



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

**MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y
RECURSOS NATURALES**

**Efecto de la morfina y dexmedetomidina sobre la concentración alveolar
mínima de isoflurano en ratas tratadas crónicamente con el cannabinoide
sintético WIN 55,212-2.**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS
AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES**

PRESENTA:

Julio Raúl Chávez Monteagudo

COMITÉ DE TUTORES

Tutor Académico

Dr. en C. José Antonio Ibancovich Camarillo

Tutores Adjuntos:

Dr. en C. Pedro Sánchez Aparicio

Dr. en C. Sergio Recillas Morales

El Cerrillo Piedras Blancas, Toluca, Estado de México. Julio 2019.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

**MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y
RECURSOS NATURALES**

**Efecto de la morfina y dexmedetomidina sobre la concentración alveolar
mínima de isoflurano en ratas tratadas crónicamente con el cannabinoide
sintético WIN 55,212-2.**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS
AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES**

PRESENTA:

Julio Raúl Chávez Monteagudo

COMITÉ DE TUTORES

Tutor Académico

Dr. en C. José Antonio Ibancovich Camarillo

Tutores Adjuntos:

Dr. en C. Pedro Sánchez Aparicio

Dr. en C. Sergio Recillas Morales

El Cerrillo Piedras Blancas, Toluca, Estado de México. Julio 2019.

El autor de la presente, agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada durante los estudios de Doctorado, con el número de registro 269158.

**Por muchos triunfos que consiga la mente,
Por muchos dones que enriquezca la humanidad,
No habrá en el transcurso de los siglos
Una hora más dulce que aquella,
En que la esperanza, la duda y el temor
Contemplaron, en medio de profundo silencio,
A un cerebro audaz decretar
Con voluntad casi divina
La muerte del dolor.**

Weir Mitchell. 1896.

INDICE

1. Resumen.....	1
2. Abstract.....	2
3. Introducción.....	3
4. Revisión de literatura.....	5
4-1. <i>Cannabis</i>	5
4.2. Antecedente Histórico del cannabis.....	5
4.3. Cannabinoides.....	6
4.4. Mecanismo de acción de los cannabinoides.....	8
4.5. <i>Anestésicos Inhalatorios</i>	11
4.6. Antecedente histórico de los anestésicos inhalatorios.....	12
4.7. Isoflurano.....	13
4.8. Concentración alveolar mínima.....	14
4.9. Dianas moleculares de los anestésicos inhalatorios.....	15
4.10. <i>Dexmedetomidina</i>	16
4.11. Efectos en el sistema nervioso central.....	18
4.12. Protección y otros efectos sobre el sistema nervioso central.....	18
4.13. <i>Opioides y Opiáceos</i>	19
4.14. Receptores opioides.....	19
4.15. Mecanismos de transducción de la señal molecular.....	20
4.16. Mecanismo de la analgesia opioide.....	20
4.17. Morfina.....	23
5. Justificación.....	25
6. Hipótesis.....	26
7. Objetivos.....	27
8. Material y Método.....	28
8.1. Animales y alojamiento.....	28
8.2. Procedimiento anestésico.....	28
8.3. Instrumentación y monitorización.....	30
8.4. Determinación de la Concentración alveolar mínima (CAM).....	34

8.5. Corrección de la CAM en base a la presión barométrica.....	36
8.6. Diseño experimental.....	36
8.7. Análisis estadístico.....	38
9. Resultados.....	39
9.1. Artículo Científico Número 1. Publicado.....	41
9.2. Artículo Científico Número 2. Enviado.....	50
9.3. Artículo Científico Número 2. Carta al editor.....	52
10. Discusión.....	53
11. Conclusiones.....	58
12. Bibliografía.....	59

INDICE DE TABLAS

Tabla 1: Medición de la CAM de isoflurano en el grupo CAM_{ISO}, CAM_{ISO}+WIN₅₅ y CAM_{ISO}+VEH.....	39
Tabla 1: Medición de la CAM de isoflurano después de 8 días de suspendido el cannabinoide sintético (CAM_{ISO}+WIN_{8D}).....	39
Tabla 1: Antagonismo del receptor CB1 (CAM_{ISO}+WIN₅₅+ANT).....	39
Tabla 2. Efecto de la morfina sobre la CAM de isoflurano en ratas.....	39
Tabla 3. Efecto de la morfina sobre la CAM de isoflurano en ratas tratadas crónicamente con el cannabinoide sintético WIN 55,212-2.....	40
Tabla 4. Efecto de la dexmedetomidina sobre la CAM de isoflurano en ratas.....	40
Tabla 5. Efecto de la dexmedetomidina sobre la CAM de isoflurano en ratas tratadas crónicamente con el cannabinoide sintético WIN 55,212-2.....	40

INDICE DE FIGURAS

Imagen 1. Componente psicoactivo del cannabis. Δ^9 Tetrahidrocannabinol.....	6
Imagen 2. Cannabinoide sintético. WIN 55,212-2.....	7
Imagen 3. Antagonista cannabinoide. SR141716 (Rimonabant).....	8
Imagen 4. Receptores cannabinoideos CB1 y CB2.....	9
Imagen 5. Estructura tridimensional de los anestésicos inhalatorios.....	11
Imagen 6. Anestésicos inhalatorios a través del tiempo.....	12
Imagen 7. La dexmedetomidina. El S-enantiómero de la medetomidina.....	17
Imagen 8. Cámara de inducción anestésica.....	28
Imagen 9. Intubación endotraqueal.....	29
Imagen 10. T-Ayre modificada.....	30
Imagen 11. Incisión longitudinal para aproximación de la arteria carótida.....	30
Imagen 12. Exposición y aislamiento de la arteria carótida.....	31
Imagen 13. Cateterización de la arteria carótida.....	31
Imagen 14. Cierre de la incisión y conexión al transductor de presión arterial.....	32
Imagen 15. Transductor de presión arterial invasiva.....	32
Imagen 16. Control del sistema de calentamiento por convección.....	33
Imagen 17. Mantenimiento de la temperatura corporal.....	33
Imagen 18. Cateterización de vena caudal lateral.....	34
Imagen 19. Aplicación de un estímulo doloroso supramáximo.....	35

ABREVIATURAS

a.C: Antes de Cristo.

AMPc: Monofosfato de Adenosina Cíclico.

Br: Bromo.

Ca²⁺: Calcio.

CAM: Concentración Alveolar Mínima.

CAM_{Iso}: Concentración Alveolar Mínima de Isoflurano.

CB1: Cannabinoid Binding 1.

CB2: Cannabinoid Binding 2.

Cl: Cloro.

CO₂: Dióxido de carbono.

COBYBA: Comisión de Bioética y Bienestar Animal.

DE: Desviación Estándar.

EC₅₀: Concentración para un efecto del 50%.

F: Flúor.

FC: Frecuencia Cardíaca.

FDA: Food and Drug Administration.

Fe_{Iso}: Fracción espirada de Isoflurano.

Fi_{Iso}: Fracción inspirada de Isoflurano.

FR: Frecuencia Respiratoria.

GABA: Ácido Gamma-Amino-Butírico.

HCN: Hyperpolarization-Activated Cyclic Nucleotide.

i.p: intra-peritoneal.

IV: Intravenosa.

K⁺: Potasio.

K_{2P}: receptores de K⁺ con dominio de 2 poros.

LC: Locus Coeruleus.

MAP quinasas: quinasas activadas por mitógeno.

MGP: Materia Gris Periacueductal.

MVR: Medula Ventromedial Rostral.

M3G: Morfina-3-glucurónido.

M6G: Morfina-6-glucurónido.

Na⁺: Sodio.

NMDA: N-metil-D-aspartato.

N₂O: óxido nitroso.

ONU: Organización de las Naciones Unidas.

O₂: Oxígeno.

PAD: Presión Arterial Diastólica.

PAM: Presión Arterial Media.

PAS: Presión Arterial Sistólica.

PEtCO₂: Presión parcial de CO₂ tele-espíatorio.

SMART: Programa Global de Vigilancia de Drogas Sintéticas: Análisis, Informes y Tendencias.

SNC: Sistema nervioso central.

TASK: Receptores con canales de k⁺ sensibles a los ácidos.

TH: Tirosina Hidroxilasa/enzima sintetizadora de catecolaminas

THC: tetrahidrocannabinol.

UCI: Unidad de cuidados intensivos.

UNODC: United Nations Office on Drugs and Crime.

5-HT₇ : Receptores de serotonina de tipo 7.

Δ9-THC: delta-9-tetrahydrocannabinol.

1. Resumen

Se determinó la concentración alveolar mínima (CAM) de isoflurano así como el efecto de la morfina y la dexmedetomidina en ratas tratadas crónicamente con WIN 5,212-2.

La CAM del isoflurano se midió en 72 ratas Wistar machos por medio del muestreo de gas alveolar al momento del pinzamiento de la cola en las siguientes condiciones: un grupo control en donde solo se calculó la concentración alveolar mínima de isoflurano (CAM_{ISO}) sin el efecto de ningún tratamiento, en el grupo $CAM_{ISO+VEH}$ se administró una solución vehículo por 21 días, en el grupo $CAM_{ISO+WIN55}$ se administró WIN 55,212-2 durante 21 días, 8 días de suspendido el tratamiento ($CAM_{ISO+WIN8D}$) y treinta minutos después de administrar un antagonista cannabinoide ($CAM_{ISO+WIN55+ANT}$) en ratas tratadas por 21 días con WIN 55,212-2. También se determinó la CAM del isoflurano después de administrar morfina ($CAM_{ISO+MOR}$) y dexmedetomidina ($CAM_{ISO+DEX}$) en ratas sin tratamiento así como tratadas por 21 días con WIN 55,212-2 ($CAM_{ISO+WIN55+MOR}$ y $CAM_{ISO+WIN55+DEX}$).

La CAM_{ISO} fue de $1.32\% \pm 0.06$. Al compararse con el grupo $CAM_{ISO+VEH}$ no se observaron diferencias estadísticamente significativas. En el grupo $CAM_{ISO+WIN55}$ la CAM se incrementó a $1.69\% \pm 0.09$ ($>28\%$). Después de 8 días sin tratamiento, la CAM no disminuye significativamente ($1.67\% \pm 0.07$). Se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos $CAM_{ISO+WIN55+ANT}$ y $CAM_{ISO+WIN55}$ ($p = 0.0173$). En el grupo $CAM_{ISO+MOR}$ se observó una disminución de la CAM de $1.32\% \pm 0.06$ a 0.97 ± 0.02 ($<26\%$) y el grupo $CAM_{ISO+WIN55+MOR}$ mostró una disminución de $1.69\% \pm 0.09$ a $1.55\% \pm 0.08$ ($<8\%$). El grupo $CAM_{ISO+DEX}$ mostró una disminución de la CAM de $1.32\% \pm 0.06$ a 0.68 ± 0.10 ($<48\%$) y en el grupo $CAM_{ISO+WIN55+DEX}$ disminuyó de $1.69\% \pm 0.09$ a $0.67\% \pm 0.08$ ($<60\%$).

En conclusión, la administración repetida de WIN 55,212-2 incrementa la CAM_{ISO} en ratas; este efecto no disminuye después de 8 días de interrumpido el tratamiento, el antagonismo modifica parcialmente la CAM. El efecto de la morfina sobre la CAM de isoflurano es menor en ratas tratadas durante 21 días con WIN 55,212-2. La dexmedetomidina incrementa el efecto sobre la CAM de isoflurano en ratas tratadas crónicamente con el cannabinoide sintético WIN 55,212-2.

