naturales, y semisintéticos, o productos de laboratorio (Pérez, 2010).

- Opioides naturales: a su vez pueden ser
 - Fenantrenos: morfina, codeína y tebaína
 - Benzilisoquinas: papaverina, noscapina y narceína

- Opioides semisintéticos: heroína, naloxona, hidromorfona, hidrocodona, oxicodona.

- Opioides sintéticos:
 - Benzomorfanos: pentazocina
 - Fenil-4-piperidina: meperidina o petidina
 - Derivados Anilino-4-piperidina: fentanilo
 - Derivados difenilheptano: metadona, dextropropoxifeno
 - Derivados tebaína: buprenorfina

En función de su estructura química:

Se consideran compuestos tridimensionales, presentando formas levóginas y dextróginas, siendo activas las primeras (Sumano, 2006).

- Alcaloides fenantrénicos:
 - Naturales: morfina, codeína, tebaína
 - Semisintéticos: etilmorfina, heroína, dihidrocodeína, hidromorfona, nalorfina

- Alcaloides benzoquinolínicos:
 - Naturales: papaverina, noscapina

En función de su potencia analgésica:

Para valorar la potencia analgésica de los distintos opioides, se ha establecido el efecto analgésico de la morfina como referente, y así, comparándola con la potencia de los demás agentes opiáceos, estos pueden tener una potencia analgésica baja, media o alta (Glass y col, 1999).

- Baja potencia analgésica: codeína 0.1, dextropropoxifeno 0.2

- Media potencia analgésica: meperidina 0.5, tramadol 0.1-0.5, pentazocina 0.5

- Alta potencia analgésica: morfina 1, metadona 1.5, heroína 3-4, buprenorfina 30-50, fentanilo 80-100.

En función de la relación con el receptor:

En función del efecto neto del opioide sobre el receptor estos se clasifican de la siguiente manera (García Fernández y col., 2001; Rivera de los Arcos, 2001):

- Agonistas puros: son aquellos que se unen a un determinado receptor y producen una respuesta celular que se traduce en un efecto farmacológico. Son, la morfina, codeína, heroína, petidina, fentanilo, metadona, oxicodona, oximorfona, tramadol, levorfanol y dextropropoxifeno

- Agonistas parciales: reconocen al receptor pero la respuesta biológica es inferior al efecto máximo. Son esencialmente agonistas parciales para el receptor μ y agonistas para el resto. Si ocupan un receptor μ ejercen efectos débiles y lo bloquean para el efecto del agonista puro. Por ejemplo, la buprenorfina.

- Agonista-Antagonista: activan parcialmente o totalmente unos receptores e inhiben otros. Normalmente la acción agonista es sobre el receptor κ , y la acción antagonista sobre el receptor μ . Son la pentazocina, nalbufina, butorfanol, dezocina.

- Antagonistas puros: reconocen un determinado receptor y lo ocupan sin inducir los cambios celulares que desencadenan la respuesta farmacológica. Son la naloxona y naltrexona.

Tabla 2: Clasificación de los opioides según su naturaleza

Naturales	Semisintéticos	Sintéticos
Morfina	Heroína	Pentazocina
Codeína	Naloxona	Meperidina
Tebaína	Hidromorfona	Petidina
Papaverina	Hidrocodona	Fentanilo
Noscapina	Oxicodona	Metadona
Narceína		Dextropropoxifeno
		Buprenorfina

Tabla 3: Clasificación de los opioides según su estructura química

Alcaloides fenantrénicos	Alcaloides benzoquinolínicos
Morfina	Papaverina
Codeína	Noscapina
Tebaína	
Etilmorfina	
Heroína	
Dihidrocodeína	
Hidromorfona	
Nalorfina	

Tabla 4: Clasificación de los opioides en función de su potencia analgésica

Baja	Media	Alta
Codeína	Meperidina	Morfina
Dextropropoxifeno	Tramadol	Metadona
	Pentazocina	Heroína
		Buprenorfina
		Fentanilo

Tabla 5: Clasificación de los opioides en función de su relación con el receptor

Agonistas puros	Agonistas parciales	Agonista-Antagonista	Antagonista parcial
Morfina	Buprenorfina	Pentazocina	Naloxona
Codeína		Nalbufina	Naltrexona
Heroína		Butorfanol	
Petidina		Dezocina	
Fentanilo			
Metadona			
Oxicodona			
Oximorfona			
Tramadol			
Levorfanol			
Dextropropoxifeno			

1.1.3. Propiedades farmacocinéticas de los opioides

a. Propiedades fisico-químicas

Una base débil es aquella que al disolverse en una solución se disocia, en proporción variable en función del pH y la pKa, en una fracción ionizada y la base libre. Los opioides se comportan como bases libres.

La fracción ionizada del opioide va a ser la que se una a su receptor, esto implica que la intensidad del efecto del opioide va a depender de su concentración en el lugar de acción o biofase. Además, teniendo también en cuenta que los opioides muy liposolubles tienen un efecto más rápido, se facilita su llegada a la biofase (Villarejo y col, 2000).

La velocidad de inicio del efecto del opioide también se ve influido por su grado de unión a proteínas plasmáticas, pues aunque todos se unen, solo la fracción libre de opioide, es decir, la que no está ionizada ni unida a proteínas plasmáticas, es la responsable del gradiente de concentración que permite la difusión del fármaco desde la sangre a los tejidos (Fukuda, 2005).

b. Absorción

Aunque los opioides se pueden administrar por todas las vías disponibles, dependiendo de cuál se utilice, su biodisponibilidad será diferente. Por ejemplo, al administrarlos vía intravenosa o vía intramuscular presentan una biodisponibilidad de prácticamente el 100%, pero si se administran vía oral, por el efecto de primer paso hepático tendrán una biodisponibilidad menor. Si se trata de opioides altamente lipofílicos, la aplicación transdérmica o a través de mucosas resulta beneficiosa, y al administrarlos vía subaracnoidea, van a actuar directamente en los receptores de la médula (Colasanti, 1990; Villarejo, 1998; Reisine 1996).

c. Distribución

El flujo sanguíneo en los diferentes tejidos determinará la concentración del fármaco en los mismos, alcanzando su máximo en hígado, riñón, cerebro y pulmón.

Los opioides atraviesan barrera hematoencefálica de forma directamente proporcional a su liposolubilidad, pero, esta llegada al SNC también va a depender del tamaño molecular, del grado de ionización y de su unión a proteínas. Atraviesan barrera placentaria, alcanzando así la circulación fetal (Sumano, 2006).

d. Biotransformación

Los opioides presentan metabolización hepática, con dos tipos de procesos metabólicos: reacciones de fase I y reacciones de fase II. La única excepción a la biotransformación hepática es el remifentanilo, que es hidrolizado por esterasas inespecíficas (Mather, 1992).

Las reacciones de fase I incluyen reacciones de oxidación y reducción, como por ejemplo las catalizadas por el sistema de citocromo P-450. Las reacciones de fase II son principalmente reacciones de conjugación con sustratos endógenos (Perez, 2010; Sumano 2006).

Las patologías que afecten a la funcionalidad o flujo sanguíneo del hígado influirán en la biodisponibilidad de los opioides, concretamente, producirán un mantenimiento en el tiempo de sus efectos farmacológicos.

d. Eliminación

Todos los opioides se eliminan a través de la orina, por una filtración activa a nivel renal, y en el caso de la morfina además, un pequeño porcentaje se elimina a través de las heces, es decir, por vía biliar (Perez, 2010; Sumano 2006).

Tabla 6: Características fisicoquímicas y farmacocinéticas de los opioides comúnmente utilizados en adultos.

PARÁMETRO	Morfina	Meperidina	Fentanilo	Sufentanilo	Alfentanilo	Remifentanilo
pK _a	7.9	8.5	8.4	8.0	6.5	7.26
% no ionizado	23	7	8.5	20	89	58
Unión a proteínas (%)	35	70	84	93	92	66-93
Aclaramiento (ml/min)	1050	1020	1530	900	238	4000
Volumen de distribución (l)	224	305	335	123	27	30
Vida media rápida de redistribución (min)			1.2-1.9	1.4	1-3.5	0.4-0.5
Vida media corta de redistribución (min)	1.5-4.4	4-16	9.2-19	17.7	9.5-17	2-3.7
Vida media de eliminación (h)	1.7-3.3	3-5	3.1-6.6	2.2-4.6	1.4-1.5	0.17-0.33

1.1.4. Propiedades farmacodinámicas: acciones de los opioides

a. Efectos neurofisiológicos

Los opioides actúan sobre el SNC de dos maneras, por un lado de forma inhibitoria, produciendo una depresión generalizada que da lugar a analgesia, depresión respiratoria, somnolencia y modificaciones en el electroencefalograma. Por otro lado, pueden actuar estimulando el SNC, dando lugar a miosis, náuseas, vómitos y activación del sistema límbico (Fukuda, 2005).

Analgesia:

La morfina y sus derivados producen, entre otros efectos, analgesia. Esta analgesia se caracteriza por no ir acompañada de pérdida del conocimiento, y a diferencia de la producida por los AINEs, es independiente de la existencia de inflamación (Villarejo, 1998; Reisine y Pasternak 1996).

Los opioides, además de reducir la sensación de dolor, parece que reducen también el estrés psicológico asociado. Producen euforia con sensación de bienestar asociado a una depresión de la emotividad y la agresividad. Raramente se ha visto disforia, con sensación de angustia y alucinaciones (Stein, 1993; Junien y Wettstein, 1992).

Es fundamental distinguir entre el dolor nociceptivo, que se transmite por vías neuronales intactas, del dolor neuropático producido por lesión de la estructura neuronal y que a menudo implica supersensibilidad neuronal. El dolor nociceptivo responde bien a los opioides, mientras que el neuropático lo hace mal, y en ocasiones son necesarias dosis altas del fármaco (McQuay, 1988).

En la actualidad los opioides se siguen considerando el tratamiento de elección ante dolor perioperatorio y oncológico (Akca y col, 1999).

Metabolismo cerebral:

En general, los opioides producen un leve descenso en el metabolismo cerebral y la presión intracraneal, aunque estos cambios pueden verse afectados por la administración concomitante de otros fármacos y por la enfermedad del paciente.

Por ejemplo, cuando los anestésicos que se administran junto a los opioides producen vasodilatación, los opioides tienden a producir vasoconstricción cerebral (Fukuda, 2005).

En cuanto a la presión intracraneal se ha visto que la sedación con opioides no afecta a la PIC en pacientes con traumatismo craneoencefálico, sin embargo si que pueden incrementar la PIC en pacientes con lesiones ocupantes de espacios supratentoriales, sobre todo si la distensibilidad intracraneal esta comprometida. Aún no esta claro a que se deben estas discrepancias en el efecto de los opioides sobre la PIC (Warner y col, 1996; Jamali y col, 1996; Lauer y col, 1997).

En cuanto a si los opioides poseen o no efecto neuroprotector, estudios en animales con lesiones neurológicas sugieren que la anestesia con opioides mejora la evolución neurológica si se compara con permanecer despierto (Cole y col, 1989).

Rigidez muscular:

Los opioides pueden incrementar el tono muscular y producir rigidez muscular. El mecanismo por el cual producen esta rigidez no está claro, pero se cree que es por su acción sobre SNC y no por acción directa sobre la fibra muscular, ya que esta rigidez se puede evitar con relajantes musculares (Fukuda, 2005; Blasco y col, 1986).

b. Efectos respiratorios

El efecto secundario más grave de los opioides es la depresión respiratoria. El principal mecanismo de esta depresión respiratoria es una menor sensibilidad de los centros respiratorios bulbares al dióxido de carbono, lo cual provoca la disminución del impulso respiratorio. Además se produce bradipnea, prolongación de la espiración y una respiración periódica similar a la de Cheynes-Stokes debido a su efecto depresor sobre los centros bulbares implicados en la regulación de la frecuencia respiratoria (Etches, 1994; Tabatabai y cols, 1989).

El resultado final es una depresión directa del volumen minuto, registrándose el mayor efecto sobre la frecuencia respiratoria.

Sin embargo, la frecuencia respiratoria por sí sola no es un índice fiable de depresión residual inducida por opioides, ya que pueden registrarse frecuencias respiratorias aparentemente suficientes en presencia de tensiones altas de CO₂ en sangre arterial. En consecuencia, para valorar los efectos depresores de los opioides el pH y la PaCO₂ arterial resultan valores útiles.

Hay diversos factores que afectan a la magnitud y a la duración de la depresión respiratoria inducida por los opioides, como por ejemplo, la dosis empleada, la edad del paciente, el uso de fármacos depresores del SNC, la presencia de insuficiencia renal o acidosis respiratoria, etc (Bailey, 1985).

c. Efectos cardiovasculares

Los efectos de los fármacos opioides sobre el sistema cardiovascular son muy variables dependiendo del tipo de fármaco, la vía de administración y del tipo del preparado, pero, en términos generales, los opioides respetan el sistema cardiovascular, y tienen escaso efecto sobre la contractilidad miocárdica. (Fukuda, 2005)

La morfina y fármacos relacionados provocan bradicardia e hipotensión, posiblemente relacionadas con la acción sobre los receptores de opioides localizados en el núcleo del fascículo solitario del tronco encefálico, lo que provoca la inhibición del tono simpático del corazón (Feldman y col, 1996; Keay y col, 1997).

d. Efectos gastrointestinales

Los opioides reducen la motilidad gastrointestinal. Se registra una tendencia al aumento del tono del músculo liso y de los esfínteres con un descenso en el peristaltismo. Esto se asocia con un retraso en el vaciado gástrico (Murphy y col, 1997; Dowlathshahi y col, 1985).

Todos los agonistas de los opioides aumentan la presión del conducto biliar al inducir la contracción del esfínter de Oddi por un mecanismo mediado por receptor. Sin embargo, las consecuencias clínicas suelen ser mínimas (Vatashsky y col, 1987).

Además, los opioides producen náuseas y vómitos al estimular la zona gatillo quimiorreceptora en el área postrema de la médula (Fisher, 1997; Tramer y col, 1997).

Algunos estudios en animales han demostrado que los agonistas de los cannabinoides suprimen las náuseas y vómitos provocados por los opioides a través de la activación del receptor de los cannabinoides CB1 (Simoneau y col, 2001).

e. Efectos sobre aparato urinario

Sobre el aparato urinario los opioides actúan produciendo, en la mayoría de los casos, retención urinaria, pues producen disminución de la tonicidad al aumentar el tono de las fibras circulares del esfínter vesical y una activación de las fibras longitudinales (Fukuda, 2005; Dregnet y Magora, 1989).

f. Efectos neuroendocrinos

Los opioides interactúan con los receptores a nivel hipotálamo-hipofisis, sin relevancia clínica en el caso de las dosis analgésicas. Sin embargo, esta interacción a dosis anestésicas produce un aumento de la liberación de ACTH, cortisol y prolactina y disminuye la liberación de FSH, TSH y LH (Fukuda, 2005).

g. Tolerancia, dependencia e hiperalgesia

La tolerancia se define como la disminución de los efectos de un compuesto administrado repetidamente. Para los opioides, la tolerancia se desarrolla por dos procesos superpuestos. Por un lado, los efectos inhibitorios se vuelven menos eficientes, y por otro, sus efectos excitatorios se vuelven más importantes, tanto a nivel celular como sistémico.

En los mecanismos de dependencia y tolerancia se hallan implicados factores genéticos, moleculares, celulares, fisiológicos y funcionales. En el locus caeruleus, el principal núcleo noradrenérgico del cerebro, la exposición a los opioides a largo plazo produce la inhibición de la adenilciclase, reduce la actividad de la proteincinasa A y activa la vía del AMPc (Nestler y Aghajanian, 1997).

La tolerancia y dependencia aparece tras la administración crónica de opioides, aunque se ha observado que también se puede desarrollar tolerancia de forma rápida tras la exposición aguda a los opioides (Kissin y col, 1991; Chia y col, 1999; Vinik y Kissin, 1998).

Aunque conceptualmente la tolerancia y la hiperalgesia son conceptos opuestos, se considera que ambos procesos podrían presentar mecanismos comunes (King y col, 2005). Por un lado la tolerancia implica mecanismos de insensibilización, mientras que la hiperalgesia está inducida por un proceso de sensibilización. Sin embargo, la tolerancia clínica a opioides se describe como un proceso que engloba tanto la tolerancia farmacológica (reducción de receptores) (Mitra, 2008) como la disminución de la eficacia de los opioides por la simultánea activación de sistemas propioceptivos del organismo (hiperalgesia) (Laulin y col, 1999).

Clínicamente, la forma de diferenciar la tolerancia de la hiperalgesia es aumentar la dosis de opiáceos. En el primer caso se producirá una mejoría, mientras que en el caso de la hiperalgesia el paciente empeorará.

En el desarrollo de tolerancia aguda se encuentran implicados la colecistocinina y el sistema NMDA-NO (Kissin y col, 2000), y la actividad serotoninérgica espinal (Li y col, 2001).

1.1.5. Morfina

Como se ha mencionado anteriormente, la morfina es uno de los 20 alcaloides presentes de forma natural en el opio.

Farmacocinética:

Tras la administración oral, la morfina se absorbe totalmente en el tracto gastrointestinal, sin embargo alcanza una biodisponibilidad de tan solo un 20-25% debido al efecto de primer paso hepático (Dowling 2000).

La absorción intramuscular y subcutánea es buena, con un periodo de latencia de 30 minutos. El máximo efecto se alcanza en 1 hora, persistiendo durante 3-5 horas. (Sumano, 2006).

Cuando se administra vía intravenosa, el efecto es muy rápido, con un tiempo de latencia de 5 minutos. Sin embargo, a las 3 horas, los niveles sanguíneos son similares a los que se obtienen con una administración vía oral de la misma dosis (Nolan, 2002).

La morfina se une a las proteínas plasmáticas en tan solo un 35%, debido a su gran carácter hidrofílico. La morfina se conjuga en el hígado, formándose morfina-3-glucuronido, que llega al intestino a través de la bilis, para sufrir una hidrólisis intestinal por acción de la flora presente. Con esta hidrólisis se obtiene morfina libre, que bien puede ser recaptada por el hígado, repitiéndose el ciclo de conjugación, o bien sufrir una nueva glucuronidación por la mucosa intestinal (Mazoit y col, 1990; Merrell y col, 1990).

Menos del 10% de la dosis de morfina administrada se elimina por las heces. La principal vía de eliminación de la morfina es la filtración glomerular, y ocurre principalmente como un derivado conjugado, aunque hay también una pequeña cantidad que se libera como morfina inalterada (Sumano 2006).

Farmacodinamia: Acciones de la morfina

La morfina ejerce sus efectos sobre el SNC de forma dosis dependiente. A dosis bajas o medias (5-10mg/kg) los principales efectos subjetivos son somnolencia, disminución de la sensibilidad frente a estímulos, disminución de la ansiedad e inhibición. A estas dosis se produce además relajación muscular, analgesia, ligera depresión respiratoria, miosis y disminución de la capacidad de concentración (Feldman y col 1997).

A medida que se va aumentando la dosis de morfina el sopor se transforma en pérdida de la consciencia, la contracción de las pupilas es aun mayor y la tasa respiratoria se ve peligrosamente disminuida, ya que a estas dosis el centro respiratorio del tronco del encéfalo se encuentra deprimido. Otro factor involucrado en el compromiso respiratorio es la acción broncoconstrictora de los opiáceos debida a la liberación de histamina.

Sin duda la propiedad mas importante de la morfina es su acción analgésica, induciendo un marcado y rápido aumento en la síntesis de serotonina (Godefroy y col 1980). Suprime fundamentalmente el componente afectivo del dolor, y lo hace de manera selectiva, en cuanto que se consigue a dosis que no producen sopor ni anestesia, ni alteran otras modalidades sensoriales (Sumano, 2006).

La morfina se considera un excelente analgésico para la mayoría de los dolores, incluso en los de origen visceral (García Fernández y col, 2001). Pero, aunque es considerado el analgésico disponible más potente, no tiene efecto sobre los dolores osteoartóricos (Sumano, 2006).

Como miembro de la familia de los opioides, la morfina tiene efectos, que podrían considerarse negativos, sobre el sistema cardiovascular y respiratorio. La morfina produce bradicardia y dilatación coronaria de origen vagal. Este efecto se magnifica en el caso de la administración intravenosa. La acción sobre el centro vasomotor, y la vasodilatación arterial y venosa produce, por tanto, hipotensión. Solo a dosis muy altas o en caso de choque se podría perjudicar gravemente la función cardiovascular.

Sobre el sistema respiratorio produce una depresión dosis dependiente al reducir la sensibilidad al CO₂ del centro respiratorio y a la hipoxia (Schaffer y col, 1986). La disminución de la ventilación alveolar produce un aumento de la PaCO₂, reduciéndose el pH arterial y la PaO₂ y conduciendo finalmente a una acidosis respiratoria. Dado que la morfina atraviesa la barrera placentaria, esta depresión respiratoria se manifestaría también en el feto.

1.2 CANNABINOIDES

1.2.1 Historia

Los cannabinoides son componentes de la planta *Cannabis sativa*. Esta planta ha sido una de las primeras en cultivarse, pudiendo encontrar referencias sobre el tratamiento y utilización de sus fibras de hace más de 10.000 años, en Taiwan.

En cuanto a las propiedades medicinales y recreativas de la planta, las referencias de su uso se remontan más de 2700 años atrás, también en China. Posteriormente, con la expansión del comercio, su uso se extendió ampliamente por el medio y lejano Oriente, África y Europa, hasta el punto de ser señalado como remedio por Galeno y otros médicos de la era clásica y helenística.

Tradicionalmente el cáñamo era utilizado contra la malaria, el estreñimiento, los dolores reumáticos y de cabeza, dismenorrea, fiebre, insomnio, disentería, incontinencia urinaria, epilepsia, neuralgias, etc. Su uso medicinal se hizo tan popular que llegó al S.XVII como “el elixir de la vida”. Sin embargo, la primera descripción moderna de sus propiedades farmacológicas no la encontramos hasta 1839, de la mano del médico irlandés William O’Shaughnessy, responsable de su introducción en la farmacopea europea moderna.

En 1963, un grupo de investigadores de la Universidad Hebrea de Tel Aviv, dirigido por el profesor Raphael Mechoulam consigue describir la caracterización molecular del cannabidiol (CBD) (Mechoulam y Shvo, 1963). Un año más tarde, en 1964 se describió la caracterización molecular del Δ^9 -tetrahidrocannabinol (THC), el principio activo responsable de los efectos psicotrópicos del cannabis (*Isolation, Structure, and Partial Synthesis of an Active Constituent of Hashish*) (Gaoni y Mechoulam, 1964).

Tras diversos estudios en animales y humanos el CBD fue perdiendo importancia, hasta el punto de ser considerado el precursor del THC, esto se produjo debido a que, al contrario del THC, el CBD no es psicoactivo y no ha sido hasta hace unos años que se han “redescubierto” sus cualidades farmacológicas.

Al mismo tiempo que se estaba describiendo la estructura del THC, se descubrió un receptor específico para opioides. Este hecho supuso, al menos en un primer momento, un gran impulso para la búsqueda de receptores cannabinoides. Sin embargo, esta investigación fue enlenteciéndose, hasta el punto de rechazar la idea de que las sustancias activas del cannabis pudieran ejercer sus acciones mediadas por la unión a receptores específicos localizados en el SNC. Entre otras cosas, esto se debió a la errónea idea que el THC y su enantiómero presentaban la misma actividad psicoactiva, además de por la dificultad que suponía trabajar con un compuesto altamente hidrofóbico y en última instancia, a la poca popularidad de los cannabinoides en un momento de máximo esplendor de los opioides (Appendino y col, 2011).

No fue hasta 1988 cuando se descubre por fin el primer receptor cannabinoide (Howlett y col, 1988) seguido del descubrimiento de la anandamida (del sánscrito, felicidad), su ligando específico. Posteriormente el descubrimiento de los laboratorios Pfizer de una molécula sintética, CP55-90 (Rinaldi-Carmona y col, 1995) veinte veces más potente que el THC supuso el impulso definitivo para retomar la búsqueda de receptores cannabinoides en SNC (Herkenham y col, 1990; Devane y col, 1998).

La planta contiene cerca de 100 tipos diferentes de cannabinoides acumulados en pequeñas glándulas epidérmicas resinosas. Actualmente se conocen dos fenotipos, una rica en CBD y prácticamente carente de THC, utilizada en la industria textil, y otra rica en THC y por tanto con potentes efectos psicoactivos (Appendino y col, 2011).

1.2.2. Farmacología de los cannabinoides

a. Receptores cannabinoides:

Los cannabinoides se unen a receptores específicos de membrana, acoplados a proteína G y con siete dominios transmembrana. Concretamente se ha descrito dos receptores diferentes, el receptor CB1 y el receptor CB2, diferenciados en su secuencia aminoacídica y en su distribución anatómica en mamíferos (Pazos y col, 2017).

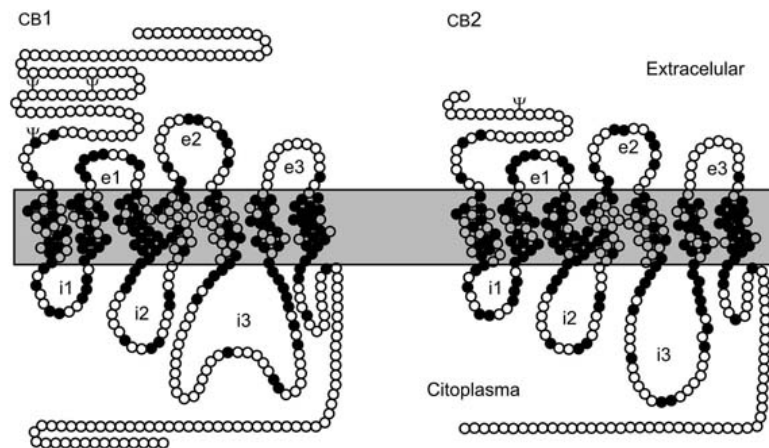


Figura 4: Estructura molecular de los receptores cannabinoides CB1 y CB2 .

(Fuente: Suero-García y col. *ArsPharm.* 2015; 56(2):77-87)

Se ha descrito la existencia de una variante del receptor CB1, denominado CB1A, resultante de un splicing alternativo que posee un modelo de distribución muy similar al del receptor CB1 (Shire y col, 1995)

El receptor CB1 se localiza fundamentalmente en el sistema nervioso central, concretamente, la mayor densidad de este receptor se encuentra en los ganglios basales, capa molecular del cerebelo y ciertas zonas del hipocampo. En las capas I y IV de la corteza cerebral la densidad es menor, y finalmente un escaso número de receptores se encuentran en el hipotálamo, tallo cerebral y médula espinal (Pertwee RG y col. 2010).

Además de esta localización central, los receptores CB1 también están presentes a nivel periférico, concretamente se han localizado en el bazo, amígdalas, corazón, próstata, útero, ovario y a nivel presináptico en terminales de nervios simpáticos (Galiegue y col, 1995; Isaac y col, 1996).

Varios efectos farmacológicos que producen los cannabinoides se pueden relacionar con la distribución de los receptores CB1. Por ejemplo, los efectos que producen sobre la actividad locomotora se relaciona con la alta densidad de receptores en los ganglios basales (Little y col, 1988).

Los efectos sobre el aprendizaje y la memoria o las propiedades anticonvulsiantes se relacionan con su presencia en áreas hipocampales y corticales. Finalmente la baja densidad de receptores en el tallo cerebral explica la baja toxicidad y ausencia de letalidad de la marihuana (Berrendero, 2002).

Se sabe además que la localización de los receptores CB1 es principalmente presináptica, lo cual produce el efecto inhibitorio que tienen los cannabinoides sobre muchos neurotransmisores (Pertwee, 1997).

En cuanto a los receptores CB2 su distribución es totalmente diferente, se localizan principalmente en tejido linfoide, linfocitos B y T, células NK, macrófagos, monocitos, microglia y mastocitos, participando en la modulación de la respuesta inmunológica (Martínez Orgado y col, 2005; Begg y col, 2005; Pertwee y col, 2010). CB2 también se localiza en células del cerebro (Van Sickle y col, 2005) y en células endoteliales de diversos órganos como el pulmón (Zoratti y col, 2003)



Figura 5: Corte sagital de cerebro de rata adulta que muestra la distribución de receptores CB1 (1,caudado-putamen; 2, globo pálido; 3, núcleo entopeduncular; 4, sustancia nigra; 5, cerebelo; 6, hipocampo; 7, corteza cerebral)

(Fuente: Berrendero. Elementos que forman el sistema cannabinoide endógeno
. En: Guía Básica sobre los Cannabinoides. Sociedad Española de Cannabinoides. 2002)

Mecanismos de transducción de señales:

Los principales mecanismos intracelulares en los que están implicados los receptores de cannabinoides CB1 incluyen la inhibición de la adenilato ciclasa, la regulación de diferentes canales iónicos y la activación de la vía de las MAP quinasas (Howlett y col, 1998). Todos estos mecanismos se producen gracias a la unión de los receptores a las proteínas Gi/o.

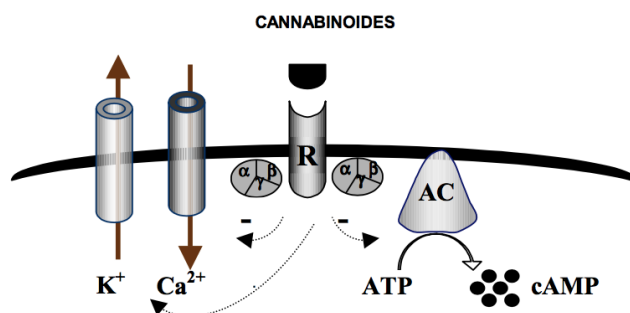


Figura 6: Acoplamiento del receptor de cannabinoides a través de proteínas G

(Fuente: Diaz-Laviada. Mecanismos de transducción de señales de los cannabinoides. En: Guía Básica sobre los Cannabinoides. Sociedad Española de Cannabinoides. 2002)

Al activarse los receptores CB1 se produce una inhibición de la vía de la adenilato ciclasa y por lo tanto un descenso en los niveles de AMPc intracelular. Esto implica una afección de la capacidad de fosforilación de proteínas quinasas dependientes de AMPc (Bouaboula y col, 1995).

El efecto combinado que produce la activación de los receptores de cannabinoides al inhibir por un lado los canales de Ca^{2+} tipo N y P/Q, y aumentar por otro, la conductancia del K^+ parece ser la base de la inhibición que ejercen en la liberación de neurotransmisores. Los cannabinoides también están involucrados en la regulación de fenómenos de proliferación y diferenciación, pues activan la ruta de las MAP quinasas (Bouaboula y col, 1995).

El receptor CB2 activa la vía de las MAP quinasas e inhibe la adenilato ciclasa, pero no es capaz de influir en los canales de Ca^{2+} y K^+ , como si puede hacer el receptor CB1 (Felder y col, 1995).

Ya sea en células o tejidos in vivo o in vitro los cannabinoides activan raf/MEK/ERK (Demuth y Molleman, 2006; Moranta y col, 2007). Esta activación se produce consecuencia de la inhibición del PKA al disminuir el AMPc intracelular. Además la interacción con β - arrestinas y la activación de PI3K/Akt también pueden actuar como vías de activación.

