

# UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID



**Grado en Biología**

**Mención: Biología Sanitaria**

**Curso académico 2015/2016**

**Trabajo de fin de grado**

## **Evaluación del efecto del agonista cannabinoide WIN 55,212-2 en el tratamiento de los efectos secundarios producidos por el fármaco antineoplásico 5-fluorouracilo en rata**

**AUTORA:** María Muñoz Huertas

**TUTORA:** Raquel Abalo Delgado (Universidad Rey Juan Carlos)

A handwritten signature in blue ink, reading 'Raquel Abalo', with a stylized flourish below it.

## Índice

<b>Resumen y palabras clave</b> .....	<b>2</b>
<b>1. Introducción</b> .....	<b>3</b>
1.1. Principales efectos secundarios de los fármacos antineoplásicos.....	4
1.1.1. Náuseas y vómitos.....	4
1.1.2. Diarrea.....	5
1.1.3. Neuropatía periférica.....	6
1.1.4. Dolor visceral.....	7
1.2. Efectos adversos del fármaco 5-Fluorouracilo.....	7
1.3. Cannabinoides.....	8
1.4. Hipótesis y objetivos.....	9
<b>2. Materiales y métodos</b> .....	<b>9</b>
2.1. Animales.....	9
2.2. Protocolo experimental.....	10
2.3. Estudio radiográfico de la motilidad gastrointestinal.....	11
2.4. Evaluación de neuropatía periférica.....	12
2.5. Tétrada cannabinoide.....	12
2.6. Sensibilidad visceral.....	13
2.7. Fármacos y compuestos.....	14
2.8. Análisis estadístico.....	14
<b>3. Resultados</b> .....	<b>15</b>
3.1. Motilidad gastrointestinal.....	15
3.1.1. Motilidad gastrointestinal: efecto inmediato.....	15
3.1.2. Motilidad gastrointestinal: efecto diferido.....	16
3.2. Neuropatía periférica.....	18
3.3. Tétrada cannabinoide.....	18
3.4. Sensibilidad visceral.....	19
<b>4. Discusión</b> .....	<b>20</b>
4.1. Motilidad gastrointestinal.....	21
4.2. Neuropatía periférica y efectos centrales.....	23
4.3. Sensibilidad visceral.....	24
<b>5. Conclusión</b> .....	<b>25</b>
<b>6. Bibliografía</b> .....	<b>26</b>

**Resumen:** Los efectos secundarios producidos por la quimioterapia anticancerosa suponen un problema para el que se han propuesto los cannabinoides como tratamiento (a pesar de su principal limitación, los efectos centrales). El antineoplásico 5-Fluorouracilo (5-FU) produce en los pacientes náuseas, vómitos, diarrea, neuropatía periférica y, posiblemente, dolor visceral. Se evaluó si el agonista cannabinoide WIN 55, 212-2 (WIN), a dosis no psicoactivas, puede ser efectivo para tratar dichos efectos secundarios. **Métodos:** Se administró WIN (1 mg/kg/día, intraperitoneal, 4 días) y/o 5-FU (150 mg/kg/día, intraperitoneal, 2 días) a 44 ratas Wistar, distribuidas en 4 grupos: vehículo+salino (n=10), WIN+salino (n=10), vehículo+5-FU (n=12) y WIN+5-FU (n=12). Se evaluó la motilidad gastrointestinal usando métodos radiográficos no invasivos (día 1 y 4), y la presencia de alodinia mecánica (test de von Frey) y los efectos psicoactivos del WIN (tétrada cannabinoide) (día 3). **Resultados:** El 5-FU produjo dismotilidad gástrica (pero no diarrea) y neuropatía periférica. El cannabinoide, sin efectos centrales, fue capaz de prevenir la neuropatía pero no la dismotilidad. **Conclusión:** Los cannabinoides, incluso a dosis no psicoactivas, podrían ser útiles para el tratamiento de algunos de los efectos secundarios de los antineoplásicos.

**Palabras clave:** Quimioterapia, cannabinoides, 5-Fluorouracilo, motilidad gastrointestinal, neuropatía periférica.

**Abstract:** Cancer chemotherapy induces important side effects which cannabinoids might palliate or even prevent. In patients, the antineoplastic drug 5-Fluorouracil (5-FU) produces nausea, emesis, diarrhea, peripheral neuropathy and, probably, visceral pain. The cannabinoid agonist WIN 55,212-2 (WIN) was used at a non-psychoactive dose to see if it avoids these side effects in a rat model. **Methods:** WIN (1 mg/kg/day, intraperitoneal, 4 days) and/or 5-FU (150 mg/kg/day, intraperitoneal, 2 days) were administered to 44 Wistar rats, distributed in 4 groups: saline+vehicle (n=10), saline+WIN (n=10), 5-FU+vehicle (n=12) and WIN+5-FU (n=12). We evaluated gastrointestinal motility with radiographic non-invasive methods (day 1 and 4), and the presence of mechanical allodynia (Von Frey test) and psychoactive effects of WIN (cannabinoid tetrad) (day 3). **Results:** 5-FU produced gastric dysmotility (but not diarrhea) and peripheral neuropathy. The cannabinoid, without central effects, prevented neuropathy but not gastric dysmotility. **Conclusion:** Cannabinoids, even at a non-psychoactive dose, could be useful to treat some chemotherapy-induced side effects.

**Keywords:** Chemotherapy, cannabinoids, 5-Fluorouracil, gastrointestinal motility, peripheral neuropathy.

## 1. Introducción

El cáncer es una de las enfermedades más importantes de nuestros días, siendo la segunda principal causa de muerte en nuestro país en el año 2014 ([www.ine.es](http://www.ine.es)). Entre los distintos tratamientos para el cáncer cabe destacar la quimioterapia, un método no quirúrgico muy habitual en el que se emplean agentes farmacológicos que acaban preferentemente con las células cancerígenas al aprovechar sus características únicas, como su rápida proliferación (Windebank & Grisold, 2008). Es el tratamiento de primera opción para muchos tipos de cáncer y casi siempre se usa de manera sistémica ([www.cancer.org](http://www.cancer.org)).

Existen muchos tipos de fármacos quimioterápicos (Tabla 1), todos ellos dirigidos a frenar la proliferación y/o crecimiento celular (Flórez, 2003).

Tipos	Acción	Ejemplos
Antimetabolitos	Interfieren en la síntesis de ADN y ARN (análogos estructurales o inhibidores de enzimas).	Análogos de pirimidinas (5-fluorouracilo), análogos de purinas (6-tioguanina)...
Productos naturales	Inhiben la mitosis (por unión a la tubulina) o las topoisomerasas; también alteran la membrana celular, se unen al ADN (antibióticos) o rompen compuestos proteicos (enzimas).	Unión a la tubulina: vincristina o paclitaxel Inhibidores de topoisomerasas: irinotecán, etopósido... Antibióticos: actinomicina D Enzimas: L-asparaginasa
Agentes alquilantes	Adicionan radicales altamente reactivos al ADN o proteínas, cambiando su estructura.	Complejos de platino (cisplatino), nitrosoureas (estrepozotozina), aziridinas (tiotepa)...
Otros (hormonas, anticuerpos monoclonales...)	Pueden ser muy importantes en tumores hormonodependientes; presentan muy diversos mecanismos.	Hormonas y antihormonas (glucocorticoides, andrógenos, estrógenos), anticuerpos monoclonales (trastuzumab)...

**Tabla 1. Tipos de fármacos antineoplásicos.** Clasificación de los diferentes tipos de fármacos usados en quimioterapia, junto con su mecanismo de acción y algunos ejemplos (adaptado de: Flórez, 2003).

Sin embargo, la quimioterapia provoca importantes efectos secundarios en los pacientes de cáncer (Tabla 2), tales como leucocitopenia, estomatitis, pérdida del apetito, diarrea, fiebre... (Tsuji *et al.* 2003). Las náuseas y vómitos son también algunos de los efectos adversos más comunes de muchos agentes quimioterapéuticos (Sharkey *et al.* 2014; Malik *et al.* 2015), junto con la neuropatía periférica (Windebank & Grisold, 2008; Fine & Rosenfeld, 2014) y el dolor

visceral (Shaiova 2006; Malik *et al.* 2015). Esto es debido a que la especificidad de los fármacos por las células tumorales es escasa, lo que ocasiona una frecuente afectación de otros órganos y tejidos, dando lugar a esta toxicidad, que muchas veces impide la administración de la dosis total de fármaco que sería conveniente para el paciente (Flórez, 2003).

Toxicidad	Efectos adversos	Fármacos
Inmediata (horas-días)	Náuseas y vómitos* Fiebre/escalofríos Erupción cutánea*	5-fluorouracilo, cisplatino... Bleomicina, interferón... Metotrexato, actinomicina D...
Temprana (días-semanas)	Leucocitopenia* Diarrea* Alopecia*	5-fluorouracilo, paclitaxel... 5-fluorouracilo, docetaxel... Bleomicina, vincristina...
Diferida (semanas-meses)	Anemia* Estreñimiento Neuropatía periférica	5-fluorouracilo, ciclofosfamida... Vincristina Cisplatino, 5-fluorouracilo...
Tardía (meses-años)	Fibrosis hepática Carcinoma de vejiga	Metotrexato Ciclofosfamida

**Tabla 2. Efectos secundarios de los antineoplásicos.** Se muestran algunos de los efectos adversos, según su orden de aparición (inmediato, temprano...), producidos por diferentes fármacos antineoplásicos. \*: Efectos adversos comunes a muchos fármacos (adaptado de: Flórez, 2003).

## 1.1. Principales efectos secundarios de los fármacos antineoplásicos

### 1.1.1. Náuseas y vómitos

La náusea es una experiencia adversa que a menudo va seguida del vómito o expulsión violenta del contenido gástrico. Ambos se encuentran entre los más desagradables efectos secundarios de la quimioterapia y pueden dar lugar a serios trastornos metabólicos, anorexia, y deterioro del estado físico y mental del paciente, lo que puede conducir a la interrupción del tratamiento (Craig y Powell, 1987; Passik *et al.* 2001). Cabe destacar que no todos los fármacos antineoplásicos producen el mismo grado de náuseas y emesis; por ejemplo, el cisplatino está entre los fármacos antitumorales más emetógenos mientras que el 5-fluorouracilo (5-FU) presenta un nivel emetógeno bajo (Jordan *et al.* 2005).

Entre un 25% y un 75% de los pacientes con quimioterapia han reportado náuseas y vómitos, que se han intentado tratar con diferentes antieméticos, como los antagonistas del receptor de serotonina, como el granisetron, y antagonistas del receptor de la sustancia P, como el aprepitant (Stern *et al.* 2011). Pero a pesar de los progresos realizados desde la introducción de estos fármacos, existe un número significativo de pacientes que todavía presentan náuseas y vómitos

inducidos por quimioterapia, por lo que es necesario seguir investigando para encontrar nuevos tratamientos que consigan prevenir o paliar estos efectos.