2. Abstract

The isoflurane minimum alveolar concentration (MAC) and the effect of morphine and dexmedetomidine were measured in rats chronically treated with WIN 55,212-2.

The isoflurane MAC_{ISO} was determined in 72 male rats from the end expiratory samples at time of tail clamping under the following conditions: MAC_{ISO} group, rats treated 21 days with vehicle ($MAC_{ISO+VEH}$), rats treated for 21 days with WIN 55,212-2 ($MAC_{ISO+WIN55}$), 8 days after stopping treatment ($MAC_{ISO+WIN8D}$), and 30 minutes after administering antagonist ($MAC_{ISO+WIN55+ANT}$) in rats treated with WIN 55,212-2. The effect of morphine ($MAC_{ISO+MOR}$) and dexmedetomidine ($MAC_{ISO+DEX}$) on isoflurane MAC in untreated rats and rats treated with WIN 55,212-2 was measured ($MAC_{ISO+WIN55+MOR}$ and $MAC_{ISO+WIN55+DEX}$).

The MAC_{ISO} was 1.32 ± 0.06 . When compared with the $CAM_{ISO+VEH}$ group, no statistically significant differences were observed. In the $MAC_{ISO+WIN55}$ group increase to 1.69 ± 0.09 (28%). After 8 days without treatment, MAC did not decrease significantly 1.67 ± 0.07 . Statistical differences were observed between the $MAC_{ISO+WIN55+ANT}$ and $MAC_{ISO+WIN55}$ groups ($p = 0.0173$). In the $MAC_{ISO+MOR}$ group, there was a decrease of 1.32 ± 0.06 to 0.97 ± 0.02 (26%) in MAC and the $MAC_{ISO+WIN55+MOR}$ showed a decrease of 1.69 ± 0.09 to 1.55 ± 0.08 (8%). The $MAC_{ISO+DEX}$ group showed 1.32 ± 0.06 to 0.68 ± 0.10 (48%) decrease in MAC and the $MAC_{ISO+WIN55+DEX}$ group showed a decrease of 1.69 ± 0.09 to 0.67 ± 0.08 (60%).

In conclusion, the administration of WIN 55,212-2 increase the MAC_{ISO} in rats; this effect does not diminish after 8 days of interrupted treatment, antagonism partially decreased the MAC. Morphine does not decrease the MAC of isoflurane in rats treated chronically with WIN 55,212-2. Dexmedetomidine increases its sparing effect on the minimum alveolar concentration of isoflurane in rats treated chronically with WIN 55,212.

3. Introducción

El Cannabis, a pesar de ser una de las drogas psicotrópicas más antiguas conocida por el hombre (Mechoulam 1986), sigue siendo la droga de mayor consumo según lo reportado por la ONU (organización de las naciones unidas) en su informe mundial sobre las drogas del 2018 UNODC (United Nations Office on Drugs and Crime, World Drug Report 2018), en el cual se calcula que existen más de 192 millones de consumidores de Cannabis, por lo que representa la droga de mayor consumo a nivel mundial, inclusive, en los lugares en los que se ha legalizado con fines recreativos, se reporta un aumento en su consumo. De igual manera, el Programa Global de Vigilancia de Drogas Sintéticas: Análisis, Informes y Tendencias (SMART) de la UNODC informó en 2018 (UNODC 2018) que los cannabinoides sintéticos representan el segundo grupo (32%) dentro de las nuevas sustancias psicoactivas. Del mismo modo, a partir del aislamiento del Δ^9 -THC (delta-9-tetrahydrocannabinol) en los años 60s (Gaoni y Mechoulam 1964), la identificación del receptor CB1 a finales de los 80s (Devane et al. 1988), del CB2 en 1993 (Munro et al. 1993); de la identificación del primer (Devane et al. 1992) y segundo cannabinoide endógeno (Mechoulam et al. 1995) así como del reconocimiento de la participación del sistema endocannabinoide en procesos de salud y enfermedad; diferentes grupos de investigación han desarrollado múltiples investigaciones (Pacher et al. 2013) acerca de la actividad moduladora y de los efectos de la manipulación de este sistema, ya que podría tener importantes aplicaciones terapéuticas en una gran variedad de enfermedades que afectan al ser humano y que en alguno de los casos permanecen sin tratamiento.

Actualmente, se sabe que diferentes receptores están involucrados en los efectos de estas sustancias y no solo los denominados CB1 y CB2, ya que se ha reconocido a los receptores TASK (canales k^+ sensibles a los ácidos) como responsables parciales del efecto de algunos cannabinoides sintéticos. Los receptores TASK también están relacionados con el efecto de algunos anestésicos inhalatorios como el halotano y del isoflurano así como de sustancias agonistas α_2 -adrenérgicos entre ellas la dexmedetomidina (Linden et al. 2006). En este estudio se investigó el efecto que provoca la administración crónica del cannabinoide sintético WIN 55,212-2 sobre la CAM de isoflurano (CAM_{ISO}) en ratas.

Igualmente, se ha reportado que existe un aumento en el efecto de agonistas de los receptores cannabinoides, agonistas α_2 -adrenérgicos y receptores opioides de tipo μ cuando se administran de manera conjunta, (Shao et al. 2005), a este efecto se le ha denominado efecto aditivo y supra-aditivo, dependiendo la intensidad del mismo.

De igual manera, investigaciones anteriores han reportado la disminución de la CAM_{ISO} por parte de la morfina (Gómez de Segura 1998) y de la dexmedetomidina (Rioja et al. 2006), a lo que algunos autores le denominan efecto ahorrador, sin embargo, se desconoce si estas sustancias tienen el mismo efecto en ratas que han sido tratadas crónicamente con cannabinoides. En la segunda parte de nuestro estudio se evaluó el efecto que la morfina y la dexmedetomidina tiene sobre la CAM_{ISO} en ratas tratadas crónicamente con el cannabinoide sintético WIN 55,212-2.

4. Revisión de literatura.

4.1. Cannabis

El cannabis es una de las drogas psicotrópicas más antigua conocida por la humanidad. Según descubrimientos arqueológicos, se le conoce en china desde el año 4000 a.C. (Mckim et al. 2000). Existen diferentes tipos de cannabis, las más relevantes son *Cannabis sativa*, *Cannabis indica* y *cannabis ruderalis*, siendo *Cannabis sativa* la variedad más grande. Las principales preparaciones derivadas de esta planta son la marihuana y el hachís. El término marihuana se refiere a las hojas secas de la planta y el nombre de hachís es un término árabe el cual se refiere a la resina viscosa de esta planta.

4.2. Antecedente Histórico del Cannabis

El emperador de China Shen Nung es considerado la primera persona en describir las propiedades y usos terapéuticos del cannabis a través de la publicación de un compendio de medicina china en el año 2737 a.C. (Li 1974). A partir de este momento la planta se comenzó a cultivar por su fibra, para el consumo recreativo y por sus efectos medicinales. La popularidad de la planta fue tan grande, que su uso se expandió hasta la India (Mechoulam 1986) en donde en el año de 1839, un médico cirujano británico llamado William O'Shaughnessy observó las propiedades analgésicas, antieméticas, anticonvulsivas y estimulantes del apetito del cannabis. Dichas observaciones fueron publicadas provocando la expansión del uso médico del cannabis. Poco tiempo después, el cannabis ya figuraba en las listas de dispensarios de los Estados Unidos de Norteamérica, se vendía de manera libre en farmacias de países occidentales y a partir de este momento el cannabis estaría disponible por más de cien años en la farmacopea británica en forma de extracto y tintura. Más tarde, en el año de 1942, el cannabis fue condenado y eliminado de la farmacopea de los Estados Unidos ya que se le hizo responsable de demencia, deterioro moral e intelectual, violencia y diversos crímenes, perdiendo su legitimidad terapéutica (Frankhauser 2002). Posteriormente, Gran Bretaña y la mayoría de países europeos, a través de un convenio sobre sustancias psicotrópicas con las Naciones Unidas, prohibieron el cannabis en 1971. A partir de este momento, en el mundo se comenzó a discutir sobre el uso médico y recreativo del cannabis, también se comenzó a estudiar el mecanismo por el cual ejerce sus múltiples efectos, así

como la importancia que el sistema endocannabinoide tiene en la fisiología normal del organismo en los estados de salud y enfermedad; éste debate permanece hasta el día de hoy. Algunos grupos de investigación, consideran al cannabis y sus derivados como una posibilidad terapéutica para diferentes enfermedades que hasta hoy permanecen sin tratamiento y se desconoce el papel que estas sustancias podrían tener en diferentes ramas de la medicina, incluyendo la anestesiología, así como el efecto que el consumo de estas sustancias podría tener en los procedimientos de anestesia general.

4.3. Cannabinoides

Hasta el día de hoy se han descrito 3 tipos de compuestos cannabiméticos. Los que se encuentran en la planta del cannabis (fitocannabinoides), los que de manera natural son producidos en el organismo son llamados cannabinoides endógenos o endocannabinoides y a los que se producen de manera artificial en el laboratorio se les conoce como cannabinoides sintéticos.

El principal componente psicoactivo de la planta del cannabis fue identificado por Rafael Mechoulam y por Gaoin en 1964, el cual fue nombrado Δ^9 tetrahidrocannabinol (Δ^9 -THC). (Imagen 1).

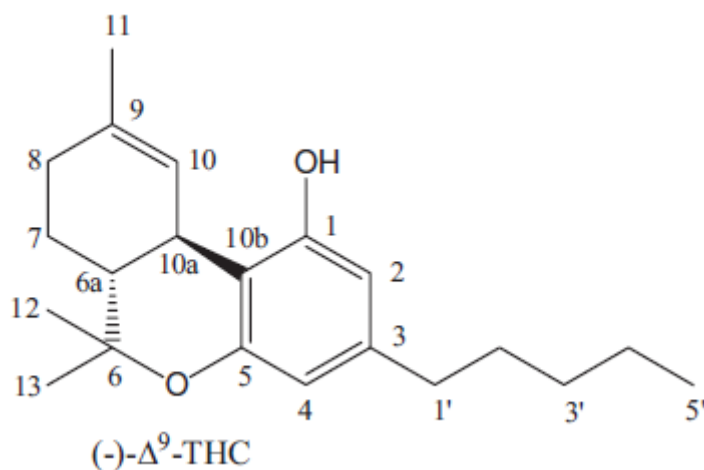


Imagen 1. Principal componente psicoactivo de la planta del cannabis.

Δ^9 Tetrahidrocannabinol (Δ^9 -THC).

El cannabis contiene 545 componentes, de los cuales 104 se consideran cannabinoides, los efectos de muchas de estas sustancias aún se desconocen. Existen una serie de compuestos de origen sintético como el WIN 55,212-2 (derivado de aminoalquinoles), el cual es un potente y no selectivo agonista de los receptores CB1 y CB2 (Pertwee et al. 2010) y ha permitido realizar muchos estudios de laboratorio basados en los diferentes efectos de los receptores cannabinoides (Imagen 2). También existen antagonistas de los receptores cannabinoides como el SR141716 (Rimonabant) el cual es un antagonista del receptor CB1 (Pertwee et al. 2010) que se desarrolló como un agente anti obesidad y que ha permitido identificar los efectos que provoca el antagonismo de dicho receptor (imagen 3).