Los cannabinoides se han relacionado con respuestas de supervivencia y protección en distintos tipos celulares, mediadas a través de la activación de la cascada IP3/Akt (Diaz- Laviada y Ruiz-Llorente, 2005; Ozaita y col, 2007).

Sin embargo, hay estudios que demuestran una inhibición tanto de MEK/ERK como de PI3/Akt (Ellert-Miklaszewska y col, 2005; Greenhough y col, 2007) lo cual concuerda con el efecto bifásico que presentan los cannabinoides. Además, los cannabinoides activan vías de estrés, como la acumulación de ceramida y la cascada p38/MAPK, a través de la cual inhiben el crecimiento celular (Gustafsson y col, 2006).

Otros receptores relacionados:

El receptor de vallinoides tipo 1 (TRPV1), de la familia de los receptores activados por potencial transitorio (TRPs), participa en la medición de la nociocepción en respuesta al calor activado por capsaicina, metabolitos de la lipooxigenasa y algunos endocannabinoides (Vennekens y col, 2008).

Por otro lado, los receptores nucleares activados por proliferados de peroxisomas (PPAR) son una familia de receptores nucleares o factores de transcripción activados por ligandos involucrados en el metabolismo lipídico, la homeostasis de la glucosa y la sensibilidad a la insulina. Se ha demostrado que, además de interactuar con receptores de membrana, los endocannabinoides pueden unirse a estos receptores, derivando de esta unión los efectos orexígenos y antiinflamatorios (Burstein y col, 2005; Sun y Bennett, 2007).

Recientemente se ha descrito la existencia de un receptor huérfano, el receptor GPR55, el cual es considerado un posible receptor de cannabinoides.

Esto es así, porque aunque su ligando endógeno es el lisofosfatidilinositol (LPI), parece ser activado por Δ^9 -THC y por algunos agonistas inversos sintéticos de los receptores CB1, mientras que es antagonizado por CBD (Iannotti y col, 2016)

Por último, en el efecto de algunos cannabinoides se ha visto implicación de los receptores de adenosina y serotonina.

b. Endocannabinoides

Del mismo modo que hay receptores cannabinoides en el organismo, hay también ligandos endógenos. Los ligandos endógenos de los receptores de cannabinoides son compuestos derivados de ácidos grasos poliinsaturados, siendo los más representativos la etanolamida del ácido araquidónico, conocida como anandamida (Devane y col, 1992) y el 2-araquidonil glicerol (2-AG) (Mechoulam y col, 1995; Sugiura y col, 1995).

La palmitoiletanolamida es otro miembro de esta familia que a pesar de compartir diversos efectos fisiológicos con los cannabinoides endógenos no es capaz de unirse a ninguno de los dos subtipos de receptores conocidos hasta el momento (Sugiura y col, 2000).

La palmitoiletanolamida parece potenciar los efectos de la anadamida y del 2-AG (García y col, 2009), de hecho se cree que sus efectos antiinflamatorios y analgésicos podrían deberse a la interacción con el receptor GPR55 (Godlewski y col, 2009).

En humanos, las áreas del cerebro con mayor concentración de anadamida son precisamente las regiones con mayor expresión de receptor CB1 (Felder y col, 1996). Además de en cerebro, su localización se ha descrito también en tejidos periféricos como bazo, corazón, testículos, útero y endotelio vascular (Felder y col, 1996; Randall, 2007). Sin embargo, el hecho de que en los fluidos corporales (plasma, suero o líquido cefalorraquídeo) los niveles de anadamida sean bajos, parece implicar que posee una acción local al producirse en zonas cercanas al lugar de acción.

Algunos autores han propuesto la idea de que el 2-AG sea el verdadero agonista endógeno, pues su concentración en cerebro es 200 veces mayor que la concentración de anandamida, y además el 2-AG es un agonista total frente a CB1 y CB2 (Sugiura y col, 2006).

El sistema cannabinoide endógeno podría ser una importante diana terapéutica, pues su importancia fisiopatológica es indudable, como demuestra la variación existente en la concentración de endocannabinoides en respuesta a diferentes estímulos, en función de los estadios de desarrollo del individuo así como en función de situaciones patológicas concretas (Di Marzo y Petrosino, 2007; Macarrone y col, 2015).

Modulando la actividad del sistema endocannabinoide se podría desarrollar una importante diana terapéutica para un amplio espectro de enfermedades, como trastornos neurológicos, dolor o enfermedades autoinmunes, entre otras (Corroon y col, 2019)

Biosíntesis y metabolismo de los endocannabinoides:

Los endocannabinoides cumplen las condiciones necesarias de todo neurotransmisor ya que son sintetizados y liberados a partir de las neuronas, son capaces de unirse y activar receptores de membrana y finalmente son inactivados por recaptación y degradación enzimática en el interior de la célula (Berrender, 2002).

A diferencia de lo que ocurre en el caso de otros neurotransmisores y dada la naturaleza lipofílica de estos compuestos, los endocannabinoides no son almacenados en el interior de vesículas sinápticas. La síntesis de anandamida se produce mediante la hidrólisis de un precursor fosfolipídico presente en la membrana celular. Este compuesto sirve como depósito de almacenaje para la anandamida que va a ser sintetizada y liberada en el momento en que existe una necesidad de la misma (Di Marzo y col, 1994).

Su vida media es muy corta ya que rápidamente es recaptada por un transportador de alta afinidad, aun no caracterizado molecularmente, que esta presente tanto en neuronas como en células gliales (Hillard y col, 1997; Beltramo y col, 1997).

Una vez en el interior de la célula, la anadamida es degradada en sus dos componentes principales, el ácido araquidónico y la etonolamina.

c. Mecanismos de acción

Los cannabinoides inhiben los canales de Ca^{2+} tipo N y P/Q y activan canales de K^{+} (Twitchell y col, 1997; Mackie y col, 1995), además inhiben también la adenilato ciclasa, lo que da lugar a un descenso del AMPc intracelular (Howlett, 1984).

Los cannabinoides controlan la supervivencia y muerte celular mediante la activación de la cascada de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPKs) (Guzman y col, 2001). Otras quinasas que pueden modular los cannabinoides, como la PI3K/PDK/PKB, están implicadas en la regulación del crecimiento y el metabolismo celular (Gomez y col, 2000). Además, con la activación o inhibición de las cascadas de quinasas se produce también la regulación de factores de transcripción.

Se ha descrito una alteración en el balance de citosinas, por ejemplo, el THC disminuye la producción de IL-2, IFN- γ e IFN- α por linfocitos Th1 asociados a procesos de inmunidad celular, y aumenta la producción de IL-4 e IL-10 por linfocitos T cooperadores tipo 2 (Th2) implicados en la inmunidad humoral (Klein y col, 2000). Los cannabinoides parecen inducir la apoptosis en células mononucleares, macrófagos, linfocitos y células gliales. (Schwarz y col, 1994; Zhu y col, 1998; Sanchez y col, 1998). Además algunos estudios han demostrado un papel neuroprotector frente a determinados estímulos tóxicos (Skaper, 1996)

Por último los cannabinoides aumentan la producción de óxido nítrico (NO) a través de la activación de la forma constitutiva (Stefano y col, 2003), aunque también se ha observado un efecto inhibitorio de la forma inducible activada por estímulos inflamatorios.

Mecanismos de acción antinocioceptivos:

La actividad antinocioceptiva de los cannabinoides se debe a la presencia de receptores a nivel supraespinal y espinal. Se produce una reducción en la percepción central del dolor y un descenso de la actividad espontánea y evocada de los centros supraespinales por la actuación de un sistema descendente (Lichtman y Martin, 1997; Hohmann, 2002).

El principal implicado en este mecanismo es el receptor CB1, de manera que, se puede establecer una alta correlación entre la potencia antinocioceptiva de una serie de agonistas cannabinoides, su capacidad para desplazar redioligandos del receptor CB1 y para inhibir la señal de traducción. Además esta antinociocepción producida puede bloquearse con antagonistas selectivos de receptor CB1 (Ledent y col, 1999).

En cuanto al receptor CB2, aunque clásicamente se relacionaba únicamente con la modulación de la respuesta inmune, actualmente se sabe que está implicado en mecanismos antinocioceptivos modulando la liberación de factores pro e inflamatorios de células no neuronales localizadas en la proximidad de neuronas nociceptivas (Malan y col, 2001).

Por último, la anandamida y algunos cannabinoides eicosanoides pueden activar receptores vanilinoideos (Zygmunt y col, 1999). Se sabe que la anandamida modula el dolor por varias vías. En primer lugar, al inhibir las señales nociceptivas en la sinapsis activando los receptores CB1, por otro lado, al transformarse en prostamidas por la acción de la COX-2, y finalmente al reducir la inflamación activando, entre otros, a los receptores CB2 (Silver, 2019).

d. Clasificación de los cannabinoides

Según su relación con el receptor pueden ser agonistas o antagonistas.

Ligandos agonistas: a su vez se clasifican en función de su origen y su estructura química.

Según su origen se pueden clasificar en cannabinoides naturales, endógenos y sintéticos.

- *Cannabinoides naturales*: derivan de la planta *Cannabis sativa*, con una estructura carboxilica con 21 carbonos y formados por tres anillos (ciclohexano, tetrahidropirano y benceno). Los más relevantes son el Δ 9-THC (Gaoni y Mechoulam, 1964), Δ 8-tetrahidrocannabinol (Mechoulam y col, 1972), cannabidiol, cannabinol (Mechoulam y Hannus, 2000), cannabicromeno, cannabicitrol, cannabigerol y cannabinodiol, aunque en la planta hay cerca de 60 cannabinoides.
- *Cannabinoides endógenos o endocannabinoides*: compuestos derivados de ácidos grasos poliinsaturados pero con propiedades similares a los presentes en la planta. Los más estudiados son la anandamida (AEA) y el 2-AG (Devane y col, 1992; Mechoulam y col, 1995). Al igual que ocurre con los neurotransmisores, estos endocannabinoides se liberan por las neuronas, uniéndose y activando receptores de membrana para ser finalmente inactivados por mecanismos de recaptación y degradación.
- *Cannabinoides sintéticos*: son compuestos con actividad cannabimimética, pero más selectivos, estables y eficaces que sus análogos naturales o endógenos. Actualmente hay dos comercializados, el nabilone (Cesamet), análogo del Δ 9-THC, y el dronabinol (Marinol), un Δ 9-THC sintético.

Según su estructura química se clasifican en cannabinoides clásicos, no clásicos, aminoalquilindoles y eicosanoides.

- *Cannabinoides clásicos*: compuestos con estructura de dibenzopirano. Son los cannabinoides naturales y los análogos sintéticos del Δ 9-THC.
- *Cannabinoides no clásicos*: son análogos bicíclicos y tricíclicos del Δ 9-THC, pero sin anillo pirano. En este grupo se clasifica el CP55,940, utilizado por Devane y col para demostrar la presencia de receptores específicos en cerebro de rata.
- *Aminoalquilindoles*: son moléculas cuya estructura química deriva de la pravadolina. El más estudiado es el WIN-2 (Pacheco y col, 1991).
- *Eicosanoides*: son los compuestos derivados del ácido araquidónico. Los dos compuestos más representativos son la AEA y el 2-AG (Devane y col, 1992).

Ligandos antagonistas:

Son los diaripirazoles, como el SR1, antagonista del receptor CB1, y SR2, antagonista del receptor CB2 (Rinaldi-Carmona y col, 1994, 1998). A partir de la estructura del SR1 se han desarrollado moléculas como la AM-251 y AM-281, que también antagonizan de forma selectiva efectos canabimiméticos derivados de la activación de receptores CB1.

Las moléculas desarrolladas como antagonistas de los receptores CB1 y CB2, pueden en general, reducir las acciones cannabimiméticas, pero se ha visto que algunas de ellas pueden incluso desarrollar, por si solas, el efecto contrario al que desarrollaría el agonista del receptor. Se baraja la idea de que algunas de estas sustancias, como por ejemplo, la molécula SR1, actual como un agonista inverso en algunos sistemas, reduciendo así la actividad constitutiva de los receptores CB1 y CB2 (Pertwee, 2001).

Tabla 7: Clasificación de los cannabinoides

	Naturales	A9-THC A8-tetrahidrocannabinol Cannabidiol Cannabinol Cannabicromeno Cannabicyclol Cannabigerol Cannabinodiol
Origen	Endógenos	AEA 2-AG
	Sintéticos	Nabilone Dronabinol
AGONISTAS	Clásicos	Cannabinoides naturales
	No clásicos	CP55,940
Estructura	Aminoalquilindoles	WIN-2
	Eicosanoides	AEA 2-AG
ANTAGONISTAS	CB1	SR1
	CB2	SR2

1.2.3. Propiedades farmacocinéticas de los cannabinoides

Los cannabinoides son sustancias con una estructura carbocíclica con 21 carbonos, formados generalmente por tres anillos, ciclohexeno, tetrahidropirano y benceno. El CBD es la excepción, pues en su estructura el anillo de tetrahidropirano está escindido, siendo por lo tanto un compuesto bicíclico. (Turner y col, 1980).

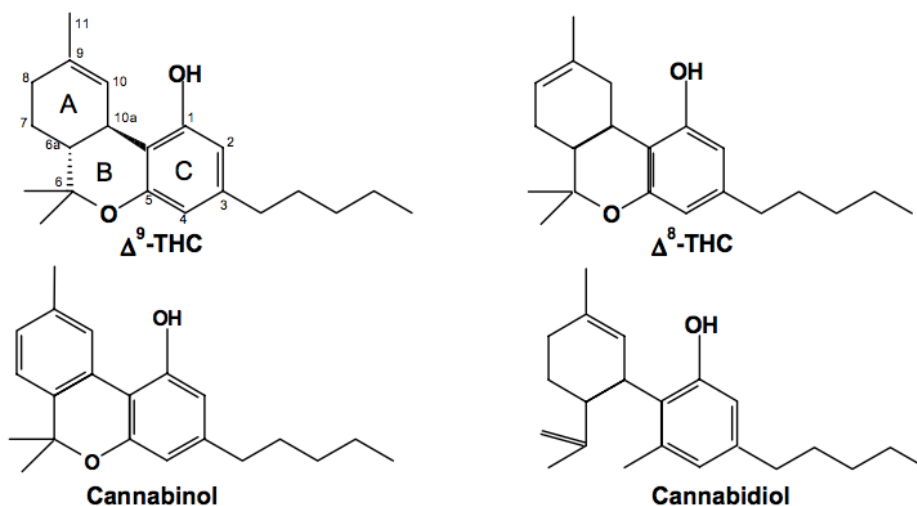


Figura 7: Estructura química de los cannabinoides más relevantes.

(Fuente: González y col. Química y metabolismo de los cannabinoides. En: Guía Básica sobre los Cannabinoides. Sociedad Española de Cannabinoides. 2002)

Los cannabinoides, y especialmente el THC, tiene unas propiedades hidrofóbicas que lo hacen muy soluble en lípidos. Esto hace que su distribución en el organismo y su eliminación presenten diferencias con lo descrito para otras drogas de abuso.

La administración de preparados de Cannabis sativa es generalmente inhalada (cigarros) u oral (cápsulas, alimentos). Se están estudiando otras formas de administración para fines terapéuticos, como por ejemplo vía rectal (Brenneisen y col, 1996), dermal (Stinchcomb y col, 2001), sublingual (Guy y Flint, 2000), conjuntival (Meritt y col, 1981) o inhalada mediante aerosoles (Lichtman y col, 2000; William y col, 1976).

En la administración oral, los niveles plasmáticos son inicialmente más bajos, esto se debe a la sensibilidad de los cannabinoides a la acidez del jugo gástrico, al metabolismo hepático e intestinal, y a su acceso a la circulación enterohepática (Agurel y col, 1986). Para conseguir el mismo efecto que por la vía inhalatoria, habría que ingerir una cantidad mayor.

Dada la alta hidrofobidad de los cannabinoides, solo aproximadamente un 3% se encuentra en sangre en forma libre, se encuentran unidos principalmente a las lipoproteínas plasmáticas y a la albumina, y en menor proporción se une también a las células sanguíneas. Esta propiedad explica su rápida penetración en los tejidos, principalmente en aquellos que están ricamente vascularizados, como el pulmón, hígado, riñón, corazón, estómago, bazo, tejido adiposo marrón, placenta, corteza adrenal, tiroides, pituitaria y glándula mamaria (Harvey, 1999; Agurell y col, 1986).

El THC puede permanecer almacenado en tejido adiposo y bazo hasta tres días después de la ingesta y su eliminación completa del organismo puede tardar semanas desde el cese de la administración (Harvey, 1999). Su retención en estos reservorios hidrofóbicos amortigua la penetración del THC en cerebro, donde su concentración y la de sus metabolitos es más baja (Agurell y col, 1986).

Los metabolitos de los cannabinoides se eliminan en forma de ácidos libres o conjugados con glucurónico, los cuales se almacenan en el cuerpo durante un periodo prolongado de tiempo, pudiendo llegar a ser detectados en orina varias semanas después del consumo de los cannabinoides. Un segundo tipo de conjugación implica la esterificación del 11-OH-THC con ácidos grasos de cadena larga como el palmítico, oleico y esteárico (Agurell y col, 1986).

Se ha demostrado que los cannabinoides pueden atravesar la barrera placentaria y llegar a la circulación fetal. Se estima que el nivel de cannabinoides en sangre fetal es aproximadamente un 10% de los niveles plasmáticos maternos. La exposición repetida a múltiples dosis produce su acumulación en tejido fetal, ya que estos no disponen todavía de los mecanismos necesarios para su degradación. Los cannabinoides también son excretados en la leche materna durante la lactancia (Fernández-Ruiz y cols., 1992).

Interacción entre cannabinoides

Se ha demostrado una interacción farmacocinética entre el CBD y el THC y sus metabolitos en cerebro de ratón (Bornheim, 1994).

El CBD inhibe la actividad de la forma 3A del citocromo P-450 hepático en humanos y de la forma 2C9 en ratón, como resultado se prolonga la permanencia del THC en el organismo, lo que implica que, el CBD pese a no tener actividad psicotrópica por sí mismo, puede potenciar la producida por el THC. Se ha observado también que al administrar conjuntamente varios compuestos cannabinoides, por ejemplo THC+CBD+CBN, se produce una mayor entrada en cerebro, al producirse un incremento en la permeabilidad de la barrera hematoencefálica (Agrawal y col, 1989).

1.2.4 Propiedades farmacodinámicas: acciones de los cannabinoides

a. Acciones sobre la actividad motora

El sistema endocannabinoide participa en el control del movimiento de la misma manera que lo hacen otros neurotransmisores clásicos como la dopamina, GABA o el glutamato (Consroe, 1998; Sañudo-Peña y col, 1999), esto ha llevado a la búsqueda de una aplicación terapéutica de los cannabinoides en el tratamiento de enfermedades motoras, como el Parkinson o el corea de Huntinton.

Actualmente se sabe que los cannabinoides controlan la actividad motora a través de la modulación de los ganglios basales, y lo consiguen al ser capaces de interferir en la actividad de los tres neurotransmisores implicados en la funcionalidad de estos ganglios basales, que son, la dopamina, GABA y el glutamato.

Sobre GABA y glutamato producen efectos directos a nivel presináptico (Maneuf y col, 1996; Romero y col, 1995; Szabo y col, 2000), mientras que sus efectos sobre la dopamina son mas bien indirectos y afectan sobre todo a la síntesis de este neurotransmisor (Romero y col, 1995).

b. Acciones sobre el sistema inmunitario

La idea de que los cannabinoides pudieran interferir en la funcionalidad del sistema inmune comenzó a estudiarse en la década de los 70, al observarse que el consumo de marihuana se relacionaba con un aumento de la susceptibilidad a desarrollar infecciones de etiología vírica y alergias (Arévalo-Martín y col, 2002).

Hoy día se sabe que los cannabinoides actúan sobre receptores específicos localizados en la membrana de las células inmunes (Turcotte y col, 2016). Sin embargo, muchas de sus acciones inmunomoduladoras son independientes de receptor, posiblemente se deba a su carácter lipofílico, que les permite afectar a la fluidez de las membranas celulares (Arévalo-Martín y col, 2002).

El principal receptor implicado en la fisiología del sistema inmune es el CB2, la mayor expresión de este receptor se produce en linfocitos B y NK, y, en menor medida está presente también en monocitos, neutrófilos y linfocitos T (Cabral y col, 2005). Esta regulación por parte del receptor CB2 se ha confirmado por los resultados en ratones knock-out para el receptor CB2, donde desaparecen las acciones inmunomoduladoras, mientras que permanecen las funciones relacionadas con la actividad del receptor CB1.

Estudios in vitro sobre linfocitos T han demostrado que, a dosis altas los cannabinoides disminuyen la proliferación de linfocitos, mientras que, a dosis bajas se produce un aumento en la capacidad proliferativa. En cuanto a los linfocitos B, se ha descrito un incremento en la tasa proliferativa tras el tratamiento con agonistas cannabinoides (Klein y col, 1998; Parolaro, 1999).

Sobre los macrófagos peritoneales y líneas celulares en cultivo se ha observado una inhibición de la función del macrófago al disminuir la quimiotaxis, la fagocitosis, la expresión de mediadores inflamatorios, la capacidad de citolisis y la presentación de antígenos (Arévalo-Martín y col, 2002).

Parece ser que los cannabinoides actúan aumentando la inmunidad celular, pero disminuyendo la inmunidad humoral (Klein y col, 2000).

Es decir, que frente a una infección puntual los cannabinoides no son efectivos, sin embargo si podrían serlo para combatir patologías autoinmunes o procesos inflamatorios, ya sean agudos o crónicos. Pues en estos casos una disminución de las citoquinas proinflamatorias (Th1) junto con un aumento de las antiinflamatorias (Th2) resultaría beneficioso (Conti y col, 2002; Malfait 2000).

c. Acciones analgésicas

Desde un punto de vista experimental, la actividad analgésica de los cannabinoides es similar a la de los opiáceos, tanto en modelos de exceso de nocicepción como en modelos de dolor visceral o neuropático.

Los cannabinoides en el tratamiento de dolor presentan inconvenientes, a corto plazo se ha visto una depresión del SNC, pudiendo producirse obnubilación, desorientación, ataxia, vértigos, desconexión, sequedad de boca, visión borrosa y alteraciones de la memoria (Campbell y col, 2001; Ashton, 1999). Los efectos cardiovasculares y sobre la función cardíaca son moderados y generalmente bien tolerados. El principal inconveniente a largo plazo es la aparición de fenómenos de tolerancia y dependencia.

Las estrategias farmacológicas para potenciar las acciones antinociceptivas de los cannabinoides con la menor tasa de efectos adversos posible pasa por la posibilidad de combinar agonistas cannabinoides con opiáceos y/o con inhibidores de la degradación de péptidos opioides. Otra opción terapéutica es la combinación de cannabinoides u opiáceos con inhibidores de la recaptación de anandamida, potenciando de esta manera los efectos analgésicos y minimizando la aparición de efectos secundarios.

Todavía es necesario un estudio exhaustivo de en que patologías y en que condiciones los agentes cannabinoides pueden ser beneficiosos para el tratamiento del dolor.

d. Acciones sobre la memoria y el aprendizaje

Entre los efectos comportamentales de los cannabinoides, uno de los más citados es el deterioro que se produce en los procesos de aprendizaje y memoria. Se cree que los efectos agudos sobre la memoria se deben al efecto directo que tienen sobre el hipocampo. Así mismo, el hipocampo parece estar relacionado también con las alteraciones cognitivas que se producen a más largo plazo tras el consumo crónico.

e. Tolerancia y dependencia

Tolerancia

Con la realización de diferentes estudios en varias especies animales (ratón, rata, paloma, perro, mono) se ha demostrado que la administración crónica de cannabinoides desarrolla fenómenos de tolerancia farmacológica sobre la respuesta al dolor, actividad locomotora, control de la motricidad, temperatura corporal, respuestas cognitivas, motilidad gastrointestinal, evolución del peso corporal, función cardiovascular, actividad anticonvulsiónante y respuestas endocrinas (Abood y Martin, 1992; Maldonado y Rodríguez de Fonseca, 2002).

Además se ha demostrado la presencia de una tolerancia cruzada entre diferentes agonistas cannabinoides exógenos que afecta a acciones farmacológicas como la analgesia, hipolocomoción e hipotermia (Pertwee, 1993).

Se ha sugerido una posible tolerancia cruzada entre el sistema cannabinoide y opioide. Algunos estudios describen una tolerancia a los efectos analgésicos y cardiovasculares de la morfina inducida por la administración de THC (Kaymakçalan y col, 1977; Hine, 1985), sin embargo Martin y col (1994) no observó este fenómeno de tolerancia cruzada tras la administración repetida de THC.

En cuanto al efecto contrario, una tolerancia al efecto analgésico del THC inducida por la administración crónica de morfina, no está tan demostrada, hasta el punto de haberse observado un efecto de potencialización de la analgesia cannabinoide en animales tolerantes a la morfina (Melvin y col, 1993).

Dependencia física

La aparición de manifestaciones somáticas de un síndrome de abstinencia espontáneo tras el cese del tratamiento crónico con THC no ha podido ser observada en diferentes especies animales, ni siquiera tras la administración de grandes dosis de THC (McMillan y col, 1970).

1.2.5. Cannabidiol

El cannabidiol (CBD) es un fitocannabinoide con escasa afinidad por los receptores CB1, lo que se traduce en una carencia de efectos psicotrópicos (Pertwee y col, 2010). Sin embargo, como se ha demostrado, mediante la liberación de citocinas y actividad COX, tiene un potente efecto antiinflamatorio. Tiene además, una excepcional capacidad antioxidante, mayor incluso que la del ácido ascórbico o el tocoferol (Hampson y col, 1998; Pertwee 2004; Sumariwalla y col, 2004; Esposito y col, 2007; Castillo y col, 2010).

Al administrar antagonistas de los receptores cannabinoides, el potente efecto antioxidante del CBD no se inhibe, es decir que el efecto antioxidante no es debido en exclusiva a la acción sobre los receptores, si no que se debe en parte a la estructura fenólica del CBD, común a la que presentan otros antioxidantes naturales procedentes de plantas. (Hampson y col, 1998).

El CBD conduce a la inhibición del transporte de calcio a través de las membranas, la recaptación y la hidrólisis enzimática de anandamida, la expresión proteica de la iNOS y la activación de NK-K β (Pertwee, 2004; Esposito y col, 2006; Mechoulam y col, 2007).

Aunque tradicionalmente se consideraba que el CBD presentaba también un baja afinidad por el receptor CB2 (Pertwee y col, 2010), posteriormente, en estudios realizados en cerebros de animales inmaduros se ha visto una regulación de las citoquinas y la expresión de COX-2 e iNOS, que se lleva a cabo cuando CB se une al receptor CB2 (Castillo y col, 2010).

Este hecho parece plantear la posibilidad de que se produzca una modificación en la afinidad del receptor relacionada con el desarrollo. Otros autores han propuesto que el CBD ejerce su actividad antiinflamatoria al unirse a receptores de adenosina (Carrier y col, 2006).

En el estudio de modelos animales de artritis, hipermotilidad intestinal y diabetes se ha demostrado un efecto antiinflamatorio mediado por CBD (Sumariwalla y col, 2004; Capasso y col, 2008). En el caso de artritis reumatoide, se ha visto que al administrar conjuntamente CBD y THC se produce una disminución del dolor (Blake y col, 2006).

En modelos animales inmaduros in vivo e in vitro, tras un daño cerebral hipóxico-isquémico, se ha demostrado un potente efecto neuroprotector tras la administración de CBD. Este efecto deriva tanto de su capacidad antiinflamatoria y antioxidante como de la interacción a receptores de adenosina (Martínez-Orgado y col, 2007; Alvarez y col, 2008; Castillo y col, 2010; Lafuente y col, 2011).

Esto significa que el CBD y los demás cannabinoides pueden desarrollar su capacidad de protección sobre el sistema nervioso sin implicar necesariamente a los receptores cannabinoides (Appendino y col, 2011). Un ejemplo que demuestra un efecto neuroportector independiente de receptor cannabinoide sería el incremento de flujo cerebral que produce el CBD al activar receptores 5HT1A (Russo y col, 2005). Por este motivo, y con independencia de cuál sea el mecanismo de acción, los cannabinoides y más en concreto el CBD, se ha propuesto como tratamiento neuroprotector en enfermedades como la encefalopatía hipóxico-isquémica neonatal, el Parkinson, la esclerosis múltiple o la esclerosis lateral amiotrófica (Pertwee, 2004, Lastres-Becker y col, 2005; Esposito y col, 2006; Alvarez y col, 2008; Arévalo-Martín, 2008; Castillo y col, 2010).

1.3 ANESTÉSICOS INHALATORIOS

1.3.1 Historia

Los anestésicos inhalatorios se comenzaron a utilizar hace más de 150 años. Hasta la década de los 80 el dietileter era el agente más empleado, ya fuera en medicina humana o veterinaria, sin embargo, su mayor problema era su gran capacidad inflamable, lo que hizo necesaria la búsqueda de nuevos compuestos que fueran compatibles con la elevada carga de aparatos eléctricos de los quirófanos actuales.

El dietileter dejó paso a los compuestos halogenados. Si bien, el uso de estos compuestos se empezó a extender a partir de los años 80, en realidad ya habían sido sintetizados cuarenta años atrás. El primer compuesto halogenado que se desarrolló fue el fluoroxeno en 1951, un etilvinilo que tuvo muy poco éxito debido a su capacidad inflamable y su efecto emético.

El halotano es un arcano que se desarrolló y comenzó a comercializar en 1957, gozando de una gran acogida desde el primer momento. Pero, pese a su popularidad inicial, el uso de los alcanos no se extendió, pues producían catecolaminas responsables de la aparición de arritmias ventriculares. Este hecho motivó que la investigación se centrara en los éteres, concretamente el segundo éter disponible fue el metoxiflurano desde 1960.

El isoflurano se desarrolló en 1965, tras una búsqueda motivada por la necesidad de conseguir fármacos con mayor potencia, pero con menor acción represora sobre el sistema cardiorrespiratorio. Sin embargo, a raíz de la publicación de un estudio que sugería que el isoflurano podía favorecer el desarrollo de neoplasias hepáticas en ratones (Corbett, 1976) se prohibió su uso hasta que más de diez años después se repitió el estudio, utilizando en esta ocasión un mayor número de animales de la misma estirpe y con diferentes concentraciones de isoflurano (Eger y col, 1978), observándose en esta ocasión que no se desarrollaban tales neoplasias.

Posteriormente se desarrollaron otros agentes, como el enflurano, el sevoflurano, y el más reciente y potente de todos, el desflurano.

En la búsqueda del agente inhalatorio ideal, se han ido definiendo las características que debería tener. Así, el agente inhalatorio ideal sería aquel con un largo periodo de conservación sin necesidad de añadir ningún otro compuesto, compatible además con los actuales equipos anestésicos, de bajo precio, no inflamable y fácil de vaporizar bajo las condiciones ambientales habituales.

También debe ser un compuesto con una baja solubilidad en sangre, que permita pasar rápidamente de un plano anestésico a otro y, en última instancia, a una recuperación anestésica rápida y controlada. Además debe ser muy potente, permitiendo, por tanto, conseguir un plano anestésico profundo con bajas concentraciones alveolares.

Por último, el agente inhalatorio ideal no debe producir depresión cardiorrespiratoria ni irritación de las vías aéreas, debe ser compatible con los fármacos vasoactivos, como las catecolaminas, y debe producir una buena relajación muscular a la vez que no resulte tóxico para los riñones, el hígado o el intestino (Dale y Brown, 1987; Steffey, 2001).