En la investigación preclínica uno de los animales más utilizados es la rata, pero ésta carece de reflejo del vómito ([www.ratbehavior.org](http://www.ratbehavior.org)), por lo que para el estudio de estos efectos adversos se utilizan marcadores indirectos, como son la pica, una alteración del comportamiento alimentario que consiste en la ingesta de sustancias no nutritivas, como caolín o serrín (Vera *et al.* 2006, 2007); o el retraso del vaciamiento gástrico (Badary *et al.* 2006; Cabezos *et al.* 2008, 2010; Takeda *et al.* 1993).

### **1.1.2. Diarrea**

La diarrea inducida por quimioterapia (CID) es un problema común en el tratamiento del cáncer que puede causar malnutrición y deshidratación (que frecuentemente requiere la hospitalización), lo que a su vez puede conducir a alteraciones cardiovasculares y a la muerte. Además, la diarrea puede interferir con el tratamiento contra el cáncer al causar retrasos o reducciones de la dosis que pueden tener un impacto en la supervivencia. La CID parece ser un proceso multifactorial en el que las lesiones agudas de la mucosa intestinal (mucositis: pérdida de epitelio intestinal, inflamación de la pared intestinal...) provocan un desequilibrio entre la absorción y la secreción en el intestino. La incidencia de CID es variable y se ha reportado entre el 50 y el 80 % de los pacientes, especialmente con aquellos tratados con 5-FU solo o en combinación con otros fármacos (Stein *et al.* 2010).

El tratamiento de la CID comprende intervenciones no farmacológicas (evitar alimentos que podrían agravar la diarrea, rehidratación oral con fluidos que contienen agua, sal y azúcar...) y farmacológicas, como la loperamida, un opioide que disminuye la motilidad intestinal y que no presenta efectos sistémicos a dosis terapéuticas (Andreyev *et al.* 2014; Dupont 1997, Stein *et al.* 2010). Sin embargo, su uso se ha relacionado con dolor epigástrico y abdominal, distensión abdominal, constipación, xerostomía, náuseas y vómitos ([www.iqb.es](http://www.iqb.es)), por lo que también es interesante investigar sobre nuevos tratamientos frente a este efecto secundario tan importante.

Cabe destacar que se han desarrollado varios modelos animales para la investigación de la mucositis del tracto digestivo, que, como ya se ha señalado, suele dar lugar a la aparición de diarrea. Se han utilizado hámsteres, ratones, ratas... con el fin de determinar los cambios morfológicos (hasta ahora no del todo conocidos) que se producen en la mucosa tras la administración de los fármacos quimioterápicos (y otros agentes citotóxicos) y también los efectos de los tratamientos utilizados para la mucositis (Logan *et al.* 2007). Uno de los modelos

más utilizados ampliamente para investigar la mucositis inducida por quimioterapia es la rata Dark agoutí hembra (Vanhoecke *et al.* 2015), en el que se han investigado varios fármacos antineoplásicos como el irinotecán, el metotrexato y el 5 –FU.

### **1.1.3. Neuropatía periférica**

La neuropatía periférica es el daño del sistema nervioso periférico y es uno de los principales efectos adversos de la quimioterapia, que no sólo reduce la calidad de vida de los pacientes, sino que también puede provocar la interrupción del tratamiento. Es uno de los efectos adversos más comunes y se suele observar tras el tratamiento con alcaloides de la vinca, taxanos, compuestos derivados del platino...

La incidencia de neuropatía varía entre el 10% y el 100% y tanto su aparición, como su gravedad dependen de varios factores, como la dosis del fármaco o condiciones médicas concomitantes tales como la diabetes o el alcoholismo (Cata *et al.* 2006; Windebank y Grisold, 2008). Se han identificado más de 100 tipos de neuropatía periférica, cada uno con sus propias características, y los síntomas dependen del tipo de nervio (motor, sensorial o autónomo) que esté dañado. En el caso de los nervios sensoriales, los síntomas se describen como entumecimiento y hormigueo en más de un 90% de los pacientes y como una sensación excesivamente dolorosa en un 26%; incluso puede verse afectada la capacidad para sentir dolor o los cambios de temperatura. Por ejemplo, los receptores de dolor en la piel pueden tornarse excesivamente sensibles, por lo que las personas afectadas presentan alodinia, es decir, sienten dolor agudo con estímulos que son normalmente indoloros ([www.ninds.nih.gov](http://www.ninds.nih.gov)).

En cuanto al tratamiento, se han probado muchos compuestos (acetilcisteína, glutatión, vitamina E...), pero hasta la fecha no se puede concluir que estos sean eficaces a la hora de impedir o limitar la neurotoxicidad entre los pacientes, al menos entre aquellos tratados con compuestos derivados del platino (Albers *et al.* 2011). Por lo tanto, la ausencia de tratamientos eficaces hace que la identificación de nuevos compuestos sea fundamental.

Se han desarrollado modelos animales de neuropatía periférica en ratas y ratones para cisplatino, vincristina y paclitaxel (Cata *et al.* 2006) en los que los animales han demostrado respuestas exageradas a la estimulación mecánica. Sin embargo, no hay estudios de neuropatía sobre otros fármacos como el 5-FU que, aunque en raras ocasiones, también ha demostrado causar neuropatía periférica en algunos pacientes (Werbrouck *et al.* 2008).

#### **1.1.4. Dolor visceral**

El dolor visceral resulta de la activación de los nociceptores situados en la cavidad torácica, la pelvis, o vísceras abdominales, que son sensibles a la distensión, la isquemia, y la inflamación. Este dolor es difuso, a menudo difícil de localizar, y por lo general acompañado por dolor referido (Malik *et al.* 2015). Puede ser descrito como un dolor sordo, agudo y profundo, intermitente o continuo, y que a menudo puede ser percibido como una debilidad generalizada; no está bien localizado y puede ir acompañado de otros síntomas, como náuseas, fatiga y exceso de sudoración (Shaiova, 2006).

El dolor visceral puede afectar hasta al 25% de la población, entre ellos pacientes oncológicos, debido a la presión del tumor, a la metástasis o al propio tratamiento del cáncer. El tratamiento suele consistir en la administración de analgésicos opiáceos, entre otros compuestos (Shaiova 2006); estos fármacos suelen producir estreñimiento, lo cual podría agravar el dolor del paciente, por lo que sería muy útil investigar y desarrollar tratamientos alternativos para aliviar este efecto secundario de los fármacos antineoplásicos.

#### **1.2. Efectos adversos del fármaco 5-fluorouracilo**

Para este trabajo se ha escogido como fármaco antineoplásico el 5-FU, un análogo del uracilo, utilizado para el tratamiento de diversos tipos de tumores sólidos (cáncer de estómago, colon, y cáncer de mama) solo o en combinación con otros fármacos ([www.aemps.gob.es](http://www.aemps.gob.es)). Sus efectos secundarios más típicos son la leucocitopenia, trastornos gastrointestinales tales como mucositis, anorexia... Cabe destacar que suele producir diarrea acuosa, así como náuseas y vómitos, aunque estos últimos efectos con menos frecuencia e intensidad que otros antineoplásicos como el cisplatino, ([www.aemps.gob.es](http://www.aemps.gob.es)). También se han dado casos de neuropatía periférica (Werbrouck *et al.* 2008) en tratamientos con este fármaco. Por otra parte, a pesar de no haberse reportado estudios experimentales que hayan valorado la presencia de dolor visceral asociado al uso de 5-FU, al producir este fármaco mucositis intestinal, cabe esperar que también pueda provocar hipersensibilidad visceral.

Por lo tanto, el 5-FU potencialmente puede producir todos los efectos secundarios de interés para este trabajo. Algunos de estos efectos secundarios (náuseas y vómitos, evaluados indirectamente como dismotilidad gástrica o pica en rata, diarrea, neuropatía) se han estudiado utilizando diferentes antineoplásicos y por separado (Pascual *et al.* 2005; Tsuji *et al.* 2003; Vera *et al.* 2006, 2013). En este trabajo se evaluarán todos ellos en el mismo modelo animal, lo que permite una aproximación mucho más traslacional a la clínica.

### 1.3. Cannabinoides

La planta *Cannabis sativa* se ha utilizado durante cientos de años tanto con fines medicinales como recreativos. Esta planta contiene al menos 70 cannabinoides diferentes, una familia de compuestos químicos que ejercen la mayor parte de sus acciones mediante la unión y activación de receptores acoplados a proteínas G, conocidos como receptores cannabinoides CB1 y CB2, que se diferencian en su patrón de expresión. Los receptores CB1 se expresan principalmente en el sistema nervioso central y periférico, incluyendo el sistema nervioso entérico, mientras que los receptores CB2 aparecen en las células inmunes (Malik *et al.* 2015; Chakravarti *et al.* 2014). Estos receptores unen diferentes tipos de ligandos: *endocannabinoides*, que se producen naturalmente en nuestro cuerpo y el de otros animales y forman parte del sistema endocannabinoide junto con los receptores y las enzimas que sintetizan y degradan los ligandos; *fitocannabinoides*, que se encuentran en la *Cannabis sativa* y algunas otras plantas; y los cannabinoides sintéticos, que se fabrican químicamente, como por ejemplo el WIN 55, 212-2 (WIN), un agonista cannabinoide no selectivo (Chakravarti *et al.* 2014).

Los cannabinoides se han utilizado desde hace mucho tiempo para tratar muchos problemas de salud, incluyendo vómitos, dolor abdominal y diarrea (ya que controlan la actividad motora gastrointestinal, disminuyen la contractilidad, y reducen el contenido acuoso luminal). También se han propuesto para el tratamiento de diversas enfermedades, incluyendo enfermedades neurodegenerativas (Alzheimer, Parkinson...), dolor neuropático y dolor inflamatorio... En cuanto a su papel en el cáncer, los efectos paliativos de los cannabinoides incluyen inhibición de náuseas y vómitos que están asociados con la quimioterapia, estimulación del apetito, alivio del dolor, elevación del humor y alivio del insomnio (Chakravarti *et al.* 2014, Duncan *et al.* 2005). A pesar de que se conocen desde hace mucho algunos de estos efectos beneficiosos, no ha sido hasta hace poco cuando se ha conseguido evidencia científica de la utilidad de los cannabinoides (Davis *et al.* 2007). Se han estudiado diferentes efectos de los cannabinoides en la motilidad gastrointestinal, en relación con náuseas y vómitos y también en relación con distintos tipos de dolor, como el dolor neuropático (sobre todo el producido por cisplatino, vincristina y paclitaxel) o el dolor visceral asociado a procesos inflamatorios (Abalo *et al.* 2012; Fine *et al.* 2014; Malik *et al.* 2015).

Sin embargo, los cannabinoides también presentan desventajas, fundamentalmente debido a la activación de receptores CB1 centrales, que puede ocasionar efectos psicoactivos que limitan su uso terapéutico. En roedores, la depresión central inducida por los cannabinoides se

caracteriza por cuatro signos: hipotermia, analgesia, catalepsia y déficit en el rendimiento motor, lo que se conoce como tétrada cannabinoide (Pertwee, 1972).

A pesar de todas las evidencias sobre la posible utilidad de los cannabinoides como tratamiento para los efectos secundarios de la quimioterapia, existen pocos datos, sobre todo aquellos obtenidos a partir de un mismo modelo animal, más traslacional. Por ello, en este trabajo proponemos un único modelo animal en el que estudiaremos los efectos de un cannabinoide (WIN 55,212-2) sobre diferentes efectos adversos del 5-FU, un antineoplásico poco utilizado en estudios anteriores pero de gran interés clínico.