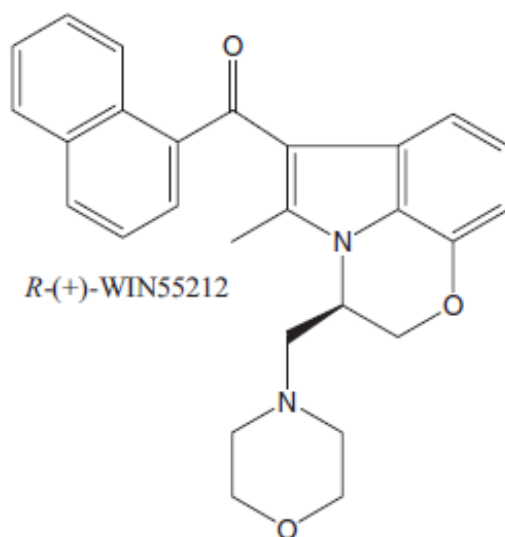
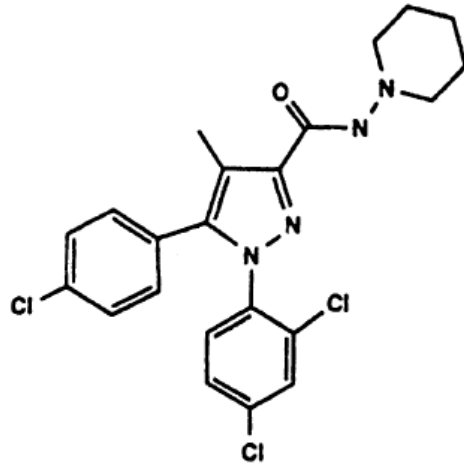


Imagen 2. Cannabinoide sintético. WIN 55,212-2.



SR141716A

Imagen 3. Antagonista cannabinoide. SR141716 (Rimonabant)

4.4. Mecanismo de acción de los cannabinoides

En algún momento se consideró que el mecanismo de acción de los cannabinoides estaba relacionado con la interacción con los lípidos de la membrana celular, pero esto solo explicaba parcialmente los efectos producidos por estas sustancias. Posteriormente, se identificó a dos receptores llamados CB1 (Devane et al. 1988), y CB2 (Munro et al. 1993); como responsables del efecto del THC (tetrahidrocannabinol).

Los receptores cannabinoides se han descrito en humanos, primates, ratas, perros, cerdos, pero no en insectos. Al primer receptor identificado se le nombro receptor cannabinoide CB1 (cannabinoid binding 1) y al segundo recetor identificado tiempo después se le nombro CB 2 (imagen 4).

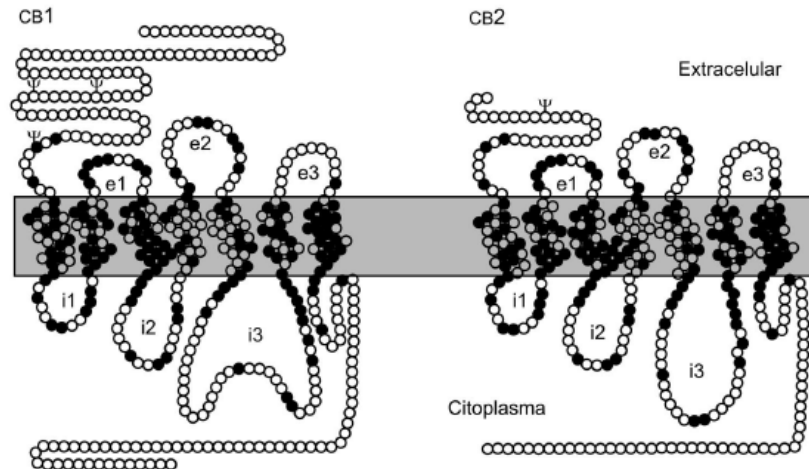


Imagen 4. Receptores cannabinoides CB1 y CB2.

El receptor CB1 media los efectos psicoactivos de los cannabinoides (Devane et al. 1988). El cual es un miembro de la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G que se inserta en la membrana plasmática donde se une el THC.

El CB1 es una molécula de 473 aminoácidos y se expresa en poblaciones neuronales del cerebro de los mamíferos (Howlett et al. 2002) y es el receptor acoplado a proteína G más abundante del cerebro. (Herkenham et al. 1991). Se encuentra abundantemente en ganglios basales, cerebelo, hipocampo, corteza cerebral, medula espinal, sustancia gris periacueductal (Pertwee 1997; Tsou et al. 1998; Hampson et al. 1999), así como en terminaciones nerviosas centrales y periféricas (Pertwee 1997; Tsou et al. 1998). También se han identificado en el bazo, amígdalas, corazón, tracto gastrointestinal, útero, ovario, próstata y en terminales nerviosas simpáticas. (Pertwee 1999; Howlett et al. 2002). El receptor CB2 es un polipéptido de 360 aminoácidos con una homología de hasta el 68% con el receptor CB1 (Munro et al. 1993). Se localiza en células del sistema inmune (Howlett et al. 2002).

Los receptores CB1 y CB2 están acoplados a proteínas $G_{i/o}$, G_s y $G_{q/11}$ siendo los de subtipo $G_{i/o}$ los principales (Glass y Northhup 1999; Lauckner et al. 2005). La activación de esta proteína conduce a la inhibición de la enzima adenilato ciclasa y a la estimulación de la vía de las quinasas activadas por mitógeno (MAP quinasas) en diferentes sistemas (Howlett et al. 2002; Pertwee 2008). También, estos receptores a través de proteínas $G_{i/o}$ están acoplados

negativamente a canales iónicos de calcio de tipo –N y –P/Q y canales de potasio de tipo –D y positivamente a canales de potasio de tipo –A y corrientes rectificadoras de potasio (Howlett et al. 2002)). Por otro lado, los receptores CB2 no regulan la función de canales iónicos (Felder et al. 1995) solo modifican el movimiento de Ca^{2+} intracelular en ciertas células (Zoratti et al. 2003). Estos efectos producen en las neuronas una menor excitabilidad y reducción de neurotransmisores (Freund et al. 2003) y en células endócrinas la inactivación de adenilato ciclasa disminuye la concentración de calcio intracelular inhibiendo la liberación de ciertas hormonas (Nakata et al. 2007). Existen estudios que sugieren la existencia de efectos cannabinoides que no están mediados por los receptores CB1 y CB2 (Di Marzo et al. 2000) y actualmente son llamados receptores huérfanos (Brown 2007; Pertwee 2007). También se sabe que los cannabinoides actúan en receptores PPAR alfa y PPAR y regulando la expresión de diversos genes (O'Sullivan 2007).

4.5. Anestésicos Inhalatorios

El concepto de anestésico inhalatorio se refiere a los agentes en forma líquida a temperatura ambiente a 1 atmósfera de presión y los cuales requieren del uso de un vaporizador para su administración (por ejemplo; isoflurano, sevoflurano y desflurano), así como también a los agentes que se encuentran en forma gaseosa contenidos en cilindros como el óxido nitroso (N_2O) y el xenón (imagen 5).

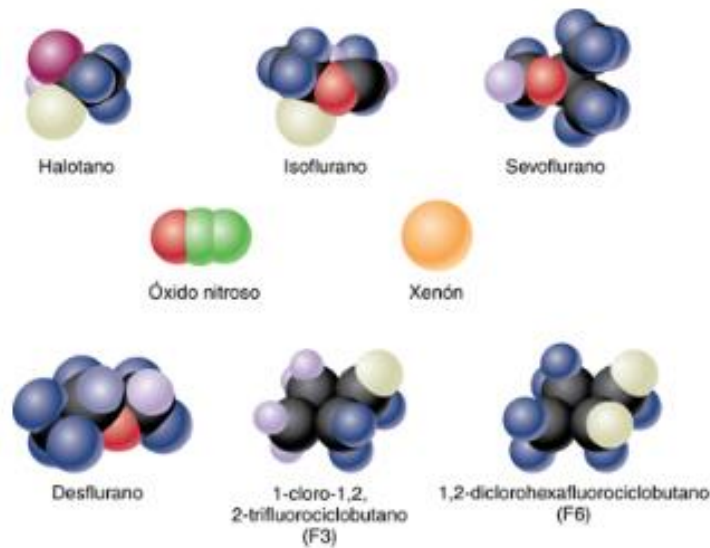


Imagen 5. Estructura tridimensional de los anestésicos inhalatorios.

Los anestésicos inhalatorios actuales son herramientas importantes para alterar de forma reversible las funciones del sistema nervioso central.

Como los anestésicos inhalatorios son tanto captados como eliminados mediante intercambio alveolar entre gas y sangre, se puede controlar la dosis del fármaco en los gases alveolares espirados y no se precisa un metabolismo dependiente del tejido su eliminación.

4.6. Antecedentes históricos de los anestésicos inhalatorios

Desde que se utilizó por primera vez el óxido nitroso por Watt in 1844 y el éter por Morton en 1846, se ha investigado un gran número de agentes anestésicos inhalatorios. Sin embargo, a través del tiempo, se ha eliminado el uso clínico de algunos, ya que se ha observado múltiples efectos no deseados, y actualmente muchos de ellos solo permanecen en los registros históricos de la anestesia (imagen 6).

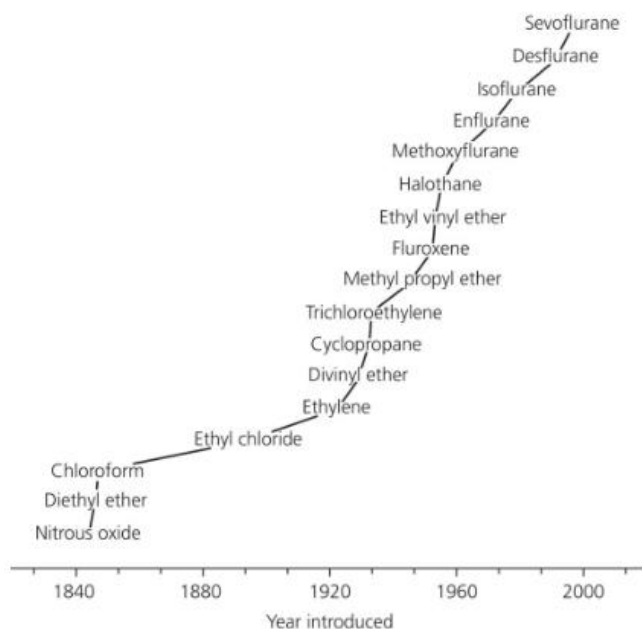


Imagen 6. Anestésicos inhalatorios a través del tiempo.

En los años 50's se desarrolló el halotano, hidrocarburo alifático halogenado que posee átomos de Br, Cl y F. Su molécula no es del todo estable, ya que sufre descomposición en contacto con luz ultravioleta y con cal sodada. La descomposición que sufre frente a la cal sodada es, junto con su metabolismo orgánico posterior, responsable de la aparición de productos de degradación tóxicos, para el paciente. Además, se observó que el halotano sensibilizaba al miocardio frente a catecolaminas, convirtiéndolo en un agente arritmogénico. Posteriormente, se desarrollaron éteres halogenados al apreciar que la introducción de uniones de tipo éter hacia desaparecer la actividad arritmogénica. Estas nuevas moléculas

entre las que destacan el metoxiflurano, enflurano, isoflurano y más recientemente el sevoflurano y desflurano, incorporan más átomos de flúor con el fin de aumentar su estabilidad. No obstante, la adición de flúor en los que sufren cierta descomposición química y degradación metabólica (metoxiflurano y sevoflurano) son responsables de fenómenos de toxicidad en algunas especies.