Hoy en día, se sigue buscando el agente que cumpla todos estos requisitos, por lo que se puede afirmar que el agente anestésico inhalatorio ideal no existe.

1.3.2 Farmacología de los anestésicos inhalatorios

a. Características físico-químicas

Con la excepción del óxido nítrico (N_2O), el resto de anestésicos inhalatorios que se emplean actualmente son compuestos orgánicos. Estos agentes se clasifican en base a su estructura química, pudiendo ser alifáticos, si poseen una cadena recta o ramificada en su estructura, e hidrocarburos ó éteres si la estructura general consiste en dos radicales orgánicos (R) unidos a un átomo de oxígeno (R-O-R).

En la constante búsqueda del agente anestésico ideal surgió la halogenación, que consiste en adicionar átomos de flúor, bromo o cloro a los agentes inhalatorios.

Con esto se consigue aumentar la potencia anestésica, y en el caso del flúor se produce además una disminución de la solubilidad en sangre de los compuestos (Eger, 1998).

Sin embargo, frente a estas ventajas de los agentes fluorados, surge el gran inconveniente que supone la toxicidad y reactividad de algunos de ellos. Para evitarlo, se sustituyen estos átomos de flúor por bromo o cloro, y así aumentar la estabilidad del agente aunque se produzca una reducción en su efecto anestésico y solubilidad en sangre. Un ejemplo es el caso del halotano (Steffey, 2001).

El peso molecular, la potencia anestésica y la solubilidad en sangre están relacionadas, y así, se puede afirmar que, si aumenta el peso molecular del átomo halogenado, aumentara también la potencia anestésica del agente y su solubilidad (Targ y col, 1989).

La administración de un anestésico inhalatorio a un paciente, requiere de un gas motriz, que siempre debe incluir una concentración igual o superior a un 21% de O₂, para lo cual se puede utilizar una fuente de O₂ al 100% o bien mezclas de O₂ con N₂O o con aire. Para la administración se hace necesario también un vaporizador específicamente diseñado para el agente inhalatorio en cuestión y un circuito anestésico adecuado al tamaño del paciente.

Desde que el agente es vaporizado por el equipo anestésico, hasta que alcanza el SNC del paciente, se producen una serie de reacciones debidas a las propiedades físicas que caracterizan a estos agentes. Estas propiedades se dividen en dos categorías: las que determinan los métodos de administración por un lado y las que afectan a la farmacocinética del agente por otro.

Propiedades que determinan los métodos de administración:

Los anestésicos inhalatorios se clasifican como gases o vapores. El N₂O, por ejemplo, es un gas, lo que significa que a temperatura ambiente (20-25°C) y a la presión barométrica del nivel del mar (760 mmHg ó 1 atmósfera) están en forma gaseosa. Sin embargo, el resto de los anestésicos inhalatorios actuales son vapores, y por lo tanto a T^a ambiente y a nivel del mar son líquidos, y deben ser vaporizados para pasar al estado gaseoso y poder ser administrados al paciente.

La capacidad de un anestésico inhalatorio para evaporarse, o ser vaporizado, se mide mediante la presión de vapor (PV). Por otro lado, la presión de vapor saturado (PVS) representa la concentración máxima de moléculas de un anestésico inhalatorio que puede haber en estado gaseoso a una T^a y una presión ambiental (Pamb) determinadas. Es decir, que la PVS indica la concentración máxima de anestésico que puede ser administrada al paciente. Se calcula con la siguiente fórmula:

$$PVS = \frac{PV}{Pamb} \times 100$$

La temperatura a la cual la PV del agente inhalatorio es igual a la presión atmosférica es el punto de ebullición de un líquido, otra de sus propiedades físicas. Teniendo en cuenta que la PV es constante para cada agente, pero que la presión barométrica es dependiente de la altitud, el punto de ebullición disminuirá a medida que aumente la altitud. Con el objetivo de tener un referente estándar, se ha acordado medir el punto de ebullición de los agentes inhalatorios a la presión barométrica al nivel del mar.

Propiedades que determinan la farmacocinética del agente inhalatorio:

La solubilidad de un anestésico inhalatorio en un líquido o en un sólido va a determinar la propiedad del agente para disolverse en ese sólido o ese líquido. Para afrontar la planificación de una anestesia, en relación a los agentes inhalatorios es necesario conocer su solubilidad en sangre y tejidos, especialmente en grasa.

La tasa de captación del anestésico en los alveolos y su consecuente distribución por el organismo va a determinar la velocidad de inducción y recuperación anestésica, y todo este proceso viene a su vez determinado por la solubilidad del agente en la sangre. Por otro lado, la solubilidad del agente en la grasa se relaciona con su potencia anestésica y con su capacidad para disolverse en los diferentes componentes del equipo anestésico. Conocer estas dos propiedades resultan de vital importancia a la hora de elegir el mejor agente inhalatorio para cada paciente, así como para su manejo posterior.

Los anestésicos inhalatorios expresan su solubilidad en términos de coeficiente de partición (CP). El CP de un agente anestésico en un solvente es la proporción de ese agente que existe, en el momento del equilibrio, en las dos fases del solvente, como pueden ser por ejemplo, la sangre y el gas. Con este concepto se puede describir la afinidad del anestésico por cada una de las fases del solvente cuando se ha alcanzado el equilibrio.

Desde el prisma anestésico, resultan de interés el CP sangre/gas y el CP aceite/gas. El CP sangre/gas es una medida de la velocidad de inducción, de recuperación y de cambio de plano anestésico, mientras que el CP aceite/gas está relacionado directamente con la potencia anestésica del agente (Steffey, 2001).

Pese a que según las teorías clásicas de la anestesia, los agentes anestésicos interactúan en la membrana lipídica para ejercer su efecto, y que esta no presenta similitudes con el aceite de oliva, en base a los trabajos realizados por Meyer (1899) y Overton (1901) es el aceite lo que se utiliza para determinar el CP aceite/gas.

Tabla 8: Propiedades físico-químicas de los anestésicos volátiles

	Sevoflurano	Desflurano	Isoflurano	Enflurano	Halotano	N ₂ O
Punto de ebullición (°C)	59	24	49	57	50	-88
Presión de vapor a 20°C (mmHg)	157	669	238	172	243	38.77
Peso molecular (g)	200	168	184	184	197	44
CP aceite:gas	47	19	91	97	224	1.4
CP sangre:gas	0.65	0.42	1.46	1.9	2.5	0.46
Solubilidad cerebro/sangre	47.5	27.2	44.9	36	51.1	2.3
Solubilidad músculo/sangre	3.1	2.0	2.9	1.7	3.4	1.2

b. Concentración alveolar mínima

En 1963 Merkel y Eger realizaron un estudio en perros, donde observaron que el valor de halotano era reproducible, y por lo tanto se podría emplear como un elemento de comparación de la potencia de los diferentes anestésicos inhalatorios. Este estudio supuso la descripción por primera vez del concepto de concentración alveolar mínima (CAM). A día de hoy la CAM es la medida estándar para valorar y comparar la potencia anestésica de los diferentes agentes inhalados, globalmente aceptada.

La CAM se define como: “*concentración mínima de anestésico inhalatorio en el alveolo necesaria para impedir el movimiento consciente y grosero en respuesta a un estímulo doloroso supramáximo en el 50% de los animales*” (Merkel y Eger, 1963). Es decir, la CAM se puede correlacionar con el concepto de dosis efectiva 50 (DE50) que se emplea en los agentes inyectables.

La potencia anestésica de un agente inhalatorio es inversamente proporcional a su CAM (Eger y col, 1965) y directamente proporcional a su coeficiente de partición aceite/gas (Janoff y col, 1981). Así, cuanto menor sea la CAM y mayor sea su CP aceite/gas, mayor es su potencia anestésica y viceversa.

La CAM expresa simultáneamente la concentración y la presión parcial del anestésico en el alveolo, y esto es así porque se define en términos de porcentaje de volumen (% Vol) de anestésico inhalatorio a 1 atmósfera de presión.

Cuando se alcanza la fase de equilibrio del agente anestésico, sus presiones parciales en el alveolo, la sangre y el cerebro son iguales. Es decir, la CAM representa la presión parcial del anestésico inhalatorio en el cerebro, que es el lugar donde ejerce su acción (Quasha y col, 1980).

Para conseguir el plano anestésico adecuado, la presión parcial del agente inhalatorio empleado que se debe alcanzar en el cerebro es siempre la misma. Sin embargo, la CAM no es la misma siempre, sino que varía en función de la presión barométrica ambiental siguiendo la relación:

$$P_x = \frac{C}{100} \times P_{bar}$$

Donde,

P_x es la presión parcial de un anestésico inhalatorio en la mezcla de gases

C es la concentración del anestésico en porcentaje de volumen (% Vol)

P_{bar} es la presión barométrica ó presión total de la mezcla de gases en mmHg.

No se debe confundir el concepto de presión parcial de anestésico con la concentración real del mismo en los tejidos, pues esta concentración depende además de la solubilidad del agente. Esto significa que, aunque en el equilibrio las presiones parciales del gas son iguales en el alveolo y los diferentes tejidos orgánicos, las concentraciones reales del anestésico van a ser variables en los diferentes tejidos en función de la solubilidad del agente empleado en cuestión (Steffey, 1996).

En el caso del hombre, para que un 95% de los individuos no respondan frente a un estímulo quirúrgico, se necesita una dosis de anestésico inhalatorio entre un 20-40% superior a la CAM. Se ha determinado que 1,5 veces la CAM de anestésico inhalatorio, es suficiente para alcanzar un plano anestésico correcto para la cirugía, es decir la CAM quirúrgica o CAM DE95. Sin embargo, a una dosis de dos veces la CAM, se puede llegar a una sobredosis anestésica (De Jong y Eger, 1975; Steffey, 2001).

A partir de este concepto de CAM DE50 y CAM DE95 se han ido desarrollando otros conceptos, como $CAM_{despertar}$, CAM_{BAR} y la más reciente, la CAM_{BS} .

La $CAM_{despertar}$ es la CAM del anestésico inhalatorio a la cual el 50% de los pacientes no presentan respuesta verbal frente a un estímulo auditivo, mientras que la CAM_{BAR} es la concentración de anestésico que bloquea la respuesta del sistema nervioso autónomo a una incisión quirúrgica (Morgan y col, 2007).

Puesto que la anestesia se asocia con cambios funcionales en el cerebro, el nivel de hipnosis se puede cuantificar mediante el registro de la actividad cerebral eléctrica (Veselis y col, 1992).

Durante la anestesia profunda, en el EEF existe un punto final común, inducido por todos los fármacos hipnóticos, a excepción de la ketamina: el patrón de supresión de rotura de EEG. La CAM_{BS} es aquella concentración que inducen la supresión de la rotura de EEG en el 50% de los pacientes, y se emplea como nueva medidas para cuantificar y comparar los efectos cerebrales de los anestésicos (Pilge y col, 2014).

La temperatura corporal, la concentración de ciertos electrolitos o la administración concomitante de otros fármacos son factores que pueden modificar la CAM de los anestésicos inhalatorios.

Tabla 9: Algunos factores que afectan a la concentración alveolar mínima (CAM) de los anestésicos inhalatorios (Quasha y col, 1980; Cullen, 1986; Steffey, 1996).

FACTORES		
AUMENTAN LA CAM	DISMINUYEN LA CAM	NO ALTERAN LA CAM
Hipertermia (hasta 42oC)	Hipotermia	Duración de la anestesia
Hipernatremia	Hiponatremia	Hiperkalemia, Hipokalemia
Fármacos que estimulan el SNC (anfetaminas, efedrina, etc)	Gestación	Género
	PaCO ₂ > 95 mmHg	PaCO ₂ (15 – 95 mmHg)
	PaO ₂ < 40 mmHg	PaO ₂ > 40 mmHg
	Presión arterial < 50 mmHg	Presión arterial > 50 mmHg
	Edad avanzada	Acidosis o alcalosis metabólica
	Fármacos que deprimen el SNC (ketamina, propofol, opiáceos, etc.)	Atropina, glicopirrolato, escopolamina (periférica)

c. Mecanismos de acción

El mecanismo de acción de los anestésicos inhalatorios en el SNC, genera aun hoy, mucha controversia, y se continua investigando qué reacciones moleculares conducen a sus acciones farmacológicas. A lo largo de los años, el desarrollo de diversos estudios han permitido esclarecer cómo y donde actúan los agentes inhalatorios, sin embargo, lo que no se ha podido describir con exactitud es que mecanismos moleculares conducen al efecto anestesia de estos fármacos.

La dificultad de medir, e incluso definir, la pérdida de consciencia por un lado, unido a las diversas interacciones que se producen entre los agentes anestésicos inhalatorios y diversos receptores o sitios de unión no relacionados con la producción de la anestesia (Humphrey y col, 2002) son las razones principales por las cuales no se ha encontrado aun el mecanismos de acción exacto de los anestésicos inhalatorios.

Como se ha comentado anteriormente, la CAM de los anestésicos inhalatorios viene determinada por su efecto inmovilizante (Sonner y col, 2003), por lo que en la actualidad, los estudios se están centrando en intentar determinar cómo se produce este efecto.

Aunque hay una variedad considerable de receptores y canales iónicos sobre los que los anestésicos inhalatorios pueden actuar, esto no significa que todos ellos participen en sus acciones anestésicas.

Para determinar la implicación de un canal iónico concreto en la CAM de un anestésico inhalatorio hay que realizar estudios *in vitro*, y posteriormente estudios *in vivo* genéticos y farmacológicos, siendo necesario obtener los mismos resultados en todos ellos para poder afirmar que ese receptor o canal iónico participa en la acción ejercida por el agente en cuestión.

Se han realizado estudios *in vitro* con preparaciones de médula espinal en los que se ha sugerido que en el efecto inmovilizante de los anestésicos inhalatorios pueden estar involucrados receptores que producen tanto excitación (AMPA y NMDA), si el agente disminuye esta excitación, como inhibición neuronal (glicinérgicos y GABAA), al incrementar el agente inhalatorio dicha inhibición (Wang y col, 1999; Cheng y Kendig, 2000).

El efecto inmovilizante podría venir mediado, a su vez, por la acción de los anestésicos sobre los canales de sodio (Cheng y Kendig, 2002). Por otro lado, se ha observado que los receptores colinérgicos no están involucrados en la inmovilidad producida por los anestésicos inhalatorios (Wang y col, 1999).

De todos los receptores y canales iónicos implicados en alguna interacción con agentes anestésicos inhalatorios, se ha conseguido aclarar, mediante la realización de estudios in vivo genéticos y farmacológicos cuales están implicados en la inmovilidad que determina la CAM de estos agentes. Aunque el mecanismo de acción exacto de los anestésicos inhalatorios despierta todavía varias dudas.

Parece ser que los receptores glicinérgicos son los principales responsables de esta acción inmovilizante (Zhang y col, 2001 y 2003b). Los receptores NMDA localizados en la médula espinal (Martin y col, 1995; McFarlane y col, 1995; Ishizaki y col, 1996; Stabernack y col, 2003) o los receptores 5-HT_{2A} y los canales de sodio (Himes y col, 1977; Lingamaneni y col, 2001; Zhang y col, 2003a) son otros de los receptores considerados como posibles responsables del efecto inmovilizante de estos agentes, aunque en el caso de estos últimos, se hace necesario un estudio más exhaustivo para llegar a confirmar esta hipótesis.

Curiosamente, los receptores GABBA, siendo de la misma familia que los receptores glicinérgicos, no parecen intervenir en la CAM de los anestésicos inhalatorios (Zhang y col, 2004). Los receptores AMPA y los kainato (Joo y col, 2001), los receptores opiáceos (Harper y col, 1978), los receptores adrenérgicos α_2 (Rabin y col, 1996; Eger y col, 2003), los receptores 5-HT₃ (Rampil y col, 2001), los receptores colinérgicos (Flood y col, 2002) y los canales de potasio (Gerstin y col, 2003), tampoco parecen intervenir en la propiedad inmovilizante de los anestésicos inhalatorios, aunque sin descartar que puedan mediar otros efectos anestésicos de estos agentes, como por ejemplo, la amnesia (Sonner y col, 2003).

1.3.3 Farmacocinética: captación y eliminación

En el caso de los anestésicos inhalatorios, no solo basta con alcanzar una determinada concentración para conseguir un plano anestésico adecuado, si no que además, hay que alcanzar una presión parcial adecuada en el SNC, es decir, en el lugar donde ejercen sus acciones.

Del periodo transcurrido desde la administración de una determinada presión parcial de anestésico, hasta que esa presión parcial se alcanza en SNC, el periodo más importante es el transcurrido entre los gases inspirados y los gases alveolares.

La presión parcial alveolar gobierna las presiones parciales de anestésico en todos los tejidos corporales, todas terminan aproximándose e igualándose a la presión parcial inspirada de anestésico.

Por tanto, una forma de monitorizar la captación de anestésico consiste en hacer un seguimiento de la relación entre la concentración de agente en los alveolos (FA) y la concentración inspirada (FI) en el tiempo (FA/FI). Esta relación se ve afectada principalmente por dos factores, la concentración inspirada y la ventilación alveolar.

La captación de anestésico viene determinada por el producto de tres factores: la solubilidad en sangre, o coeficiente de partición sangre:gas (λ), el gasto cardiaco (Q) y la diferencia de presión parcial alveolar-venosa (PA-PV).

$$\text{Captación} = \frac{\lambda \times Q_x (PA - PV)}{\text{presión barométrica}}$$

Dado que la captación es un producto y no una suma de factores, si alguno de ellos se aproxima a cero, la captación también debería aproximarse a cero, y la ventilación produce rápidamente un FA/FI de 1.

Factores que modifican la velocidad de incremento FA/FI:

- Coeficiente de partición sangre:gas: describe como se reparte el anestésico entre sus dos fases cuando se alcanza el equilibrio. Los agentes inhalatorios con una baja solubilidad van a sufrir una inducción y eliminación anestésica más rápida, pues cuanto menor es la solubilidad en sangre, más rápido es el incremento FA/FI. A los 15 minutos de la administración, la pendiente de la curva se reduce, o lo que es lo mismo, los tejidos ricamente vascularizados se han saturado y la captación de anestésico se reduce. (Figura 8) Un coeficiente de partición sangre:gas más alto produce una mayor captación y una menor relación FA/FI.
- Gasto cardiaco: cuanto mayor sea la circulación pulmonar, más anestésico se va a captar y más va a disminuir la FA del anestésico, retrasándose así la inducción. Por lo tanto, a menor gasto cardiaco mas rápido es el incremento FA/FI.

- Ventilación alveolar: cuanto mayor es la ventilación minuto del paciente mas rápido es el incremento de F_A/F_I .
- Diferencia de presión parcial arterial y venosa: la alta presión parcial pulmonar arterial frente a la venosa aumenta la velocidad de incremento de F_A/F_I .

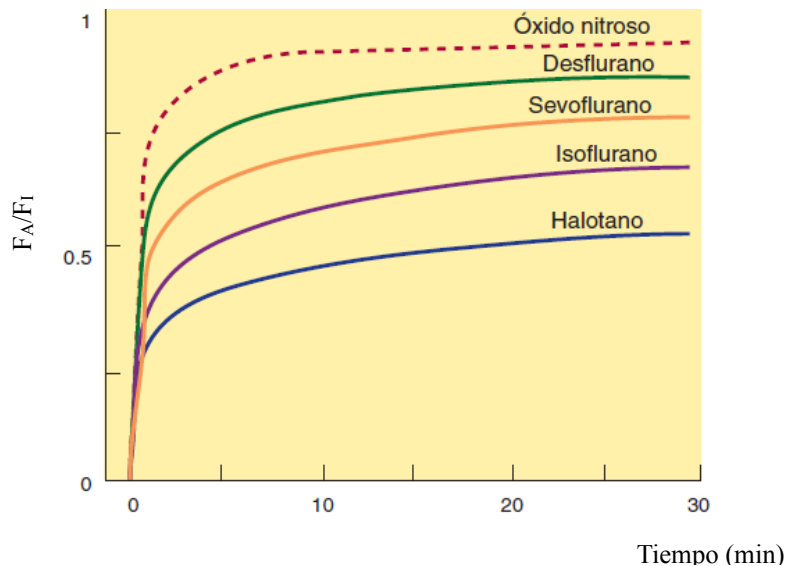


Figura 8: Relación concentración alveolar (F_A) e inspiratoria (F_I) de los diferentes agentes inhalados en fx del tiempo.

(Fuente: Bertram G. Katzung, Anthony J. Trevor. *Farmacología básica y clínica*. 13ed McGraw-Hill Education)

Efecto de sobrepresión y efecto del segundo gas:

El hecho de administrar a un paciente una concentración de agente inhalada superior a la concentración alveolar deseada se denomina sobrepresión, y equivaldría a la administración de un bolo intravenoso. De esta manera se consigue acelerar la inducción anestésica.

Al administrar dos gases de forma simultánea se produce un caso especial de sobrepresión. Por ejemplo, al administrar conjuntamente óxido nitroso y sevoflurano, la captación de gran volumen de NO incrementa la concentración alveolar del sevoflurano. Este fenómeno se denomina efecto de segundo gas.

1.3.4 Farmacodinamia: acciones de los agentes inhalatorios

Los anestésicos inhalatorios actúan sobre diferentes receptores y canales iónicos presentes en el SNC, dando lugar así a su efecto farmacológico, que consiste, en términos generales, en una depresión del SNC que finalmente conduce a un estado de anestesia general.

Los diferentes agentes inhalatorios disponibles se diferencian, entre otros aspectos, por sus efectos farmacológicos, cobrando especial importancia las diferencias existentes entre los efectos adversos de cada uno de ellos. Este hecho sirve para discriminar uno u otro agente inhalatorio, pudiendo elegir en cada caso el que mejor se adapte al paciente y/o al tipo de procedimiento quirúrgico para el que va a ser empleado.

La clave para evitar, o minimizar al máximo, los efectos adversos es realizar siempre que sea posible una “anestesia equilibrada”, es decir, con el fin de reducir la dosis administrada de un solo fármaco necesario para alcanzar un plano anestésico adecuado, se administran combinaciones de dos o más fármacos. Así, al reducir las dosis de cada uno de ellos, se reducen también los efectos adversos que pudieran producir.

a. Acciones en el SNC:

Todos los agentes inhalatorios producen una depresión generalizada y reversible del SNC, proporcional a su concentración en el mismo. Esta depresión se puede graduar con el concepto de “profundidad anestésica”.

Al comprobarse que la actividad eléctrica cortical representada en un EEG sufre una serie de cambios a medida que se va aumentando la profundidad anestésica, se ha intentado correlacionar ciertos parámetros de este EEG con el grado de profundidad anestesia, en términos de hipnosis (Schneider y col, 2004).

En pacientes predispuestos, ciertos agentes inhalatorios, como por ejemplo el enflurano, pueden causar crisis epilépticas (Joas y col, 1971; Nicoll, 1986).

Además, los anestésicos inhalatorios producen un aumento de la presión intracraneal, al aumentar el flujo sanguíneo cerebral, consecuencia de su potente acción vasodilatadora (Matta y col, 1995), lo que les hace inadecuados en pacientes con patologías intracraneales previas.

b. Acciones cardiovasculares

Todos los anestésicos inhalatorios producen una depresión del sistema cardiovascular dependiente de la dosis y del agente en cuestión (Steffey y Howland, 1977; Hikasa y col, 1998). Esta depresión está mediada por un lado, por la acción directa que ejercen sobre el miocardio, y por otro, por su efecto sobre la contractilidad miocárdica que se traduce en una disminución del gasto cardíaco y la postcarga (Pagel y col, 1991).

Este descenso en el gasto cardíaco, a su vez conduce a una disminución dosis dependiente de la presión arterial. Aunque, en ocasiones, esta acción hipotensora se ha visto influida también por la disminución de la resistencia vascular sistémica (Merin y col, 1991).

En el caso de la frecuencia cardíaca (FC), salvo que existan otros factores que la modifiquen, como podría ser un estímulo doloroso, no se va a ver afectada por los anestésicos inhalatorios, manteniéndose constante en un rango clínico de concentraciones alveolares (Pagel y col, 1991).

Los anestésicos inhalatorios producen una estimulación del automatismo del miocardio y en la propagación de los impulsos que se generan en lugares ectópicos (Price, 1996). Este efecto se ve potenciado cuando se administran combinados con agonistas de los receptores adrenérgicos (Katz y Epstein, 1968). Además pueden también sensibilizar al corazón frente a los efectos arritmogénicos de las catecolaminas, haciendo que en presencia de estos agentes, la cantidad de adrenalina necesaria para producir complejos prematuros ventriculares sea mucho menor. Este efecto se produce especialmente con el halotano (Joas y Stevens, 1971; Weiskopf y col, 1989).

Mientras que, como ya hemos visto, en el cerebro se produce un aumento del flujo cerebral, en otros órganos, como por ejemplo el hígado y los riñones, el flujo sanguíneo disminuye (Bernard y col, 1991; Matta y col, 1995).

c. Acciones respiratorias

De forma general, los agentes inhalatorios producen una depresión respiratoria dosis-dependiente, de modo que, a mayor profundidad anestésica, mayor depresión de la ventilación. Esta depresión respiratoria es variable entre las diferentes especies animales y se produce de manera progresiva, disminuyendo primero el volumen corriente, y la frecuencia respiratoria a continuación.

A medida que aumenta la concentración de anestésico inhalatorio, aumenta proporcionalmente la presión parcial de CO₂ en la sangre arterial (PaCO₂) (Munson y col, 1966; Fourcade y col, 1971), esto se produce porque al reducirse el volumen minuto, se produce una disminución de la ventilación alveolar.

En respuesta a este aumento de la PaCO₂ y a una disminución de la PaO₂ se debería producir una estimulación de la ventilación, sin embargo en los pacientes anestesiados con agentes inhalatorios este efecto se ve disminuido. Posiblemente se deba a la acción directa de estos agentes sobre los quimioceptores medulares y periféricos (aórticos y carotídeos) (Knill y Gelb, 1978; Pavlin y Su, 1994).

En los pacientes con riesgo de padecer broncoconstricción, los agentes anestésicos inhalatorios son los agentes de elección, pues son potentes broncodilatadores (Hirshman y col, 1982).

d. Otras acciones

Se ha visto que, con independencia de la especie animal empleada, todos los anestésicos inhalatorios producen un descenso en el flujo sanguíneo renal y en la tasa de filtración glomerular dosis-dependiente (Lhoest, 1976; Hartman y col, 1992). Esto se traduce en la producción de una pequeña cantidad de orina, y concentrada, en pacientes bajo anestesia inhalatoria.

En cualquier caso, estos efectos se ven muy influenciados por el estado hemodinámico y la hidratación de los pacientes anestesiados y van a revertir rápidamente tras la anestesia. Cuando la anestesia inhalatoria se prolonga en el tiempo, pueden aparecer también altos niveles de urea, creatinina y fosfatos inorgánicos en plasma (Steffey y col, 1979 y 1993).

En cuanto al hígado de los pacientes sometidos a anestesia inhalatoria, la funcionalidad hepática también se reduce, consecuencia de la disminución del flujo sanguíneo hepático, tanto el flujo arterial como el flujo portal, y del oxígeno disponible (Hursh y col, 1987), lo cual se traduce en un grado variable de hipoxia hepática.

La acción depresora generalizada que ejercen los anestésicos inhalatorios sobre el SNC se traducen en relajación muscular (Dale y Brown, 1987). E incluso, aumentan el efecto relajante que producen los fármacos bloqueantes de la placa neuromuscular no despolarizantes (Paul y col, 2002).

e. Efectos adversos

Los anestésicos inhalatorios pueden producir nefrotoxicidad, en el caso de agentes como el metoxiflurano y el enflurano, se produce por efecto directo de ciertos compuestos derivados de su biotransformación (Steffey, 1996). En el caso del sevoflurano, esta nefrotoxicidad se puede producir por la acción del llamado “Compuesto A” (Morio y col, 1992), un compuesto que se libera cuando el sevoflurano es degradado en los absorbentes de CO₂ que se emplean en los circuitos anestésicos (cal sodada o baritada).

Otro efecto adverso que puede producirse es daño hepático de extensión variable y caracterizada por necrosis centro-lobular, derivado por un lado de la posible hipoxia derivada de la reducción del flujo sanguíneo hepático (Shingu y col, 1982), y por otro de la acetilación de proteínas que se produce con la biotransformación del agente en el hígado (Reichle y Conzen, 2003). Clínicamente este efecto se manifiesta con un aumento de las enzimas hepáticas en plasma, llegando en casos extremos a un fallo hepático fulminante (Plummer y col, 1986; Steffey, 1996).

Uno de los efectos adversos más graves, y que pueden llevar a la muerte del paciente es el desarrollo de hipertermia maligna. Este proceso se produce únicamente en pacientes genéticamente susceptibles como consecuencia de una reacción hipermetabólica del músculo estriado. Concretamente, se produce una pérdida aguda del control intracelular del calcio y por lo tanto, una liberación incontrolada desde el retículo sarcoplasmático, a la vez que se inhibe su recaptación, haciéndose persistente la contracción muscular (Ali y col, 2003).

Como consecuencia se produce rigidez musculoesquelética, aumento rápido de la temperatura corporal, acidosis metabólica, taquicardia, taquipnea, un gran consumo de oxígeno y una elevada producción de CO₂, que se manifiesta con un aumento del CO₂ teleespiratorio (Ali y col, 2003).

La hipertermia maligna se asocia principalmente al uso del halotano, aunque se ha visto también en el empleo de isoflurano y enflurano en pacientes genéticamente susceptibles (McGrath y col, 1981). Las especies más predispuestas a este síndrome son la especie humana y porcina.

1.3.5 Sevoflurano

El sevoflurano (1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-fluorometoxi propano) es un líquido volátil, incoloro y no inflamable con un característico olor. Fue sintetizado por primera vez a principios de los años 70 por Wallin y col., sin embargo, su uso clínico no se extendió hasta los años 90, debido al elevado coste que suponía su síntesis y a los aparentes efectos tóxicos que producía.

Actualmente, sus propiedades farmacodinámicas y farmacocinéticas junto con la ausencia de efectos adversos en la mayoría de los órganos corporales le convierte en un agente anestésico seguro y ampliamente empleado en la práctica clínica.

Farmacología básica

El sevoflurano es estable a temperatura ambiente, tiene un punto de ebullición de 58,6°C, una presión de vapor de 157mmHg y coeficiente de partición aceite/gas de 47,2.

Por lo tanto, su potencia anestésica es considerablemente más baja que los antiguos anestésicos inhalatorios como el halotano o el isoflurano, pero es tres veces más potente que el desflurano. Además su menor solubilidad en sangre le permite una rápida inducción y recuperación anestésica.

El sevoflurano se transforma en el hígado, produciéndose hexafluoroisopropanolol (HFIP), iones de fluoruro inorgánico y CO₂. Posteriormente los compuestos de fluoruro inorgánico sufren una desfluoración intrarrenal, la cual se ha asociado con toxicidad renal en otros agentes halogenados, sin embargo, en la anestesia clínica con el sevoflurano no se ha descrito esta toxicidad renal. De la misma manera el HFIP, asociado con la aparición de hepatitis inmunomediada tras la anestesia con halotano, no produce daño hepático tras la anestesia con sevoflurano.