#### **1.4. Hipótesis y objetivos**

*Hipótesis:* Los cannabinoides podrían ser útiles para tratar los efectos adversos de los fármacos empleados en la quimioterapia.

*Objetivo general:* Evaluar si los cannabinoides podrían ser útiles para el tratamiento o prevención de los efectos secundarios de la quimioterapia.

*Objetivo específico:* Evaluar si el agonista cannabinoide WIN 55,212-2, a dosis no psicoactivas, es útil para el tratamiento o prevención de los efectos secundarios producidos por el fármaco antineoplásico 5-fluorouracilo en rata.

## **2. Materiales y métodos**

Los experimentos llevados a cabo en el presente trabajo fueron diseñados para minimizar el número de animales utilizados así como su sufrimiento y fueron realizados en estricto acuerdo con la legislación europea y española sobre el cuidado y uso de animales de experimentación (Directiva de la UE 2010/63/UE para los experimentos con animales; R.D 53/2013), y aprobados por el Comité de Ética de la Universidad Rey Juan Carlos (URJC). Conforme al reglamento, la manipulación de los animales y el diseño de los experimentos fueron llevados a cabo, respectivamente, por personal cualificado con categoría B y C de investigación con animales.

### **2.1. Animales**

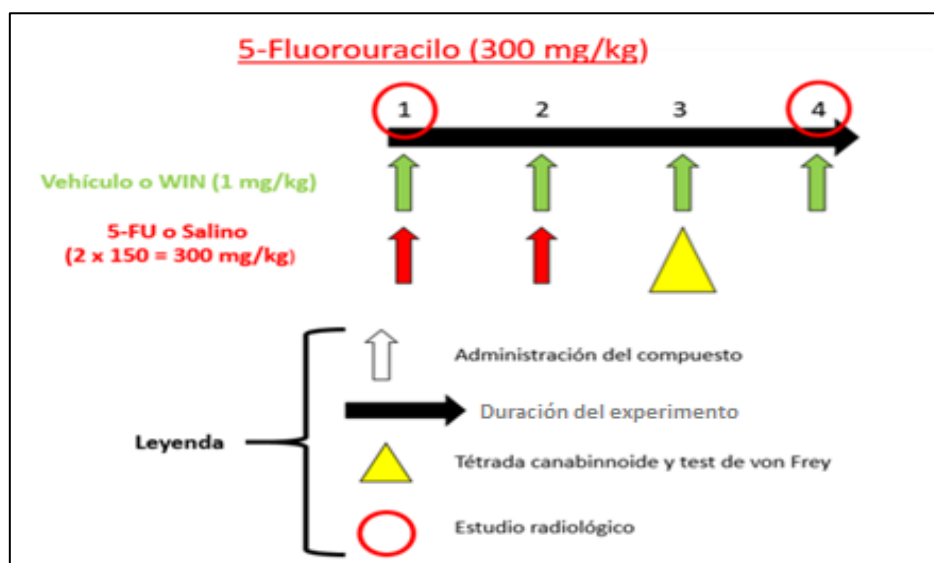
Para el presente trabajo se utilizaron ratas Wistar macho adultas (250 g al inicio del experimento, n = 44) procedentes de la Unidad Veterinaria de la URJC. Estas fueron alojadas en jaulas transparentes estándar (60 x 40 x 20 cm; 4 animales/jaula) provistas de virutas de madera que se cambiaban cada 3-4 días. Las jaulas permanecieron en el animalario colocadas

próximas unas a otras en condiciones ambientales controladas (temperatura = 20°C, humedad = 60%), con un ciclo de 12 h/luz 12 h/oscuridad. Los animales tuvieron libre acceso tanto a pienso estándar de rata de laboratorio (Teklad 20/14, Envigo) como a agua estéril.

## 2.2. Protocolo experimental

Para este estudio se establecieron 4 grupos experimentales: vehículo+suero salino (n=10); vehículo+5-FU (n=12); WIN+suero salino (n=10); y WIN+5-FU (n=12). Las dosis diarias de WIN fueron de 1 mg/kg (0,5 mL por animal) y las de 5-FU fueron de 150 mg/kg (2 mL por animal). Como se muestra en la Figura 1 esquemáticamente, el experimento duró 4 días y comenzó con la administración, por vía intraperitoneal, en el día 1, de WIN (1 mg/kg) o su vehículo (0,5 mL) y, 20 minutos después, de 5-FU (150 mg/kg) o suero salino (0.5 mL). Esta pauta se repitió al día siguiente (día 2), alcanzando así una dosis acumulativa de 5-FU de 300 mg/kg. Los días 3 y 4 los animales continuaron recibiendo WIN o su vehículo, pero no se realizó ninguna administración del antitumoral o el suero salino.

Tanto el día 1 como el día 4 se realizó, a los 20 minutos de la administración del tratamiento, un estudio radiográfico de la motilidad gastrointestinal. Esto nos permitió caracterizar el efecto del 5-FU en la motilidad general del tracto digestivo a una dosis de 150 mg/kg (efecto inmediato) y a una dosis acumulativa de 300 mg/kg (efecto diferido), respectivamente. Durante el día 3 se evaluó el comportamiento de los animales (20 minutos después de la administración del WIN) mediante la prueba de la tétlada cannabinoide (para determinar posibles efectos centrales) y el test de von Frey (para detectar la posible presencia de neuropatía periférica inducida por 5-FU). El experimento se repitió en lotes de 3-4 animales/lote, hasta completar el número de animales indicado para cada grupo experimental.



**Figura 1. Esquema del protocolo experimental.** La flecha negra indica la duración del experimento en días. Los círculos rojos indican la realización de las radiografías y el triángulo amarillo el estudio de comportamiento. Las flechas verticales indican el día de administración y el tipo de tratamiento, ya sea WIN/vehículo (verde) o 5-FU/suero salino (rojo).

En el protocolo se estableció como grupo control al grupo vehículo + suero salino ya que en trabajos anteriores (Abalo *et al.* 2009, 2011; Vera *et al.* 2013) la administración del vehículo del cannabinoide a los animales no indujo ninguna alteración significativa en la motilidad gastrointestinal, en la pruebas de la tétada cannabinoide ni en el umbral de alodinia mecánica.

### **2.3. Estudio radiográfico de la motilidad gastrointestinal**

La motilidad gastrointestinal general de los animales se evaluó de modo no invasivo mediante el uso de un contraste radiológico, sulfato de bario (Barigraf® A.D., 2 g/mL, T°= 22°C), administrado a los animales (2,5 mL/animal) mediante el uso de una cánula orogástrica a los 20 minutos de la administración de los fármacos.

Las radiografías se realizaron utilizando un aparato de rayos X (CS2100, Carestream Dental, 60 kV, 7 mA), con una distancia focal fijada manualmente a 50±1 cm y un tiempo de exposición de 20 ms, en una sala emplomada. Durante el uso del aparato el investigador permanecía fuera de la sala para evitar la exposición a los rayos X.

Estas radiografías fueron realizadas inmediatamente después de la administración del sulfato de bario (T0) y pasadas 1, 2, 4, 6 y 8 horas tras la administración del contraste (T1-T8). Para ello, se emplearon chasis equipados con una pantalla intensificadora y una placa radiológica (Carestream Dental, 15 x 30 cm). Cada chasis era dividido en cuatro partes o posiciones con dimensiones similares que serían ocupadas por cuatro animales distintos. Para evitar la exposición del resto de posiciones de la placa mientras que sólo una de ellas estaba ocupada por el animal para la radiografía, se utilizaron placas de plomo que además permitían delimitar el espacio donde se debía colocar el animal. Las ratas, no anestesiadas, eran inmovilizadas en posición de decúbito prono mediante un cepo de plástico transparente y ajustable al tamaño del animal.

Las radiografías fueron reveladas en un procesador automático Kodak X-OMAT 2000 (Kodak AG, Stuttgart, Alemania), y se analizaron siguiendo un método semicuantitativo (Cabezas *et al.*, 2008), mediante la asignación de un valor para cuatro regiones gastrointestinales distintas: estómago, intestino delgado, ciego y colorrecto (presencia de bolos fecales). En cada una de ellas se evaluaban 4 parámetros: proporción del órgano marcado, intensidad del marcaje, perfil

del órgano y homogeneidad del marcaje en el órgano. Los dos primeros parámetros se evaluaban asignando un número del 1 al 4 y los dos últimos del 1 al 2, teniendo cada órgano una puntuación mínima de 0, si no se observa marcaje alguno, y una puntuación máxima de 12 al sumar la puntuación de los 4 parámetros evaluados. La valoración de cada una de las regiones se llevó a cabo según se observa en la Tabla 3.

Puntuación	Proporción del órgano marcado	Intensidad del marcaje	Perfil del órgano	Homogeneidad del marcaje en el órgano
0	No hay marcaje			
0-1	<25%	Débil (sombra)	No bien definido	Heterogéneo
2	25-50%	Ligero	Bien definido	Homogéneo
3	50-75%	Moderado		
4	75-100%	Fuerte		

**Tabla 3. Parámetros para la evaluación de la motilidad gastrointestinal.** Para la evaluación nos centramos en el área marcada más intensamente de cada una de las regiones (estómago, intestino delgado, ciego y colorrecto). Como excepción, el estómago y el ciego se consideraron como un todo cuando se evaluaron los dos últimos parámetros (perfil y homogeneidad).

#### 2.4. Evaluación de neuropatía periférica

Con el test de von Frey se valoró la presencia de alodinia mecánica (como signo de neuropatía periférica). Para ello, las ratas se colocaron individualmente sobre una malla de hierro elevada y cubiertas por una jaula de plástico transparente (26,5 x 20,5 x 14,5 cm) y se les permitió adaptarse al entorno de la prueba durante al menos 10 min. Se colocó un espejo debajo de la malla, para poder observar mejor la planta de las patas de la rata. Se aplicaron en la planta de cada pata trasera filamentos calibrados de von Frey (4, 8, 10, 15, 26 y 60 g, siendo este último el punto de corte) a través de la malla, empezando por el filamento más pequeño. Cada estímulo se aplicó durante aproximadamente 1 s con un intervalo entre estímulos de unos 3 s. Sólo se consideró como respuesta la retirada brusca de la pata. Por otro lado, se consideró como resultado positivo la obtención de 3 o más respuestas de retirada de 5 intentos consecutivos con cada filamento. Cuando se obtenían menos de 3 retiradas, se repetía el proceso con el siguiente filamento.

#### 2.5. Tétrada cannabinoide

En la prueba de la tétada cannabinoide se evaluó la temperatura, hiperalgesia, catalepsia y motilidad (hipoquinesia) de cada uno de los animales tras la administración del cannabinoide WIN o su vehículo.

La temperatura se midió utilizando un termómetro de P6 y una sonda rectal lubricada (Cibertec, España) que se insertó en el recto del animal hasta unos 5 cm de profundidad.