4.7. Isoflurano

El isoflurano es un isómero estructural del enflurano y existe como una mezcla racémica de dos isómeros ópticos (Stevens 1972). Es un líquido transparente que se suministra en botellas de vidrio de color obscuro y no requiere el uso de ningún conservador. La alta volatilidad del isoflurano junto con su solubilidad relativamente baja en sangre y tejidos, permite una inducción y recuperación de la anestesia notablemente más rápida que con dosis equipotentes de halotano y su baja solubilidad en tejidos grasos evita la acumulación en sujetos obesos y durante el mantenimiento anestésico es fácil realizar cambios rápidos en la profundidad anestésica. El isoflurano es irritante para las vías respiratorias, causando secreciones de la vía aérea, tos y dificultad para respirar. Por lo tanto, no es adecuado para la inducción con mascarilla en seres humanos. Este problema no parece ser un problema clínico relevante en medicina veterinaria.

Se ha utilizado ampliamente en seres humanos y animales durante más de 40 años. La depresión respiratoria es mayor que con el halotano. El isoflurano causa una marcada caída dependiente de la dosis en la presión arterial y la resistencia vascular sistémica a dosis cercanas a 1 CAM, hay poca depresión miocárdica, la frecuencia cardíaca se mantiene estable, por lo que el gasto cardíaco por lo general se mantiene estable. El isoflurano no sensibiliza el miocardio a las arritmias inducidas por catecolaminas. Al igual que el sevoflurano y el desflurano, el isoflurano a 1 CAM o menor, conserva la respuesta de la vasculatura cerebral al CO₂ y puede disminuir la resistencia vascular cerebral y la tasa metabólica cerebral. El isoflurano sufre una pequeña cantidad de biotransformación (0.2%), los principales metabolitos son el ácido trifluoroacético y el fluoruro inorgánico, pero el riesgo de hepatitis mediada por el sistema inmunitario en pacientes susceptibles es mucho menor que en el caso del halotano. El isoflurano puede interactuar con la cal sodada para

formar monóxido de carbono (Kharach 2008), pero las cantidades son menores que con la utilización de desflurano.

4.8. Concentración alveolar mínima

La potencia de los anestésicos inhalatorios para inmovilización quedaron establecidas en los estudios clásicos de los años sesenta (Eger 2002) que definieron la concentración alveolar mínima (CAM) de un anestésico inhalatorio a presión atmosférica como la necesaria para impedir el movimiento en respuesta a un estímulo doloroso en el 50% de los individuos. El concepto de CAM evolucionó dentro de un paradigma unitario de acción anestésica y reflejó las prioridades de la práctica clínica. Como consecuencia, la prevención del movimiento (inmovilidad) se convirtió en un criterio de los efectos anestésicos, que se suponía ocurría en el cerebro. La CAM es similar a la concentración para un efecto del 50% (EC₅₀) plasmática de los anestésicos intravenosos porque las concentraciones de anestésicos inhalatorios reflejan las concentraciones en otros órganos tras el equilibrio, que se alcanza antes en los órganos bien perfundidos como el encéfalo y el corazón. El concepto de CAM aportó a los investigadores y a los clínicos una referencia universal para medir un criterio de valoración anestésico definido (inmovilidad), permitiendo las comparaciones apropiadas de los resultados experimentales y acelerando la investigación de laboratorio y clínica sobre los mecanismos anestésicos.

A pesar del uso clínico generalizado de los anestésicos inhalatorios, el conocimiento actual de sus mecanismos moleculares, celulares y de redes neurológicas es incompleto. Este vacío crítico en la farmacología de una de las clases farmacológicas más importantes en medicina no solo impide un uso racional de los anestésicos disponibles, sino que también dificulta el desarrollo de nuevos anestésicos que pueden conseguir de modo selectivo los criterios de valoración deseables de la anestesia con menos efectos secundarios cardiovasculares, respiratorios y posiblemente neuropsicológicos. Aunque se han logrado avances importantes en el conocimiento farmacológico de los anestésicos intravenosos mediante estudios genéticos y moleculares, las acciones de los anestésicos inhalatorios a nivel molecular y celular son complejos y aun poco claros. Sigue sin ser posible trazar con precisión la secuencia de fenómenos que van desde las interacciones anestésico inhalatorio-diana, a

través de niveles ascendentes de complejidad biológica, hasta los distintos efectos conductuales que caracterizan el estado mixto de anestesia.

Junto con el avance en la identificación de los mecanismos moleculares de la anestesia, nuestro conocimiento de la naturaleza del estado anestésico ha evolucionado. Aunque es posible provocar un estado de anestesia general con anestésicos inhalatorios administrados en concentraciones apropiadas, el uso de estas concentraciones tiene numerosos efectos secundarios a corto y probablemente a largo plazo. Ahora se sabe que la anestesia consiste en componentes o sustratos separables y al menos parcialmente independientes, cada uno con mecanismos diferentes, aunque probablemente superpuestos, en distintos puntos del sistema nervioso central y con variaciones en las potencias relativas de fármacos específicos (Rudolph 2004). La inmovilización, el principal indicador de la CAM, se debe en gran parte al efecto en la médula espinal de los anestésicos inhalatorios (Antognini 1993), pero no al de los barbitúricos, por ejemplo. Por el contrario, es poco probable que la médula espinal sea el lugar principal de fenómenos, como la amnesia y la inconsciencia, que están relacionados con la función cortical.

4.9. Dianas moleculares de los anestésicos inhalatorios

Los canales iónicos son las dianas moleculares más prometedoras de los anestésicos inhalatorios. Los canales iónicos regulados por neurotransmisores, en concreto los receptores GABA_A, glicina y glutamato tipo NMDA, son los candidatos principales debido a sus distribuciones apropiadas en el SNC, las funciones fisiológicas esenciales en la transmisión sináptica inhibitoria-excitadora y las sensibilidades a concentraciones clínicamente relevantes de los anestésicos (Rudolph 2004; Bertaccini et al. 2007). Otros canales iónicos sensibles a los anestésicos inhalatorios son la familia de los canales regulados por nucleótido cíclico activado por hiperpolarización HCN (del inglés hyperpolarization-activated cyclic nucleotide) que provocan corrientes marcapasos (Bertaccini et al. 2007) y regulan la excitabilidad dendrítica, los canales de K⁻ de “fuga” con dominio de dos poros (K_{2P}) que mantienen el potencial de membrana en reposo en muchas células (Patel et al. 1999) y los canales de Na⁻ y Ca²⁻ regulados por voltaje (Bertaccini et al. 2007). Los anestésicos inhalatorios pueden dividirse en dos clases en función de sus propiedades farmacológicas. La primera clase corresponde a los anestésicos inhalatorios potentes (volátiles) con

modulación positiva de receptores GABA_A, que también tienen efectos notables compatibles con la anestesia en otros canales/receptores como potenciación de los receptores de glicina inhibidores, inhibición de receptores NMDA excitadores y de acetilcolina nicotínicos neuronales, activación de canales de K_{2P} e inhibición de los canales presinápticos de Na⁻. La segunda clase son los anestésicos inhalatorios gaseosos como ciclopropano, óxido nítrico y xenón. Estos anestésicos son inactivos en los receptores GABA_A, pero bloquean los receptores N-metil-D- aspartato (NMDA) y activan ciertos canales de K_{2P} (receptores de K⁺ con dominio de 2 poros) a concentraciones clínicas.

4.10. Dexmedetomidina

Los agonistas de los receptores α_2 -adrenérgicos ejercen efectos sedantes, ansiolíticos, hipnóticos, analgésicos y simpaticolíticos. Su posible aplicación en el ámbito de la anestesia se identificó en personas tratadas con clonidina (Maze y Tranquilli 1991), observándose disminución de la concentración alveolar mínima del halotano (Bloor et al. 1982). La dexmedetomidina es un agonista de los receptores α_2 con mayor selectividad de los receptores α_2 -adrenérgicos, con una relación de selectividad por el receptor $\alpha_2:\alpha_1$ de 1.600:1 en comparación con la clonidina 220:1. La dexmedetomidina se introdujo en la práctica clínica en los Estados Unidos en 1999 y recibió la autorización de la FDA como sedante a corto plazo (menor a 24 horas) en adultos sometidos a ventilación mecánica en la unidad de cuidados intensivos (UCI). Actualmente se emplea en la sedación y como ansiolítico en la UCI, así como fuera de esta en distintas situaciones, como la sedación y la analgesia adyuvante en el quirófano y la sedación en unidades diagnósticas/tratamiento, también es utilizada en el tratamiento del síndrome de abstinencia o durante la desintoxicación en pacientes adultos y pediátricos (Gerlach y Dasta 2007).

La dexmedetomidina es el S-enantiómero de la medetomidina, una molécula utilizada en la sedación y analgesia en medicina veterinaria (Dexdomitor) (Tobias 2007) (imagen 7).

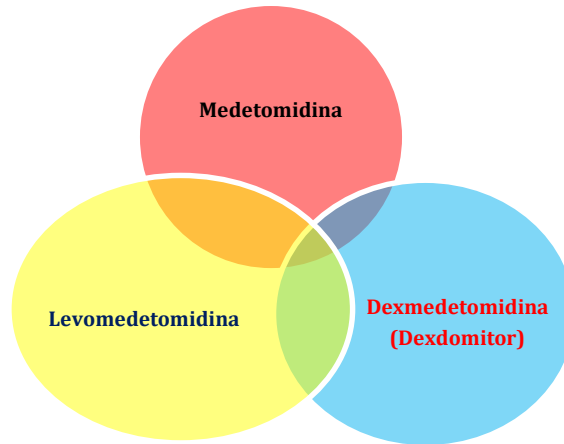


Imagen 7. La dexmedetomidina. El S-enantiómero de la medetomidina.

La dexmedetomidina, es un agonista completo de los receptores α_2 (Virtanen 1988). La dexmedetomidina pertenece a la subclase imidazol de agonistas de los receptores α_2 .

La dexmedetomidina ejerce una acción no selectiva sobre los distintos subtipos de receptores adrenérgicos α_2 acoplados a proteínas G de membrana. Las vías intracelulares engloban la inhibición del adenilato ciclasa y la modulación de los canales iónicos de calcio y potasio. Se han descrito tres subtipos de receptores adrenérgicos α_2 en el ser humano: α_{2A} , α_{2B} , y α_{2C} (Aantaa y Jalonen 2006). Los receptores adrenérgicos α_{2A} se localizan en la periferia, mientras que los otros dos subtipos lo hacen en el cerebro y la médula espinal. Los receptores adrenérgicos α_2 postsinápticos localizados en los vasos sanguíneos periféricos tienen un efecto vasoconstrictor, mientras que los presinápticos inhiben la liberación de noradrenalina y pueden atenuar la vasoconstricción. La respuesta global a los agonistas de los receptores adrenérgicos α_2 se vincula con la estimulación de los subtipos localizados en el sistema nervioso central (SNC) y la medula espinal. Estos receptores participan en los efectos simpaticolíticos, sedantes y antinociceptivos de los receptores adrenérgicos α_2 (Aantaa y Jalonen 2006). Los agonistas de los receptores α_2 muestran unos efectos fácilmente reversibles por acción de antagonistas α_2 adrenérgicos (p. ej., atipamezol) (Aho et al. 1993). Este último solo está autorizado su uso en medicina veterinaria, no así en medicina humana.