El sevoflurano, en presencia de absorbentes de CO₂ secos, como por ejemplo la cal sodada de las máquinas de anestesia, se degrada a haluro de vinilo (compuesto A). Este compuesto A, en ratas, presenta toxicidad renal dosis-dependiente. En humanos se ha determinado que el umbral mínimo para producir nefrotoxicidad estaría en 150 partes por millón/hora, concentraciones que solo se observan en situaciones de exposición prolongada y de forma transitoria.

Realmente, el compuesto A no se asocia a toxicidad renal clínica significativa tras la utilización de sevoflurano (Martin y Njoku, 2005), por lo que su interés es meramente académico.

Efectos del sevoflurano:

Sobre el aparato circulatorio

Diversos estudios han demostrado una gran estabilidad hemodinámica durante la anestesia con sevoflurano (Ebert y col 1995; Manohar y Parks 1984). En estudios realizados tanto en modelos animales como en humanos, se ha descrito una aparente estabilidad de la FC, sin embargo, otros autores han descrito un efecto ionotrópico y lusotrópico negativo del sevoflurano en un estudio realizado en perros (Harkin y col, 1994).

Se ha demostrado que el sevoflurano no favorece la aparición de arritmias y taquicardia cuando se administra conjuntamente con adrenalina (Navarro y col 1994), a diferencia de lo que ocurre con el halotano. Además se considera un buen agente en pacientes pediátricos, pues la aparición de bradicardia y arritmia es menor que con el uso de otros anestésicos inhalatorios (Ebert y col 1995).

Al igual que el resto de anestésicos volátiles el sevoflurano produce una reducción dosis dependiente de la presión arterial sistémica por reducción de la resistencia vascular sistémica (RVS), manteniendo el gasto cardiaco (GC). En el caso del sevoflurano se ha descrito una reducción de la PAM de hasta el 30% a dosis de 1,2 CAM.

Igualmente se produce una reducción dosis dependiente de la contractibilidad miocárdica, aunque en este caso el efecto del sevoflurano es menor que el de otros agentes inhalados, como el halotano (Wendell y col 1999).

Algunos estudios sugieren que el sevoflurano y el isoflurano actúan modificando la sensibilidad de los canales de calcio del miocito y el calcio intracelular (James y col 2004).

Con el empleo de halotano se producen cambios en la actividad nerviosa simpática y en la concentración de norepinefrina en plasma, sin embargo el uso de sevoflurano no tiene estos efectos, por lo que se cree que a diferencia de en el halotano, con el sevoflurano no se produce estimulación simpática (Ebert 1995).

Aunque es un efecto sin repercusión clínica (Sharpe y col 1999), conviene mencionar que el sevoflurano disminuye la frecuencia de descarga del nodo sinoauricular por efecto de la automaticidad (Atlee y col 1986).

Durante la anestesia con sevoflurano en una cirugía cardiaca, se preserva el ATP en el miocito durante la isquemia, disminuye la concentración de calcio intracelular, se inhibe la actividad de los radicales libres y se activan los canales de potasio dependientes de ATP (Ross y Foex, 1999). Todos estos efectos son cardioprotectores, unidos además a que el sevoflurano produce una vasodilatación coronaria mínima.

Sobre el sistema respiratorio

Al igual que ocurre con el resto de los anestésicos volátiles el sevoflurano reduce el volumen corriente. Sin embargo, su efecto sobre la ventilación/minuto es menor, pues se produce un aumento de la frecuencia respiratoria que compensa la disminución de la ventilación. La respuesta ventilatoria a la hipoxia se ve disminuida por la depresión que ejerce el sevoflurano sobre los quimiorreceptores, incluso en dosis subanestésicas.

Con el sevoflurano se produce relajación del músculo liso bronquial, tanto por la acción directa sobre la reducción de la contractilidad, como por la inhibición de las vías reflejas neurales. La intubación endotraqueal produce una resistencia de las vías aéreas que se inhibe en mayor medida cuando se emplea sevoflurano como anestésico frente al empleo de halotano o isoflurano (Wendell y col 1999).

Sobre el sistema nervioso

En el SNC el sevoflurano produce un aumento del flujo cerebral y un ligero aumento de la PIC. Además produce depresión dosis-dependiente de la actividad electroencefalográfica, de la función cortical y disminuye el consumo metabólico de oxígeno. No tiene actividad convulsiva y no modifica los mecanismos de autorregulación cerebral.

Al igual que el resto de anestésicos inhalatorios fluorados derivados del éter, el sevoflurano potencia el efecto de los relajantes musculares no despolarizantes, actuando a nivel postsináptico, a nivel de los receptores nicotínicos de acetilcolina (Wendell y col 1999). Finalmente, como cualquier otro anestésico volátil, el sevoflurano puede desencadenar hipertermia maligna en pacientes predispuestos genéticamente.

Sobre el sistema gastrointestinal

A pesar del descenso en la PAM y en el GC, a una dosis de dos veces la CAM, el sevoflurano preserva el flujo hepático y el flujo portal.

Sobre el riñón

El sevoflurano no modifica el flujo sanguíneo renal, siempre y cuando la PAM se mantenga por encima de 70mmHg.

Sin embargo, se ha demostrado nefrotoxicidad asociada al compuesto A, principalmente en ratas, y en mucha menor medida en humanos. El compuesto A es un vinil-eter que se produce cuando el sevoflurano reacciona con los absorbentes de CO₂ de los equipos anestésicos, produciendo necrosis en los túbulos proximales corticomedulares (Njoku y col, 1999; Kharasch y col, 1998).

II. Justificación

Hoy en día no podemos afirmar que exista un anestésico ideal, es decir, no disponemos de un agente que sin producir una depresión desmedida de los sistemas cardiovascular y respiratorio sea capaz de conseguir un buen estado de hipnosis, analgesia y relajación muscular. Sin embargo, se hace necesario conseguir un plano anestésico adecuado a la cirugía, utilizando protocolos anestésicos seguros y eficaces que no pongan en riesgo la vida del paciente, ya sea en medicina veterinaria o humana. La única forma de alcanzar estos requerimientos es combinando los distintos fármacos disponibles.

La combinación de distintos fármacos se realiza para alcanzar el concepto de “anestesia equilibrada” y reducir así los efectos secundarios que se producirían al administrar una dosis muy elevada de un solo agente anestésico, pues al combinar más de uno, se pueden reducir las dosis necesarias para conseguir el mismo efecto. Estas combinaciones tradicionalmente incluyen un agente tranquilizante o ansiolítico, un analgésico, un hipnótico y un bloqueante neuromuscular.

Para la realización de este trabajo se planteó la utilización de un opiáceo y un agente cannabinoide administrados en ratas Wistar Han anestesiadas con un agente inhalatorio, con el objetivo de estudiar la posible interacción farmacológica que tiene lugar entre esos dos fármacos sobre la CAM del anestésico inhalatorio.

En base a una revisión bibliográfica, el opiáceo elegido fue la morfina, el cannabinoide seleccionado fue el cannabidiol, y el agente inhalatorio el sevoflurano.

Los opioides y los cannabinoides son dos grupos de drogas psicoactivas consideradas potenciales adyuvantes en el manejo del dolor, tanto en humanos como en animales (Sverrisdóttir y col. 2015; Lossignol 2019; Kogan y col. 2019).

La morfina es uno de los opioides perioperatorios más difundidos, empleado como analgésico para reducir el dolor de moderado a intenso (Sverrisdóttir y col. 2015). El cannabidiol (CDB), un componente natural de *Cannabis sativa*, es un cannabinoide que comparte un perfil farmacológico similar al de la morfina, produciendo analgesia, catalepsia, hipotermia, depresión motora, hipotensión, sedación y efectos de recompensa (Barann y col. 2002; Páldy y col. 2008; Burford y col. 2015). Además, ciertos estudios de comportamiento han revelado que el CDB induce efectos centrales, como por ejemplo, efectos anticonvulsivos, hipnóticos y ansiolíticos (Mechoulam y col. 2002). Por otro lado, cuando se administran conjuntamente opioides y cannabinoides se ha sugerido un efecto analgésico sinérgico (Cichewicz 2004; Desroches y Beaulieu 2010).

Se sabe que los opioides reducen la CAM de ciertos anestésicos volátiles; específicamente, se sabe que la morfina reduce los requerimientos de los anestésicos inhalatorios tanto en humanos como en animales (Hug 1999). Sin embargo, solo dos estudios han demostrado que los cannabinoides, como el Δ -9 tetrahidrocannabidiol (THC) reduce la CAM del halotano en perros (Stoelting y col. 1973) y del ciclopropano en ratas (Vitez y col. 1973); sin embargo, no hay referencias bibliográficas acerca de los efectos del CDB sobre la CAM de los anestésicos inhalatorios.

A partir de una posible interacción farmacológica entre la morfina, el cannabidiol y el sevoflurano, podría establecerse un protocolo anestésico más seguro y eficaz, que es, en definitiva, el objetivo que persigue la anestesiología clínica.

III. Objetivos

Para la realización del presente trabajo se plantearon los siguientes objetivos:

1. Determinar los efectos del cannabidiol administrado vía intraperitoneal sobre la concentración alveolar mínima de sevoflurano en ratas Wistar Han.
2. Determinar los efectos del cannabidiol combinado con morfina y administrados vía intraperitoneal sobre la concentración alveolar mínima de sevoflurano en ratas Wistar Han.
3. Determinar los efectos cardiovasculares y respiratorios que tienen lugar cuando se administra cannabidiol vía intraperitoneal en ratas Wistar Han anestesiadas con sevoflurano a una concentración de una vez la concentración alveolar mínima.
4. Determinar los efectos cardiovasculares y respiratorios que tienen lugar cuando se administra cannabidiol combinado con morfina vía intraperitoneal en ratas Wistar Han anestesiadas con sevoflurano a una concentración de una vez la concentración alveolar mínima.
5. Describir el tipo de interacción farmacológica existente entre la morfina y el cannabidiol sobre la concentración alveolar mínima de sevoflurano en ratas Wistar Han.

IV. Material y Métodos

4.1 Animales

Para la realización de este trabajo se utilizaron un total de 68 ratas Wistar Han, sanas y sin medicación previa. En todos los casos se emplearon machos, de tres meses de edad y un peso medio de 272 ± 23 gramos (rango 250-300 gramos). Para evitar la posible influencia del ritmo circadiano en los resultados del ensayo, los estudios se realizaron siempre por la mañana.

Las ratas fueron estabuladas en grupos de 8-10 animales en jaulas de U-TEMP polieterimida con comida y agua ad-libitum, con un ciclo 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad, una temperatura ambiente de $20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ y una humedad relativa del aire del 50% - 70%. Con el objetivo de permitir que los animales se aclimatasen antes de comenzar el estudio, se mantuvieron en estas mismas condiciones durante la semana previa al ensayo.

Todos los animales fueron tratados de acuerdo a las normativas europeas y nacionales sobre el cuidado y la protección de los animales de experimentación (Directiva 2010/63/UE y RD53/2013). El estudio fue aprobado por el Comité Ético de Experimentación Animal y el Órgano Habilitado del Instituto de Investigación Sanitaria Puerta de Hierro y autorizado por el Órgano Competente de la Comunidad Autónoma de Madrid (CEEA 003/2017 Ref. PROEX 090/17).

4.2 Personal

Para cumplir con los objetivos del bienestar animal, reduciendo el nivel de estrés de los animales, todos los procedimientos fueron desarrollados por personal acreditado, con experiencia en el manejo de animales de experimentación.

Además, a fin de evitar repeticiones innecesarias, así como procedimientos invasivos o causantes de estrés, en la fase de desarrollo experimental del proyecto, se realizó un exhaustivo estudio estadístico, estudiando el máximo número de variables controlables para evitar variabilidad, así como el mínimo número de procedimientos que ofrecen el máximo potencial de resultados.

4.3 Metodología

4.3.1 Procedimientos

4.3.1.1. Anestesia

Para anestesiar a los animales se utilizó una mascarilla a través de la cual se administró sevoflurano (Sevorane, Laboratorios Abbott, Madrid, España) a una concentración del 8% vaporizado en un flujo de 5L/min de oxígeno al 100%.



Figura 9: Colocación de mascarilla facial para la inducción anestésica

Cuando el animal perdía el reflejo palpebral y el tono mandibular se llevaba a cabo la intubación endotraqueal con un catéter de 16G, tal y como describen Weksler y col. (1994). Colocando al animal en decúbito supino, y con ayuda de un otoscopio de cono largo, se visualiza la laringe y se introduce a su través, una guía de teflón de punta roma. A continuación, se utiliza la guía como medio para introducir el catéter en la tráquea, hasta llevarlo a una distancia de unos 3 a 5 mm de la carina.

La correcta posición del catéter se comprobaba con un analizador de CO₂ por infrarrojos (PM 8050 NMR, Dräger Medizintechnik GmbH, Lübeck, Alemania). Una vez correctamente intubado el animal, se conectaba a un circuito anestésico tipo T de Ayre con un espacio muerto mínimo (0,2 mL). El flujo de O₂ se regulaba a 1L/min y la concentración de sevoflurano inspirado a un 5% durante todo el proceso de preparación del animal.

Durante el procedimiento los animales presentaban ventilación espontánea.



Figura 10a

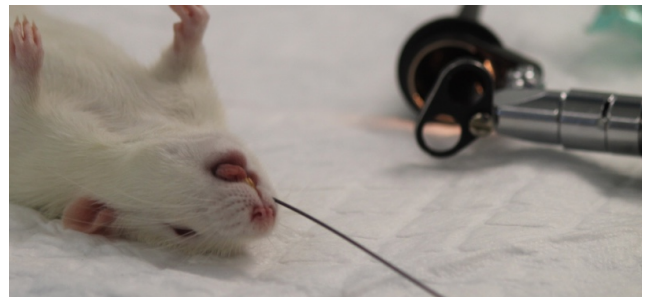


Figura 10b



Figura 10c

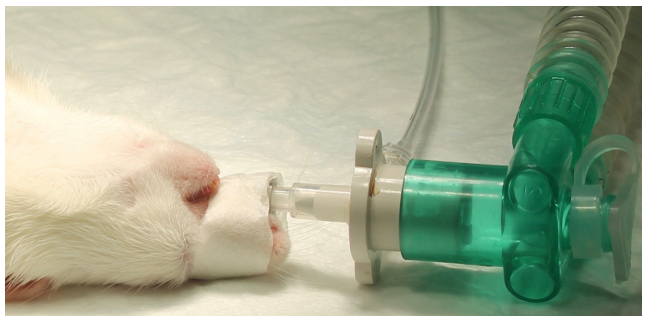


Figura 10d

Figura 10: Proceso de intubación. (10a: visualización de la laringe; 10b: introducción de la guía de teflón; 10c: colocación del catéter; 10d: conexión al circuito anestésico)

4.3.1.2. Monitorización

A continuación se procedía al abordaje quirúrgico de la arteria carótida izquierda mediante una incisión longitudinal de aproximadamente 2cm en la parte ventral del cuello. Posteriormente se cateterizaba la arteria con un catéter de teflón de 24G.

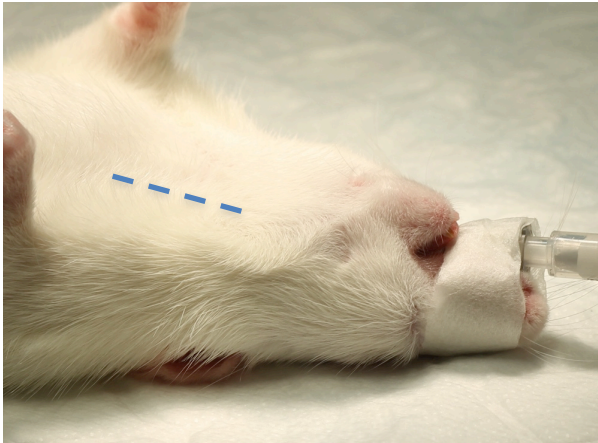


Figura 11a

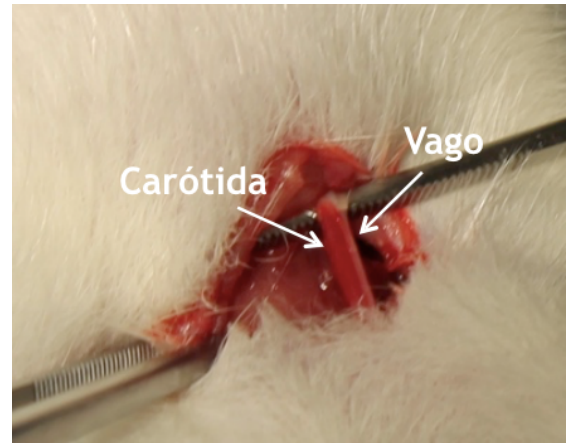


Figura 11b

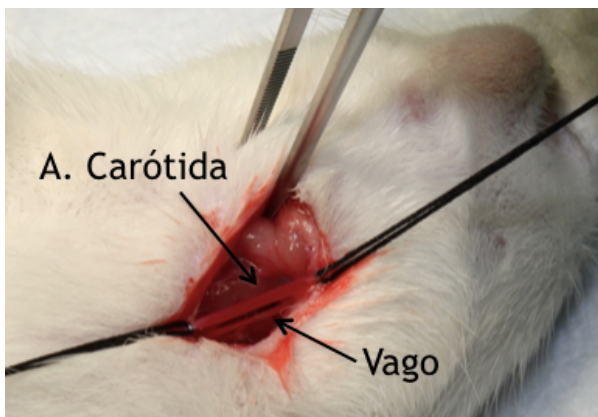


Figura 11c



Figura 11d

Figura 11: Cateterización de la arteria carótida izquierda (11a: lugar de incisión; 11b: abordaje quirúrgico de la arteria; 11c: disección de la carótida con dos suturas de seda; 11d: introducción del catéter)

Este acceso permitía la toma de muestras de sangre arterial y la monitorización continua de la frecuencia cardíaca, la presión arterial sistólica (PAS) y la presión arterial diastólica (PAD) de manera invasiva y continua. (Infinity Delta XL, Dräger Medizintechnik GmbH, Lübeck, Alemania).

Tras haber introducido el catéter intra-arterial, este se fijaba a la piel con una sutura de seda para evitar que se saliera. Posteriormente se conectaba al traductor de presión a través de un prolongador de línea arterial.

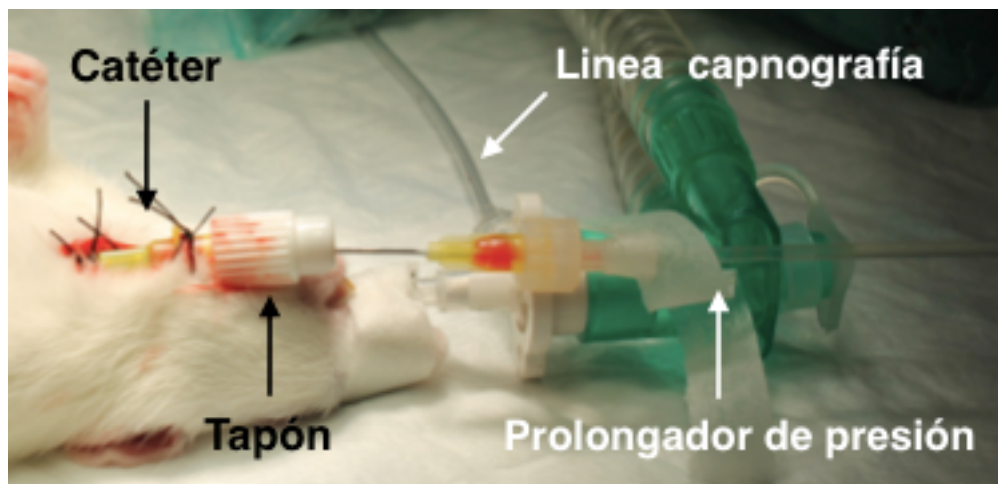


Figura 12: Monitorización de los parámetros cardiovasculares y respiratorios

La presión arterial media (PAM) se calculó aplicando la siguiente fórmula:

$$PAM = PAD + 1/3 (PAS - PAD)$$

Finalmente, con el objetivo de tener la temperatura corporal monitorizada de forma continua, se colocaba en el animal una sonda rectal de temperatura. Para mantener la temperatura corporal dentro de los límites considerados fisiológicos en esta especie (37-39°C) se utilizó un sistema de calentamiento con aire seco caliente (Bair Hugger mod.505, Augustine Medical Inc, Eden Prairie, MN, USA).

Además se llevó a cabo un registro de la frecuencia respiratoria, la presión parcial de CO₂ teleespiratorio y las fracciones inspiradas y espiradas de anestésico inhalatorio en cada determinación de la CAM.

En dos ocasiones se extrajeron 0,5mL de sangre arterial directamente de la carótida con el fin de realizar un análisis gasométrico de la misma y comprobar que todos los parámetros estaban dentro de sus rangos fisiológicos (pH 7,30-7,40, PaO₂ > 90 mmHg, PaCO₂ 40-45mmHg). (GemPremier 3000, Instrumentation Laboratory, MA, USA).

Cuando se concluía con la preparación y monitorización de los animales, la concentración inspirada de sevoflurano se reducía hasta un 3%, que es un valor cercano a la CAM de este agente inhalatorio para la rata (Abreu y col, 2012).

Las concentraciones de sevoflurano inspirada y espirada se midieron continuamente a partir de una muestra de gas intratraqueal recogida a través de un tubo fino insertado dentro del catéter endotraqueal, con la punta ubicada en su extremo distal (Santos y col. 2005). El extremo proximal del catéter se conectó a un analizador de absorción infrarrojo (PM 8050 NMR, Dräger Medizintechnik GmbH, Lübeck, Alemania) con un flujo de aspiración de la muestra de 60 mL/min.

4.3.1.3. Determinación de la CAM

Cada rata fue su propio control, esto es, la CAM de sevoflurano se determinó antes de la inyección de las drogas (CAM_{SEVi}), y este valor fue tomado como referencia para determinar el porcentaje de reducción. En todos los grupos, la determinación de la CAM después de la administración de las drogas (CAM_{SEVt}) se comenzó a realizar a los 30 minutos de la administración y fue determinada o confirmadas a los 95 ± 12 minutos después de la administración de las drogas.

Para la determinación de la CAM se utilizó el método descrito por Quasha y col. (1980). Durante un periodo de 15 minutos la concentración teleespiratoria del agente inhalatorio, sevoflurano en este caso, se mantenía constante, pues se ha estimado que este es el tiempo necesario para alcanzar el equilibrio entre la concentración de anestésico en alveolos, sangre arterial y SNC.

Transcurrido este tiempo se aplicaba el estímulo doloroso supramáximo, clampando la cola de la rata, por su base, perpendicularmente a la misma y abarcando toda su anchura con una pinza hemostática Rochester-Pean recta, sin dientes, de 16 cm de longitud. La pinza se cerraba hasta el primer nivel, y se mantenía así durante 1 minuto.

Si con este estímulo no se observaba una respuesta motora positiva, se reducía la concentración de sevoflurano en un 0,1%-0,2% y se dejaban pasar otros 15 minutos para alcanzar nuevamente el equilibrio. Transcurrido este tiempo se volvía a aplicar el efecto doloroso, en un lugar próximo, pero diferente al anterior.

Si por el contrario, ante el estímulo nociceptivo se observaba una respuesta positiva, la concentración alveolar de sevoflurano se incrementaba en un 0,1%-0,2% con respecto a la anterior, y tras 15 minutos de espera, se procedía de nuevo al clampaje de la cola.

Se consideró la CAM como la concentración tele-espíroria de anestésico inhalatorio situada entre la concentración más alta a la que se obtuvo una respuesta negativa y la concentración más baja a la que se obtuvo una respuesta positiva.

Para considerar si una respuesta al estímulo era positiva o no, se siguieron las pautas descritas por Quasha y col. (1980). Así, se consideraba que una respuesta era positiva si el animal presentaba un movimiento muscular voluntario y brusco, normalmente de la cabeza, el torso o las extremidades. No se consideraron como respuestas positivas un tic nervioso o una mueca, ni tan solo una sacudida o una torsión del cuerpo o de la cabeza. Tampoco se consideraron la tos, el masticar o el tragar como respuestas positivas. Los movimientos de las extremidades eran los que se presentaban con una mayor frecuencia.

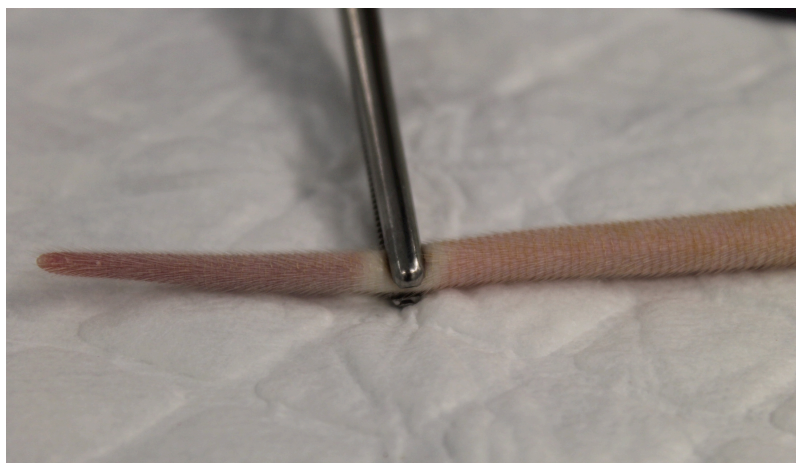


Figura 13: Aplicación del estímulo doloroso supramáximo

El valor de CAM obtenido en cada animal fue corregido a la presión barométrica al nivel del mar de 1 atmósfera, o lo que es lo mismo, a una presión atmosférica de 760 mmHg. La corrección se realizó aplicando la siguiente fórmula (Dorsch y Dorsch, 1994): $CAM_{corregida} = CAM_{obtenida} \times \frac{\text{Presión barométrica ambiental (mmHg)}}{760 \text{ mmHg}}$.

4.3.2 Registro de parámetros

Los parámetros fisiológicos fueron monitorizados en cada concentración de sevoflurano antes del clampaje de la cola; sin embargo, para el estudio estadístico, solo fueron considerados el pH, PaO₂, PaCO₂, frecuencia respiratoria y temperatura registrados en los momentos de las determinaciones de la CAM_{SEVi} y CAM_{SEVf}. Los parámetros cardiovasculares también fueron registrados en el momento de la determinación de la MAC_{SEV} antes de la inyección de los fármacos y cada 30 minutos después de la administración intraperitoneal de los fármacos.

Al final de cada experimento, se aumentaba la concentración de sevoflurano hasta un valor de 8%, tras lo cual los animales eran sacrificados con una sobredosis intravenosa de pentobarbital sódico.

4.3.3 Grupos de estudio

El CBD (Cannabidiol, Tocris Bioscience, Bristol, Reino Unido) se preparó inicialmente en una formulación de 5mg/mL de un vehículo basado en etanol: solutol: solución salina en una proporción de 2:1:17 (Pazos y col. 2012).

Los animales fueron distribuidos de manera aleatoria mediante una lista aleatorizada generada por ordenador en 15 grupos, compuestos por N animales cada uno. El estudio fue doble ciego, es decir, el investigador encargado de determinar la CAM de cada anestésico no conocía el grupo al que pertenecía el animal en cuestión. Los 15 grupos de animales fueron los siguientes:

1. Grupo Vehículo (N = 4): Los animales pertenecientes a este grupo recibieron una dosis de vehículo intraperitoneal (IP) equivalente a la dosis más alta de CBD (10mg/kg).
2. Grupo CBD1 (N = 4): Los animales pertenecientes a este grupo recibieron una dosis de 1mg/kg de cannabidiol IP.
3. Grupo CBD3 (N= 4): Los animales pertenecientes a este grupo recibieron una dosis de 3mg/kg de canabidiol IP.

4. Grupo CBD5 (N= 4): Los animales pertenecientes a este grupo recibieron una dosis de 5mg/kg de canabidiol IP.
5. Grupo CBD6,5 (N=4): Los animales pertenecientes a este grupo recibieron una dosis de 6.5mg/kg de canabidiol IP.
6. Grupo CBD7,5 (N=4): Los animales pertenecientes a este grupo recibieron una dosis de 7.5mg/kg de canabidiol IP.
7. Grupo CBD10 (N=4): Los animales pertenecientes a este grupo recibieron una dosis de 10mg/kg de canabidiol IP.
8. Grupo MOR+CBD1 (N=5): Los animales pertenecientes a este grupo recibieron una dosis de 5mg/kg de morfina más 1mg/kg de cannabidiol IP.
9. Grupo MOR+CBD3 (N=5): Los animales pertenecientes a este grupo recibieron una dosis de 5mg/kg de morfina más 3mg/kg de cannabidiol IP.
10. Grupo MOR+CBD5 (N=5): Los animales pertenecientes a este grupo recibieron una dosis de 5mg/kg de morfina más 5mg/kg de cannabidiol IP.
11. Grupo MOR+CBD6,5 (N=5): Los animales pertenecientes a este grupo recibieron una dosis de 5mg/kg de morfina más 6.5mg/kg de cannabidiol IP.
12. Grupo MOR+CBD7,5 (N=5): Los animales pertenecientes a este grupo recibieron una dosis de 5mg/kg de morfina más 7.5mg/kg de cannabidiol IP.
13. Grupo MOR+CBD10 (N=5): Los animales pertenecientes a este grupo recibieron una dosis de 5mg/kg de morfina más 10mg/kg de cannabidiol IP.
14. Grupo Morfina (MOR) (N=5): Los animales pertenecientes a este grupo recibieron una dosis de 5mg/kg de morfina IP.

15. Grupo MOR+Vehículo (N=5): Los animales pertenecientes a este grupo recibieron una dosis de 5mg/kg de morfina IP diluida en un volumen de vehículo equivalente a la dosis más alta de CBD (10mg/kg).

Todas las soluciones fueron diluidas en solución salina fisiológica al 0,9% hasta alcanzar un volumen total de 1mL.

4.3.4 Estudio estadístico

El tamaño de muestra y la potencia estadística se determinó mediante el programa Granmo 7.12. Un tamaño muestral de 5 animales por grupo se consideró adecuada para la detección de un porcentaje de reducción $\geq 15\%$ con una potencia de 90% en el modelo analítico de dos colas. El análisis estadístico de los datos se realizó mediante el programa informático SPSS 15.0 SPSS (Inc, Chicago, IL, EE.UU).

Tras la confirmación de la distribución normal (test de Shapiro-Wilk), se estudió la significación estadística de la interacción de la diferencia de las medias entre CAM_{SEVi} y CAM_{SEVf} mediante la prueba T para datos apareados. El porcentaje de reducción se analizó usando un análisis unidireccional de la varianza (ANOVA) seguido de la prueba de Tukey. Los datos fisiológicos se analizaron mediante un análisis de dos vías de la varianza (ANOVA) para medidas repetidas y cuando hubo significación se hizo una comparación post hoc mediante la prueba de Tukey para comparaciones múltiples. Todos los datos se presentaron como media \pm desviación estándar. La significación estadística fue aceptada cuando $p < 0,05$.

Se aplicó un análisis de regresión para determinar la correlación entre los porcentajes de reducción de la CAM de sevoflurano en las diferentes dosis de CBD combinadas con morfina.