La hiperalgesia al calor de las patas traseras de la rata se midió usando métodos descritos anteriormente (Bennett & Hargreaves, 1990); para ello se midió el tiempo que tardaba la rata en retirar las extremidades posteriores de un haz de calor radiante aplicado a la superficie plantar de cada pata trasera usando un aparato de plantar test (Ugo Basile, Italia). La rata se colocó dentro de un compartimento de plástico sobre una superficie de vidrio bajo la cual se puso el aparato: cuando el reflejo de retirada del animal interrumpía el haz de luz, ésta se apagaba automáticamente junto con un temporizador que se había encendido a la vez que el estímulo calorífico. El tiempo de retirada se midió durante 3 ensayos a intervalos de 2 min y se realizó la media para el análisis de datos.

La catalepsia se midió usando una modificación de la "prueba del anillo" (Pertwee, 1972). Se utilizó un cilindro de plástico en cuya parte superior se colocaron las patas delanteras del animal, estando la rata estirada y en una posición incómoda. Se midió entonces el tiempo que tardaba el animal en cambiar de postura durante un tiempo máximo de 30 s. Estas medidas se repitieron 5 veces por rata y se realizó una media de los datos.

La actividad locomotora espontánea se evaluó utilizando cámaras individuales de actividad equipadas con células fotoeléctricas (Cibertec, España). Las ratas se colocaron en las cámaras (55 × 40 cm, con un espacio entre haces de luz de 3 cm) en las que se registró durante 30 minutos el número de interrupciones de los haces de las células fotoeléctricas provocadas por el movimiento del animal.

## **2.6. Sensibilidad visceral**

Además del protocolo presentado, en un grupo pequeño de animales se inició la puesta en marcha de un método para evaluar las posibles alteraciones en la sensibilidad visceral inducidas por el 5-FU y los efectos que podría tener el WIN sobre ellas. Para ello se utilizaron 4 de las ratas empleadas anteriormente pertenecientes al grupo vehículo + suero salino a los 12-16 días de finalizar el protocolo anterior.

Para evaluar este parámetro, se usó un balón de látex de 5 cm de largo insertado por vía rectal. Para ello se sedó a los animales con clorhidrato de medetomidina (Sedator®, Dechra, 1 mg/ml; 0,35 mL/300g) y previamente al sondaje del animal, se dibujó una línea longitudinal de 10 cm sobre el abdomen de la rata desde el pene hacia la cabeza, siguiendo la línea alba y sobre ésta

unas líneas transversales de 4 cm a intervalos de 2 cm (con esto podríamos observar más fácilmente las contracciones abdominales que se produjeran durante el experimento). Tras esto, insertamos la sonda, previamente lubricada con vaselina, hasta una longitud de 7 cm marcada previamente y la fijamos a la cola de la rata utilizando Parafilm®. Después revertimos el estado de sedación con hidrocloreto de atipamezol (Revertor®, Virbac, 5 mg/ml; 0,25 mL/300g). Seguidamente, se situó al animal en una jaula transparente (26,5 x 20,5 x 14,5 cm) elevada y se colocó una cámara de vídeo debajo de la jaula. Se realizó un registro del comportamiento basal de la rata durante 5 min y su respuesta a presiones crecientes del balón de látex alojado en el colon; con un esfigmomanómetro aumentamos la presión pasando de 0 mmHg a 75 mmHg a intervalos de 5 minutos en pasos de 15 mmHg. El experimento finalizó con un último periodo de 5 minutos a 0 mmHg, con lo que la duración total del mismo fue de 40 min. Al terminar se sacrificó al animal mediante sobredosis de pentobarbital sódico (Dolethal®, Vetoquinol, 200 mg/mL; 0,6 mL/300g).

Para la valoración de la sensibilidad visceral analizamos la presencia y la duración de las contracciones abdominales, tanto durante el experimento como posteriormente, utilizando los vídeos realizados a lo largo del mismo, que fueron descompuestos en fotogramas (1 fotograma/s). De estos análisis se obtuvieron finalmente 3 parámetros en cada intervalo de presión: número y duración de las contracciones, y porcentaje de tiempo en contracción.

## **2.7. Fármacos y compuestos.**

El antitumoral 5-fluorouracilo (Sigma-Aldrich, España), se dispersó en suero salino al 0.9% mediante sonicación.

El cannabinoide WIN 55, 212-2 (Tocris Bioscience, Bristol, Reino Unido) se diluyó en su vehículo (Tocrisolve®, Tocris Bioscience, Bristol, Reino Unido), y en suero salino al 0.9% en una proporción suero salino/vehículo de 32:1.

El sulfato de bario (Barigraf® A.D., Juste, S.A.Q.F., Coslada, Madrid, España) fue suspendido en agua destilada en una proporción contraste/agua de 2:1 y continuamente agitado a mano para evitar la precipitación del compuesto hasta la administración.

## **2.8. Análisis estadístico**

Los datos se presentan como el valor de la media  $\pm$  SEM (error estándar de la media). Las diferencias entre grupos fueron analizadas utilizando una ANOVA de una o dos vías seguida de una prueba *post-hoc* de Bonferroni para comparaciones múltiples. También se utilizó la

prueba t de Student, con corrección de Welch cuando fue necesario. Los valores de  $p < 0.05$  fueron considerados significativamente diferentes. Los gráficos fueron realizados con Microsoft Excel 2013 (Microsoft Corporation, Santa Rosa, California) y su análisis se realizó con GraphPad Prism 5 para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, EEUU).

### **3. Resultados**

#### **3.1. Motilidad gastrointestinal**

Este parámetro se valoró mediante métodos radiográficos no invasivos el día 1 del protocolo experimental (Figura 2) y el día 4 (Figura 3), pasados 20 minutos de la administración de los fármacos e inmediatamente después de la administración de sulfato de bario (2,5 mL, 2 g/mL) con una sonda orogástrica.

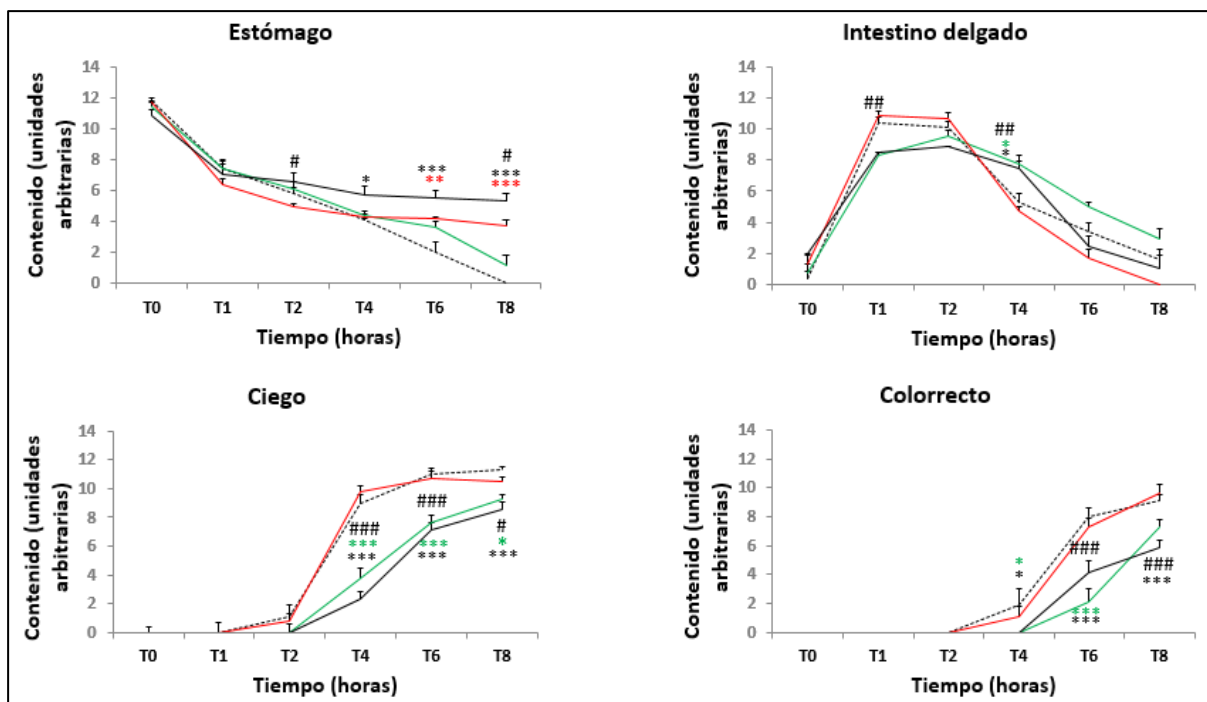
##### **3.1.1. Motilidad gastrointestinal: efecto inmediato**

El día 1 del protocolo y tras la administración de una concentración de 150 mg/kg de 5-FU y 1 mg/kg de WIN se obtuvieron los resultados que se observan en la Figura 2.

La administración aguda de WIN en ausencia de antitumoral y en comparación con el grupo vehículo+suero salino no produjo ningún efecto significativo en el estómago (aunque presentó una ligera tendencia a frenar el vaciamiento); sin embargo, sí produjo un retraso ligero pero significativo en un punto temporal (T4) del vaciado del intestino delgado (y también mostró cierta tendencia a retrasar su vaciamiento). En cuanto al ciego y al colon, el WIN produjo un retraso significativo de su llenado en comparación con el grupo control.

Por otro lado, la administración aguda de 5-FU produjo un claro y significativo retraso del vaciamiento del estómago, en comparación con el grupo control. Sin embargo no presentó diferencias significativas al compararlo con el grupo control en las demás regiones.

Por último, la administración conjunta de WIN y 5-FU el día 1 del experimento dio lugar a un retraso acusado y significativo del vaciamiento gástrico en comparación con el grupo control e incluso con el grupo tratado solamente con el antitumoral. Se observaron también diferencias con estos dos grupos en el resto de tramos del tracto digestivo, retrasando por un lado el vaciamiento del intestino delgado y por otro el llenado tanto del ciego como del colorrecto, aunque en estas regiones, no hubo diferencias clínica y estadísticamente relevantes con el grupo que recibió sólo el cannabinoide.



**Figura 2. Análisis radiográfico de los efectos inmediatos del 5-FU y del WIN en la motilidad gastrointestinal general.** Se evaluó el efecto de los fármacos durante el día experimental 1 en cada uno de los grupos experimentales: vehículo+salino (n=10, línea discontinua), WIN+salino (n=10, dosis de WIN de 1 mg/mg, línea verde), vehículo+5-FU (dosis de 5-FU de 150 mg/kg, n=12, línea roja), y WIN+5-FU (dosis de WIN de 1 mg/kg, dosis de 5-FU de 150 mg/kg, n=12, línea negra). Las líneas muestran los resultados como el valor de la media  $\pm$  S.E.M. Análisis estadístico: ANOVA de dos vías seguido de un test *post-hoc* de Bonferroni; \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  vs vehículo + suero salino, #  $p < 0,05$ ; ##  $p < 0,01$ ; ###  $p < 0,001$  vs vehículo + 5-FU.

### 3.1.2. Motilidad gastrointestinal: efecto diferido

El día 4 del protocolo, con una dosis acumulativa de 300 mg/kg de 5-FU y la administración de otra dosis de 1 mg/kg de WIN, se obtuvieron los resultados que se observan en la Figura 3.