4.11. Efectos en el sistema nervioso central

Los agonistas de los receptores α_2 ejercen un efecto sedante-hipnótico mediante su acción en los receptores localizados en el *locus coeruleus* y su acción analgésica en los situados en el *locus coeruleus* y la médula espinal (Guo et al. 1996). La dexmedetomidina induce un descenso de la actividad de las proyecciones del *locus coeruleus* hacia el núcleo ventrolateral preóptico, como consecuencia de lo cual se incrementan la liberación de GABA y galanina en el núcleo tuberomamilar y se reduce la secreción de histamina en las proyecciones corticales y subcorticales (Aantaa y Jalonen 2006). Los agonistas de los receptores α_2 adrenérgicos inhiben la conductancia iónica de los canales de calcio de tipo L o P y potencian la conductancia de los canales de potasio activados por calcio y controlados por voltaje. El efecto sedante de la dexmedetomidina se obtiene por medio de las vías endógenas que favorecen el sueño, lo que genera patrones de sueño naturales (Angst et al. 2004).

El efecto analgésico de los agonistas de los receptores α_2 adrenergicos se lleva a cabo mediante la estimulación del receptor α_{2C} y α_{2A} en la asta dorsal de la medula espinal, lo que inhibe de manera directa la transmisión del dolor al reducir la liberación de neurotransmisores pronociceptivos, sustancia P, glutamato e hiperpolarización de las interneuronas (Ishii et al. 2008). En procedimientos de anestesia general, este fármaco reduce la CAM de los anestésicos inhalatorios (Aho et al. 1991; Aantaa et al. 1990).

4.12. Protección y otros efectos sobre el sistema nervioso central

No se conocen bien los efectos protectores en el SNC. En modelos animales de isquemia cerebral incompleta y reperusión, la administración de dexmedetomidina se asoció a una disminución de la necrosis cerebral y una mejora del desenlace neurológico. Se cree que este fármaco reduciría el flujo eferente de catecolaminas intracerebrales durante la lesión. La neuroprotección puede atribuirse a la modulación de diversas proteínas proapoptósicas y antiapoptósicas (Engelhard et al. 2003). Asimismo, la reducción del neurotransmisor excitador glutamato durante la lesión podría ser responsable de algunos de los efectos protectores (Talke y Bickler 1996).

4.13. Opioides y Opiáceos

El término *opioide* se utiliza para referirse a todos los compuestos relacionados con el opio. La palabra *opio* deriva de *opos*, que en griego significa jugo, y es el fármaco que se encuentra en el jugo de la adormidera o planta del opio, *Papaver somniferum*. Los opiáceos son medicamentos que derivan del opio y entre ellos hay productos naturales como la morfina, la codeína, la tebaína y varios derivados semisintéticos que se originan a partir de los primeros. La primera referencia al opio la encontramos en los escritos de Teofrasto, en el siglo III a. C. Durante la Edad Media, muchos de los usos del opio fueron muy apreciados. El opio contiene más de 20 alcaloides distintos. En 1806, Serturmer describió el aislamiento de una sustancia pura en el opio y la denominó morfina, en honor a Morfeo, el dios griego del sueño. Hacia la mitad del siglo XIX, en el ámbito de la medicina se comenzó a extender el uso de alcaloides puros en lugar del opio sin modificar.

Los opioides se pueden clasificar como naturales, semisintéticos y sintéticos. Los naturales se pueden dividir en dos clases químicas: los fenantrenos (morfina y codeína) y las bencilisoquinolinas (papaverina). Los opioides semisintéticos son derivados de la morfina, de la que se han realizado numerosas modificaciones. Los opioides sintéticos se clasifican en cuatro grupos: los derivados de la morfina (levorfanol), los derivados difenilicos o de la metadona (metadona y d-propoxifeno), los benzomorfanos (fenazocina y pentazocina) y los derivados de la fenilpiperidina (meperidina, fentanilo, alfentanilo, sufentanilo y remifentanilo).

4.14. Receptores opioides

En 1973, tres grupos independientes de investigadores describieron la presencia de zonas de unión de los opioides en el sistema nervioso. A partir de los experimentos farmacológicos, se postuló la existencia de tres tipos de receptores opioides, a los que se denominó: μ , el receptor del tipo morfina; κ , el receptor del tipo cetociclazocina, y σ , el receptor del tipo SKF10047 (N-alilnormetazocina). Además, en los vasos del conducto deferente del ratón se encontraron receptores de gran afinidad por las encefalinas, a los que se le denominó receptores δ . Más tarde, un péptido nuevo, denominado nociceptina u orfanina FQ, se identificó como un agonista endógeno del cuarto miembro de la familia de los receptores

opioides (Reinscheid et al. 1995; Meunier et al. 1995). Los receptores μ , δ y κ de opioides y el receptor de nociceptina comparten entre sí aproximadamente un 50% de homología en la secuencia de aminoácidos. Se ha propuesto una clasificación farmacológica adicional del receptor μ en subtipos μ_1 , μ_2 y μ_3 , pero la identidad molecular de estos subtipos de receptor aún debe clasificarse.

4.15. Mecanismos de transducción de la señal molecular

Los receptores opioides pertenecen a la familia de los receptores acoplados a la proteína G. Se ha probado que la activación de los receptores opioides produce la activación de las proteínas G sensibles a la toxina *pertusis* (G_1 y/o G_o). La expresión del receptor opioide clonado, en células cultivadas, pro transfección del ADNc clonado ha facilitado el análisis de los mecanismos de transducción de la señal intracelular que se activan por los receptores opioides (Minami M y Satoh M 1995). La activación del receptor opioide inhibe el adenilato ciclasa y reduce el contenido celular de monofosfato de adenosina cíclico (AMPC). Electrofisiológicamente se ha demostrado que, mediante el receptor de los opioides, se inhiben los canales de Ca^{2-} dependientes de voltaje y se activan los canales de potasio (K^+) de rectificación interna. Como resultado, la activación de dichos receptores produce una reducción de la excitabilidad neuronal. Por el contrario, también se ha descrito que los opioides pueden estimular la entrada de Ca^{2-} en las células neuronales cultivadas (Wandless et al. 1996). Recientemente se ha observado que la cinasa relacionada con la señal extracelular, una clase de proteína cinasa activada por mitógenos, es activada por los receptores opioides (Fukuda et al. 1996).

La exposición a largo plazo de los receptores opioides a los agonistas induce unos mecanismos de adaptación celular que podrían estar implicados en la tolerancia, la dependencia y los síntomas de privación.

4.16. Mecanismo de la analgesia opioide

Se ha establecido que su efecto analgésico deriva de su capacidad de inhibir directamente la transmisión ascendente de la información nociceptiva desde la asta dorsal de la médula espinal y de activar los circuitos de control del dolor que descienden desde el mesencéfalo a través de la medula ventromedial rostral (MVR) hasta la asta dorsal de la médula espinal.

Los estudios inmunohistoquímicos y los análisis de hibridación *in situ* han probado que los receptores opioides se expresan en distintas zonas del SNC (Mansour et al. 1995). Entre dichas zonas se encuentran la amígdala, la formación reticular mesencefálica, la MGP (materia gris periacueductal) y la MVR. Sin embargo, el papel de los receptores opioides en todas estas zonas no se conoce completamente. La micro inyección de morfina en la MGP o la estimulación eléctrica directa de esta zona produce una analgesia que se puede bloquear con naloxona. El efecto de los opioides en la MGP influye en la MVR, que a su vez modula la transmisión nociceptiva en el asta dorsal de la médula espinal a través de la acción de la vía de inhibición descendente. Por tanto, los opioides causan analgesia por el efecto directo en la médula espinal y también por la interacción con las neuronas localizadas en lugares distantes al sitio donde se administran los opioides. Los receptores de serotonina de tipo 7 (5-HT₇) medulares también tienen una importante función en los efectos antinociceptivos de la morfina sistémica (Dogrul y Seyrek 2006). La distribución de los receptores opioides en los circuitos descendentes del control del dolor indica que hay una gran superposición entre los receptores μ y κ . La interacción entre el receptor κ y el μ puede tener importancia para modular la transmisión del estímulo nociceptivo desde los centros nociceptivos superiores y el asta dorsal de la médula espinal. El receptor μ provoca analgesia en los circuitos descendentes del control del dolor, al menos en parte, al eliminar la inhibición del ácido γ -aminobutírico (gabaérgica) en las neuronas que se proyectan desde la MVR a la MGP y desde las neuronas medulares que se proyectan a la MVR (Fields et al. 1991). El efecto de los agonistas de los receptores μ es invariablemente analgésico, mientras que los agonistas del receptor κ pueden ser analgésicos o antianalgésicos. Estos efectos de los agonistas de los receptores κ en la modulación del dolor en el tronco del encéfalo parecen ser opuestos a los de los agonistas del receptor μ (Pan et al. 1997).

El efecto analgésico de los opioides se debe a los mecanismos locales en la médula espinal, además de a la inhibición de los circuitos descendentes. En la médula espinal, los opioides actúan en las sinapsis, tanto en la zona presináptica como en la postsináptica. Los receptores opioides se expresan de forma abundante en la sustancia gelatinosa, donde los opioides inhiben la liberación de sustancia P por las neuronas sensitivas primarias. El efecto de los opioides en las vías bulbo espinales es fundamental para su efecto analgésico. Está claro que los efectos de los opioides en el prosencéfalo contribuyen a su acción analgésica. La

descerebración evita la analgesia cuando se ha sometido a ratas a pruebas de dolor con la prueba de la formalina (Matthies y Franklin 1992), y que la microinyección de opioides en distintas zonas del prosencéfalo causa analgesia durante esta prueba (Manning et al. 1994). La analgesia como resultado de la administración sistémica de morfina se encontraba inhibida tanto en la prueba de la aplicación de calor en la cola como en la de la formalina si se lesionaba o se inactivaba de forma reversible el núcleo central de la amígdala, lo que prueba que el efecto de los opioides en el prosencéfalo interviene en la analgesia (Manning y Mayer 1995; Manning y Mayer 1995B). Por otro lado, los opioides pueden también producir analgesia a través de mecanismos periféricos (Stein 1995). Las células inmunitarias que infiltran los lugares inflamados pueden liberar sustancias parecidas a los opioides endógenos, que actúan sobre los receptores opioides que se localizan en la neurona sensitiva primaria (Stein 1995).