4.3.5 Cuantificación de la interacción farmacológica

A la hora de cuantificar la interacción farmacológica entre dos agentes distintos, el modelo de adición (Ko y col. 2000) asume que el efecto final de dos fármacos administrados conjuntamente es igual a la suma de los efectos de los fármacos administrados por separado.

Si aplicamos este modelo a nuestro trabajo, es de suponer que si la interacción entre la morfina y el CBD es aditiva, el porcentaje de reducción de la CAM de sevoflurano de la morfina, más el porcentaje de reducción de la CAM del sevoflurano del CBD, si lo hubiera, sería igual al porcentaje de reducción de la CAM del sevoflurano de la morfina+CBD.

Partiendo de este modelo, si al combinar la morfina con el CBD se obtiene un porcentaje de reducción de la CAM mayor al esperado de la suma de los porcentajes de reducción al administrar los fármacos por separado, lo que se está produciendo es un efecto sinérgico. Por otro lado, si lo que se obtiene es una menor reducción de la CAM de la esperada por una simple adición, estaríamos ante un efecto antagonista.

V. Resultados

5.1 Reducción en la CAM

La media de los valores obtenidos en cada animal para la CAM_{SEVi} no mostró diferencias estadísticamente significativas en ningún grupo (Tabla 10).

No se observó reducción en el valor de CAM_{SEVf} en los grupos de animales que recibieron vehículo o cannabidiol administrado solo a diferentes dosis (grupos vehículo, CBD1, CBD3, CBD5, CBD6,5, CBD7,5 y CBD10). Sin embargo, la morfina administrada sola, con el vehículo o en adición a las diferentes dosis de CBD, si produce una reducción considerable de la CAM_{SEVf} de $2.55\% \pm 0.26\%$ a $1.68\% \pm 0.25\%$ ($p < 0.001$), de $2.64\% \pm 0.14\%$ a $1.77\% \pm 0.23\%$ ($p < 0.001$), de $2.50\% \pm 0.21\%$ a $1.78\% \pm 0.17\%$ ($p < 0.001$), de $2.67\% \pm 0.26\%$ a $2.02\% \pm 0.20\%$ ($p < 0.001$), de $2.58\% \pm 0.23\%$ a $2.15\% \pm 0.10\%$ ($p < 0.001$), de $2.59\% \pm 0.24\%$ a $1.90\% \pm 0.16\%$ ($p < 0.001$), de $2.61\% \pm 0.16\%$ a $1.78\% \pm 0.11\%$ ($p < 0.001$) y de $2.65\% \pm 0.18\%$ a $1.85\% \pm 0.06\%$ ($P < 0.001$) en MOR, MOR+vehículo, MOR+CBD1, MOR+CBD3, MOR+CBD5, MOR+CBD6,5, MOR+CBD7,5 y MOR+CBD10 respectivamente (Tabla 10).

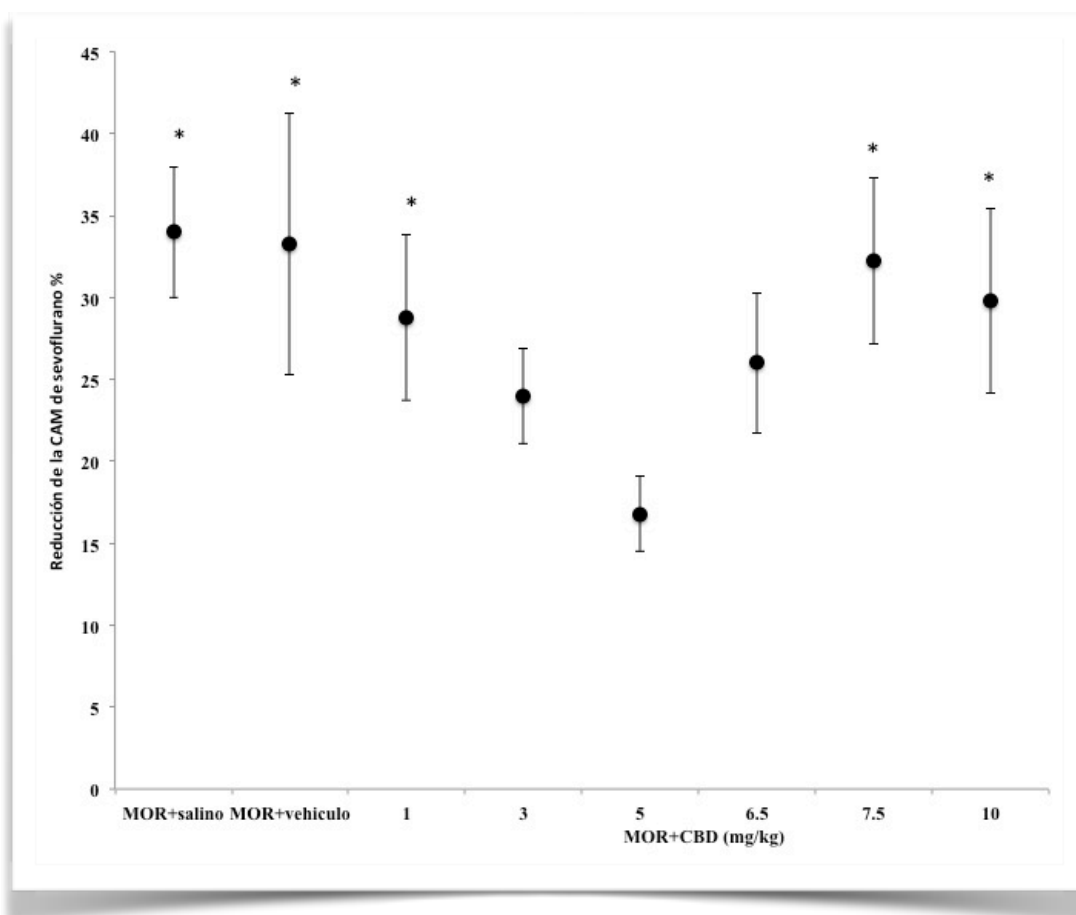
El mayor porcentaje de reducción tras la administración de morfina se observa en los grupos MOR, MOR+vehículo, MOR+CBD1, MOR+CBD7,5 y MOR+CBD10 ($34 \pm 4\%$, $33 \pm 8\%$, $29 \pm 5\%$, $32 \pm 5\%$ y $30 \pm 6\%$ respectivamente), mientras que en los grupos MOR+CBD3 y MOR+CBD6,5 se observa un porcentaje de reducción menor ($24 \pm 3\%$ y $26 \pm 4\%$ respectivamente) y la reducción más baja se obtiene en el grupo MOR+CBD5 ($17 \pm 2\%$). Sin embargo, solo el grupo MOR+CBD5 fue estadísticamente significativo con respecto a los grupos MOR ($p < 0,001$), MOR+vehículo ($p < 0,001$), MOR+CBD1 ($p < 0,05$), MOR+CBD7,5 ($p < 0,05$) y MOR+CBD10 ($p < 0.05$). (Tabla 10) (Figura 14).

Tabla 10: Valores medios \pm desviación estándar (SD) de los valores de MAC_{SEVi} y MAC_{SEVf} y porcentaje de reducción de la MAC.

GRUPO	n	$MAC_{SEVi} \pm SD$	$MAC_{SEVf} \pm SD$	%Reduccion $\pm SD$
VEHICULO	4	2.67 \pm 0.10	2.70 \pm 0.08	NR
CBD1	4	2.54 \pm 0.14	2.77 \pm 0.04	NR
CBD3	4	2.51 \pm 0.05	2.54 \pm 0.04	NR
CBD5	4	2.53 \pm 0.13	2.59 \pm 0.06	NR
CBD6,5	4	2.57 \pm 0.23	2.62 \pm 0.26	NR
CBD7,5	4	2.54 \pm 0.20	2.67 \pm 0.22	NR
CBD10	4	2.53 \pm 0.13	2.73 \pm 0.07	NR
MOR+SALINO	5	2.55 \pm 0.26	1.68 \pm 0.25*	34 \pm 4#
MOR+VEHÍCULO	5	2.64 \pm 0.14	1.77 \pm 0.23*	33 \pm 8#
MOR+CBD1	5	2.50 \pm 0.21	1.78 \pm 0.17*	29 \pm 5#
MOR+CBD3	5	2.67 \pm 0.26	2.02 \pm 0.20*	24 \pm 3
MOR+CBD5	5	2.58 \pm 0.23	2.15 \pm 0.10*	17 \pm 2
MOR+CBD6,5	5	2.59 \pm 0.24	1.90 \pm 0.16*	26 \pm 4
MOR+CBD7,5	5	2.61 \pm 0.16	1.78 \pm 0.11*	32 \pm 5#
MOR+CBD10	5	2.65 \pm 0.18	1.85 \pm 0.06*	30 \pm 6#

*Diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,001$) frente a MAC_{SEVi} .

Diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$) frente a MOR+CBD5.



*Estadísticamente significativa ($p < 0,05$) respecto 5 MOR+CBD5

Figura 14: Reducción de la concentración alveolar mínima (MAC) de sevoflurano producida por la administración intraperitoneal de 5mg/kg de morfina con solución salina (MOR+salino), vehículo (MOR+vehículo) y diferentes dosis de cannabidiol (MOR+CBD). Los datos están expresados como media \pm SD.

Se realizó un análisis de regresión cuadrático para determinar el coeficiente de correlación entre los porcentajes de reducción de la MAC de sevoflurano a las diferentes dosis de CBD combinado con morfina y la parábola extraída del análisis de los datos. La ecuación de regresión obtenida fue $Y = 0.9163X^2 - 7.3093X + 34.464$, y el valor de R^2 para esta curva fue de 0.8366 (Figura 15).

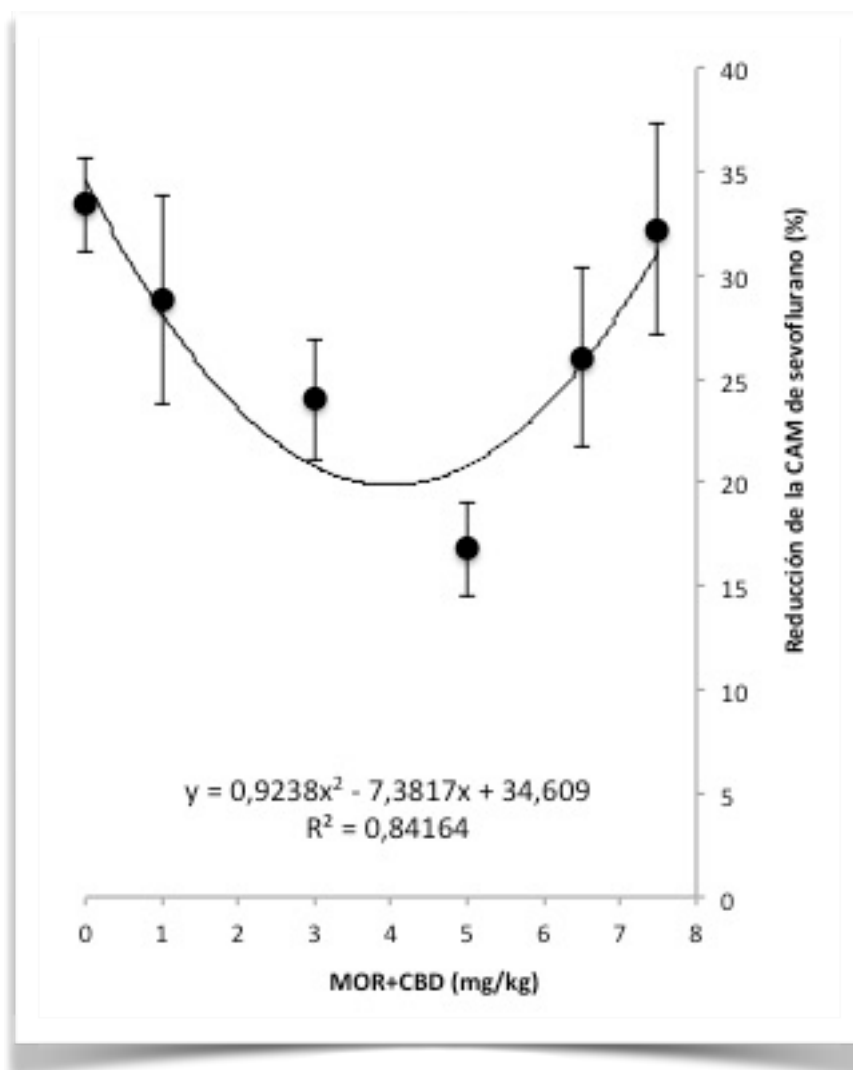


Figura 15: Representación gráfica de la ecuación de regresión cuadrática. Los datos están expresados como media \pm SD.

5.2 Parámetros fisiológicos

En los momentos de determinación de la MAC no hubo diferencias estadísticamente significativas en los valores de presión arterial, frecuencia cardiaca, frecuencia respiratoria, pH, PaO₂, PaCO₂ y temperatura entre los diferentes grupos estudiados. (Tablas 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17,18, 19).

Tabla 11: Valores medios \pm desviación estándar (SD) de la PAS (mmHg) en el momento de determinación de la MAC_{SEVi} y la MAC_{SEVf}

GRUPO	N	MAC _{SEVi} \pm SD	MAC _{SEVf} \pm SD
VEHÍCULO	4	132 \pm 11	127 \pm 37
CBD1	4	135 \pm 4	144 \pm 15
CBD3	4	130 \pm 6	139 \pm 5
CBD5	4	146 \pm 10	126 \pm 10
CBD6,5	4	146 \pm 28	154 \pm 14
CBD7,5	4	147 \pm 19	139 \pm 25
CBD10	4	142 \pm 8	146 \pm 13
MOR+SALINO	5	143 \pm 22	123 \pm 19
MOR+VEHÍCULO	5	127 \pm 25	130 \pm 24
MOR+CBD1	5	123 \pm 12	131 \pm 4
MOR+CBD3	5	138 \pm 5	134 \pm 15
MOR+CBD5	5	126 \pm 9	133 \pm 19
MOR+CBD6,5	5	113 \pm 16	112 \pm 15
MOR+CBD7,5	5	131 \pm 8	120 \pm 21
MOR+CBD10	5	129 \pm 17	127 \pm 19

Tabla 12: Valores medios \pm desviación estándar (SD) de la PAD (mmHg) en el momento de determinación de la MAC_{SEVi} y la MAC_{SEVf}

GRUPO	N	MAC _{SEVi} \pm SD	MAC _{SEVf} \pm SD
VEHÍCULO	4	109 \pm 6	98 \pm 34
CBD1	4	104 \pm 6	119 \pm 25
CBD3	4	108 \pm 3	110 \pm 1
CBD5	4	116 \pm 0	102 \pm 8
CBD6,5	4	113 \pm 15	125 \pm 13
CBD7,5	4	123 \pm 22	118 \pm 26
CBD10	4	107 \pm 22	107 \pm 22
MOR+ SALINO	5	110 \pm 18	89 \pm 25
MOR+VEHÍCULO	5	108 \pm 22	115 \pm 24
MOR+CBD1	5	101 \pm 15	112 \pm 7
MOR+CBD3	5	100 \pm 2	98 \pm 11
MOR+CBD5	5	102 \pm 11	103 \pm 17
MOR+CBD6,5	5	88 \pm 20	85 \pm 10
MOR+CBD7,5	5	109 \pm 4	93 \pm 19
MOR+CBD10	5	102 \pm 12	98 \pm 17

Tabla 13: Valores medios \pm desviación estándar (SD) de la PAM (mmHg) en el momento de determinación de la MAC_{SEVi} y la MAC_{SEVf}

GRUPO	N	MAC _{SEVi} \pm SD	MAC _{SEVf} \pm SD
VEHÍCULO	4	122 \pm 8	112 \pm 36
CBD1	4	118 \pm 4	131 \pm 15
CBD3	4	119 \pm 3	125 \pm 12
CBD5	4	121 \pm 3	125 \pm 5
CBD6,5	4	120 \pm 7	130 \pm 8
CBD7,5	4	127 \pm 7	127 \pm 19
CBD10	4	123 \pm 12	125 \pm 14
MOR+SALINO	5	124 \pm 19	100 \pm 20
MOR+VEHÍCULO	5	121 \pm 21	118 \pm 15
MOR+CBD1	5	110 \pm 10	120 \pm 8
MOR+CBD3	5	117 \pm 3	109 \pm 12
MOR+CBD5	5	112 \pm 9	115 \pm 16
MOR+CBD6,5	5	115 \pm 6	103 \pm 9
MOR+CBD7,5	5	119 \pm 5	105 \pm 19
MOR+CBD10	5	112 \pm 12	103 \pm 22

Tabla 14: Valores medios \pm desviación estándar (SD) de la FC (ppm) en el momento de determinación de la MAC_{SEVi} y la MAC_{SEVf}

GRUPO	N	$MAC_{SEVi} \pm SD$	$MAC_{SEVf} \pm SD$
VEHÍCULO	4	423 \pm 42	387 \pm 61
CBD1	4	424 \pm 15	446 \pm 5
CBD3	4	443 \pm 63	442 \pm 31
CBD5	4	457 \pm 10	459 \pm 19
CBD6,5	4	409 \pm 5	454 \pm 6
CBD7,5	4	393 \pm 26	439 \pm 15
CBD10	4	409 \pm 26	401 \pm 16
MOR+SALINO	5	435 \pm 75	391 \pm 54
MOR+VEHÍCULO	5	430 \pm 36	427 \pm 50
MOR+CBD1	5	409 \pm 38	390 \pm 56
MOR+CBD3	5	429 \pm 34	417 \pm 44
MOR+CBD5	5	406 \pm 25	378 \pm 41
MOR+CBD6,5	5	423 \pm 33	409 \pm 45
MOR+CBD7,5	5	408 \pm 59	392 \pm 73
MOR+CBD10	5	453 \pm 16	420 \pm 32

Tabla 15: Valores medios \pm desviación estándar (SD) de la FR (rpm) en el momento de determinación de la MAC_{SEVi} y la MAC_{SEVf}

GRUPO	N	$MAC_{SEVi} \pm SD$	$MAC_{SEVf} \pm SD$
VEHÍCULO	4	68 \pm 7	63 \pm 12
CBD1	4	65 \pm 5	63 \pm 9
CBD3	4	66 \pm 3	64 \pm 5
CBD5	4	61 \pm 6	72 \pm 8
CBD6,5	4	65 \pm 5	68 \pm 9
CBD7,5	4	66 \pm 6	65 \pm 11
CBD10	4	66 \pm 8	57 \pm 7
MOR+SALINO	5	66 \pm 12	59 \pm 9
MOR+VEHÍCULO	5	61 \pm 10	62 \pm 9
MOR+CBD1	5	70 \pm 11	61 \pm 10
MOR+CBD3	5	66 \pm 5	64 \pm 2
MOR+CBD5	5	61 \pm 6	67 \pm 4
MOR+CBD6,5	5	65 \pm 8	63 \pm 10
MOR+CBD7,5	5	66 \pm 6	65 \pm 11
MOR+CBD10	5	71 \pm 9	67 \pm 8

Tabla 16: Valores medios \pm desviación estándar (SD) del pH en el momento de determinación de la MAC_{SEVi} y la MAC_{SEVf}

GRUPO	N	$MAC_{SEVi} \pm SD$	$MAC_{SEVf} \pm SD$
VEHÍCULO	4	7,36 \pm 0,02	7,40 \pm 0,05
CBD1	4	7.42 \pm 0.02	7.47 \pm 0.06
CBD3	4	7.45 \pm 0.02	7.43 \pm 0.01
CBD5	4	7.47 \pm 0.02	7.48 \pm 0.01
CBD6,5	4	7.39 \pm 0.06	7.47 \pm 0.03
CBD7,5	4	7.46 \pm 0.05	7.42 \pm 0.01
CBD10	4	7.41 \pm 0.13	7.40 \pm 0.04
MOR+SALINO	5	7.44 \pm 0.06	7.36 \pm 0.03
MOR+VEHÍCULO	5	7,35 \pm 0,04	7,35 \pm 0,06
MOR+CBD1	5	7.46 \pm 0.04	7.34 \pm 0.03
MOR+CBD3	5	7.44 \pm 0.08	7.35 \pm 0.09
MOR+CBD5	5	7.41 \pm 0.06	7.35 \pm 0.05
MOR+CBD6,5	5	7.46 \pm 0.03	7.40 \pm 0.06
MOR+CBD7,5	5	7.46 \pm 0.03	7.34 \pm 0.02
MOR+CBD10	5	7.47 \pm 0.02	7.33 \pm 0.06

Tabla 17: Valores medios \pm desviación estándar (SD) de la PaO₂ (mmHg) en el momento de determinación de la MAC_{SEVi} y la MAC_{SEVf}

GRUPO	N	MAC_{SEVi} \pm SD	MAC_{SEVf} \pm SD
VEHICULO	4	195 \pm 18	288 \pm 47
CBD1	4	184 \pm 13	202 \pm 11
CBD3	4	169 \pm 10	208 \pm 12
CBD5	4	295 \pm 53	328 \pm 62
CBD6,5	4	184 \pm 13	224 \pm 37
CBD7,5	4	187 \pm 12	286 \pm 24
CBD10	4	194 \pm 30	258 \pm 37
MOR+SALINO	5	212 \pm 86	263 \pm 98
MOR+VEHICULO	5	209 \pm 79	226 \pm 76
MOR+CBD1	5	221 \pm 69	212 \pm 66
MOR+CBD3	5	172 \pm 11	213 \pm 25
MOR+CBD5	5	199 \pm 21	212 \pm 44
MOR+CBD6,5	5	165 \pm 38	198 \pm 19
MOR+CBD7,5	5	224 \pm 44	246 \pm 72
MOR+CBD10	5	201 \pm 54	266 \pm 86

Tabla 18: Valores medios \pm desviación estándar (SD) de la PaCO₂ (mmHg) en el momento de determinación de la MAC_{SEVi} y la MAC_{SEVf}

GRUPO	N	MAC_{SEVi} \pm SD	MAC_{SEVf} \pm SD
VEHÍCULO	4	36 \pm 9	34 \pm 4
CBD1	4	38 \pm 3	32 \pm 6
CBD3	4	35 \pm 2	34 \pm 2
CBD5	4	34 \pm 6	32 \pm 3
CBD6,5	4	38 \pm 9	33 \pm 6
CBD7,5	4	35 \pm 4	36 \pm 3
CBD10	4	34 \pm 8	41 \pm 9
MOR+SALINO	5	34 \pm 7	42 \pm 6
MOR+VEHÍCULO	5	38 \pm 9	35 \pm 4
MOR+CBD1	5	33 \pm 7	45 \pm 7
MOR+CBD3	5	34 \pm 9	43 \pm 9
MOR+CBD5	5	35 \pm 8	40 \pm 9
MOR+CBD6,5	5	33 \pm 5	44 \pm 9
MOR+CBD7,5	5	34 \pm 9	43 \pm 9
MOR+CBD10	5	38 \pm 4	41 \pm 4

Tabla 19: Valores medios \pm desviación estándar (SD) de la T^a (°C) en el momento de determinación de la MAC_{SEVi} y la MAC_{SEVf}

GRUPO	N	MAC_{SEVi} \pm SD	MAC_{SEVf} \pm SD
VEHÍCULO	4	38.5 \pm 0.7	38.7 \pm 0.3
CBD1	4	37.7 \pm 0.4	37.8 \pm 0.6
CBD3	4	37.8 \pm 0.6	38.0 \pm 0.3
CBD5	4	38.0 \pm 0.3	38.1 \pm 0.1
CBD6,5	4	37.2 \pm 0.3	37.7 \pm 0.9
CBD7,5	4	38.8 \pm 0.2	38.6 \pm 0.6
CBD10	4	39.0 \pm 0.4	38.5 \pm 0.4
MOR+SALINO	5	38.4 \pm 0.7	38.4 \pm 0.3
MOR+VEHÍCULO	5	38.6 \pm 0.7	38.6 \pm 0.5
MOR+CBD1	5	38.8 \pm 0.5	39.0 \pm 0.2
MOR+CBD3	5	38.1 \pm 0.6	38.3 \pm 0.6
MOR+CBD5	5	38.6 \pm 0.5	38.8 \pm 0.7
MOR+CBD6,5	5	38.1 \pm 0.3	38.0 \pm 0.8
MOR+CBD7,5	5	38.3 \pm 0.6	39.0 \pm 0.3
MOR+CBD10	5	39.0 \pm 0.7	39.2 \pm 0.4

A pesar de no ser estadísticamente significativa ($p > 0.064$), se observa una caída en la frecuencia cardiaca (Tabla 20, Figura 16) y la presión arterial (Tabla 21, Figura 17) tras la administración de morfina sola, con vehículo o con CBD; sin embargo, esta caída no se observa tras la administración de CBD solo.

La máxima caída en la frecuencia cardiaca y la presión arterial se produce a los 30 minutos de la administración de la morfina, y posteriormente empiezan a recuperarse progresivamente. En el caso de los animales que recibieron ambas drogas (MOR+CBD1, MOR+CBD3, MOR+CBD5, MOR+CBD6,5, MOR+CBD7,5 y MOR+CBD10) la caída de presión arterial es variable en función de la dosis de CBD.

En el caso de la frecuencia respiratoria, se observa una caída transitoria de la misma en los animales que recibieron morfina, ya sea administrada sola, con vehículo o con diferentes dosis de CBD; sin embargo, en ningún caso se produjo apnea.

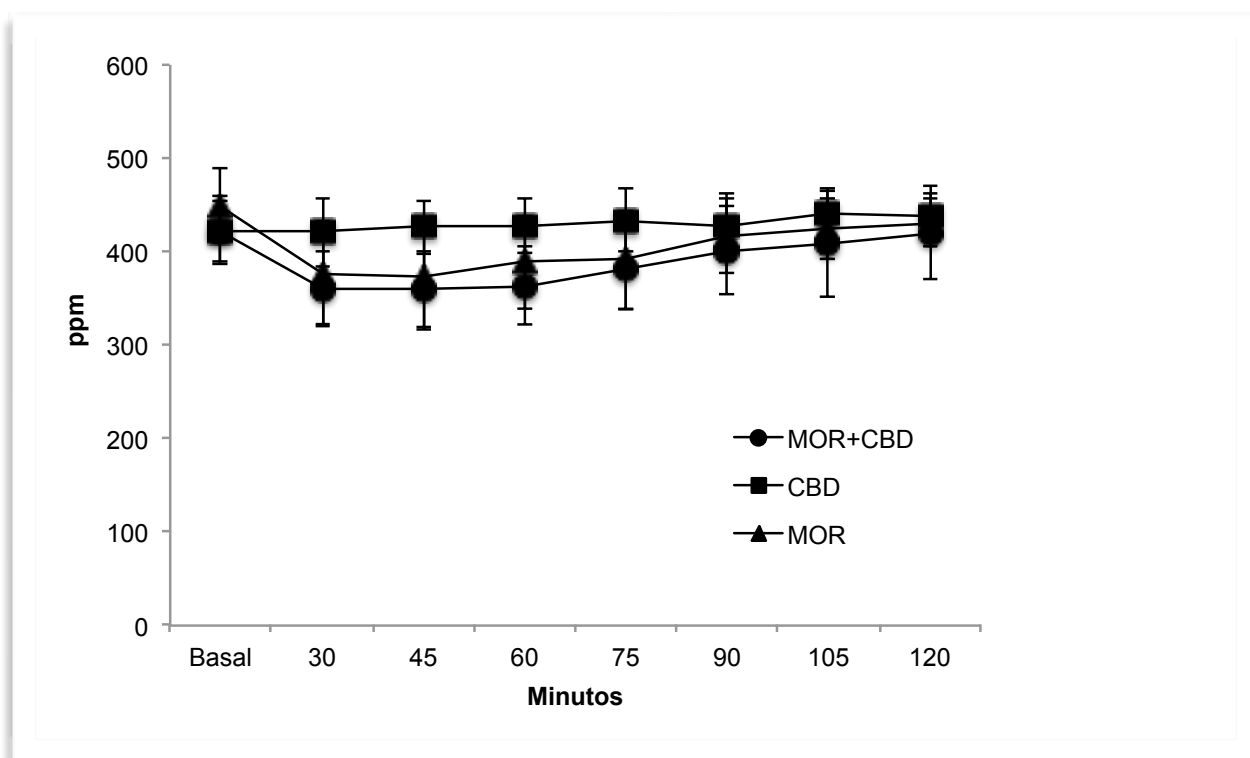


Figura 16: Representación gráfica de la FC (ppm) en el momento de la determinación de la MAC_{SEV} antes de la inyección de los fármacos (Tiempo 0) y después de la administración intraperitoneal de morfina (MOR) y cannabidiol solo (CBD) o en combinación con morfina (MOR+CBD) en ratas Wistar Han. Los datos están expresados como media \pm SD.

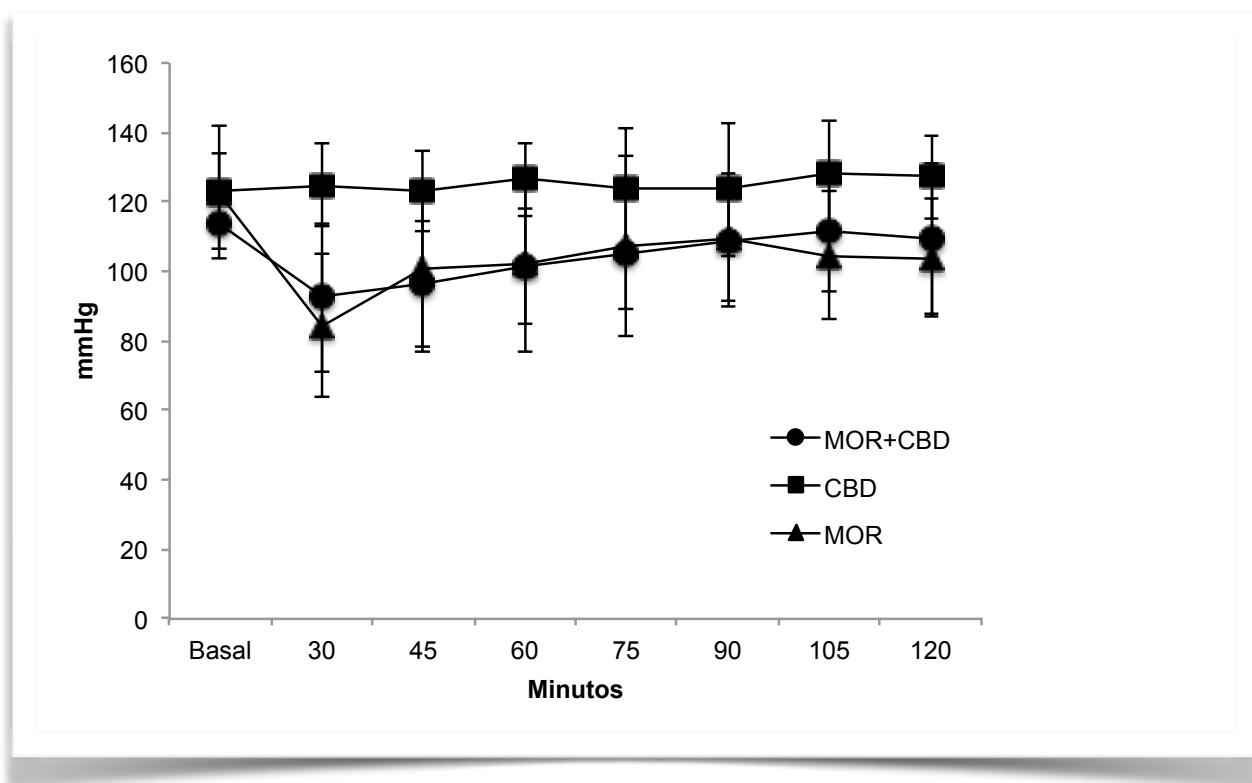


Figura 17: Representación gráfica de la PAM (mmHg) en el momento de la determinación de la MAC_{SEV} antes de la inyección de los fármacos (Tiempo 0) y después de la administración intraperitoneal de morfina (MOR) y cannabidiol solo (CBD) o en combinación con morfina (MOR+CBD) en ratas Wistar Han. Los datos están expresados como media \pm SD.