La administración crónica de WIN durante 4 días en ausencia de 5-FU no dio lugar a ninguna alteración significativa de la motilidad gástrica ni intestinal en comparación con el grupo control. En cuanto al ciego y al colon, sí que disminuyó significativamente su llenado en un principio, pero esta tendencia se normalizó a medida que avanzó el tiempo.

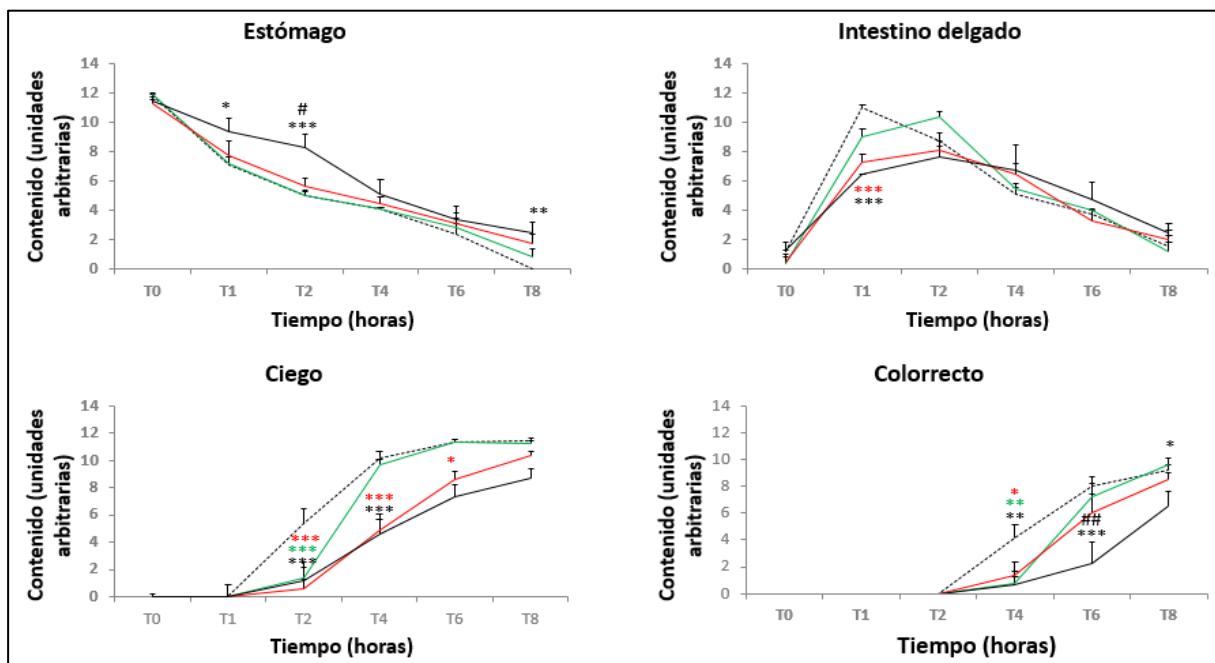
En cuanto al 5-FU, no se produjeron diferencias significativas en la motilidad gástrica con respecto al grupo control y no apareció el retraso del vaciamiento del estómago observado en el día 1 del experimento. Sí que se observaron diferencias significativas en el intestino delgado con respecto a los animales tratados con vehículo y suero salino, produciéndose un retraso en el llenado del órgano. Sin embargo esta tendencia de disminución de la motilidad intestinal se

normalizó con el tiempo. Por otro lado, produjo un retraso significativo en el llenado del ciego y también el del colon, aunque menos acusado.

Por último, la administración conjunta de WIN y 5-FU dio lugar a un retraso significativo del vaciamiento gástrico en comparación con el grupo control y con el grupo vehículo+5-FU, aunque de forma más leve que en el día 1. También se observó un retraso significativo en el llenado del intestino delgado, pero este parámetro se normalizó con el tiempo.

Finalmente, la combinación del cannabinoide y el antitumoral retrasó significativamente el llenado tanto del ciego como de la región colorrectal en comparación con el grupo control (y también comparando con el grupo vehículo+5-FU en el caso del colorrecto).

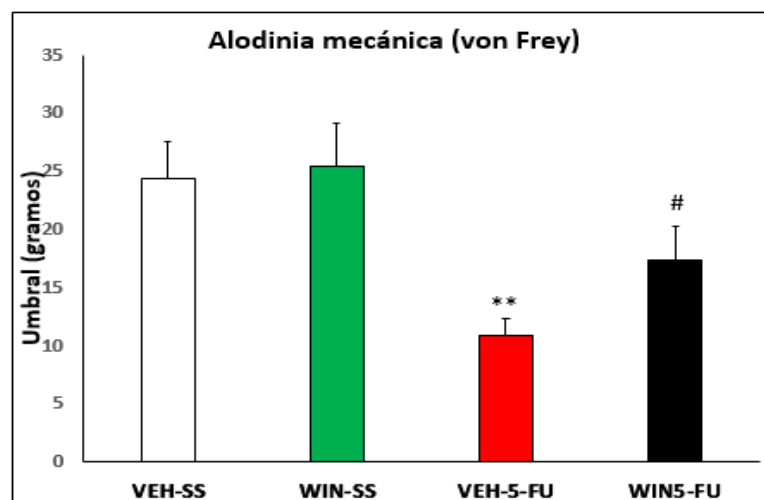
No se observó diarrea en ninguna de las ratas tratadas con el antineoplásico.



**Figura 3. Análisis radiográfico de los efectos diferidos del 5-FU y del WIN en la motilidad gastrointestinal general.** Se evaluó el efecto de los fármacos durante el día experimental 4 en cada uno de los grupos experimentales: vehículo+suero salino (n=10, línea discontinua), WIN+suero salino (n=10, dosis de WIN de 1 mg/mg, línea verde), vehículo+5-FU (dosis acumulativa de 5-FU de 300 mg/kg, n=12, línea roja), y WIN+5-FU (dosis de WIN de 1 mg/kg, dosis acumulativa de 5-FU de 300 mg/kg, n=12, línea negra). Las líneas muestran los resultados como el valor de la media  $\pm$  S.E.M. Análisis estadístico: ANOVA de dos vías seguido de un test *post-hoc* de Bonferroni; \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  vs vehículo + suero salino, #  $p < 0,05$ ; ##  $p < 0,01$  vs vehículo + 5-FU.

### 3.2. Neuropatía periférica

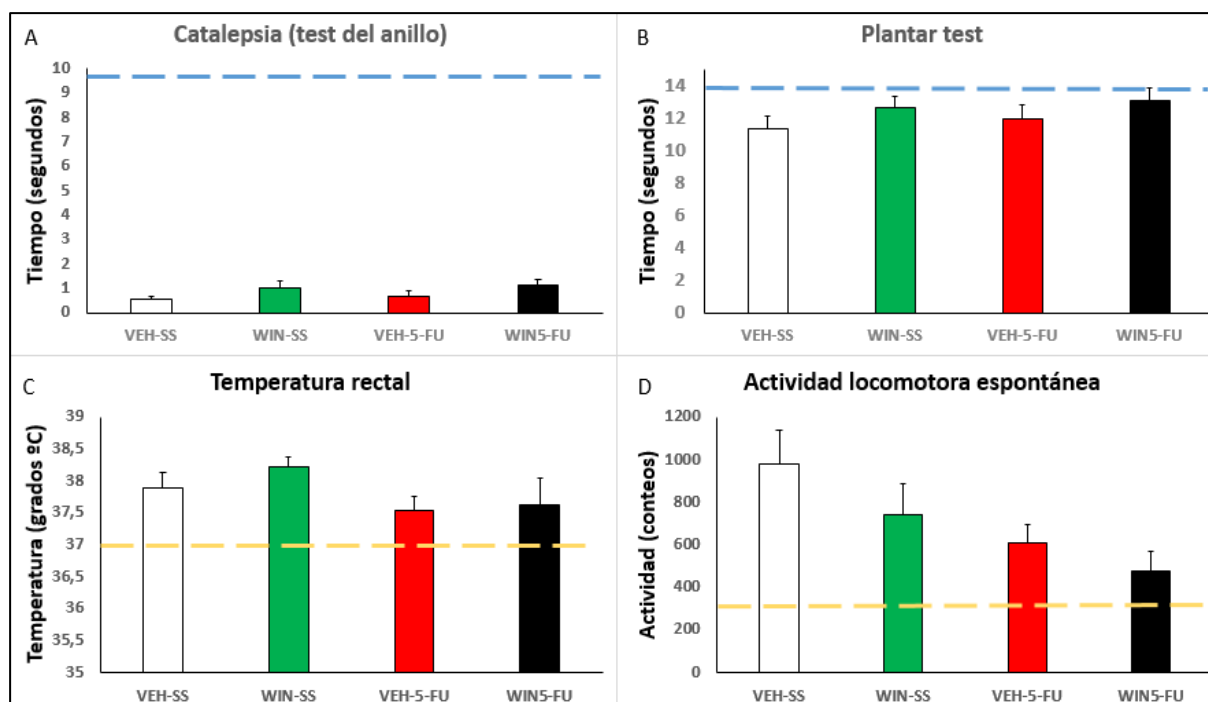
Durante el día 3 del protocolo se realizó el test de von Frey para la evaluación de la alodinia mecánica a cada uno de los grupos experimentales. La administración diaria de solamente el cannabinoide no produjo ninguna alteración significativa en el umbral para la alodinia mecánica en comparación con el grupo control. Sin embargo, la administración de dos dosis de 150 mg/kg (dosis acumulativa de 300 mg/kg) de 5-FU sí que produjo una reducción significativa de este parámetro. En cambio, el grupo tratado con WIN+5-FU presentó un aumento significativo en el umbral de este parámetro comparado con el grupo anterior, que no fue significativamente diferente del control (Figura 4).



**Figura 4. Aparición de alodinia mecánica (test de Von Frey).** Se analizaron los efectos de los diferentes tratamientos de cada uno de los 4 grupos experimentales: vehículo+salino (n=10, color blanco), WIN+salino, (n=10, dosis de WIN de 1 mg/kg, color verde) vehículo+5-FU (n=12, dosis acumulativa de 5-FU de 300 mg/kg, color rojo) y WIN+5-FU (n=12, dosis de WIN de 1 mg/kg, dosis acumulativa de 5-FU de 300 mg/kg, color negro); los datos fueron tomados durante el tercer día del protocolo experimental. Las barras muestran los resultados como el valor de la media  $\pm$  S.E.M. Análisis estadístico: ANOVA de una vía seguida de un test *post hoc* de Bonferroni para todos los grupos y t de Student entre los grupos vehículo + 5-FU y WIN + 5-FU; \*\*  $p < 0.01$  vs vehículo + salino; #  $p < 0,05$  vs vehículo + 5-FU.

### 3.3. Tétrada cannabinoide

Durante el tercer día del protocolo experimental también se evaluó si la dosis de WIN empleada, 1 mg/kg, producía efectos centrales, por medio de la tétrada cannabinoide: medición de la temperatura rectal, *plantar test*, test del anillo y prueba del actímetro. La dosis de WIN utilizada no produjo ninguna modificación significativa del comportamiento en ninguno de los cuatro test realizados (Figura 5).