En los seres humanos, los fármacos parecidos a la morfina producen analgesia, somnolencia, cambios en el estado de ánimo y embotamiento mental. Una característica esencial de la analgesia por opioides es que no se asocia a pérdida de conocimiento. Cuando se administra morfina a personas normales, sin dolor, estas pueden experimentar una sensación desagradable. El alivio del dolor que causan los opioides parecidos a la morfina es relativamente selectivo, de modo que no se ven afectados otros tipos de sensaciones. Los pacientes suelen decir que el dolor está aún presente, sin embargo, dicha sensación es menos molesta. Es fundamental distinguir el dolor que resulta de la estimulación de los receptores nociceptivos, que es transmitido por vías neuronales intactas (dolor nociceptivo), del dolor producido por la lesión de las estructuras neuronales, que con frecuencia implica supersensibilidad neuronal (dolor neuropático). El dolor nociceptivo suele responder a los analgésicos opioides, mientras que el neuropático lo hace mal y puede requerir de dosis elevadas. Los analgésicos opioides no solo afectan a la sensación del dolor, sino que también influyen en la respuesta afectiva al mismo. Los efectos analgésicos, así como los efectos colaterales de los opioides, varían entre los individuos (Angst et al. 2012; Angst et al. 2012B). Los estudios en el ser humano y en los animales indican que existen diferencias relacionadas con el sexo en el efecto que sobre el comportamiento tienen los opioides (Kest et al. 2000). Se ha estudiado la influencia de la morfina en el dolor inducido de manera experimental en

voluntarios sanos y demostraron que había diferencias en la analgesia que produce la morfina en los distintos sexos, de modo que en las mujeres la morfina muestra mayor potencia, aunque con un inicio y un fin del efecto más lentos (Sarton et al. 2000). Aun no se conoce el mecanismo en virtud del cual existen estas diferencias entre sexos. Las características farmacocinéticas y farmacodinámicas de los opioides varían con frecuencia a lo largo del día, como se demostró con la morfina oral en el dolor crónico (Gourlay et al. 1995). La duración de la analgesia con sufentanilo intratecal mostraba un patrón temporal con una variación del 30% a lo largo del día en mujeres en la primera fase del parto (Debon et al. 2004). Con fentanilo medular-epidural o hidromorfona sistémica, el momento de administración en el día no parece influir en la duración de la analgesia durante el parto (Scavone et al. 2010). El impacto potencial de la cronobiología en la práctica clínica no está claro y justifica la investigación sobre la influencia de los ritmos circadianos sobre las acciones de los opioides. La analgesia producida por la acción periférica de los opioides sigue siendo una cuestión controvertida. Una revisión reciente de los metaanálisis ha concluido que la administración intraarticular de morfina provoca un efecto analgésico leve (Gupta et al. 2001). Dicho efecto podría ser dependiente de dosis, por lo que no puede excluirse del todo que se trate de un efecto sistémico.

4.17. Morfina

La farmacocinética de la morfina difiere a la del fentanilo. Las diferencias se deben, en gran parte, a que la morfina es, en comparación, menos liposoluble. Existe una captación de morfina por el pulmón relativamente menor durante el primer paso. La pK_2 de la morfina (8) es mayor que el pH fisiológico y, por tanto, después de una inyección intravenosa, solo una pequeña fracción (10-20%) se encuentra no ionizada. La entrada al cerebro y la salida de este de la morfina son, al parecer, más lentas que las de otros opioides. Alrededor del 20-40% de la morfina se halla unida a proteínas plasmáticas, en especial a la albumina. La morfina se metaboliza sobre todo mediante conjugación en el hígado, aunque el riñón desempeña una función primordial en el metabolismo extrahepático de dicho fármaco. La morfina -3-glucurónido (M3G) es el principal metabolito de la morfina, pero no se une al receptor opioide y posee un escaso efecto analgésico. La M3G puede antagonizar de forma aguda a la morfina, lo cual podría contribuir a la variabilidad analgésico de esta última. Se ha

comunicado que M3G causa convulsiones en animales y alodinia en niños (Lotsch 2009). La morfina-6-glucurónido (M6G) constituye aproximadamente el 10% de los metabolitos de la morfina, y es agonista del receptor μ más potente que la morfina, con una duración del efecto similar a esta. Se sabe que la M6G contribuye de forma significativa al efecto analgésico de la morfina, incluso en pacientes con una función renal normal (Romberg et al. 2004). La proporción de extracción hepática de la morfina es alta, por lo que la biodisponibilidad de morfina que se administra por vía oral es mucho menor (20-30%) que tras la administración intramuscular o subcutánea. La M6G es uno de los principales compuestos activos de la morfina cuando se administra por vía oral.

5. Justificación

El consumo crónico de cannabinoides naturales y sintéticos con fines lúdicos y medicinales es cada vez mayor, por lo tanto es necesario considerar el efecto que estas sustancias podrían provocar sobre la concentración alveolar mínima de isoflurano y su interacción con la morfina y dexmedetomidina bajo anestesia inhalatoria.

6. Hipótesis

1. La administración crónica de WIN 55,212-2 disminuye la concentración alveolar mínima de isoflurano en ratas.
2. La administración crónica de WIN 55,212-2 en combinación con morfina o dexmedetomidina, disminuye la concentración alveolar mínima de isoflurano en ratas.

7. Objetivos

1. Determinar el efecto que provoca la administración crónica de WIN 55,212-2 sobre la concentración alveolar mínima de isoflurano en ratas.
2. Identificar el efecto que la morfina y la dexmedetomidina presentan sobre la concentración alveolar mínima de isoflurano en ratas tratadas crónicamente con WIN 55,212-2.

8. Material y Método

8.1. Animales y alojamiento

En este estudio, con número de protocolo 3492/2013CHT, se incluyeron 72 ratas macho de la raza Wistar con un peso de 310 ± 20 g, dicho estudio fue sometido a la comisión de bioética y bienestar animal (COBYBA) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma del Estado de México para su revisión y posterior aprobación. Las ratas fueron alojadas en grupos de 4 animales en jaulas de Plexiglas con ciclos de 12 horas de luz y 12 horas de obscuridad (luz prendida a las 07:00 h), con humedad relativa de 50-60% y una temperatura ambiente de $23 \pm 2^\circ\text{C}$. El alimento (Prolab® RMH 2500, USA) y el agua se proporcionaron a libre acceso. A los animales se les permitió aclimatarse durante una semana antes de la realización de iniciar el diseño experimental, el cual se llevó acabo de 09:00-12:00 horas. Todos los animales fueron manipulados de acuerdo a los lineamientos establecidos en la guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio con fines de experimentación.

8.2. Procedimiento anestésico

La inducción anestésica se llevó a acabo colocando a la rata en una cámara de inducción (imagen 8) a la que se administró un flujo de 5 L/min de oxígeno al 100%, en el cual se vaporizó isoflurano (Forane; Baxter Laboratories, USA) a una concentración de 5%.



Imagen 8. Cámara de inducción anestésica. La unidad experimental es colocada dentro hasta alcanzar el plano anestésico deseado para posteriormente realizar la intubación endotraqueal.

Una vez alcanzado en plano anestésico deseado, se retiró de la cámara de inducción y se colocó en decúbito dorsal para realizar la intubación endotraqueal. Posteriormente, se abrió la cavidad oral y con la ayuda de un otoscopio, se visualizó la laringe y se introdujo en su interior una guía de teflón con punta roma (imagen 9) y a través de la misma se insertó un catéter de teflón de 16G (Introcan; B-Braun, Brazil) el cual se aseguró al maxilar por medio de cinta adhesiva.



Imagen 9. Intubación endotraqueal. La unidad experimental es colocada en decúbito dorsal, se introduce el otoscopio en la cavidad oral para poder visualizar de la laringe y realizar la intubación endotraqueal.

A continuación, el catéter fue conectado a un circuito anestésico con una T-Ayre modificada para obtener un mínimo espacio muerto (imagen 10). La correcta colocación del catéter fue confirmada por medio del análisis de absorción de CO₂ a través de espectrometría por infrarrojos (BeneView T5, mindray, Multi-gas offers, Nanshan, China). El flujo de O₂ se reguló a 1 L/min y la concentración de isoflurano se ajustó al 2% (según las respuestas hemodinámicas durante el procedimiento de instrumentación). Durante todo el estudio, la ventilación fue espontánea.



Imagen 10. T-Ayre modificada utilizando una llave de tres vías con el objetivo de evitar la re inhalación de dióxido de carbono conectada al circuito anestésico.

8.3. Instrumentación y monitorización

Se realizó una disección quirúrgica de la arteria carótida izquierda por medio de una incisión longitudinal de aproximadamente 2 cm en la región ventral del cuello (imagen 11), posteriormente la arteria carótida se cateterizó (imagen 12 y 13) utilizando un catéter de 24G (Introcan; B-Braun, Brazil), la cual se conectó a un transductor de presión (imagen 14 y 15) calibrado para la monitorización de la presión arterial sanguínea, así como para la recolección de sangre arterial y análisis de gases sanguíneos.



Imagen 11. Incisión longitudinal en la región ventral del cuello para aproximación de la arteria carótida izquierda.



Imagen 12. Exposición y aislamiento de la arteria carótida. Una vez visualizada la arteria carótida, se realiza la disección de la misma y posteriormente se expone y aísla del tejido circundante colocando en ambos extremos sutura de ceda para que sea posible su cateterización.

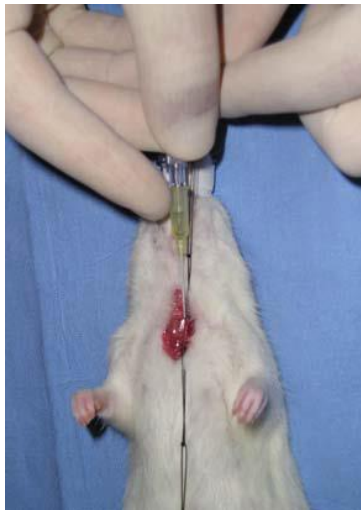


Imagen 13. Cateterización de la arteria carótida. Se introduce un catéter de calibre 24G en la arteria carótida con el objetivo de medir la presión arterial por métodos invasivos y poder obtener la muestra sanguínea arterial para su evaluación gasométrica.



Imagen 14. Cierre de la incisión y conexión al transductor de presión arterial invasiva así como a una llave de tres vías para la obtención de sangre arterial para su análisis gasométrico.



Imagen 15. Transductor de presión arterial invasiva colocado a la altura del corazón de la unidad experimental y calibrado a la presión atmosférica a la cual se realizó el experimento.

La frecuencia cardíaca (FC), presión arterial sistólica (PAS), presión arterial diastólica (PAD) y presión arterial media (PAM) se monitorizaron de manera continua (BeneView T5,

Mindray, Nanshan, China). Para el análisis gasométrico de sangre arterial (GEM Premier 3000; Instrumentation Laboratory, UK), se obtuvieron 0.3 mL de sangre inmediatamente después de la determinación de la CAM para asegurar (en ese momento) que los valores se encontraran dentro de parámetros fisiológicos normales. La temperatura rectal se monitorizó de manera continua (BeneView T5, Mindray, Nanshan, China) y fue mantenida entre 37°C y 38°C por medio de un sistema de calentamiento por convección (Equator®, SurgiVet®, Smiths Medical PM Inc., USA) (imagen 16 y 17).



Imagen 16. Control del sistema de calentamiento por convección Equator®.



Imagen 17. Mantenimiento de la temperatura corporal entre 37°C y 38°C durante el procedimiento anestésico y al momento de la medición de la CAM.

Para la administración de los fármacos endovenosos, se realizó la cateterización de una vena caudal de la cola por medio de un catéter 24G (Introcan; B-Braun, Brazil) (imagen 18).