Tabla 20: Valores medios \pm desviación estándar de la FC (ppm) en el momento de la determinación de la MAC_{SEV} antes de la inyección de los fármacos (Tiempo 0) y después de la administración intraperitoneal de vehículo, morfina con salino (MOR+saline), morfina con vehículo(MOR+vehicle) y cannabidiol solo (CBD) o en combinación con morfina (MOR+CBD) en ratas Wistar Han.

GRUPO	0	30	45	60	75	90	105	120
VEHICULO	423 \pm 42	427 \pm 31	420 \pm 26	423 \pm 23	410 \pm 50	386 \pm 61	427 \pm 29	428 \pm 35
CBD1	424 \pm 15	413 \pm 8	416 \pm 16	416 \pm 16	431 \pm 5	446 \pm 5	446 \pm 5	452 \pm 8
CBD3	443 \pm 63	409 \pm 60	413 \pm 63	424 \pm 57	446 \pm 37	442 \pm 31	442 \pm 31	435 \pm 21
CBD5	457 \pm 10	465 \pm 21	465 \pm 21	457 \pm 31	472 \pm 31	459 \pm 19	472 \pm 31	461 \pm 16
CBD6,5	409 \pm 5	431 \pm 5	443 \pm 7	454 \pm 6	450 \pm 10	454 \pm 6	450 \pm 8	450 \pm 9
CBD7,5	393 \pm 26	420 \pm 8	424 \pm 15	427 \pm 10	431 \pm 5	439 \pm 15	435 \pm 21	432 \pm 17
CBD10	409 \pm 26	390 \pm 42	405 \pm 21	397 \pm 31	401 \pm 26	401 \pm 16	409 \pm 26	412 \pm 31
MOR+SALINO	435 \pm 75	334 \pm 45	347 \pm 40	358 \pm 48	363 \pm 57	391 \pm 54	396 \pm 55	418 \pm 46
MOR+VEHICULO	430 \pm 35	410 \pm 69	400 \pm 70	413 \pm 46	410 \pm 52	427 \pm 50	433 \pm 31	423 \pm 31
MOR+CBD1	409 \pm 38	357 \pm 37	358 \pm 48	365 \pm 45	376 \pm 60	390 \pm 56	399 \pm 56	420 \pm 68
MOR+CBD3	429 \pm 34	369 \pm 39	364 \pm 59	371 \pm 49	396 \pm 41	417 \pm 44	420 \pm 63	430 \pm 36
MOR+CBD5	406 \pm 25	345 \pm 8	343 \pm 9	343 \pm 35	359 \pm 36	378 \pm 41	381 \pm 48	390 \pm 43
MOR+CBD6,5	423 \pm 33	364 \pm 32	357 \pm 30	360 \pm 40	382 \pm 42	409 \pm 45	437 \pm 35	453 \pm 40
MOR+CBD7,5	408 \pm 59	334 \pm 54	342 \pm 53	360 \pm 66	361 \pm 56	392 \pm 73	384 \pm 73	393 \pm 82
MOR+CBD10	453 \pm 16	381 \pm 45	382 \pm 43	374 \pm 36	400 \pm 35	420 \pm 32	433 \pm 23	434 \pm 17

Tabla 21: Valores medios \pm desviación estándar de la PAM (mmHg) en el momento de la determinación de la MAC_{SEV} antes de la inyección de los fármacos (Tiempo 0) y después de la administración intraperitoneal de vehículo, morfina con salino (MOR+saline), morfina con vehículo(MOR+vehicle) y cannabidiol solo (CBD) o en combinación con morfina (MOR+CBD) en ratas Wistar Han.

GRUPO	0	30	45	60	75	90	105	120
VEHICULO	122 \pm 8	136 \pm 4	129 \pm 8	134 \pm 4	128 \pm 25	122 \pm 26	137 \pm 6	128 \pm 15
CBD1	118 \pm 4	125 \pm 9	125 \pm 12	129 \pm 12	130 \pm 12	131 \pm 15	131 \pm 14	132 \pm 13
CBD3	119 \pm 3	119 \pm 5	118 \pm 2	120 \pm 4	122 \pm 2	125 \pm 2	125 \pm 2	123 \pm 2
CBD5	121 \pm 3	124 \pm 5	124 \pm 4	126 \pm 1	131 \pm 2	125 \pm 5	129 \pm 9	126 \pm 5
CBD6,5	120 \pm 7	122 \pm 17	127 \pm 21	128 \pm 14	128 \pm 9	130 \pm 8	131 \pm 7	125 \pm 8
CBD7,5	127 \pm 7	132 \pm 4	129 \pm 5	131 \pm 5	126 \pm 15	127 \pm 19	124 \pm 22	130 \pm 5
CBD10	123 \pm 12	117 \pm 16	121 \pm 19	120 \pm 18	121 \pm 17	125 \pm 14	127 \pm 17	124 \pm 18
MOR+SALINO	124 \pm 19	76 \pm 11	85 \pm 19	91 \pm 26	94 \pm 25	100 \pm 20	104 \pm 20	109 \pm 13
MOR+VEHICULO	121 \pm 21	98 \pm 23	108 \pm 22	113 \pm 21	121 \pm 21	118 \pm 15	105 \pm 19	109 \pm 14
MOR+CBD1	110 \pm 10	94 \pm 18	102 \pm 14	109 \pm 10	114 \pm 7	120 \pm 8	121 \pm 5	122 \pm 23
MOR+CBD3	117 \pm 3	86 \pm 23	93 \pm 28	95 \pm 25	100 \pm 23	109 \pm 12	112 \pm 10	113 \pm 7
MOR+CBD5	112 \pm 9	92 \pm 19	95 \pm 17	107 \pm 12	114 \pm 8	115 \pm 16	117 \pm 14	120 \pm 9
MOR+CBD6,5	115 \pm 6	84 \pm 11	87 \pm 9	94 \pm 7	96 \pm 5	103 \pm 9	113 \pm 4	114 \pm 7
MOR+CBD7,5	119 \pm 5	93 \pm 30	100 \pm 9	100 \pm 10	101 \pm 10	105 \pm 19	105 \pm 17	109 \pm 16
MOR+CBD10	112 \pm 12	99 \pm 29	97 \pm 22	100 \pm 24	105 \pm 26	103 \pm 22	104 \pm 26	105 \pm 17

VI. Discusión

6.1 Limitaciones de la metodología

El método de determinación de la CAM proporciona datos fiables y cuantificables relacionados con la potencia anestésica; sin embargo, este valor puede variar hasta un 20% dentro de una especie determinada, aunque generalmente varía menos de un 10% en un mismo animal (Quasha y col, 1980). Se han descrito diferencias genéticas frente a la sensibilidad de la morfina en diferentes cepas de ratas (Hoffmann y col, 1988), pero además estas diferencias entre cepas se han demostrado en diferentes estudios de los efectos de la morfina sobre la CAM de sevoflurano, isoflurano o halotano en ratas Wistar Han frente a ratas Sprague-Dawley (Lake y col, 1985; Criado y col, 2000). También se ha visto que los requerimientos anestésicos varían con la edad (Mapleson, 1996), aunque la MAC no parece variar entre sexos (Quasha y col, 1980; Eger y col, 2003). Por lo tanto, con el fin de evitar estas discrepancias, en nuestro estudio únicamente utilizamos ratas Wistar Han, de la misma edad y rango de peso. La diferencia de peso en la cepa Wistar Han entre ratas macho y hembra de tres meses de edad es de más de 100 gramos, se decidió realizar el estudio solo con ratas macho de peso similar y evitar así las variaciones en la CAM producidas por la edad.

A pesar de determinar un tamaño muestral de cinco animales por grupo adecuado para detectar un porcentaje de reducción $\geq 15\%$ con una potencia del 90% en un modelo analítico de dos colas, en el caso de los grupos de CBD administrado solo, se utilizaron cuatro animales por grupo pues durante el estudio no se apreciaron cambios en la reducción de la CAM en estos grupos. El estudio estadístico posterior no reveló cambios estadísticamente significativos en estos grupos con una $p > 0,188$ (rango 0,188-0,262). Después del estudio, se repitió el tamaño de muestra con los datos obtenidos, y así, aceptando un riesgo alfa de 0,05 y un riesgo beta de 0,05 en un modelo de dos colas, se requerirían 4 sujetos para reconocer como estadísticamente significativo un porcentaje de reducción mayor o igual al 17%, suponiendo una desviación estándar de 9. De esta manera además se reduce el número de animales empleados de acuerdo con la normativa europea y nacional sobre el uso de animales de experimentación.

La morfina empleada fue un preparado comercial (ampollas de 10mg/mL conteniendo 1mL). Sin embargo, el CBD empleado era suministrado por el laboratorio en forma de polvo, por lo que para poder ser inyectado había que realizar una suspensión del mismo en etanol:solutol:suero salino en proporción 2:1:17. Basándonos en los resultados observados en los grupos vehículo y MOR+vehículo, concluimos que el etanol y el solutol de la formulación del compuesto no afecta al proceso de determinación de la CAM.

La CAM del etanol en ratas se ha determinado tanto en condiciones de normotermia (0,12%) como en hipotermia (0,06%). Sin embargo, para lograr alcanzar estas concentraciones, fue necesaria la administración intraperitoneal de 3,5-4,5 g/kg de etanol (Won y col, 2006).

Otros estudios han demostrado que entre 0,15 y 0,30 mL de etanol intraperitoneal no modifica la CAM de ciclopropano en ratas (Vitez y col, 1973). Mientras que dosis superiores, de entre 0,5 y 1,5 g/kg de etanol administrado por vía intraperitoneal reducen la CAM del sevoflurano en ratas de forma dosis dependiente, y este efecto también se produce a la concentración de acetato sanguíneo resultante del metabolismo del etanol en el hígado (Carmichael y col, 1991).

Sin embargo, las dosis de etanol utilizadas en nuestro trabajo oscilaron entre 0,006mL o 0,015 g/kg para la menor dosis de CBD administrada, correspondiente al grupo CBD1 y 0,06 mL o 0,15 g/kg para la mayor dosis de CBD administrada, correspondiente al grupo CBD10, lo cual supone una concentración muy inferior a las empleadas en los estudios citados previamente.

Por otro lado, ciertos analizadores de gases pueden artefactar los valores de los agentes inhalatorios al detectar valores por encima de 0,1% de etanol. Sin embargo, no parece ser este el caso de nuestro estudio, pues las concentraciones de etanol presumiblemente fueron inferiores al 0,1%.

En cualquier caso, en el grupo vehículo se calculó, para cada animal, el volumen de vehículo que le correspondería si recibiese la concentración de CBD más alta administrada; es decir, a la concentración de 10mg/kg. Los resultados de este grupo muestran que el etanol:solutol no modifica la CAM del sevoflurano.

Finalmente, al tratarse de un estudio doble ciego, en todos los casos tras calcular el volumen de inyección necesario en función del grupo al que perteneciese el animal este se diluyó en suero salino fisiológico hasta un volumen final de 1mL, con el fin de que el investigador encargado de administrarlo y evaluar la CAM no tuviera indicios de que grupo se trataba.

En cuanto a la dosis y vía de administración del CBD, la selección de las mismas se realizaron en base a trabajos previos sobre el efecto antinociceptivo del cannabidiol administrado por vía intraperitoneal en ratas (Gonçalves y col. 2014; Genaro y col. 2017).

Se ha estudiado que en esta especie, la concentración plasmática máxima de CBD sobre una base de solutol, alcanza su punto máximo a los 30 minutos después de su administración vía intraperitoneal. Los niveles máximos de CBD en plasma y cerebro son relativamente estables durante 6 horas (Deiana y col. 2012).

En cuanto a la morfina, se sabe que después de su administración intraperitoneal en ratas, la concentración plasmática máxima se alcanza después de 9 min (Hasselström y col. 1996). Además, en relación a su efecto sobre la CAM del sevoflurano, se ha establecido un tiempo máximo de reducción de la CAM de 64 min después de la administración de 5mg/kg de morfina intraperitoneal con una duración de la reducción de 180 min (Abreu y col. 2012).

En el caso del sevoflurano, como se ha comentado anteriormente, su mecanismo de acción en el SNC, genera aun hoy, mucha controversia, y aunque se ha podido esclarecer cómo y donde actúan los agentes inhalatorios, no se ha podido describir con exactitud que mecanismos moleculares conducen al efecto anestésico de estos fármacos.

A principios del siglo XX, Overton y Meyer realizaron, de manera independiente, estudios en los que correlacionaban la potencia anestésica con la solubilidad en aceite de oliva, sugiriendo la importancia de una fase lipídica en los mecanismos de acción de los agentes anestésicos.

La regla de Overton y Meyer se cumplen con todos los agentes inhalatorios convencionales y muchos de los experimentales; sin embargo hay varias excepciones, como los alcoholes, que no siguen este patrón. Por ejemplo, el etanol tiene un CP aceite/ gas de 108 (Fang y col, 1997) y el isoflurano de 98 (Cromwell y col, 1971), por lo que según esta teoría deberían tener potencias anestésicas similares, sin embargo la CAM del etanol en ratas es de 0,1% (Fang y col, 19977), mientras que la CAM del isoflurano en ratas es 1,5% (White y col, 1974).

Otra excepción a esta regla son los agentes no inmovilizantes, que tienen un CP aceite/gas que sugiere una buena capacidad anestésica y, sin embargo, no poseen dicho efecto ni solos ni en combinación (Koblin y col, 1994).

Estas excepciones a la teoría de Meyer y Overton hizo que se cuestionase la idea de que los sitios de unión de los anestésicos inhalatorios eran de naturaleza lipídica. Así, en 1984, un estudio publicado por Franks y Lieb, demostró que una gran variedad de compuestos inhalatorios, incluidos los convencionales, se unen de manera competitiva a receptores específicos de naturaleza proteica. A partir de este momento todas las investigaciones fueron encaminadas a identificar los canales iónicos que constituyen los sitios de acción de los anestésicos inhalatorios.

Pese a que varios estudios in vitro han descrito un gran número de receptores o canales iónicos a los que los anestésicos inhalatorios podrían unirse, al reproducir in vivo estos estudios se ha puesto de manifiesto que no todos los receptores o canales descritos son en realidad los responsables de las acciones anestésicas de los agentes inhalatorios (Sonner y col, 2003).

Aunque el efecto amnésico y la pérdida de consciencia producida por los anestésicos inhalatorios se produce por su acción en el cerebro, se ha visto que la inmovilidad del paciente frente al estímulo doloroso se produce por su acción sobre la médula espinal, y no en los centros supraespinales (Antognini y Schwartz, 1993; Rampil y col, 1993; Antognini y Carstens, 1998).

De hecho, se llegó a observar que la actividad eléctrica del encéfalo y la inmovilidad durante el estímulo nociceptivo no están correlacionadas. Este hecho llevo a determinar que tras la aplicación de un estímulo nociceptivo, las respuestas motoras que se generan no están controladas por la actividad eléctrica cortical (Rampil y Laster, 1992).

Otro hecho que confirma esta teoría, es que, en ratas, se ha visto que ni la descerebración a nivel precolicular ni la sección completa de la médula espinal torácica superior afecta a la capacidad del isoflurano para producir inmovilidad (Rampil y col, 1993; Rampil, 1994).

Varios estudios electrofisiológicos in vivo han sugerido que los anestésicos inhalatorios pueden suprimir tanto la actividad sensorial como motora a nivel de la médula espinal (Rampil y King, 1996; Jinks y col, 2003), siendo la depresión de las motoneuronas la responsable de la inmovilidad ante un estímulo doloroso o quirúrgico, tanto en las ratas como en el hombre (Rampil y King, 1996; Zhou y col, 1998). Sin embargo, la localización exacta en la médula espinal donde los anestésicos inhalatorios actúan para producir esta inmovilidad no se conoce en su totalidad.

El hecho de que, por ejemplo, al estimular, la cola de una rata anestesiada con un agente inhalatorio se produzcan movimientos de las extremidades superiores e inferiores (Sonner y col, 2003) ha llevado a pensar que los mecanismos de acción son de una gran diversidad y complejidad.

6.2 Determinación de la CAM

El método que se utilizó para la determinación de la CAM de sevoflurano fue el que describieron Merkel y Eger (1963), y posteriormente Quasha y col (1980). Para la determinación de la CAM de cualquier agente inhalatorio, en cualquier especie animal se hace necesario aplicar un estímulo doloroso.

Hay diversos tipos de estímulos dolorosos considerados supramáximos, y por lo tanto, validados para determinar la CAM. En el caso de las ratas, el que más frecuentemente se utiliza es el clampaje de la cola; en los perros, se suele emplear el clampaje del pliegue interdigital; y en el caballo la aplicación de una corriente eléctrica subcutánea de 50 Voltios a 50 ciclos/seg durante 10 mseg (Quasha y col, 1980).

De la misma manera que se han validado estímulos nociceptivos según la especie animal, también se han estandarizado criterios para considerar una respuesta positiva o negativa frente al estímulo aplicado. Así se asume que la respuesta es positiva cuando el animal realiza un movimiento voluntario y brusco de las extremidades, la cabeza o el cuerpo. Por el contrario, si el animal no se mueve, o simplemente traga, mastica, tose o hace una mueca se considera que la respuesta es negativa (Quasha y col, 1980).

La concentración teleespiratoria de sevoflurano se mantenía constante durante 15 minutos antes de aplicar el estímulo nociceptivo, pues es el tiempo que se ha estimado que se tarda en alcanzar el 95% del equilibrio entre las presiones parciales del agente en el gas alveolar o teleespiratorio, la sangre arterial y el SNC.

Además, se ha considerado que durante la determinación de la CAM, para conseguir una relación entre la fracción alveolar y la fracción inspirada de anestésico superior a un 0,95, la reducción o el incremento de la concentración teleespiratoria del agente inhalatorio deberá ser de un 10% o un 20%, dependiendo de la precisión que se quiera obtener (Eger y col, 1965).

En el presente estudio el incremento y la reducción de la concentración de sevoflurano teleespiratorio, entre dos determinaciones consecutivas, fue de un 0,1% - 0,2%, que son las mínimas variaciones que posibilitaba el analizador de gases utilizado, consiguiéndose una relación entre la fracción alveolar y la fracción inspirada de 0,95.

6.3 Determinación de los parámetros fisiológicos

Puesto que hay ciertos parámetros fisiológicos que pueden influir en la CAM cuando se alteran, es fundamental que en todos los casos se mantenga una presión arterial media > 50 mmHg, una $\text{PaO}_2 > 40$ mmHg, una PaCO_2 entre 15 - 95 mmHg y una normotermia. En el caso de la hipertermia se produce un aumento de la CAM, mientras que la hipotermia, la hipotensión ($\text{PAM} < 50$ mmHg), la hipoxia ($\text{PaO}_2 < 40$ mmHg) y la hipercapnia ($\text{PaCO}_2 > 95$ mmHg) producen una disminución de la CAM (Quasha y col, 1980; Cullen, 1986; Steffey, 1996). En el presente estudio todos estos parámetros eran monitorizados de forma continua para asegurar el mantenimiento de los valores en el rango fisiológico de la especie.

Es bien conocido que la depresión respiratoria y la hipotensión son efectos adversos comúnmente producidos por los opioides, de hecho, algunos autores han descrito la aparición de apnea y un descenso transitorio de la presión arterial del 40-45% tras la administración intravenosa de morfina en ratas (Criado y col. 2000).

En nuestro estudio, también observamos una disminución transitoria en la frecuencia respiratoria y una disminución similar en la presión arterial; sin embargo estos efectos se produjeron después de la administración intraperitoneal de morfina; mientras que en otros estudios, estos efectos no se producen por esta vía de administración a dosis similares (Abreu y col. 2012).

Si bien la vía intraperitoneal se usa ampliamente en roedores, es relativamente frecuente una incorrecta administración del fármaco por la inyección inadvertida en el intestino, la grasa abdominal y los tejidos subcutáneos (Gaines Das y North, 2007).

Además, sumado a lo anterior, en el caso de la rata, parece que se puede producir una reducción de la efectividad intraperitoneal de la morfina debida a un “*efecto de primer paso*”. De hecho, se ha estimado que un tercio del *efecto de primer paso* global de la morfina se debe al metabolismo hepático (Iwamoto y Klaassen, 1977).

Este *efecto de primer paso* podría explicar la falta de efectos cardiorrespiratorios observados en el trabajo de Abreu y col. (2012) después de la administración intraperitoneal de morfina; sin embargo, no explicaría la presencia de estos efectos en nuestro trabajo.

Esa disparidad en los resultados podría deberse a la diferente metodología utilizada, pues en el estudio de Abreu y col. (2012), una vez administrada la morfina, redujeron la concentración de sevoflurano hasta el valor que esperaban alcanzar en función de la reducción de la CAM del sevoflurano que produce la morfina en otras especies (Abreu y col, 2012). Sin embargo, en nuestro estudio, mantuvimos la concentración de sevoflurano en un valor próximo al de la CAM_{SEVI} durante los 30 minutos posteriores a la administración de las drogas.

Quasha y col. (1980) describieron la hipotensión como un factor alterante de la CAM, además un estudio realizado en perros sugiere que la hipotensión reduce los requerimientos anestésicos, y que esta reducción depende en parte de los rápido que se produzca esta hipotensión (Tantfuji y Eger, 1976).

Sin embargo, otros autores no han podido demostrar un descenso en los requerimientos de ciclopropano en humanos tras generar una hipotensión mediante trimetaphan (Bellville y Artusio, 1956).

La principal diferencia entre estos dos estudios es que en el primero, descienden a unas presiones arteriales medias de 20-30mmHg, mientras que en el segundo trabajo, al igual que en nuestro estudio, la presión arterial media no desciende por debajo de 45mmHg. Además en nuestro estudio el descenso en la presión arterial se produce progresivamente durante media hora, mientras que en el estudio de Tanifuji y Eger la hipotensión se produjo rápidamente. En base a estos datos concluimos que la hipotensión producida por la morfina no está alterando el valor de CAM obtenido.

Este efecto hipotensor de la morfina no se observó en el caso de la administración del CBD a diferentes dosis. En los grupos que combinaban morfina y CBD si se produjo un ligero descenso de la presión arterial, pero siempre de menor magnitud al producido en los grupos que recibieron solo morfina, por lo que al igual que estos grupos, este descenso de la presión arterial no influye en el valor de reducción de CAM obtenido.

En cuanto a la tasa respiratoria, tras la administración de morfina se observó una reducción en la frecuencia respiratoria en todos los animales, pero al igual que ocurre con la presión arterial, la depresión respiratoria y la apnea son efectos secundarios comunes de la administración de opiáceos, y se han observado en rata tras la administración de dosis altas de morfina (Criado y col, 2000). En todos los casos la frecuencia respiratoria aumentó, hasta alcanzar su valor fisiológico normal en el momento de determinar la CAM_{SEVf} .

Se ha descrito una reducción en la temperatura corporal en pacientes sometidos a una anestesia general (Hall, 1978); para evitar una caída de la temperatura que conllevara una disminución en los requerimientos anestésicos que alterasen nuestros resultados se utilizó una bomba de calor, manteniendo así a los animales en su rango de temperatura fisiológico durante todo el estudio.

Cuando el pH disminuye por debajo de 7,0 se produce una acidosis metabólica que deriva en una reducción de la CAM (Quasha y col, 1980), sin embargo, ligeras variaciones del pH no afectan a la CAM (Quasha y col, 1980; Cullen, 1986; Steffey, 1996). Como ya se ha descrito anteriormente, el pH de la sangre arterial de todos los animales se midió tanto al inicio del estudio, como en el momento de determinar la CAM. Aunque en algún animal el valor medio de pH obtenido fue de 7,3, no se observan diferencias estadísticamente significativas con respecto al resto de animales estudiados, por lo que consideramos que la ligera acidosis metabólica que presentaron algunos de los individuos no alteró los valores de la CAM ni los demás resultados de este estudio.

6.4 Efecto sobre la CAM

Las investigaciones de los últimos años han demostrado que los cannabinoides son capaces de potenciar el efecto antinocioceptivo de los opioides (Cichewicz, 2004; Desroches y Beaulieu, 2010). Estos hallazgos de una relación sinérgica existente entre los cannabinoides y los opioides sugieren un posible cruce en las vías de señalización de estos dos sistemas, lo cual podría plantear nuevas terapias para el control del dolor. De hecho, ha podido demostrarse que la analgesia producida por cannabinoides y opioides se produce por la activación de circuitos cerebrales muy similares mediante la modulación de la actividad de la medula ventromedial rostral (Vaysse y col, 1987; Meng y col, 1998; Vigane y col 2005; Neelakantan y col, 2015).

El efecto de potenciación analgésica parece estar producido principalmente por el THC, mediante su unión al receptor CB1. El CBD por su parte es considerado como un cannabinoide carente de afinidad por los receptores CB1 y CB2, aunque otros autores cuestionan esta afirmación, al haber demostrado un potente efecto antiinflamatorio mediado por CB2 (Castillo y col, 2010). En cualquier caso, la reducción de la MAC producida por agentes analgésicos no refleja necesariamente su potencia analgésica.

Se sabe que los receptores cannabinoides y opioides poseen propiedades similares, al reducir la actividad de la adenilato ciclasa, bloquear los canales de calcio y la activación de los canales de potasio mediante la unión a proteínas Gi/G0 GTP-dependientes. La administración conjunta de agonistas que actúan a través de diferentes receptores acoplados a proteínas G pueden resultar en interacciones sinérgicas o antagónicas (Childers et al. 1992; Reisine et al. 1996).

Basándose en estos datos, el receptor de cannabinoides CB2 podría actuar como modulador alostérico del receptor opioide μ . La activación conjunta de ambos receptores podría desencadenar la desestabilización de la interacción entre proteínas G asociadas a receptor, haciendo que disminuya la eficacia o potencia de la activación de las proteínas G, y en última instancia una atenuación de la señal, de hecho, Paldyova y col. (2007) han demostrado interacciones funcionales entre los receptores CB2 y μ en el cerebro, y su impacto en las señales mediadas por agonistas.

Según los resultados observados el CBD administrado solo a diferentes dosis no parece tener efecto en la CAM del sevoflurano en ratas; sin embargo en estudios previos realizados con THC se observó una disminución significativa en los requerimientos anestésicos para el ciclopropano en ratas (Vitez y col, 1973) y una disminución dosis dependiente en la CAM del halotano en perros (Weksler y col, 1994).

Cuando se combina CBD con morfina, el mayor porcentaje de reducción para la CAM del sevoflurano se produce en el grupo MOR+CBD1, MOR+CBD7,5 y MOR+CBD10, es decir, a unas dosis de CBD de 1mg/kg, 7.5mg/kg y 10mg/kg (en torno a un 30%). Con una dosis de CBD de 3mg/kg y 6.5mg/kg (grupos MOR+CBD3 y MOR+CBD6,5) el porcentaje de reducción es algo inferior, en torno a un 25%. Finalmente, este porcentaje se reduce a casi un 15% en la combinación de la morfina con su dosis equivalente de CBD (5mg/kg) (grupo MOR+CBD5).

Este porcentaje máximo de reducción de la CAM del sevoflurano que se produce al administrar de forma conjunta morfina y cannabidiol en los grupos MOR+CBD1, MOR+CBD7,5 y MOR+CBD10, (en torno a un 30%) es comparable al producido por la morfina administrada sola (34%) o en combinación con vehículo (33%).

En el caso de la morfina, se observa una reducción la la CAM del sevoflurano en un 34% y 33% (grupo MOR+salino y MOR+vehículo respectivamente), lo cual es similar a los resultados publicados por otros autores (Abreu y col, 2012), y es también comparable a la reducción en la CAM del isoflurano producida por una dosis similar de morfina (Criado y col, 2000).

Con estos resultados podemos concluir que no existe efecto aditivo, sinérgico o antagonista. Por lo tanto, es posible que la mayoría de nuestros resultados solo se deban al efecto de la morfina.

Durante todo el estudio, las ratas anestesiadas respiraban un flujo de aire con cerca de un 100% de oxígeno. Está bien estudiado que en respuesta a un 100% de oxígeno administrado vía inhalatoria se produce una pequeña disminución en el flujo sanguíneo cerebral (Watson y col. 2000) y, por lo tanto, disminuye la disponibilidad de ciertos fármacos para acceder al sistema nervioso central.

En nuestro estudio, y en el caso de la morfina, es poco probable que se esté produciendo una disminución de su biodisponibilidad en el sistema nervioso central, pues observamos el efecto esperado en la reducción de la CAM del sevoflurano. Sin embargo, existe la posibilidad de que diferentes efectos en la farmacocinética de diferentes moléculas se han visto alterados. De hecho, no se puede excluir que el CBD careciera de algún efecto sobre la CAM del sevoflurano en rata debido a una disminución en su disponibilidad en el sistema nervioso central.

VII. Conclusiones

A partir de los resultados obtenidos y en las condiciones de realización del presente estudio, se pueden desprender las siguientes conclusiones:

1. El cannabidiol no modifica los requerimientos anestésicos del sevoflurano.
2. La adición de morfina al cannabidiol produce una reducción en los requerimientos anestésicos de sevoflurano.
3. La reducción por la adición de morfina no es dosis dependiente (dosis mayores no proporcionan mayor efecto).
4. El cannabidiol no altera los parámetros cardiorespiratorios en ratas anestesiadas con sevoflurano.
5. La adición de morfina al cannabidiol produce una disminución transitoria de los parámetros cardiorespiratorios.
6. El cannabidiol y la morfina administrados de forma conjunta no producen una interacción farmacológica de tipo aditivo, sinérgico, o antagónico total en la reducción de la CAM del sevoflurano.

VIII. Bibliografía

- Abood ME y Martin BR. Neurobiology of marijuana abuse. *Trends Pharmacol Sci* 1992; 13:201-206.
- Abreu M, Aguado D, Benito J, Gómez de Segura IA. Reduction of the sevoflurane minimum alveolar concentration induced by methadone, tramadol, butorphanol and morphine in rats. *Lab Anim* 2012; 46:200-206.
- Agrawal AK, Kumar P, Gulati A y col. Cannabis induced neurotoxicity in mice: effect of cholinergic (muscarinic) receptors and blood barrier permeability. *Res Commun Subst Abuse* 1989; 10:155-168.
- Agurell S, Halldin M, Lindgren J y col. Pharmacokinetics and metabolism of delta-9-THC and other cannabinoids with emphasis on man. *Pharmacol Rev* 1986; 38:21-42.
- Akca O, Melichek M, Scheck T y col. Postoperative pain and subcutaneous oxygen tension. *Lancet* 1999; 354:41-42.
- Akil H, Owens C, Gutstein H y col. Endogenous opioids: overview and current issues. *Drug Alcohol Depend* 1998; 51:127-140.
- Ali SZ, Taguchi A, Rosenberg H. Malignant hyperthermia. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol* 2003;17:519-533.
- Alvarez FJ, Lafuente H, Rey-Santano MC y col. Neuroprotective effects of the nonpsychoactive cannabinoid cannabidiol in hypoxic-ischemic newborn piglets. *Pediatr Res*. 2008; 64:653-8.
- Antognini JF y Schwartz K. Exaggerated anesthetic requirements in the preferentially anesthetized brain. *Anesthesiology* 1993; 79:1244-1249.
- Antognini JF y Carstens E. Macroscopic sites of anesthetic action: brain versus spinal cord. *Toxicol Lett* 1998; 100-101:51-58.