**Figura 5. Evaluación de los efectos psicoactivos de WIN 55.212-2 (tétrada cannabinoide).** Se analizaron los efectos de los diferentes tratamientos de cada uno de los 4 grupos experimentales para cada una de las cuatro pruebas de la téttrada cannabinoide: vehículo+salino (n=10, color blanco), WIN+salino, (n=10, dosis de WIN de 1 mg/kg, color verde), vehículo+5-FU (n=12, dosis acumulativa de 5-FU de 300 mg/kg, color rojo) y WIN+5-FU (n=12, dosis de WIN de 1 mg/kg, dosis acumulativa de 5-FU de 300 mg/kg, color negro); los datos fueron tomados durante el tercer día del protocolo experimental. Pruebas de la téttrada cannabinoide: prueba del anillo (A), *plantar test* (B), temperatura rectal (C), actividad locomotora espontánea (D). Las líneas discontinuas azul y naranja representan los resultados medios de un control positivo para efectos psicoactivos: WIN 5 mg/kg (Abalo *et al.* 2011; Vera *et al.* 2013) Por encima de los valores azules y por debajo de los naranjas se considera que el cannabinoide ha tenido efectos centrales. Las barras muestran los resultados como el valor de la media  $\pm$  S.E.M. Análisis estadístico: ANOVA de una vía seguida de un test *post hoc* de Bonferroni. No se produjo ninguna diferencia significativa.

### 3.4. Sensibilidad visceral

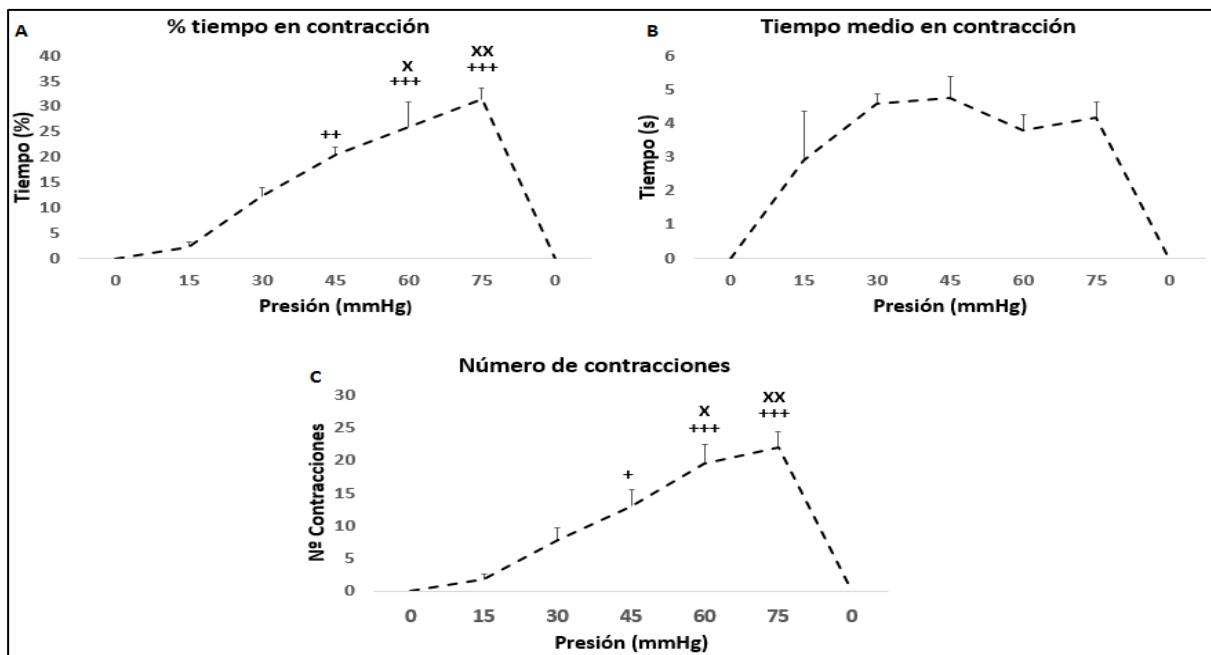
A los 12-16 días de finalizar el protocolo principal, se inició la puesta en marcha de un nuevo protocolo con el fin de evaluar, en futuros experimentos, las posibles alteraciones en la sensibilidad visceral de las ratas, cuyos resultados se muestran en la Figura 6.

Las ratas utilizadas (vehículo+suero salino, n=4) presentaron un aumento progresivo tanto del número de contracciones como del porcentaje de tiempo en contracción (es decir, de las respuestas de dolor visceral) conforme aumentaba la presión del balón intracolónico (estímulo mecánico). Como se puede observar en la Figura 6, en estos dos parámetros se obtuvieron diferencias significativas al comparar las presiones más bajas (15 y 30 mmHg) con las más altas

(45, 60 y 75 mmHg), aunque comparando las más altas entre sí no se observaron diferencias significativas.

En el caso del parámetro duración de la contracción, se produjo un aumento del mismo cuando la presión fue distinta de 0 mmHg pero entre las distintas presiones comprendidas entre 15 mmHg y 75 mmHg el parámetro no mostró diferencias significativas, con una duración media de  $4,03 \pm 0,51$  s.

Finalmente, al volver la presión a 0 durante el paso final del experimento, no se presentaron más contracciones, por lo que los tres parámetros considerados presentaron una media de 0.



**Figura 6. Evaluación de la sensibilidad visceral en respuesta a un estímulo mecánico (balón intracolónico).** Se evaluaron los resultados de cada uno de los parámetros a las distintas presiones aplicadas del grupo vehículo+salino (n=4) tomados 12-16 días después de realizar el protocolo experimental principal. Los parámetros analizados fueron: número de contracciones (A), porcentaje de tiempo en contracción (B) y tiempo medio en contracción (C). Las líneas muestran los resultados como el valor de la media  $\pm$  S.E.M. Análisis estadístico: ANOVA de una vía seguida de un test *post hoc* de Bonferroni. +  $p < 0,05$ ; ++  $p > 0,01$ ; +++  $p > 0,001$  vs presión 15 mmHg. X  $p < 0,05$ ; XX  $p < 0,01$  vs presión de 30 mmHg.

#### 4. Discusión

La quimioterapia es el tratamiento de primera elección para muchos tipos de cáncer (www.cancer.org); sin embargo, provoca importantes efectos secundarios en los pacientes (Flórez, 2003; Malik *et al.* 2015) que aún no tienen un tratamiento eficaz, por lo que se han propuesto los cannabinoides como alternativa terapéutica de los mismos.

En el presente estudio se utilizó el antitumoral 5-FU a una dosis acumulativa de 300 mg/kg repartida en dos dosis de 150 mg/kg. Aunque una sola dosis de 150 mg/kg (IP) puede provocar mucositis intestinal y problemas de motilidad gástrica en rata (Soares *et al.* 2008; Vanhoecke *et al.* 2015), la experiencia del departamento de Farmacología y Nutrición de la URJC nos llevó a elegir la dosis de 300 mg/kg, que ha demostrado producir diarrea grave (vía oral o IV) en otros estudios (Shiota *et al.* 2010; Tsuji *et al.* 2003). Por otro lado, el cannabinoide WIN fue utilizado a una dosis de 1 mg/kg, que no produce efectos centrales y es capaz de reducir el tránsito intestinal y aliviar la neuropatía periférica inducida por antitumorales como el cisplatino (Abalo *et al.*, 2010; Abalo *et al.*, 2013; Vera *et al.* 2013).

#### **4.1. Motilidad gastrointestinal**

Mediante este análisis se evaluaron tanto la diarrea como la dismotilidad gástrica. Esta última es un marcador indirecto de náuseas y vómitos en la rata (Cabezos *et al.* 2008, 2010), que carece del reflejo del vómito ([www.ratbehavior.org](http://www.ratbehavior.org)).

El primer día de administración de 5-FU (efecto agudo) observamos alteraciones en la motilidad gástrica en forma de retraso en el vaciamiento gástrico (marcador indirecto de náusea en las ratas), lo que era de esperar habiéndose descrito ya las náuseas y vómitos como efecto secundario de este fármaco ([www.aemps.gob.es](http://www.aemps.gob.es)). Por otro lado, es sabido que los efectos de los cannabinoides en el tracto gastrointestinal incluyen la disminución de la motilidad y la secreción y la ralentización del vaciado gástrico (Malik *et al.* 2015). Nuestros resultados en el grupo WIN + suero salino concuerdan con estos efectos, pues se produjo cierto retraso en la motilidad intestinal, tanto del intestino delgado como del ciego y el colorrecto pero no un retraso significativo en el vaciamiento gástrico, lo cual sugiere que el intestino podría ser más sensible que el estómago al efecto depresor de los cannabinoides. Estos resultados concuerdan con otros anteriores (Abalo *et al.* 2009, 2011, 2013). Por último, la administración del WIN junto con el antitumoral empeoró aún más el vaciamiento gástrico, lo cual puede deberse al efecto combinado de ambos fármacos en el estómago, algo ya observado anteriormente con otro antitumoral como el cisplatino (Abalo *et al.* 2013). Sin embargo tuvo prácticamente el mismo efecto que el WIN solo sobre la motilidad del intestino delgado, ciego y colorrecto, lo cual sugiere que los efectos sobre la motilidad en estas zonas se deben al propio cannabinoide.

El aumento del retraso del vaciamiento gástrico sugiere que el cannabinoide WIN 55,212-2 no es eficaz para la prevención de náuseas y vómitos producidas por los antineoplásicos, a pesar de que otros cannabinoides sí han demostrado ser útiles (Malik *et al.* 2015) Sin embargo,

debemos tener en cuenta las limitaciones que supone utilizar una especie que no puede vomitar como la rata, en que la medida de estos efectos secundarios es más difícil, y requiere el uso de marcadores indirectos como la dismotilidad gástrica. Habría que estudiar también otros parámetros como la pica, usados más frecuentemente para valorar efectos emetógenos y antieméticos (Cabezos *et al.* 2008, 2010; Vera *et al.* 2006). Por último, no se puede descartar que otros cannabinoides y dosis puedan presentar un mejor efecto en nuestro modelo.

En cuanto al día 4 (efecto diferido del antitumoral), en el grupo tratado solamente con el cannabinoide no se produjo ninguna alteración intestinal, al contrario que durante el día 1. Esta falta de efecto tras la administración crónica del WIN (4 días de tratamiento), al igual que en otros estudios previos (Abalo *et al.* 2009), probablemente se deba a la aparición de tolerancia al efecto de este fármaco. Con respecto al 5-FU, no produjo efectos en la región gástrica, aunque sí produjo cierto retraso en el llenado del ciego y el colon. La falta de efectos en el estómago puede deberse a que la administración de la última dosis de 5-FU se realizó 2 días antes de la evaluación radiográfica y el efecto del antineoplásico haya disminuido, aunque en otros estudios (Soares *et al.* 2008), el 5-FU a una dosis menor mantuvo el efecto sobre el vaciado del estómago hasta 15 días después; sin embargo, existen diferencias metodológicas con este trabajo, como el uso de procedimientos invasivos frente a los no invasivos usados por nosotros, que podrían explicar las discrepancias.