Imagen 18. Cateterización de vena caudal lateral por medio de un catéter calibre 24G para la administración de fármacos.

La fracción inspirada de isoflurano ($F_{I_{Iso}}$), la fracción espirada de isoflurano ($F_{E_{Iso}}$), presión parcial de CO_2 tele-espiratorio ($PEtCO_2$) y la frecuencia respiratoria (FR) también se monitorizaron de manera continua a través de una muestra de gas alveolar tele-espiratorio (60 mL/min) obtenida por medio de un catéter insertado a través del tubo endotraqueal colocado en un adaptador entre tubo endotraqueal y la T-de Aire, utilizando un analizador de gases mediante espectrometría por infrarrojos (BeneView T5, Mindray, Multi-gas offers, Nanshan, China).

8.4. Determinación de la concentración alveolar mínima (CAM)

Una vez realizada la instrumentación y antes de la determinación de la CAM de isoflurano, la $F_{E_{Iso}}$ se mantuvo constante durante un periodo de 15 minutos a una concentración reportada previamente por los autores (Chávez et al. 2015) en el cual la CAM de Isoflurano en ratas fue de 1.32%. Una vez alcanzada dicha concentración y transcurrido el periodo de equilibrio entre el gas alveolar, la sangre arterial y el sistema nervioso central, la CAM_{Iso} se determinó por el método descrito por Quasha y col (1980) el cual consiste en la aplicación de un

estímulo doloroso supramáximo a una concentración específica conocida de anestésico inhalatorio, mediante la utilización de una pinza hemostática Rochester Dean de 8-pulgadas de longitud, la cual se colocó cerca de la base de la cola de la rata, perpendicularmente a la misma y abarcando la totalidad de la anchura, posteriormente la pinza se cerró hasta la primera cremallera durante 60 segundos (imagen 19).



Imagen 19. Aplicación de un estímulo doloroso supramáximo a una concentración específica conocida de anestésico inhalatorio. El estímulo se realiza con una pinza Rochester Dean de 8 pulgadas de longitud.

La cola siempre se estimuló en un lugar próximo al sitio de la prueba anterior, nunca en el mismo lugar. Se consideró una respuesta positiva si la rata presentaba movimientos musculares bruscos y voluntarios de la cabeza, cuerpo o extremidades. La falta de movimiento de la cabeza, cuerpo o cola, así como rigidez y tremor muscular, deglución o masticación fueron consideradas como respuestas negativas. Si la respuesta era positiva, la concentración del agente anestésico se incrementaba 10% y se mantenía durante 15 minutos antes de la siguiente aplicación del estímulo. En caso de observarse una respuesta negativa, la concentración de isoflurano se reducía un 10% y se esperó el mismo periodo de tiempo antes de la siguiente medición. La CAM se consideró como el valor medio entre la concentración que permitía el movimiento y la concentración a la cual se prevenía el

movimiento intencionado como respuesta al estímulo nocivo. En cada rata, la CAM se calculó por duplicado.

8.5. Corrección de la CAM en base a la presión barométrica

El valor de la CAM obtenida en cada unidad experimental, se corrigió a 1 atm de presión utilizando la siguiente formula:

$CAM\text{ corregida} = CAM\text{ obtenida} \times \text{Presión barométrica ambiental (mmHg)} / 760\text{ mmHg.}$

Según la estación meteorológica oficial, la presión barométrica ambiental a la altitud a la cual se llevó acabo el experimento (2,680 m sobre el nivel del mar) es de 556 mmHg.

Una vez finalizado cada experimento, la Fe_{ISO} se incrementó al 5% y los animales fueron sacrificados por medio de la administración endovenosa de pentobarbital sódico.

8.6. Diseño experimental

Utilizando un generador de números aleatorios (Excel 2007, Microsoft office), los animales fueron distribuidos en 9 grupos (n=8).

Este estudio está conformado por dos partes. La parte 1 consta del experimento 1A, 1B y 1C; la parte 2 está conformada del experimento 2A y 2B.

Parte 1

Experimento 1A: Medición de la CAM de isoflurano en el grupo CAM_{ISO} , $CAM_{ISO+WIN55}$ y $CAM_{ISO+VEH}$

En el Grupo $CAM_{ISO+WIN55}$ se administró 1 mg/Kg de WIN 55,212-2 (mesylate salt, Sigma-Aldrich, St Louis, MO) intra-peritoneal (i.p.) cada 24 horas (a las 09:00 h) durante 21 días. El WIN 55,212-2 se suspendió en una solución vehículo compuesta por 0.3% de Tween 80 en solución salina (0.9%) como lo describió Tanda y col (1997).

Al grupo $CAM_{ISO+VEH}$ se administró 0.3 ml de la solución vehículo i.p. cada 24 horas (a las 09:00h) durante 21 días. La medición de la CAM de isoflurano en el grupo $CAM_{ISO+WIN55}$ y $CAM_{ISO+VEH}$ se realizó 24 horas después de la última administración del tratamiento correspondiente (día 22).

En el grupo control (CAM_{ISO}) se realizó la medición de la CAM sin efecto de algún tratamiento.

Experimento 1B: Medición de la CAM de isoflurano después de 8 días de suspendido el cannabinoide sintético.

En el grupo CAM_{ISO+WIN8D} se administró 1 mg/Kg de WIN 55,212-2 i.p. cada 24 horas (a las 09:00 h) durante 21 días. La medición de la CAM de isoflurano se realizó 8 días después de la última administración de WIN 55,212-2 (día 29).

Experimento 1C: Antagonismo del receptor CB1.

En el grupo CAM_{ISO+WIN55+ANT} se administró 1 mg/Kg de WIN 55,212-2 i.p. cada 24 horas (a las 09:00 h) durante 21 días. La medición de la CAM de isoflurano se realizó 24 horas después de la última administración del cannabinoide (día 22). En este grupo experimental se administró 1 mg/Kg IV del antagonista cannabinoide específico del receptor CB1 conocido como SR141716A (rimonabant) 30 minutos antes del inicio de la medición de la CAM. El SR141716A se suspendió en una solución vehículo compuesta por 0.3% de Tween 80 en solución salina (0.9%).

Parte 2:

Experimento 2A: Efecto de la morfina sobre la CAM de isoflurano en ratas tratadas crónicamente con el cannabinoide sintético WIN 55,212-2.

En el grupo CAM_{ISO+WIN55+MOR} se administró 1 mg/Kg de WIN 55,212-2 i.p. cada 24 horas (a las 09:00 h) durante 21 días. La medición de la CAM de isoflurano se realizó 24 horas después de la última administración del tratamiento correspondiente (día 22), 45 minutos antes de la medición de la CAM se administró 3 mg/Kg IV de morfina (Graten, PiSA, México). En el grupo CAM_{ISO+MOR}, no se administró WIN 55,212-2 y se realizó la medición de la CAM de isoflurano 45 minutos después de administrarse 3 mg/Kg IV de morfina.

Experimento 2B: Efecto de la dexmedetomidina sobre la CAM de isoflurano en ratas tratadas crónicamente con el cannabinoide sintético WIN 55,212-2.

En el grupo CAM_{ISO+WIN55+DEX} se administró 1 mg/Kg de WIN 55,212-2 i.p. cada 24 horas (a las 09:00 h) durante 21 días. La medición de la CAM de isoflurano se realizó 24 horas después de la última administración del tratamiento correspondiente (día 22), 30 minutos

antes de la medición de la CAM se administró una infusión continua intravenosa de dexmedetomidina a una dosis de 0.25 $\mu\text{g}/\text{Kg}/\text{minuto}$. En el grupo $\text{CAM}_{\text{ISO}+\text{DEX}}$, se administró una infusión continua intravenosa de dexmedetomidina a dosis de 0.25 $\mu\text{g}/\text{Kg}/\text{minuto}$ 30 minutos antes de la medición de la CAM. En este grupo no se administró el cannabinoide sintético.

8.7. Análisis estadístico

Parte 1:

El análisis estadístico de los datos se realizó utilizando Prism 6 (GraphPad Software, Inc., EE.UU.). Los datos se presentan como media \pm desviación estándar (DE). Para la evaluación de la normalidad de los datos se utilizó la prueba de Shapiro-Wilk. Se realizó un análisis de varianza y una prueba post hoc de los grupos utilizando la prueba de Holm-Sidak's. Los valores se consideraron estadísticamente significativos cuando el valor de $p < 0.05$.

Parte 2:

En análisis estadístico se realizó mediante una prueba pareada de t de Student entre el grupo CAM_{ISO} y el Grupo $\text{CAM}_{\text{ISO}+\text{MOR}}$, así como entre el grupo $\text{CAM}_{\text{ISO}+\text{WIN55}}$ y el grupo $\text{CAM}_{\text{ISO}+\text{WIN55}+\text{MOR}}$. La prueba pareada de t de Student también se utilizó entre los grupos CAM_{ISO} y $\text{CAM}_{\text{ISO}+\text{DEX}}$ y entre el grupo $\text{CAM}_{\text{ISO}+\text{WIN55}}$ y el grupo $\text{CAM}_{\text{ISO}+\text{WIN55}+\text{DEX}}$. Los valores se consideraron estadísticamente significativos cuando el valor de $p < 0.05$.

9. Resultados

Parte 1

Tabla 1. Se muestran los valores del experimento 1A: Grupo control (CAM_{ISO}), del grupo al cual se le administró la solución vehículo $CAM_{ISO+VEH}$ y del grupo $CAM_{ISO+WIN55}$. También contiene la CAM del experimento 1B ($CAM_{ISO+WIN8D}$) y 1C ($CAM_{ISO+WIN55+ANT}$).

Grupo	CAM	Incremento de la CAM %	Valor - p
CAM_{ISO}	1.32 ± 0.06	-	-
$CAM_{ISO+VEH}$	1.36 ± 0.03	3%	< 0.4784
$CAM_{ISO+WIN55}$	$1.69 \pm 0.09^{*#}$	28%	< 0.0001 ^{**}
$CAM_{ISO+WIN8D}$	$1.67 \pm 0.07^{*#}$	26%	< 0.0001 ^{**}
$CAM_{ISO+WIN55+ANT}$	$1.57 \pm 0.09^{*#+}$	18%	< 0.0001 ^{**} <0.0173 ⁺

*Estadísticamente significativo comparado con el grupo control CAM_{ISO} ($p < 0.05$).

#Estadísticamente significativo comparado con el grupo $CAM_{ISO+VEH}$ ($p < 0.05$).

+Estadísticamente significativo comparado con el grupo $CAM_{ISO+WIN}$ ($p < 0.05$).

Parte 2

Experimento 2A:

Tabla 2. Efecto de la morfina sobre la CAM de isoflurano en ratas.

Grupo	CAM	Reducción de la CAM en %	Valor - p
CAM_{ISO}	1.32 ± 0.06	-	-
$CAM_{ISO+MOR}$	$0.97 \pm 0.02^*$	26%	< 0.0001

*Estadísticamente significativo ($p < 0.05$).

Tabla 3. Efecto de la morfina sobre la CAM de isoflurano en ratas tratadas crónicamente con el cannabinoide sintético WIN 55,212-2.

Grupo	CAM	Reducción de la CAM en %	Valor - p
CAM_{ISO+WIN55}	1.69 ± 0.09	-	-
CAM_{ISO+WIN55+MOR}	1.55 ± 0.08*	8%	< 0.0094

*Estadísticamente significativo (p < 0.05).