- Appendino G, Chianese G, Tagliatela-Scafati O. Cannabinoids: occurrence and medicinal chemistry. *Curr Med Chem*. 2011; 18:1085-1099.
- Arévalo-Martín A, García-Ovejero D, Gómez O y col. CB2 cannabinoid receptors as an emerging target for demyelinating diseases: from neuroimmune interactions to cell replacement strategies. *Br J Pharmacol* 2008; 153:216-225.
- Arruza Gómez L. El tratamiento con cannabidiol mejora la lesión pulmonar inflamatoria secundaria a hipoxia-isquemia cerebral en un nuevo modelo experimental neonatal. [Tesis doctoral]. Madrid: Universidad Complutense de Madrid; 2012.
- Arvidsson U, Riedl M, Chakrabarti S y col. Distribution and targeting of a mu-opioid receptor (MOR1) in brain and spinal cord. *J. Neurosci* 1995; 15:3328-3341.
- Ashton CH. Adverse effects of cannabis and cannabinoids. *Br J Anaesth* 1999; 63:637-649.
- Avidor-Reiss T, Nevo I, Levy R y col. Chronic opioid treatment induces adenylyl cyclase V superactivation. Involvement of Gbetagamma. *J Biol Chem* 1996; 271:21309-21315.
- Bailey PL, Wilbrink J, Zwanikken P y col. Anesthetic induction with fentanyl. *Anesth Analg* 1985; 64:48-53.
- Begg M, Pacher P, Bátakai S y col. Evidence for novel cannabinoid receptors. *Pharm Ther* 2005; 106:133-145.
- Bellville JW y Artusio JA jr. Effect of Arfonad on anesthetic requirements during cyclopropane anesthesia. *Anesthesiology* 1956; 17:347.
- Beltramo M, Stella N, Calignano A y col. Functional role of high-affinity anandamide transport, as revealed by selective inhibition. *Science* 1997; 277:1094-1097.

- Bernard JM, Doursout MF, Wouters P y col. Effects of enflurane and isoflurane on hepatic and renal circulations in chronically instrumented dogs. *Anesthesiology* 1991; 74:298-302.
- Blake DR, Robson P, Ho M y col. Preliminary assessment of the efficacy, tolerability and safety of a cannabis-based medicine (Sativex) in the treatment of pain caused by rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 2006; 45:50-52.
- del Blanco Narciso BB. Valoración de la interacción de agentes anestésicos (propofol, sevoflurano) de uso contaminante en los efectos electrofisiológicos del remifentanilo en un modelo experimental porcino. [Tesis doctoral]. Madrid: Universidad Complutense de Madrid; 2012.
- Blasco TA, Lee D, Amalrik M y col. The role of the nucleus raphe pontis and the caudate nucleus in alfentanil rigidity in the rat. *Brain Res* 1986; 386:280-286.
- Bodnar R, Paul D, Pastemark G. Synergistic interactions between the periaqueductal gray and the locus coeruleus. *Brain Res* 1991; 558: 224-230.
- Bornheim LM, Everhart ET, Li J y col. Induction and genetic regulation of mouse hepatic cytochrome P-450 by cannabidiol. *Biochem Pharmacol* 1994; 48:161-171.
- Bouaboula M, Bourrie B, Rinaldi-Carmona M y col. Stimulation of cannabinoid receptor CB1 induces krox-24 expression in human astrocytoma cells. *J Biol Chem* 1995a; 270:13973-13980.
- Bouaboula M, Poinot-Chazel C, Bourrie B y col. Activation of mitogen-activated protein kinases by stimulation of the central cannabinoid receptor CB1. *Biochem J* 1995b; 312:637-641.
- Brenneisen R, Egli A, Elsohly MA y col. The effect of orally and rectally administered delta 9-tetrahydrocannabinol on spasticity: a pilot study with 2 patients. *Int J Clin Pharmacol Ther* 1996; 34:446-52.

- Burstein S. PPAR-gamma: a nuclear receptor with affinity for cannabinoids. *Life Sci* 2005; 77:1674-1684.
- Cabral GA, Marciano-Cabral F. Cannabinoid receptors in microglia of the central nervous system: immune functional relevance. *J Leukoc Biol.* 2005; 78:1192-7.
- Campbell FA, Tramer MR, Carrol D y col. Are cannabinoids an effective option in the management of pain? A quantitative systematic review. *BMJ* 2001; 323:16.
- Capasso R, Borrelli F, Aviello G y col. Cannabidiol, extracted from *Cannabis sativa*, selectively inhibits inflammatory hypermotility in mice. *Br J Pharmacol* 2008; 154:1001-1008.
- Carmichael FJ, Israel Y, Crawford M y col. Central nervous system effects of acetate: contribution to the central effects of ethanol. *J Pharmacol Exp Ther* 1991;259, 403-408.
- Castanas E, Giraud P, Bourhim N y col. Kappa 3: a novel subtype of the kappa opioid site in bovine adrenal medulla, highly selective for Met- enkephalin-Arg6-Phe7. *Neuropeptides* 1984; 5:133-136.
- Castillo A, Tolón MR, Fernández-Ruiz J y col. The neuroprotective effect of cannabidiol in an in vitro model of newborn hypoxic- ischemic brain damage in mice is mediated by CB(2) and adenosine receptors. *Neurobiol Dis* 2010; 37:434-440.
- Carrier EJ, Auchampach JA, Hillard CJ. Inhibition of an equilibrative nucleoside transporter by cannabidiol: a mechanism of cannabinoid immunosuppression. *Proc Natl Acad Sci* 2006; 103:7895-7900.
- Chauvin M. Pharmacologie des morphiniques et des antagonistes de la morphine. *Encycl. Med. Chir. Paris, Anesthésie-Réanimation*, 36-371-A- 10. 1995, 18p.

Cheng G y Kendig JJ. Enflurane directly depresses glutamate AMPA and NMDA currents in mouse spinal cord motor neurons independent of actions on GABAA or glycine receptors. *Anesthesiology* 2000; 93:1075-1084.

Cheng G y Kendig JJ. Pre- and postsynaptic volatile anaesthetic actions on glycinergic transmission to spinal cord motor neurons. *Br J Pharmacol* 2002; 136:673-684.

Chia YY, Liu K, Wang JJ y col. Intraoperative high dose fentanyl induces postoperative fentanyl tolerance. *Can J Anaesth* 1999; 46:872-877.

Cichewicz DL. Synergistic interactions between cannabinoid and opioid analgesics. *Life Sci J* 2004; 74:1317-1324.

Clark JA, Liu L, Price M y col. Kappa opiate receptor multiplicity: evidence for two U50,488-sensitive kappa 1 subtypes and a novel kappa 3 subtype. *J Pharmacol Exp Ther* 1989; 251:461-468.

Colasanti B. Narcotic analgesics. In: *Modern Pharmacology*. 3a. ed. Boston: Craig C, Stitzel R, editors; 1990.

Cole DJ, Shapiro HM, Drummond JC y col. Halotane, fentanyl/nitrous oxide, and spinal lidocaine protect against spinal cord injury in the rat. *Anesthesiology* 1989; 70:967-972.

Consroe P. Brain cannabinoid systems as targets for the therapy of neurological disorders. *Neurobiol Dis* 1998; 5:534-551.

Conti S, Costa B, Colleoni M y col. Antiinflammatory action of endocannabinoid palmitylethanolamide and the synthetic cannabinoid nabilone in a model of acute inflammation in the rat. *Br J Pharmacol* 2002; 181-187.

Corbett TH. Cancer and congenital anomalies associated with anesthetics. *Ann N Y Acad Sci* 1976; 271:58-66.

- Corroon J, Felice JF. The Endocannabinoid System and its Modulation by Cannabidiol (CBD). *Altern Ther Health Med*. 2019;25(S2):6-14.
- Criado AB, Gomez de Segura IA, Tendillo FJ y col. Reduction of isoflurane MAC with buprenorphine and morphine in rats. *Lab Anim* 2000; 34:252-259.
- Cromwell TH, Eger EI 2nd, Stevens WC y col. Forane uptake, excretion, and blood solubility in man. *Anesthesiology* 1971; 35:401-408.
- Cullen DJ. Anesthetic depth and MAC. En: *Miller Anesthesia*. 2a. ed. New York: Ed. R.D. Miller; 1986. 553-580.
- Dale O, Brown BR Jr. Clinical pharmacokinetics of the inhalational anesthetics. *Clin Pharmacokin* 1987; 12:145-167.
- De Jong RH, Eger EI 2nd. MAC expanded: AD50 and AD95 values of common inhalation anesthetics in man. *Anesthesiology* 1975; 42:384-389.
- Deiana S, Watanabe A, Yamasaki Y et al. Plasma and brain pharmacokinetic profile of cannabidiol (CBD), cannabidivarin (CBDV), Delta(9)-tetrahydrocannabivarin (THCV) and cannabigerol (CBG) in rats and mice following oral and intraperitoneal administration and CBD action on obsessive-compulsive behaviour. *Psychopharmacology* 2012; 219, 859-873.
- Demuth DG, Molleman A. Cannabinoid signalling. *Life Sci* 2006; 78:549-563.
- Desroches J y Beaulieu P. Opioids and cannabinoids interactions: involvement in pain management. *Curr Drug Targets* 2010; 11:462-473.
- Devane WA, Dysarz FA 3rd, Johnson MR y col. Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. *Mol Pharmacol* 1988; 34:605-613.
- Devane WA, Hanus L, Breuer A y col. Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science* 1992; 258:1946-1949.

- Díaz-Laviada I, Ruiz-Llorente L. Signal transduction activated by cannabinoid receptors. *Mini Rev Med Chem* 2005; 5:619-630.
- Di Marzo V y Petrosino S. Endocannabinoids and the regulation of their levels in health and disease. *Curr Opin Lipidol* 2007; 18:129-140.
- Dorsch JA, Dorsch SE. *Understanding Anesthesia Equipment*. 3a. ed. Baltimore: Williams & Wilkins; 1994.
- Dowling PM. Farmacoterapia Sistémica del Aparato Digestivo. En: *El Manual Merck de Veterinaria*. 5a. ed. Barcelona: Editorial Océano en colaboración con Merial Limited; 2000. 1892-1910.
- Dowling PM. Farmacoterapia Sistémica del Aparato Respiratorio. En: *El Manual Merck de Veterinaria*. 5a. ed. Barcelona: Editorial Océano en colaboración con Merial Limited; 2000. 1943-1948.
- Dowlatshahi K, Evander A, Walther B y col. Influences of morphine on the distal oesophagus and the lower oesophageal sphincter-a manometric study. *Gut* 1985;26:802-806.
- Drenger B, Magora F. Urodynamic studies after intrathecal fentanyl and buprenorphine in the dog. *Anesth Analg* 1989; 69:348-353.
- Ebert TJ, Muzi M, Lopatka CW. The neurocirculatory responses to sevoflurane anesthesia in humans: A comparación to desflurane. *Anesthesiology* 1995; 83:88-95.
- Ebert TJ, Harkin CP, Muzi M. Cardiovascular responses to sevoflurane: A review. *Anesth Analg* 1995; 81:11-22.
- Eger El 2nd, Saidman LJ, Brandstater B. Minimum alveolar anesthetic concentration: a standard of anesthetic potency. *Anesthesiology* 1965; 26:756-763.

- Eger EI 2nd, White AE, Brown CL y col. A test of the carcinogenicity of enflurane, isoflurane, halothane, methoxyflurane, and nitrous oxide in mice. *Anesth Analg* 1978; 57:678-694.
- Eger EI 2nd. Current and future perspectives on inhaled anesthetics. *Pharmacotherapy* 1998; 18:895-910.
- Eger EI 2nd, Xing Y, Laster M y col. Halothane and isoflurane have additive minimum alveolar concentration (MAC) effects in rats. *Anesth Analg* 2003; 96:1350-1353.
- Eger EI 2nd, Xing Y, Laster M y col. Alpha-2 adrenoceptors probably do not mediate the immobility produced by inhaled anesthetics. *Anesth Analg* 2003; 96:1661-1664.
- Ellert-Miklaszewska A, Kaminska B, Konarska L. Cannabinoids down-regulate PI3K/Akt and Erk signalling pathways and activate proapoptotic function of Bad protein. *Cell Signal* 2005; 17:25-37.
- Esposito G, De Filippis D, Maiuri MC y col. Cannabidiol inhibits inducible nitric oxide synthase protein expression and nitric oxide production in beta-amyloid stimulated PC12 neurons through p38 MAP kinase and NF-kappaB involvement. *Neurosci Lett* 2006; 399:91-95.
- Esposito G, Scuderi C, Savani C y col. Cannabidiol in vivo blunts beta-amyloid induced neuroinflammation by suppressing IL-1beta and iNOS expression. *Br J Pharmacol* 2007; 151:1272-1279.
- Etches RC. Respiratory depression associated with patient-controlled analgesia: a review of eight cases. *Can J Anaesth* 1994; 41:125-232.
- Fang Z, Ionescu P, Chortkoff BS y col. Anesthetic potencies of n-alkanols: results of additivity and solubility studies suggest a mechanism of action similar to that for conventional inhaled anesthetics. *Anesth Analg* 1997; 84:1042-1048.

- Felder CC, Joyce KE, Briley EM y col. Comparison of the pharmacology and signal transduction of the human cannabinoid CB1 and CB2 receptors. *Mol Pharmacol* 1995; 48:443-450.
- Felder CC, Nielsen A, Briley EM y col. Isolation and measurement of the endogenous cannabinoid receptor agonist, anandamide, in brain and peripheral tissues of human and rat. *FEBS Lett* 1996; 393:231-235.
- Feldman PD, Parveen N, Sezen S. Cardiovascular effects of leu-enkephalin in the nucleus tractus solitarius of the rat. *Brain Res* 1996; 709:331-333.
- Feldman RS, Meyer JS, Quenzer L. The opiates. *Neuropsychopharmacology*. Sunderland MA: Sinauer Associates 1997:495-598.
- Fields HL, Heinricher MM, Mason P. Neurotransmitters in nociceptive modulatory circuits. *Annu Rev Neurosci* 1999; 14:219-245.
- Fisher DM. The “big Little problem” of postoperative nausea and vomiting: Do we know the answer yet?. *Anesthesiology* 1997;87:1271-1273.
- Flood P, Sonner JM, Gong D y col. Heteromeric nicotinic inhibition by isoflurane does not mediate MAC or loss of righting reflex. *Anesthesiology* 2002; 97:902-905.
- Flórez J. Fármacos analgésicos opiáceos. En J. Flórez (Ed.), *Farmacología Humana*. Masson-Salvat. Barcelona. 1992.
- Fourcade HE, Stevens WC, Larson CP Jr y col. The ventilatory effects of Forane, a new inhaled anesthetic. *Anesthesiology* 1971; 35:26-31.
- Franks NP y Lieb WR. Do general anaesthetics act by competitive binding to specific receptors? *Nature* 1984; 310:599-601.
- Fukuda K. Anestésicos intravenosos opioides. En: *Miller Anestesia*. 6a. ed. Madrid: Elsevier; 2005. 379-439.

- Fukuda K, Kato S, Mori K y col. cDNA cloning and regional distribution of a novel member of the opioid receptor family. *FEBS Lett* 1994; 343:42-46.
- Galiègue S, Mary S, Marchand J y col. Expression of central and peripheral cannabinoid receptors in human immune tissues and leukocyte subpopulations. *Eur J Biochem* 1995; 232:54-61.
- Gaines Das R, North D (2007) Implications of experimental technique for analysis and interpretation of data from animal experiments: outliers and increased variability resulting from failure of intraperitoneal injection procedures. *Lab Anim* 41, 312-320.
- Gaoni Y y Mechoulam R. Isolation, Structure, and Partial Synthesis of an Active Constituent of Hashish. *J Am Chem Soc* 1964; 86:1646–1647.
- García Fernández, P, Rodríguez Quirós, J., García Gramser, A., 2001. Agentes utilizados para el control del dolor. En: *Terapéutica del dolor (I)*, Monografía no52, *Canis et Felis (Aula Veterinaria)*.
- García MC, Adler-Graschinsky E, Celuch SM. Enhancement of the hypotensive effects of intrathecally injected endocannabinoids by the entourage compound palmitoylethanolamide. *Eur J Pharmacol* 2009; 610:75-80.
- Gaudriault G, Nouel D, Dal Farra C y col. Receptor-induced internalization of selective peptidic mu and delta opioid ligands. *J Biol Chem.* 1997; 272:2880-2888.
- Genaro K, Fabris D, Arantes ALF y col. Cannabidiol is a potential therapeutic for the affective-motivational dimension of incisión pain in rats. *Front Pharmacol* doi: 10.3389/fphar.2017.00391. eCollection 2017.
- Gerstin KM, Gong DH, Abdallah M y col. Mutation of KCNK5 or Kir3.2 potassium channels in mice does not change minimum alveolar anesthetic concentration. *Anesth Analg* 2003; 96:1345-1349.

- Gintzler AR y Pasternak GW. Multiple mu receptors: evidence for mu₂ sites in the guinea pig ileum. *Neurosci Lett* 1983; 39:51-56.
- Glass PS, Iselin-Chaves IA, Goodman D y col. Determination of the potency of remifentanil compared with alfentanil using ventilatory depression as the measure of opioid effect. *Anesthesiology* 1999; 90:1556-63.
- Godefroy F, Weil-Fugazza J, Coudert D y col. Effect of acute administration of morphine on newly synthesized 5-hydroxytryptamine in spinal cord of the rat. *J Pharmacol Exp Ther* 1980; 199:415-422.
- Godlewski G, Offertáler L, Wagner JA y col. Receptors for acylethanolamides-GPR55 and GPR119. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2009; 89:105-111.
- Gomez dP, Velasco G, Guzman. The CB1 cannabinoid receptor is coupled to the activation of protein kinase B/Akt. *Biochem J* 2000; 347:369-373.
- Gonçalves TC, Londe AK, Albano RI y col. Cannabidiol and endogenous opioid peptide-mediated mechanisms modulate antinociception induced by transcutaneous electrostimulation of the peripheral nervous system. *J Neurol Sci* 2014; 347, 82-89.
- Greenhough A, Patsos HA, Williams AC y col. The cannabinoid delta(9)-tetrahydrocannabinol inhibits RAS-MAPK and PI3K-AKT survival signalling and induces BAD-mediated apoptosis in colorectal cancer cells. *Int J Cancer* 2007; 121:2172-2180.
- Grisel JE, Mogil JS, Belknap JK y col. Orphanin FQ acts as a supraspinal, but not a spinal, anti-opioid peptide. *Neuroreport* 1996; 7:2125-2129.
- Grotenhermen F. Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Cannabinoids. *Clin Pharmacokinet* 2003; 42:327-360.

- Gustafsson K, Christensson B, Sander B y col. Cannabinoid receptor- mediated apoptosis induced by R(+)-methanandamide and Win55,212-2 is associated with ceramide accumulation and p38 activation in mantle cell lymphoma. *Mol Pharmacol* 2006; 70:1612-1620.
- Gutstein HB y Akil H. Opioid Analgesics. In: Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics. 10a. ed. New York: McGraw-Hill; 2001. 569-619.
- Guy GW y Flint ME. A phase one study of sublingual Cannabis based medicinal extracts. 2000 Symposium on the Cannabinoids. Burlington (VT): International Cannabinoid Research Society; 2000, 115.
- Guzman M, Sanchez C, Galve-Roperh I. Control of the cell survival/death decision by cannabinoids. *J Mol Med* 2001; 78:613-625.
- Hall GM. Body temperature and anaesthesia. *Br J Anaesth* 1978; 50: 39-40.
- Hampson AJ, Grimaldi M, Axelrod J y col. Cannabidiol and (-)⁹-tetrahydrocannabinol are neuroprotective antioxidants. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95:8268- 8273.
- Harkin CP, Pagel PS, Kersten JR y col. Direct negative inotropic and lusitropic effects of sevoflurane. *Anesthesiology* 1994; 81:156-167.
- Harper MH, Winter PM, Johnson BH y col. Naloxone does not antagonize general anesthesia in the rat. *Anesthesiology* 1978; 49:3-5.
- Hartman JC, Pagel PS, Proctor LT y col. Influence of desflurane, isoflurane and halothane on regional tissue perfusion in dogs. *Can J Anaesth* 1992; 39:877-887.
- Harvey DJ. Absorption, distribution and biotransformation of the cannabinoids en Nahas GG, Sutin KM, Harvey DJ y Agurell S. Humana Press. Totowa. New Jersey. 1999; 91-103.

- Hasselström J, Svensson JO, Sawe J, y col. Disposition and analgesic effects of systemic morphine, morphine-6-glucuronide and normorphine in rat. *Pharmacol Toxicol* 1996; 79, 40-46.
- Herkenham M, Lynn AB, Little MD y col. Cannabinoid receptor localization in brain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990; 87:1932-1936.
- Hikasa Y, Okuyama K, Kakuta T y col. Anesthetic potency and cardiopulmonary effects of sevoflurane in goats: comparison with isoflurane and halothane. *Can J Vet Res* 1998; 62:299-306.
- Hillard CJ, Edgemond WS, Jarrahan A y col. Accumulation of N-arachidonylethanolamine (anandamide) into cerebellar granule cells occurs via facilitated diffusion. *J Neurochem* 1997; 69:631-638.
- Himes RS Jr, DiFazio CA, Burney RG. Effects of lidocaine on the anesthetic requirements for nitrous oxide and halothane. *Anesthesiology* 1977; 47:437-440.
- Hine B. Morphine and delta-9-tetrahydrocannabinol: two-way cross tolerance for antinocioceptive and heart-rate responses in the rat. *Psychopharmacol* 1985; 87:34-38.
- Hirshman CA, Edelstein G, Peetz S y col. Mechanism of action of inhalational anesthesia on airways. *Anesthesiology* 1982; 56:107-111.
- Hoffmann O, Plesan A, Wiesenfeld-Hallin Z. Genetic differences in morphine sensitivity, tolerance and withdrawal in rats. *Brain Res* 1998; 806: 232-237.
- Howlett AC. Inhibition of neuroblastoma adenylate cyclase by cannabinoid and nantradol compounds. *Life Sci* 1984; 35:1803-1810.
- Howlett AC, Johnson MR, Melvin LS y col. Nonclassical cannabinoid analgetic inhibit adenylate cyclase: development of a cannabinoid receptor model. *Mol Pharmacol* 1988; 33:297-302.

- Hugues J, Smith TW, Kosterlitz HW y col. Identification of two related pentapeptides from the brain with potent opiate agonist activity. *Nature* 1975; 258: 577.
- Humphrey JA, Sedensky MM, Morgan PG. Understanding anesthesia: making sense of the absence of senses. *Human Molecular Genetics* 2002; 11:1241-1249.
- Hursh D, Gelman S, Bradley EL Jr. Hepatic oxygen supply during halothane or isoflurane anesthesia in guinea pigs. *Anesthesiology* 1987; 67:701-706.
- Iannotti FA, Di Marzo V, Petrosino S. Endocannabinoids and endo-cannabinoid-related mediators: Targets, metabolism and role in neurological disorders. *Prog Lipid Res.* 2016, 62:107-128.
- Ishizaki K, Yoshida N, Yoon DM y col. Intrathecally administered NMDA receptor antagonists reduce the MAC of isoflurane in rats. *Can J Anaesth* 1996; 43:724-730.
- Iwamoto K, Klaassen CD. First-pass effect of morphine in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 1977;203, 365-376.
- Jaffe JH, Martin WR. Opioids analgesics and antagonist. En: *The pharmacological basis of therapeutics*. New York:Macmillan; 1985. p.473.
- Jamali S, Ravussin P, Archer D y col. The effects of bolus administration of opioids on cerebrospinal fluid pressure in patients with supratentorial lesions. *Anest Analg* 1996; 82:600-606.
- James DH, Mark JC, David XS y col. Effects of isoflurane and sevoflurane on intracellular calcium and contractility in pressure overload hypertrophy. *Anesthesiology* 2004; 101:675-686.
- Janoff A, Pringle MJ, Miller KW. Correlation of general anesthetic potency with solubility in membranes. *Biochim Biophys Acta* 1981; 649:125-128.

- Jiang Q, Takemori AE, Sultana M y col. Differential antagonism of opioid delta antinociception by [D-Ala²,Leu⁵,Cys⁶]enkephalin and naltrindole 5'-isothiocyanate: evidence for delta receptor subtypes. *J Pharmacol Exp Ther* 1991; 257:1069-1075.
- Jinks SL, Martin JT, Carstens E y col. Peri-MAC depression of a nociceptive withdrawal reflex is accompanied by reduced dorsal horn activity with halothane but not isoflurane. *Anesthesiology* 2003; 98:1128-1138.
- Joas TA, Stevens WC, Eger EI 2nd. Electroencephalographic seizure activity in dogs during anaesthesia. *Br J Anaesth* 1971; 43:739-745.
- Joas TA, Stevens WC. Comparison of the arrhythmic doses of epinephrine during Forane, halothane, and fluroxene anesthesia in dogs. *Anesthesiology* 1971; 35:48-53.
- Joo DT, Gong D, Sonner JM y col. Blockade of AMPA receptors and volatile anesthetics: reduced anesthetic requirements in GluR2 null mutant mice for loss of the righting reflex and antinociception but not minimum alveolar concentration. *Anesthesiology* 2001; 94:478-488.
- Katz RL, Epstein RA. The interaction of anesthetic agents and adrenergic drugs to produce cardiac arrhythmias. *Anesthesiology* 1968; 29:763-784.
- Kaymakcalan S, Ayhan IH, Tulunay FC. Naloxone-induced or postwithdrawal abstinence signs in A9-tetrahydrocannabinol-tolerant rats. *Psychopharmacol* 1977; 55:243-249.
- Keay KA, Crowfoot IJ, Floyd NS y col. Cardiovascular effects of microinjections of opioid agonists into the "Depressor Region" of the ventrolateral periaqueductal gray region. *Brain Res* 1997; 762:61-71.
- Keith DE, Murray SR, Zaki PA y col. Morphine activates opioid receptors without causing their rapid internalization. *J Biol Chem* 1996; 271:19021-19024.

- Kharasch ED, Hoffman GM, Thorning D y col. Role of renal cysteine conjugate 13-lyase pathway in inhaled compound A nephrotoxicity in rats. *Anesthesiology* 1998; 88: 1.624-1.633.
- King T, Ossipov MH, Vanderah TW y col. Is paradoxical pain induced by sustained opioid exposure an underlying mechanism of opioid antinociceptive tolerance? *Neurosignals* 2005; 14:194-205.
- Kissin I, Brown PT, Robinson CA y col. Acute tolerance in morphine analgesia: continuous infusion and single injection in rats. *Anesthesiology* 1991; 74:166-171.
- Kissin I, Bright CA, Bradley EL Jr. Acute tolerance to continuously infused alfentanil: The role of cholecystinin and N-methyl-D-aspartate-nitric oxide system. *Anesth Analg* 2000; 91:110-116.
- Klein TW, Lane B, Newton CA y col. The cannabinoid system and cytokine network. *Proc Soc Exp Biol Med* 2000; 225:1-8.
- Ko JCH, Lange DN, Mandsager RE y col. Effects of butorphanol and carprofen on the minimal alveolar concentration of isoflurane in dogs. *JAVMA* 2000; 217:1025-1028.
- Koblin DD, Chortkoff BS, Laster MJ y col. Polyhalogenated and perfluorinated compounds that disobey the Meyer-Overton hypothesis. *Anesth Analg* 1994; 79:1043-1048.
- Köster A, Montkowski A, Schulz S y col. Targeted disruption of the orphanin FQ/nociceptin gene increases stress susceptibility and impairs stress adaptation in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*.1999; 96:10444-10449.
- Knill RL, Gelb AW. Ventilatory responses to hypoxia and hypercapnia during halothane sedation and anesthesia in man. *Anesthesiology* 1978; 49:244-251.
- Kuhar MJ, Pert CB, Snyder SH. Regional distribution of opiate receptor binding in monkey and human brain. *Nature* 1973; 245: 447.

- Lafuente H, Alvarez FJ, Pazos MR y col. Cannabidiol reduces brain damage and improves functional recovery after acute hypoxia-ischemia in newborn pigs. *Pediatr Res* 2011; 70:272-277.
- Lake CL, DiFazio CA, Moscicki JC y col. Reduction in halothane MAC: comparison of morphine and alfentanil. *Anesth Analg* 1985; 64: 807-810.
- Lastres-Becker I, Molina-Holgado F, Ramos JA y col. Cannabinoids provide neuroprotection against 6-hydroxydopamine toxicity in vivo and in vitro: relevance to Parkinson's disease. *Neurobiol Dis* 2005; 19:96-107.
- Lauer KK, Connolly LA, Schmeling WT. Opioid sedation does not alter intracranial pressure in head injured patients. *Can J Anaesth* 1997; 44:929-933.
- Laulin JP, Celerier E, Larcher A y col. Opiate tolerance to daily heroin administration: an apparent phenomenon associated with enhanced pain sensitivity. *Neuroscience* 1999; 89:631-636.
- Ledent C, Valverde O, Cossu G y col. Unresponsiveness to cannabinoids and reduced addictive effects of opiates in CB1 receptor knockout mice. *Science* 1999; 283:401-404.
- Li JY, Wong CH, Huang EY y col. Modulations of spinal serotonin activity affect the development of morphine tolerance. *Anesth Analg*. 2001; 92:1563-1568.
- Lichtman AH, Peart J, Poklis JL y col. Pharmacological evaluation of aerosolized cannabinoids in mice. *Eur J Pharmacol* 2000; 399:141-9.
- Lingamaneni R, Birch ML, Hemmings HC Jr. Widespread inhibition of sodium channel- dependent glutamate release from isolated nerve terminals by isoflurane and propofol. *Anesthesiology* 2001; 95:1460-1466.
- Lhoest L. Study of the renal function during anesthesia with halothane and enflurane. *Acta Anaesthesiol Belg* 1976; 27:272-282.