Por otro lado, el grupo tratado con WIN y 5-FU mostró efectos similares a los del día 1, aunque menos acusados, tal vez por la falta de efecto del 5-FU y la disminución del efecto del WIN. Aun así, el efecto conjunto de ambos fármacos provocó una disminución de la motilidad gastrointestinal en mayor medida que solamente la administración del antineoplásico, parecido a lo encontrado con otros antitumorales (Abalo *et al.* 2013).

En este caso, el uso de WIN para el tratamiento de la posible diarrea producida por el antitumoral podría ser útil, ya que la disminución de la motilidad intestinal la disminuiría o impediría. También podría contribuir la disminución que ejercen los cannabinoides sobre las secreciones intestinales (Malik *et al.* 2015), pues la diarrea, además de tener un componente motor en algunos casos, es un desequilibrio entre la absorción y la secreción intestinal (al disminuir la secreción, los cannabinoides podrían impedir o reducir la diarrea). Tras haber alcanzado ya la dosis acumulativa de 5-FU de 300 mg/kg, no se observó diarrea en ninguna de las ratas tratadas con este fármaco, al contrario de lo observado en otros trabajos (Shiota *et al.* 2010; Tsuji *et al.* 2003). Aunque pueden contribuir factores como la vía de administración

(intraperitoneal frente a oral o intravenosa), la dosis (quizás algo menor de la equivalente en pacientes; André *et al.* 1999; Pinkel, 1958) o la cepa de rata (Wistar frente a Dark Agoutí) que no se hayan producido los mismos efectos observados habitualmente en clínica con el 5-FU podría deberse a que en las ratas el ciego actúa como reservorio del exceso de agua presente en el intestino, y de hecho, las ratas con el ciego extirpado son un mejor modelo de diarrea (Islam *et al.* 2004, Islam & Sakaguchi, 2006). Por otra parte, para evaluar la existencia de diarrea en rata algunos autores miden, invasivamente, la cantidad de líquido presente en el intestino delgado (*enteropooling*, Robert *et al.* 1976). Por lo tanto, aunque es muy probable que los cannabinoides tengan un efecto beneficioso en cuanto al tratamiento de la diarrea, en este estudio no se pudo probar. En futuros estudios, nos planteamos valorar los efectos del 5-FU y cannabinoides usando la técnica del *enteropooling* o la cecectomía.

#### **4.2. Neuropatía periférica y efectos centrales**

La neuropatía periférica es bastante frecuente entre antitumorales como el cisplatino, la vincristina o el paclitaxel (Cata *et al.* 2006; Rahn y Hohmann, 2009). En cuanto al antineoplásico 5-FU, su aparición es rara, pero se han dado casos en algunos pacientes (Werbrouck *et al.* 2008). Debido a que los mecanismos celulares que dan lugar a la neuropatía aún no se conocen del todo, el tratamiento farmacológico para este efecto es aún muy limitado. Por ello en este trabajo se proponen los cannabinoides como posible tratamiento.

En el presente estudio confirmamos la presencia de neuropatía periférica, en forma de alodinia mecánica (disminución del umbral de sensibilidad mecánica), en las ratas tratadas con una dosis acumulativa de 5-FU. Además, se observó un aumento del umbral de sensibilidad mecánica (comparado con el grupo control) de aquellas ratas tratadas con 5-FU y con el agonista cannabinoide sintético WIN. Por lo tanto, los resultados sugieren que los cannabinoides pueden ser efectivos para la prevención y/o tratamiento de la neuropatía periférica producida por este último. Además, a pesar del tratamiento de 4 días con el cannabinoide, el alivio de la neuropatía podría indicar que no se genera tolerancia a este efecto. Este efecto analgésico del WIN a dosis bajas (como la de 1 mg/kg) y administración por vía intraperitoneal, ya ha demostrado ser efectivo en el tratamiento de la neuropatía inducida por otros antitumorales (Pascual *et al.* 2005; Vera *et al.* 2007, 2013), por una lesión nerviosa (Hama y Sagen, 2009) o por la diabetes (Vera *et al.* 2012). El WIN podría producir antinocicepción mediante la activación no sólo de receptores CB1, que deprimen la actividad neuronal, sino CB2, cuya activación reduce también la nocicepción en varios modelos preclínicos (Ibrahim *et al.* 2005; Malik *et al.* 2015).

Por otro lado, los cannabinoides pueden provocar efectos psicoactivos, lo cual es un obstáculo para su uso clínico. En nuestro trabajo, la dosis de WIN utilizada no produjo efectos centrales, como se observa en la falta de significación obtenida en las cuatro pruebas de la tétada cannabinoide (y en la falta de efecto en el test de von Frey). En diferentes estudios se han obtenido resultados similares con la administración aguda de esta dosis del cannabinoide (Pascual *et al.* 2005; Vera *et al.* 2007, 2012, 2013); sin embargo, dosis superiores de WIN (2 y 5 mg/kg) han demostrado producir efectos centrales después de su administración (Abalo *et al.* 2010, Vera *et al.* 2007).

Por lo tanto, la dosis de WIN no produjo efectos psicoactivos y previno la aparición de la neuropatía periférica producida por la dosis acumulativa de 300 mg/kg de 5-FU en las ratas.

### **4.3. Sensibilidad visceral**

El dolor visceral es difuso, difícil de localizar y puede manifestarse como alodinia/hiperalgesia mecánica y térmica. Este tipo de dolor suele afectar a pacientes de cáncer, muchas veces debido a la quimioterapia (Malik *et al.* 2015; Shaiova, 2006). Ante la necesidad de buscar tratamientos y desarrollar modelos útiles para estudiar este efecto, iniciamos la puesta en marcha de un método de evaluación de los posibles efectos en la sensibilidad visceral inducidos por el 5-FU y el WIN.

La mayoría de los modelos emplean estímulos químicos, mecánicos o estresantes. En nuestro caso utilizamos un estímulo mecánico (balón intracolónico) que se aplicó en intervalos de presiones crecientes para observar la respuesta al dolor de nuestros animales. Se tuvieron en cuenta 3 parámetros: número de contracciones, porcentaje de tiempo en contracción y tiempo medio en contracción (duración de las contracciones). Mediante este modelo, obtuvimos un resultado similar al de otros estudios en los que también se usaba un balón intracolónico como estímulo mecánico (Kim *et al.* 2014; Sanson *et al.* 2006). En cuanto al grupo control, en esos modelos se observó que las respuestas al dolor visceral iban aumentando a medida que aumentaba la presión aplicada. Además se observó una hipersensibilidad a la estimulación mecánica intracolónica en aquellos grupos que habían recibido el tratamiento de interés (presentaban valores más altos en el parámetro utilizado para medir el dolor que en los grupos utilizados como control).

En nuestro caso, las ratas (vehículo+suero salino, n=4) presentaron un aumento dependiente de la intensidad del estímulo mecánico tanto del número de contracciones como del porcentaje de tiempo en contracción, lo cual concuerda con lo obtenido en los estudios comentados

anteriormente. Por otro lado, la duración de las contracciones fue prácticamente la misma en todos los intervalos, por lo que podemos concluir que ese parámetro fue independiente del aumento de la presión.

Por supuesto, este experimento tiene sus limitaciones, pues el número de ratas empleado es bajo y se necesita completarlo, esto es sólo el paso inicial. El siguiente paso en nuestro modelo será probarlo en los grupos experimentales vehículo+5-FU y WIN+5-FU (y WIN+suero salino). Dado que el 5-FU produce mucositis intestinal ([www.aemps.gob.es](http://www.aemps.gob.es)), es probable que ocasione una hipersensibilidad a la estimulación mecánica, aumentando el número de contracciones y el porcentaje de tiempo en contracción (parámetros claramente dependientes del aumento de presión). En cuanto a las ratas tratadas con WIN y 5-FU, se espera que el cannabinoide normalice el umbral de dolor, dado su efecto analgésico (de hecho el WIN alivió la neuropatía en este modelo).

## **5. Conclusión**

Los efectos secundarios de la quimioterapia (nauseas, vómitos, diarrea, neuropatía periférica y dolor visceral, entre otros), son un grave problema para el cual no existe un tratamiento totalmente eficaz. Nosotros hemos planteado la posible utilidad de los cannabinoides para el tratamiento integral de los mismos en un solo modelo animal. Nuestros resultados sugieren que estos fármacos podrían ser útiles para el tratamiento de algunos de los efectos secundarios (dolor neuropático), mientras que podrían empeorar otros como son las náuseas y vómitos (que nosotros hemos medido indirectamente como dismotilidad gástrica). Lamentablemente, los datos sobre su efecto antidiarreico no son concluyentes porque no fuimos capaces de observar diarrea en las ratas tratadas con el antitumoral elegido. Aunque se necesita seguir investigando para determinar con mayor precisión sus mecanismos y efectos, los cannabinoides son una opción terapéutica interesante que hay que tener en cuenta.

## 6. Bibliografía

- Abalo, R., Cabezos, P.A., López-Miranda, V., Vera, G., González, C., Castillo, M., Fernández-Pujol, R. & Martín, M. I. 2009. *Selective lack of tolerance to delayed gastric emptying after daily administration of WIN 55,212-2 in the rat*. *Neurogastroenterol Motil* 21, 1002–e80
- Abalo, R., Cabezos, P. A., Vera, G., Fernández-Pujol, R. & Martín, M. I. 2010. *The cannabinoid antagonist SR144528 enhances the acute effect of WIN 55,212-2 on gastrointestinal motility in the rat*. *Neurogastroenterol Motil* 22: 694-703, e206.
- Abalo, R., Cabezos, P. A., Vera, G., López-Miranda, V., Herradón, E. & Martín-Fontelles, M. I. 2011. *Cannabinoid-induced delayed gastric emptying is selectively increased upon intermittent administration in the rat: role of CB1 receptors*. *Neurogastroenterol Motil* 23: 457–e177.
- Abalo, R., Vera, G., López-Pérez, A.E., Martínez-Villaluenga, M. & Martín-Fontelles, M.I. 2012. *The Gastrointestinal Pharmacology of Cannabinoids: Focus on Motility*. *Pharmacology* 90:1–10.
- Abalo, R., Cabezos, P. A., Vera, G., López-Pérez, A.E. & Martín, M. I. 2013. *Cannabinoids may worsen gastric dysmotility induced by chronic cisplatin in the rat*. *Neurogastroenterol Motil* 25: 373–e292.
- Albers, J.W., Chaudhry, V., Cavaletti, G. & Donehower, R.C. 2011. *Interventions for preventing neuropathy caused by cisplatin and related compounds*. *Cochrane Database Syst Rev* 2:CD005228.
- André, T., Louvet, C., Maindrault-Goebel, F., Couteau, C., Mabro, M., Lotz, J.P., Gilles-Amar, V., Krulik, M., *et al.* 1999. *CPT-11 (irinotecan) addition to bimonthly, high-dose leucovorin and bolus and continuous-infusion 5-fluorouracil (FOLFIRI) for pretreated metastatic colorectal cancer*. *Eur J Cancer* 35:1343-7.
- Andreyev, J., Ross, P., Donnellan, C., Lennan, E., Leonard, P., Waters, C. *et al.* 2014. *Guidance on the management of diarrhoea during cancer chemotherapy*. *Lancet Oncol* 15: 447-60.

Badary, O.A., Awad, A.S., Sherief, M.A. & Hamada, F.M. 2006. *In vitro and in vivo effects of ferulic acid on gastrointestinal motility: inhibition of cisplatin-induced delay in gastric emptying in rats*. World J Gastroenterol 12, 5363–5367.

Bennett GJ & Hargreaves KM. 1990. *Reply to Hirata and his colleagues*. Pain 42:255.

Cabazos, P. A., Vera, G., Castillo, M., Fernández-Pujol, R., Martín, M. I. & Abalo, R. 2008. *Radiological study of gastrointestinal motor activity after acute cisplatin in the rat. Temporal relationship with pica*. Auton Neurosci 141: 54-65.

Cabazos, P. A., Vera, G., Martín-Fontelles, M. I., Fernández-Pujol, R. & Abalo, R. 2010. *Cisplatin-induced gastrointestinal dysmotility is aggravated after chronic administration in the rat. Comparison with pica*. Neurogastroenterol Motil 22: 797–e225.

Cata, J.P., Weng, H.R., Lee, B.N., Reuben, J.M. & Dougherty, P.M. 2006. *Clinical and experimental findings in humans and animals with chemotherapy-induced peripheral neuropathy*. Minerva Anestesiol 72(3):151–69.

Chakravarti, B., Ravi, J. & Ganju, R.K. 2014. *Cannabinoids as therapeutic agents in cancer: current status and future implications*. Oncotarget 15 (5): 5852-5872.

Craig, J.B. & Powell, B.L. 1987. *The management of nausea and vomiting in clinical oncology*. Am J Med Sci 293 (1): 34–44.

Davis, M., Maida, V., Daeninck, P. & Pergolizzi, J. 2007. *The emerging role of cannabinoid neuromodulators in symptom management*. Supportive Care in Cancer 15 (1): 63–71.

*Defunciones según la causa de muerte. Año 2014* [en línea]. Instituto Nacional de Estadística. <<http://www.ine.es/prensa/np963.pdf>> [Consulta: 03-6-2016].

Duncan, M., Davison, J.S. & Sharkey, K.A. 2005. *Endocannabinoids and their receptors in the enteric nervous system*. Aliment Pharmacol Ther 22:667-683.

Dupont, H.L. 1997. *Guidelines on acute infectious diarrhea in adults. The Practice Parameters Committee of the American College of Gastroenterology*. Am J Gastroenterol 92: 1962–1975.

*Ficha técnica AEMPS 5-Fluorouracilo* [en línea]. Asociación Española de Medicamentos y Productos Sanitarios. <[http://www.aemps.gob.es/cima/pdfs/es/ft/71868/71868\\_ft.pdf](http://www.aemps.gob.es/cima/pdfs/es/ft/71868/71868_ft.pdf)> [Consulta: 03-6-2016].

Fine, P.G. & Rosenfeld, M.J. 2014. *Cannabinoids for Neuropathic Pain*. *Curr Pain Headache Rep* 18:451-460.

Flórez, J. 2003. *Farmacología humana*. 1440 páginas. Masson. Barcelona.

Hama, A. & Sagen, J. 2009. *Sustained antinociceptive effect of cannabinoid receptor agonist WIN 55,212-2 over time in rat model of neuropathic spinal cord injury pain*. *J Rehabil Res Dev* 46:135– 143.

Ibrahim, M.M., Porreca, F. Lai, J. Albrecht, P.J., Rice, F.L., Khodorova, A., *et al.* 2005. *CB2 cannabinoid receptor activation produces antinociception by stimulating peripheral release of endogenous opioids*. *PNAS* 102 (8): 3093-8.

Islam, S., Sakaguchi, E., Kashima, N. & Hoshi, S. 2004. *Effect of Sugar Alcohols on Gut Function and Body Composition in Normal and Cecctomized Rats*. *Exp Anim* 53 (4): 361-371.

Islam, S. & Sakaguchi, E. 2006. *Sorbitol-based osmotic diarrhea: Possible causes and mechanism of prevention investigated in rat*. *World J Gastroenterol* 12 (47): 7635-7641.

Jordan, K., Kasper, C. & Schmoll, H.J. 2005. *Chemotherapy-induced nausea and vomiting: current and new standards in the antiemetic prophylaxis and treatment*. *Eur J Cancer* 41 (2): 199–205.

Kim, E.R., Min, B.H., Lee, T.H., Son, M. & Rhee, P.L. 2014. *Effect of DA-9701 on Colorectal Distension-Induced Visceral Hypersensitivity in a Rat Model*. *Gut and Liver* 8 (4): 388-93.

Logan, R.M., Stringer, A.M., Bowen J.M., Yeoh, A.S., Gibson R.J., Sonis, S.T. & Keefe, D.M.K. 2007. *The role of pro-inflammatory cytokines in cáncer treatment-induced alimentary tract mucositis: Pathobiology, animal models and cytotoxic drugs*. *Cancer Treat Rev* 33: 448–460.

Malik, Z., Baik, D. & Schey, R. 2015. *The Role of Cannabinoids in Regulation of Nausea and Vomiting, and Visceral Pain*. *Curr Gastroenterol Rep* 17: 1-9.

*Neuropatía periférica* [en línea]. National Institute of Neurological Disorders and Stroke <[http://espanol.ninds.nih.gov/trastornos/neuropatia\\_periferica.htm](http://espanol.ninds.nih.gov/trastornos/neuropatia_periferica.htm)> [Consulta: 08-6-2017].

Pascual, D., Goicoechea, C., Suardiaz, M. & Martín, M.I. 2005. *A cannabinoid agonist, WIN 55,212-2, reduces neuropathic nociception induced by paclitaxel in rats.* Pain 118: 23–34.

Passik, S.D., Kirsh, K.L., Rosenfeld, B., McDonald, M.V. & Theobald, D.E. 2001. *The changeable nature of patients' fears regarding chemotherapy: implications for palliative care.* J Pain Symptom Manage 21 (2): 113–120.

Pertwee, R.G. 1972. *The ring test: a quantitative method for assessing the 'cataleptic' effect of cannabis in mice.* Br J Pharmacol 46 (4): 753–763.

Pinkel, D. 1958. *The use of body surface area as a criterion of drug dosage in cancer chemotherapy.* Cancer Res 18: 853-6.

*Quimioterapia* [en línea]. Sociedad Americana del Cáncer. <<http://www.cancer.org/espanol/servicios/tratamientosyefectossecundarios/quimioterapia>> [Consulta: 08-6-2016].

Rahn, E.J. & Hohmann, A.G. 2009. *Cannabinoids as pharmacotherapies for neuropathic pain: From the bench to the bedside.* Neurotherapeutics 6(4):713-37.

Robert, A., Nezamis, J.E., Lancaster, C., Hanchar, A.J. & Klepper, M.S. 1976. *Enteropooling assay; a test for diarrhea produced by prostaglandins.* Prostaglandins 11: 809–828.

Russo, E.B. 2008. *Cannabinoids in the management of difficult to treat pain.* Therapeutics and Clinical Risk Management 4(1): 245–259.

Sanson, M., Bueno, L. & Fioramonti, J. 2006. *Involvement of cannabinoid receptors in inflammatory hypersensitivity to colonic distension in rats.* Neurogastroenterol Motil 18: 949-956.

Sharkey, K.A., Darmani, N.A. & Parker, L.A. 2014. *Regulation of nausea and vomiting by cannabinoids and the endocannabinoid system.* Eur J Pharmacol 722: 134–146.

Shaiova, L. 2006. *Difficult pain syndromes: bone pain, visceral pain and neuropathic pain.* Cancer J 12, 5: 330-340.

Shiota A., Hada T., Baba T., Sato M., Yamanaka-Okumura H., Yamamoto H., Taketani Y. & Takeda E. 2010. *Protective effects of glycolipids extracted from spinach on 5-fluorouracil induced intestinal mucosal injury*. J Med Invest 57(3-4):314-20.

Soares, P.M.G., Mota, J.M.S.C., Gomes, A.S., Oliveira, R.B., Assreuy, A.M.S., Brito, G.A.C. *et al.* 2008. *Gastrointestinal dysmotility in 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis outlasts inflammatory process resolution*. Cancer Chemother Pharmacol 63: 91-8.

Stein, A., Voigt, W. & Jordan, K. 2010. *Chemotherapy-induced diarrhea: pathophysiology, frequency and guideline-based management*. Ther Adv Med Oncol 2: 51-63.

Stern, R.M., Koch, K.L. & Andrews, P.L. 2011. *Nausea: Mechanisms and Management*. 462 páginas. Oxford University Press. Nueva York.

Takeda, N., Hasegawa, S., Morita, M. & Matsunaga, T. 1993. *Pica in rats is analogous to emesis: an animal model in emesis research*. Pharmacol Biochem Behav 45, 817–821.

Tsuji, E., Hiki, N., Nomura, S., Fukushima, R., Kojima, J., Ogawa, T., Mafune, K., Mimura, Y., & Kaminishi, M. 2003. *Simultaneous onset of acute inflammatory response, sepsis-like symptoms and intestinal mucosal injury after cancer chemotherapy*. Int J Cancer 107(2): 303-308.

*Vademecum: loperamida* [en línea]. Equipo de redaccion de IBQ, centro colaborador de ANMAT. <<http://www.iqb.es/cbasicas/farma/farma04/1027.htm>> [Consulta: 14-6-2016].

Vanhoecke B., Bateman E., Mayo B., Vanlancker E., Stringer A., Thorpe D. & Keefe D. 2015. *Dark Agouti rat model of chemotherapy-induced mucositis: establishment and current state of the art*. Exp Biol Med 240: 725-41.

Vera, G., Chiarlone, A., Martín, M. I. & Abalo, R. 2006. *Altered feeding behaviour induced by long-term cisplatin in rats*. Auton Neurosci 126-127: 81-92.

Vera, G., Chiarlone, A., Cabezos, P.A., Pascual, D., Martín, M. I. & Abalo, R. 2007. *WIN 55,212-2 prevents mechanical allodynia but not alterations in feeding behaviour induced by chronic cisplatin in the rat*. Life Sciences 81: 468–479.

Vera, G., López-Miranda, V., Herradón, E., Martín, M.I. & Abalo R. 2012. *Characterization of cannabinoid-induced relief of neuropathic pain in rat models of type 1 and type 2 diabetes*. Pharmacol Biochem Behav 102 (2):335–43.

Vera, G., Cabezos, P.A., Martín, M. I. & Abalo, R. 2013. *Characterization of cannabinoid-induced relief of neuropathic pain in a rat model of cisplatin-induced neuropathy*. Pharmacol Biochem Behav 105: 205–212.

Werbrouck, B.F., Walter, J.P. & De Bleecker, J.L. 2008. *A case of 5-fluorouracil-induced peripheral neuropathy*. Clin Toxicol 46: 264–266.

*Why rats can't vomit* [en línea]. Rat Behavior and Biology <<http://www.ratbehavior.org/vomit.htm>> [Consulta: 14-6-2016]

Windebank AJ & Grisold W. 2008. *Chemotherapy-induced neuropathy*. J Peripher Nerv Syst 2008; 13: 27–46.