- Lord JA, Waterfield AA, Hughes J y col. Endogenous opioid peptides: multiple agonists and receptors. *Nature* 1977; 267:495-499.
- Macarrone M, Bab I, Biró T y col. Endocannabinoid signaling at the periphery: 50 years after THC. *Trends Pharmacol Sci.* 2015; 36(5):277-296.
- Mackie K, Lai Y, Westenbroek R y col. Cannabinoids activate an inwardly rectifying potassium conductance and inhibit Q-type calcium currents in AtT20 cells transfected with rat brain cannabinoid receptor. *J Neurosci* 1995; 15:6552-6561.
- Makman MH, Bilfinger TV, Stefano GB. Human granulocytes contain an opiate alkaloid-selective receptor mediating inhibition of cytokine-induced activation and chemotaxis. *J Immunol* 1995; 154:1323-1330.
- Malan TP, Ibrahim MM, Deng H y col. CB2 cannabinoid receptor-mediated peripheral antinociception. *Pain* 2001; 93:239-245.
- Maldonado R, Rodríguez de Fonseca F. Cannabinoid addiction: behavioral models and neural correlates. *J Neurosci* 2002; 22: 3326-3331.
- Malfait AM, Gallily R, Sumariwalla PF y col. The nonpsychoactive cannabis constituent cannabidiol is an oral anti-arthritic therapeutic in murine collagen-induced arthritis. *Proc Natl Acad Sci* 2000; 97:9561-9566.
- Maneuf YP, Nash JE, Crossman AR y col. Activation of the cannabinoid receptor by A9-tetrahydrocannabinol reduces gamma-aminobutyric acid uptake in the globes pallidus. *Our J Pharmacol* 1996; 308:161-164.
- Manohar M, Parks CM. Porcine systemic and regional organ blood flow during 1.0 and 1.5 minimum alveolar concentrations of sevoflurane anesthesia without and with 50% nitrous oxide. *J. Pharmacol Exp Ther* 1984; 231:640-648.
- Mansour A, Khachaturian H, Lewis ME y col. Anatomy of CNS opioid receptors. *Trends Neurosci* 1988; 11:308-314.

- Mansour A, Fox CA, Akil H y col. Opioid-receptor mRNA expression in the rat CNS: anatomical and functional implications. *Trends Neurosci* 1995; 18:22-29.
- Martin BR, Welch SP, Abood M. Progress toward understanding the cannabinoid receptor and its second messenger systems. *Adv Pharmacol* 1994; 25:341-397.
- Martin DC, Plagenhoef M, Abraham J y col. Volatile anesthetics and glutamate activation of N-methyl-D-aspartate receptors. *Biochem Pharmacol* 1995; 49:809-817.
- Martin JL, Njoku DB. Metabolismo y toxicidad de los anestésicos inhalatorios modernos. En: *Miller Anestesia*. 6a. ed. Madrid: Elsevier; 2005. 231-272.
- Martin WR, Eades CG, Thompson JA y col. The effects of morphine and nalorphine-like drugs in the nondependent and morphine dependent chronic spinal dog. *J Pharmacol Exp Ther* 1976;197:517-32.
- Martínez Orgado JA, Fernández López D, Bonet Serra B y col. El sistema cannabinoide y su importancia en el período perinatal. *An Pediatr* 2005; 63:433-440.
- Martínez-Orgado J, Fernández-López D, Lizasoain I y col. The seek of neuroprotection: introducing cannabinoids. *Recent Pat CNS Drug Discov* 2007; 2:131-139.
- Matta BF, Mayberg TS, Lam AM. Direct cerebro-vasodilatory effects of halothane, isoflurane, and desflurane during propofol-induced isoelectric electroencephalogram in humans. *Anesthesiology* 1995;83:980-985.
- Mazoit JX, Sandouk P, Scherrmann JM y col. Extrahepatic metabolism of morphine occurs in human. *Clin Pharmacol Ther* 1990; 48:613-618.
- McFarlane C, Warner DS, Dexter F. Interactions between NMDA and AMPA glutamate receptor antagonists during halothane anesthesia in the rat. *Neuropharmacology* 1995; 34:659-663.

- McGrath CJ, Rempel WE, Jessen CR y col. Malignant hyperthermia- triggering liability of selected inhalant anesthetics in swine. *Am J Vet Res* 1981; 42:604-607.
- McMillan DE, Harris LS, Frankenheim JM y col. L-a9-tetrahydrocannabinol in pigeons: tolerance to the behavioral effects. *Science* 1970; 169:501-503.
- McPherson RW, Feldman MA. Narcotics in neuroanesthesia. In: Estafanous FG (ed). *Opioids in anesthesia II*. p. 116. Boston. Butterworth-Heinemann, 1991.
- McQuay HJ. Pharmacological treatment of neuralgic and neuropathic pain. *Cancer Surv* 1988; 7;141-159.
- Mechoulam R y Shvo Y. The structure of cannabidiol. *Tetrahedron* 1963.
- Mechoulam R, Ben-Shabat S, Hanus L y col. Compton DR. Identification of an endogenous 2- monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem Pharmacol* 1995; 50:83-90.
- Mechoulam R, Peters M, Murillo-Rodriguez E y col. Cannabidiol recent advances. *Chem Biodivers* 2007; 4:1678–1692.
- Melvin LS, Milne GM, Jhonson MR y col. Structure-activity relationships for cannabinoid receptor-binding and analgesic activity: studies of bicyclic cannabinoid analogs. *Mol Pharmacol* 1970; 44:1008-1015.
- Meng ID, Manning BH, Martin WJ y col. An analgesic circuit activated by cannabinoids. *Nature* 1998; 395:381-383.
- Merkel G, Eger EI 2nd. A comparative study of halothane and halopropane anesthesia including method for determining equipotency. *Anesthesiology* 1963; 24:346-357.
- Merin RG, Bernard JM, Doursout MF y col. Comparison of the effects of isoflurane and desflurane on cardiovascular dynamics and regional blood flow in the chronically instrumented dog. *Anesthesiology* 1991; 74:568-574.

- Merrell WJ, Gordon L, Wood AJ y col. The effect of halothane on morphine disposition: relative contribution of the liver and kidney to morphine glucuronidation in the dog. *Anesthesiology* 1990; 72:308-314.
- Merritt JC, Olsen JL, Armstrong JR y col. Topical delta 9-tetrahydrocannabinol in hypertensive glaucomas. *J Pharm Pharmacol* 1981; 33:40-41.
- Mestek A, Hurley JH, Bye LS y col. The human mu opioid receptor: modulation of functional desensitization by calcium/calmodulin-dependent protein kinase and protein kinase C. *J Neurosci* 1995; 15:2396-2406.
- Meunier JC, Mollereau C, Toll L y col. Isolation and structure of the endogenous agonist of opioid receptor-like ORL1 receptor. *Nature* 1995; 377:532-535.
- Meyer HH. Theorie der Alkoholnarkose. *Arch Exp Pathol Pharmacol (Naunyn-Schmiedebergs)* 1899; 42:109-118.
- Minami M y Satoh M. Molecular biology of the opioid receptors: structures, functions and distributions. *Neurosci Res* 1995; 23:121-145.
- Mitra S. Opioid-induced hyperalgesia: pathophysiology and clinical implications. *J Opioid Manag* 2008; 4:123-130.
- Mogil JS y Pasternak GW. The molecular and behavioral pharmacology of the orphanin FQ/nociceptin peptide and receptor family. *Pharmacol Rev* 2001; 53:381-415.
- Mollereau C, Parmentier M, Mailleux P y col. ORL1, a novel member of the opioid receptor family. Cloning, functional expression and localization. *FEBS Lett* 1994; 341:33-38.
- Moranta D, Esteban S, García-Sevilla JA. Acute, chronic and withdrawal effects of the cannabinoid receptor agonist WIN55212-2 on the sequential activation of MAPK/Raf-MEK-ERK signaling in the rat cerebral frontal cortex: short-term regulation by intrinsic and extrinsic pathways. *J Neurosci Res* 2007; 85:656- 667.

- Morgan GE, Mikhail MS. Anestesiología clínica. Quinta edición 2007; ed. Manual Moderno.
- Morio M, Fujii K, Satoh N y col. Reaction of sevoflurane and its degradation products with soda lime. Toxicity of the byproducts. *Anesthesiology* 1992; 77:1155-1164.
- Morre M, Bachy A, Gout B y col. Kappa binding sites in guinea-pig brain membranes: evidence for a dynorphin-resistant subtype. *Life Sci* 1983; 33:179-182.
- Munson ES, Larson CP Jr, Babad AA y col. The effects of halothane, fluroxene and cyclopropane on ventilation: a comparative study in man. *Anesthesiology* 1966; 27:716-728.
- Murphy DB, Sutton JA, Prescott LF y col. Opioid induced delay in gastric emptying a peripheral mechanism in human. *Anesthesiology* 1997; 87:765-770.
- Navarro R, Weiskopf RB, Moore MA y col. Humans anesthetized with sevoflurane or isoflurane have similar arrhythmic response to epinephrine. *Anesthesiology* 1994; 80:545-549.
- Neelakantan H, Tallarida RJ, Reichenbach ZW y col. Distinct interactions of cannabidiol and morphine in three nociceptive behavioral models in mice. *Behav Pharmacol* 2015; 26:304-314.
- Nestler EJ, Aghajanian GK. Molecular and cellular basis of addiction. *Science* 1997; 278:58-63.
- Nicoll JM. Status epilepticus following enflurane anaesthesia. *Anaesthesia* 1986; 41:927-930.
- Nishi M, Houtani T, Noda Y y col. Unrestrained nociceptive response and dysregulation of hearing ability in mice lacking the nociceptin/orphaninFQ receptor. *EMBO J* 1997; 16:1858-1864.

- Njoku DB, Pohl LR, Sokoloski EA y col. Immunochemical evidence against the involvement of cysteine conjugate β -lyase in compound A nephrotoxicity in rats. *Anesthesiology* 1999; 90: 458-469.
- Nolan A. SNC.Opioides. En: *Farmacología y Terapéutica Veterinaria*. Ed: McGraw-Hill / Interamericana. 2002.
- Overton E. Studien über die Narkose, Zugleich ein Beitrag zur allgemeinen Pharmakologie. Verlag von Gustav Fischer, Jena, Germany, 1901:1-195.
- Ozaita A, Puighermanal E, Maldonado R. Regulation of PI3K/Akt/GSK-3 pathway by cannabinoids in the brain. *J Neurochem* 2007; 102:1105-1114.
- Pacheco M, Childers SR, Arnold R y col. Aminoalkylindoles: actions on specific G-protein-linked receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 1991; 257:170-183.
- Pagel PS, Kampine JP, Schmeling WT y col. Alteration of left ventricular diastolic function by desflurane, isoflurane, and halothane in the chronically instrumented dog with autonomic nervous system blockade. *Anesthesiology* 1991; 74:1103-1114.
- Pagel PS, Kampine JP, Schmeling WT y col. Comparison of the systemic and coronary hemodynamic actions of desflurane, isoflurane, halothane, and enflurane in the chronically instrumented dog. *Anesthesiology* 1991; 74:539-551.
- Páldyová E, Bereczki E, Sántha M y col. Noladin ether, a putative endocannabinoid, inhibits μ -opioid receptor activation via CB2 cannabinoid receptors. *Neurochem Int* 2007; 52:321-328.
- Pan ZZ, Tershner SA, Fields HL. Cellular mechanism for anti analgesic action of agonists of the kappa-opioid receptor. *Nature* 1997; 389:382-385.
- Pan Z, Hirakawa N, Fields HL. A cellular mechanism for the bidirectional pain-modulating actions of orphaning FQ/nociceptin. *Neuron* 2000; 26:515-522.

- Pasternak GW. High and low affinity opioid binding sites: relationship to mu and delta sites. *Life Sci* 1982; 31:1303-1306.
- Pasternak GW y Wood PJ. Multiple mu opiate receptors. *Life Sci* 1986; 38:1889-1898.
- Paul M, Fokt RM, Kindler CH y col. Characterization of the interactions between volatile anesthetics and neuromuscular blockers at the muscle nicotinic acetylcholine receptor. *Anesth Analg* 2002; 95:362-367.
- Pavlin EG, Su JY. Cardiopulmonary pharmacology. En: *Miller Anesthesia*. 4a. ed. New York: Churchill Livingstone; 1994. 125-156.
- Pazos MR, Cinquia V, Gómez A y col. Cannabidiol administration after hypoxia-ischemia to newborn rats reduces long-term brain injury and restores neurobehavioral function. *Neuropharmacology* 2012; 63, 776-783.
- Pazos Rodríguez MR, Grandes Moreno P. Cannabinoides y sistema endocannabinoide. En: *Efectos terapéuticos de los cannabinoides*. Edita Instituto universitario de Investigación en Neuroquímica de la Universidad Complutense de Madrid. 2017;7-23.
- Pérez, R., 2010. *Farmacología Veterinaria*. Texto de apoyo a la docencia. Universidad de Concepción.
- Pertwee RG, Stevenson LA, Griffin G. Cross tolerance between delta-9-tetrahydrocannabinol and the cannabimimetic agents, CP 55,940, WIN 55,212-2 and anandamide. *Br J Pharmacol* 1993; 110:1483-1490.
- Pertwee RG. Pharmacology of cannabinoid CB1 and CB2 receptors. *Pharmacol Ther* 1997; 74:129-180.
- Pertwee RG. Cannabinoids and the gastrointestinal tract. *Gut* 2001; 48:859-867.

- Pertwee R. Receptors and pharmacodynamics: natural and synthetic cannabinoids and endocannabinoids. En: *The medicinal uses of cannabis and cannabinoids*. London: Pharmaceutical Press; 2004. 103-117.
- Pertwee RG, Howlett AC, Abood ME y col. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXIX. Cannabinoid Receptors and Their Ligands: Beyond CB1 and CB2. *Pharmacol Rev* 2010; 62:588–631.
- Pilge S, Jordan D, Kreuzer M y col. Burst suppression-MAC and burst suppression-CP50 as measures of cerebral effects of anaesthetics. *British Journal of Anaesthesia* 112 (6): 1067–74 (2014).
- Plummer JL, Hall PM, Jenner MA y col. Effects of chronic inhalation of halothane, enflurane or isoflurane in rats. *Br J Anaesth* 1986; 58:517-523.
- Price HL. The significance of catecholamine release during anaesthesia. *Br J Anaesth* 1966; 38:705-711.
- Puig M y Montes A. Opioids: From receptors to clinical application. *Current Pain and Headache Reports* 1998; 2:234-241.
- Quasha AL, Eger EI II, Tinker JH. Determination and applications of MAC. *Anesthesiology* 1980; 53:315.
- Rabin BC, Guo TZ, Gregg K y col. Role of serotonergic neurotransmission in the hypnotic response to dexmedetomidine, an alpha 2-adrenoceptor agonist. *Eur J Pharmacol* 1996; 306:51-59.
- Rabin BC, Reid K, Guo TZ y col. Sympatholytic and minimum anesthetic concentration-sparing responses are preserved in rats rendered tolerant to the hypnotic and analgesic action of dexmedetomidine, a selective alpha(2)-adrenergic agonist. *Anesthesiology* 1996; 85:565-573.

- Rampil IJ, Laster MJ. No correlation between quantitative electroencephalographic measurements and movement response to noxious stimuli during isoflurane anesthesia in rats. *Anesthesiology* 1992; 77:920-925.
- Rampil IJ, Mason P, Singh H. Anesthetic potency (MAC) is independent of forebrain structures in the rat. *Anesthesiology* 1993; 78:707-712.
- Rampil IJ. Anesthetic potency is not altered after hypothermic spinal cord transection in rats. *Anesthesiology* 1994; 80:606-610.
- Rampil IJ, King BS. Volatile anesthetics depress spinal motor neurons. *Anesthesiology* 1996; 85:129-134.
- Rampil IJ, Laster MJ, Eger EI 2nd. Antagonism of the 5-HT(3) receptor does not alter isoflurane MAC in rats. *Anesthesiology* 2001; 95:562-564.
- Randall MD. Endocannabinoids and the haematological system. *Br J Pharmacol* 2007; 152:671-675.
- Reichle FM, Conzen PF. Halogenated inhalational anaesthetics. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol* 2003; 17:29-46.
- Reinscheid RK, Nothacker HP, Bourson A y col. Orphanin FQ: a neuropeptide that activates an opioidlike G protein-coupled receptor. *Science* 1995; 270:792-794.
- Reisine T, Pasternak G. Analgésicos opioides y sus antagonistas. En: *Las bases farmacológicas de la terapéutica*. 9a. ed. McGraw-Hill Co; 1996. 557-593.
- Rinaldi-Carmona M, Barth F, Heaulme M y col. SR141716A, a potent and selective antagonist of the brain cannabinoid receptor. *FEBS Lett* 1994; 350:240-244.
- Rinaldi-Carmona M, Barth F, Héaulme M y col. Biochemical and pharmacological characterisation of SR141716A, the first potent and selective brain cannabinoid receptor antagonist. *Life Sci* 1995; 56:1941-1947.

- Rinaldi-Carmona M, Barth F, Millan J y col. SR 144528, the first potent and selective antagonist of the CB2 cannabinoid receptor. *J Pharmacol Exp Ther* 1998; 284:644-650.
- Rioja García E. Efecto de la asociación de dexmedetomidina y midazolam sobre la concentración alveolar mínima de halotano e isoflurano en ratas. [Tesis doctoral]. Madrid: Universidad Complutense de Madrid; 2004.
- Rivera de los Arcos, L.. Fisiología del dolor. En: *Terapéutica del dolor (I)*, Monografía no52, Canis et Felis (Aula Veterinaria); 2001.
- Romero J, de Miguel R, Garcia-Palomero E y col. Time course of the effects of anandamide, the putative endogenous cannabinoid receptor ligand, on extrapyramidal function. *Brain Res* 1995; 694:223-232.
- Ross S, Foex P. Protective effects of anaesthetics I reversible and irreversible ischaemia-reperfusion injury. *Br J Anaesth* 1999; 82:622-32.
- Russo EB, Burnett A, Hall B y col. Agonistic properties of cannabidiol at 5-HT_{1a} receptors. *Neurochem Res* 2005; 30:1037-1043.
- Sanchez C, Galve-Roperh I, Canova C y col. Delta9-tetrahydrocannabinol induces apoptosis in C6 glioma cells. *FEBS Lett* 1998; 436: 6-10.
- Santos M, Kuncar V, Martínez-Taboada F y col. Large concentrations of nitrous oxide decrease the isoflurane minimum alveolar concentration sparing effect of morphine in the rat. *Anesth Analg* 2005;100, 404-408.
- Sañudo-Peña MC, Tsou K, Walker JM. Motor actions of cannabinoids in the basal ganglia output nuclei. *Life Sci* 1999; 65:703-713.
- Schäffer J, Piepenbrock S, Kretz F y col. Nalbuphine and tramadol for the control of operative pain in children. *Anesthesist* 1986; 35:408-413.

- Schwarz H, Blanco FJ, Lotz M. Anandamide, an endogenous cannabinoid receptor agonist inhibits lymphocyte proliferation and induces apoptosis. *J Neuroimmunol* 1994; 55:107-115.
- Schneider G, Mappes A, Neissendorfer T y col. EEG-based indices of anaesthesia: correlation between bispectral index and patient state index. *Eur J Anaesthesiol* 2004; 21:6-12.
- Sharpe, MD, Cuillerier DJ, Lee JK y col. Sevoflurane has no effect on sinoatrial node function or on normal atrioventricular and accessory pathway conduction in Wolff-Parkinson-White Syndrome during alfentanil/midazolam anesthesia. *Anesthesiology* 1999; 90:60-65.
- Shingu K, Eger El 2nd, Johnson BH. Hypoxia may be more important than reductive metabolism in halothane-induced hepatic injury. *Anesth Analg* 1982; 61:824-827.
- Shire D, Carillon C, Kaghad M y col. An amino-terminal variant of the central cannabinoid receptor resulting from alternative splicing. *J Biol Chem* 1995; 270:3726-3731.
- Silver RJ. The Endocannabinoid System of Animals. *Animals* 2019;9:686.
- Simoneau II, Hamza MS, Mata HP y col. The cannabinoid agonist Win 55, 212-2 suppresses opioid-induced emesis in ferrets. *Anesthesiology* 2001; 94:882-887.
- Skaper SD, Buriani A, Dal Toso R y col. The ALIAmide palmitoylethanolamide and cannabinoids, but not anandamide, are protective in a delayed postglutamate paradigm of excitotoxic death in cerebellar granule neurons. *Proc Natl Acad Sci U. S. A* 1996; 93:3984-3989.
- Snyder SH. Opiate receptors and internal opiates. *Sci Am* 1977; 236: 44.
- Snyder SH y Pasternak GW. Historical review: Opioid receptors. *Trends Pharmacol.Sci* 2003; 24:198-205.

- Sofuoglu M, Portoghesi PS, Takemori AE. Cross-tolerance studies in the spinal cord of beta-FNA-treated mice provides further evidence for delta opioid receptor subtypes. *Life Sci* 1991; 49:L153-L156.
- Sonner JM, Antognini JF, Dutton RC y col. Inhaled anesthetics and immobility: mechanisms, mysteries, and minimum alveolar anesthetic concentration. *Anesth Analg* 2003; 97:718-740.
- Stabernack C, Sonner JM, Laster M y col. Spinal N- methyl-d-aspartate receptors may contribute to the immobilizing action of isoflurane. *Anesth Analg* 2003; 96:102-107.
- Stefano GB, Digenis A, Spector S y col. Opiate-like substances in an invertebrate, an opiate receptor on invertebrate and human immunocytes, and a role in immunosuppression. *Proc Natl Acad Sci U.S.A* 1993; 90:11099-11103.
- Stefano GB, Esch T, Cadet P y col. Endocannabinoids as autoregulatory signaling molecules: coupling to nitric oxide and a possible association with the relaxation response. *Med Sci Monit* 2003; 9:RA63-RA75.
- Steffey EP, Howland D Jr. Isoflurane potency in the dog and cat. *Am J Vet Res* 1977; 38:1833-1836.
- Steffey EP, Zinkl J, Howland D Jr. Minimal changes in blood cell counts and biochemical values associated with prolonged isoflurane anesthesia of horses. *Am J Vet Res* 1979; 40:1646-1648.
- Steffey EP, Giri SN, Dunlop CI y col. Biochemical and haematological changes following prolonged halothane anaesthesia in horses. *Res Vet Sci* 1993; 55:338-345.
- Steffey EP. Inhalation anesthetics. En: Lumb & Jones Veterinary Anesthesia. 3a. ed. Edition. Eds. Thurmon JC, Tranquilli WJ y Benson GJ. Lippincott Williams & Wilkins, Maryland 1996:297-329.

- Steffey EP. Inhalation anesthetics. En *Veterinary Pharmacology & Therapeutics*. Ed. H. Richard Adams, 8a edición. Iowa State University Press 2001;184-212.
- Stein C. Peripheral mechanisms of opioid analgesia. *Anesth Analg* 1993; 76: 182-191.
- Stein C (comp). *Opioids in pain control. Basic and Clinical Aspects*. Cambridge: Press syndicate of the University of Cambridge; 1999.
- Stewart PE y Hammond DL. Evidence for delta opioid receptor subtypes in rat spinal cord: studies with intrathecal naltriben, cyclic[D-Pen2, D-Pen5] enkephalin and [D-Ala2, Glu4]deltorphan. *J Pharmacol Exp Ther* 1993; 266:820-828.
- Stinchcomb A, Challapalli P, Harris K, y col. Optimization of in vitro experimental conditions for measuring the percutaneous absorption of Δ^9 -THC, cannabidiol, and WIN55,212-2. 2001 Symposium on the Cannabinoids. Burlington (VT): International Cannabinoid Research Society, 2001: 161.
- Sugiura T, Kondo S, Sukagawa A y col. 2- Arachidonoylglycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 215:89-97.
- Sugiura T, Waku K. 2-Arachidonoylglycerol and cannabinoid receptors. *Chem Phys Lipids* 2000; 108: 89–106.
- Sugiura T, Kishimoto S, Oka S y col. Biochemistry, pharmacology and physiology of 2-arachidonoylglycerol, an endogenous cannabinoid receptor ligand. *Prog Lipid Res* 2006; 45:405-446.
- Sumariwalla PF, Gallily R, Tchilibon S y col. A novel synthetic, nonpsychoactive cannabinoid acid (HU-320) with antiinflammatory properties in murine collagen induced arthritis. *Arthritis Rheum* 2004; 50:985–998.

- Sumano López HS y Ocampo Camberos L. Analgésicos narcóticos. En: Farmacología Veterinaria. 3a. ed. México: McGraw-Hill Interamericana Editores S.A; 2006. 799-804.
- Sun Y, Bennett A. Cannabinoids: a new group of agonists of PPARs. PPAR Res. 2007; 2007:23513.
- Szabo B, Wallmicharh I, Mathonia P y col. Cannabinoids inhibit excitatory neurotransmission in the substantia nigra per reticulata. Neuroscience 2000; 97:89-97.
- Tabatabai M, Kitahata LM, Collings JG. Disruption of the rhythmic activity of the medullary inspiratory neurons and phrenic nerve by fentanyl and reversal with nalbuphine. Anesthesiology 1989; 70:489-495.
- Tantfuji Y, Eger EI 2nd. Effect of arterial hypotension on anaesthetic requirement in dogs. *Br J Anaesth* 1976; 48:947-951.
- Targ AG, Yasuda N, Eger EI 2nd y col. Halogenation and anesthetic potency. *Anesth Analg* 1989; 68:599-602.
- Tramer MR, Reynolds DJ, Moore RA y col. Efficacy, dose-response, and safety of ondansetron in prevention of postoperative nausea and vomiting: a quantitative systematic review of randomized placebo-controlled trials. *Anesthesiology* 1997; 87:1277-1289.
- Trapaidze N, Keith DE, Cvejic S y col. Sequestration of the delta opioid receptor. Role of the C terminus in agonist-mediated internalization. *J Biol Chem* 1996; 271:29279-29285.
- Turcotte C, Blanchet MR, Laviolette M y col. The CB(2) receptor and its role as a regulator of inflammation. *Cell Mol Life Sci.* 2016; 73: 4449-4470.
- Twitchell W, Brown S, Mackie K. Cannabinoids inhibit N- and P/Q-type calcium channels in cultured rat hippocampal neurons. *J Neurophysiol* 1997; 78:43-50.

- Van Sickle MD, Duncan M, Kingsley PJ y col. Identification and functional characterization of brainstem cannabinoid CB2 receptors. *Science* 2005; 310:329–332.
- Vatashsky E, Haskel Y, Nissan S y col. Effect of morphine on the mechanical activity of common bile duct isolated from the guinea pig. *Anesth y Analg* 1987;66:245-248.
- Vaysse PJ, Gardner EL, Zukin RS. Modulation of rat brain opioid receptors by cannabinoids. *J Pharmacol Exp Ther* 1987; 241:534-539.
- Vennekens R, Owsianik G, Nilius B. Vanilloid transient receptor potential cation channels: an overview. *Curr Pharm Des* 2008; 14:18-31.
- Veselis RA, Reinsel RA. Electroencephalographic effects of sedative hypnotics. *Anesthesiology* 1992; 77: 837–8.
- Vicente Sanchez A. Mecanismos reguladores implicados en la regulación entre receptores opioide mu-cannabinoide CB1 y glutamatérgico NMD. [Tesis doctoral]. Madrid: Universidad Complutense de Madrid; 2012.
- Viganò D, Rubino T, Parolaro D. Molecular and cellular basis of cannabinoid and opioid interactions. *Pharmacol Biochem Be* 2005; 81:360-368.
- Villarejo DM. Farmacología de los analgésicos opioides y sus antagonistas. En: *Farmacología aplicada a la anestesia (Intersistemas)*. Villarejo DM editores; 1998. tomo A-3: 5-18.
- Villarejo-Díaz M, Murillo-Zaragoza JR, Alvarado-Hernandez H. Farmacología de los agonistas y antagonistas de los receptores opioides. *Educación e Investigación Clínica* 2000; 2:106-137.
- Vinik HR, Kissin I. Rapid development of tolerance to analgesia during remifentanil infusion in humans. *Anesth Analg* 1998; 86:1307-1311.

- Vitez TS, Way WL, Miller RD y col. Effects of Delta-9-tetrahydrocannabinol on Cyclopropane MAC in the Rat. *Anesthesiology* 1973; 38:525-527.
- Wandless AL, Smart D, Lambert DG. Fentanyl increases intracellular Ca²⁺ concentrations in SH-SY5Y cells. *Br J Anaesth* 1977; 76:461-463.
- Wang MY, Rampil IJ, Kendig JJ. Ethanol directly depresses AMPA and NMDA glutamate currents in spinal cord motor neurons independent of actions on GABAA or glycine receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 1999; 290:362-367.
- Warner DS, Hindman BJ, Todd MM y col. Intracranial pressure and hemodynamic effect of remifentanyl vs alfentanil in patients undergoing supratentorial craniotomy. *Anesth Analg* 1996; 83:348-353.
- Watson NA, Beards SC, Altaf N y col. The effect of hyperoxia on cerebral blood flow: a study in healthy volunteers using magnetic resonance phase-contrast angiography. *Eur J Anaesthesiol* 2000; 17, 152-159.
- Weiskopf RB, Eger EI 2nd, Holmes MA y col. Epinephrine-induced premature ventricular contractions and changes in arterial blood pressure and heart rate during I-653, isoflurane, and halothane anesthesia in swine. *Anesthesiology* 1989; 70:293-298.
- Wendell C, Stevens Y, Harry G y col. Anestesia inhalatoria. En: *Anestesia Clínica*. México: McGraw-Hill interamericana; 1999. 425-453.
- Weksler B, NG B, Lenert J y col. A simplified method for endotracheal intubation in the rat. *J Appl Physiol* 1994; 76:1823-1825.
- Williams SJ, Hartley JP, Graham JD. Bronchodilator effect of delta1-tetrahydrocannabinol administered by aerosol of asthmatic patients. *Thorax* 1976; 31:720-723.
- White PF, Johnston RR, Eger EI 2nd. Determination of anesthetic requirement in rats. *Anesthesiology* 1974; 40:52-57.

- Won A, Oh I, Brosnan R y col (2006) Hypothermia decreases ethanol MAC in rats. *J Anesth* 20, 247-250.
- Yamamoto T, Nozaki-Taguchi N, Kimura S. Analgesic effect of intrathecally administered nociceptin, an opioid receptor-like 1 receptor agonist, in the rat formalin test. *Neuroscience* 1997; 81:249-254.
- Zhang Y, Wu S, Eger EI 2nd y col. Neither GABA(A) nor strychnine-sensitive glycine receptors are the sole mediators of MAC for isoflurane. *Anesth Analg* 2001; 92:123-127.
- Zhang Y, Laster MJ, Eger EI 2nd y col. Blockade of 5-HT_{2A} receptors may mediate or modulate part of the immobility produced by inhaled anesthetics. *Anesth Analg* 2003a; 97:475-479.
- Zhang Y, Laster MJ, Hara K y col. Glycine receptors mediate part of the immobility produced by inhaled anesthetics. *Anesth Analg* 2003b; 96:97-101.
- Zhang Y, Sonner JM, Eger EI 2nd y col. Gamma-aminobutyric acidA receptors do not mediate the immobility produced by isoflurane. *Anesth Analg* 2004; 99:85-90.
- Zhou HH, Jin TT, Qin B y col. Suppression of spinal cord motoneuron excitability correlates with surgical immobility during isoflurane anesthesia. *Anesthesiology* 1998; 88:955-961.
- Zhu W, Friedman H, Klein TW. Delta9-tetrahydrocannabinol induces apoptosis in macrophages and lymphocytes: involvement of Bcl-2 and caspase-1. *J Pharmacol Exp Ther* 1998. 286:1103-1109.
- Zoratti C, Kipmen-Korgun D, Osibow K y col. Anandamide initiates Ca²⁺ signaling via CB₂ receptor linked to phospholipase C in calf pulmonary endothelial cells. *Br J Pharmacol* 2003; 140:1351-1362.
- Zygmunt PM, Petersson J, Andersson DA y col. Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide. *Nature* 1999; 400:452-457.