Experimento 2B:

Tabla 4. Efecto de la dexmedetomidina sobre la CAM de isoflurano en ratas.

Grupo	CAM	Reducción de la CAM en %	Valor - p
CAM_{ISO}	1.32 ± 0.06	-	-
CAM_{ISO+DEX}	0.68 ± 0.10*	48%	< 0.0001

*Estadísticamente significativo (p < 0.05).

Tabla 5. Efecto de la dexmedetomidina sobre la CAM de isoflurano en ratas tratadas crónicamente con el cannabinoide sintético WIN 55,212-2.

Grupo	CAM	Reducción de la CAM en %	Valor - p
CAM_{ISO+WIN55}	1.69 ± 0.09	-	-
CAM_{ISO+WIN55+DEX}	0.67 ± 0.08*	60%	< 0.0001

*Estadísticamente significativo (p < 0.05).

9.1. Artículo Científico Número 1. Publicado

RESEARCH ARTICLE


Effect of Acetaminophen Alone and in Combination with Morphine and Tramadol on the Minimum Alveolar Concentration of Isoflurane in Rats

Julio R. Chavez¹, José A. Ibancovich^{1*}, Pedro Sanchez-Aparicio², Carlos M. Acevedo-Arcique³, Rafael Moran-Muñoz¹, Sergio Recillas-Morales²

1 Faculty of Veterinary Medicine, Department of Anesthesiology, Universidad Autónoma del Estado de México, El Cerrillo Piedras Blancas, Toluca, Estado de México, Mexico, **2** Faculty of Veterinary Medicine, Department of Pharmacology, Universidad Autónoma del Estado de México, El Cerrillo Piedras Blancas, Toluca, Estado de México, México, **3** Faculty of Veterinary Medicine, Universidad Autónoma de Yucatán, Department of Anesthesiology and Pharmacology, Merida, Yucatán, México

* ibanvet@gmail.com



 OPEN ACCESS

Citation: Chavez JR, Ibancovich JA, Sanchez-Aparicio P, Acevedo-Arcique CM, Moran-Muñoz R, Recillas-Morales S (2015) Effect of Acetaminophen Alone and in Combination with Morphine and Tramadol on the Minimum Alveolar Concentration of Isoflurane in Rats. PLoS ONE 10(11): e0143710. doi:10.1371/journal.pone.0143710

Editor: Francesco Staffieri, University of Bari, ITALY

Received: June 9, 2015

Accepted: November 8, 2015

Published: November 25, 2015

Copyright: © 2015 Chavez et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: This study was funded from the Autonomous University of the State of Mexico in order to strengthen research. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Abstract

Background

It has been observed that acetaminophen potentiates the analgesic effect of morphine and tramadol in postoperative pain management. Its capacity as an analgesic drug or in combinations thereof to reduce the minimum alveolar concentration (MAC) of inhalational anesthetics represents an objective measure of this effect during general anesthesia. In this study, the effect of acetaminophen with and without morphine or tramadol was evaluated on the isoflurane MAC.

Methods

Forty-eight male Wistar rats were anesthetized with isoflurane in oxygen. MAC_{ISO} was determined from alveolar gas samples at the time of tail clamping without the drug, after administering acetaminophen (300 mg/kg), morphine (3 mg/kg), tramadol (10 mg/kg), acetaminophen (300 mg/kg) + morphine (3 mg/kg), and acetaminophen (300 mg/kg) + tramadol (10 mg/kg).

Results

The control and acetaminophen groups did not present statistically significant differences ($p = 0.98$). The values determined for MAC_{ISO} after treatment with acetaminophen + morphine, acetaminophen + tramadol, morphine, and tramadol were $0.98\% \pm 0.04\%$, $0.99\% \pm 0.009\%$, $0.97\% \pm 0.02\%$, and $0.99\% \pm 0.01\%$, respectively.

Conclusions

The administration of acetaminophen did not reduce the MAC of isoflurane and did not potentiate the reduction in MAC_{ISO} by morphine and tramadol in rats, and therefore

does not present a sparing effect of morphine or tramadol in rats anesthetized with isoflurane.

Introduction

Acetaminophen, also known as paracetamol, has analgesic and antipyretic properties like NSAIDs. However, its classification is controversial, because unlike NSAIDs it has little anti-inflammatory activity, it does not induce side effects in the gastrointestinal tract and kidney, and it does not affect platelet function when applied at the recommended dose [1]. Acetaminophen is the drug of choice in patients where the administration of NSAIDs is contraindicated [2]. Although its clinical use began more than 100 years ago, its mechanism of action has not been fully determined. Indeed, acetaminophen has constantly been compared with NSAIDs, starting with Vane et al. [3] who demonstrated that the mechanism of action for aspirin-like drugs is the inhibition of prostaglandin synthesis. The mechanism by which acetaminophen exerts its action has been investigated in various research studies. Flower et al. [4] reported that the inhibition of brain cyclooxygenase is responsible for the antipyretic effect of paracetamol, generating the concept of a central mechanism of action. More recently, Chandrasekharan et al. [5] reported the existence of a variant of COX-1 in dogs. This enzyme, named COX-3 was identified in the central nervous system and was found to be selectively inhibited by antipyretic-analgesic drugs such as acetaminophen, suggesting a mechanism for pain and possibly fever reduction. Nevertheless, Kis et al. [6] recommended that these results should not be generalized to other species such as rodents and humans, and pointed out several methodological contradictions in the study. Currently, the existence of a third isozyme is the subject of debate [7]. A study by Hinz et al. [8] showed that acetaminophen is a selective COX-2 inhibitor in humans. In fact, there are reports of reduced inflammation in patients undergoing dental surgery [9]. At present, it is known that the mechanism of action of acetaminophen is complex because it involves the inhibition of cyclooxygenases both centrally and peripherally depending on the concentration of circulating peroxides. Therefore, some authors suggest classifying acetaminophen as an atypical NSAID [10]. At the same time, research has been conducted showing that acetaminophen is a prodrug, and indicating that the analgesic effect of acetaminophen is generated by the indirect activation of cannabinoid CB₁ receptors [11,12]. Also, it has been

shown that acetaminophen has an effect on the descending serotonergic pathway [13,14] and may interact with opioidergic systems [15,16] or nitric oxide pathways [17]. Overall, the mechanism of action of acetaminophen is currently not entirely clear.

Acetaminophen is used alone and in combination with other drugs—the administration of analgesic drugs with different mechanisms of action is often used to provide synergistic or additive effects, and in order to decrease the dose required to control pain and side effects [18]. Several studies have shown a morphine-sparing effect when morphine is combined with acetaminophen in the postoperative period [19,20]. Gomez de Segura et al. [21] demonstrated that aspirin potentiates the sparing effect of morphine on the MAC of isoflurane (MAC_{ISO}) in rats. The opioid sparing effect of aspirin in perioperative management was demonstrated for the first time, using a reduction in the MAC of halogenated anesthetics as an objective measure to test the antinociceptive potency of analgesic drugs and their combinations in patients under general anesthesia [22,23]. To our knowledge, the benefit of combining acetaminophen and morphine in terms of reducing the minimum alveolar concentration (MAC) of isoflurane has not been reported, although acetaminophen is commonly used in the management of perioperative pain [24].

Another drug used in combination with acetaminophen is tramadol, an atypical opioid and synthetic analog of codeine [25,26]. These drugs have been clinically proven to be effective in the control of postoperative pain and in oncology patients [27,28] but there is no information about the effect of this combination on the MAC of inhaled anesthetics.

The aim of this study was evaluate the effect of acetaminophen on the reduction in MAC_{ISO} produced by morphine and tramadol in rats, and to test the hypothesis that acetaminophen synergistically potentiates the effect of morphine and tramadol on MAC_{ISO} reduction in rats.

Materials and Methods

Animals and husbandry

Forty-eight male Wistar rats, weighing 310 ± 20 g (290–330 g) were included in this experiment, which was approved by the Animal Research Ethics Committee for Animal Experimentation (protocol number 3492/2013CHT) of the Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma del Estado de México. Rats were housed in groups of six in Plexiglas cages, with a 12 h light/12 h dark cycle (lights on at 07:00), with a relative humidity of 50–60% and ambient temperature $22 \pm 2^\circ\text{C}$. The animals had free access to rodent food (Prolab® RMH 2500, USA) and water was provided ad libitum. Animals were allowed to acclimatize for at least one week before the studies took place. All the studies were performed during the morning (09:00–12:00). All animals were handled according to the guidelines set forth in the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals.

Anesthesia

Anesthesia induction was conducted by placing each rat in the induction chamber providing 5% isoflurane (Forane; Baxter Laboratories, USA) in a continuous oxygen flow of 5 L/min. Once the animal was anesthetized, tracheal intubation was performed with the animal positioned in dorsal recumbency using a 16-gauge catheter (Introcan; B-Braun, Brazil). A flexible, blunt-tip, wire guide was inserted into the trachea with an otoscope and used to direct the endotracheal catheter. Correct placement of the catheter was confirmed by CO₂ infrared-absorption analysis (BeneView T5, mindray, Multi-gas offers, Nanshan, China). The catheter was then connected to a small T-piece breathing system with minimal dead space and a fresh gas flow of 1 L/min of oxygen. The isoflurane concentration was adjusted as necessary based on assessment of the palpebral reflex and hemodynamic responses during instrumentation. During the study, the rats were breathing spontaneously.

Instrumentation and monitoring

The carotid artery was exposed via surgical cut-down and catheterized using a 24-gauge catheter (Introcan; B-Braun, Brazil); this was connected to a pressure transducer system for direct blood pressure monitoring and the collection of arterial blood to determine blood gases. Systolic, diastolic and mean arterial blood pressures (SAP, DAP and MAP, respectively) and heart rate (HR) were continuously monitored (BeneView T5, Mindray, Nanshan, China). For blood gas analysis, 0.3 mL of blood was obtained immediately before the first noxious stimulation and another one after determining the MAC (GEM Premier 3000; Instrumentation Laboratory, UK). The rectal temperature was maintained between 37°C and 38°C by means of a Convective Warming System (Equator®; SurgiVet®), Smiths Medical PM Inc., USA). The tail vein was catheterized using a 24-gauge catheter for the administration of drugs (Introcan; B-Braun, Brazil). Inspired ISO ($F_{i\text{ISO}}$), end-tidal ($F_{e\text{ISO}}$) concentrations, end-tidal carbon dioxide tension ($P_{e\text{tCO}_2}$) and respiratory rate (RR) were continuously measured with an infrared gas analyzer

(BeneView T5, mindray, Multi-gas offers, Nanshan, China) by endotracheal gas sampling (60 mL/min) obtained by means of a catheter inserted through the endotracheal tube with the tip located at the level of the carina.

MAC determination

Before the Control, MAC_{ISO} , and $MAC_{ISO + Treatment}$ group determination, the inspired concentration of isoflurane was adjusted to 1.3%, which is a value close to the MAC of isoflurane (MAC_{ISO}) reported in a study conducted by Criado et al. [29] in which, the MAC_{ISO} value determined in all rats was 1.29%. Once this concentration was achieved, it was maintained for 15 minutes, in order to achieve equilibrium between alveolar gas (end-tidal), arterial blood and the brain [22]. The MAC of isoflurane was determined by the tail clamp method described by Quasha et al. [22]. A painful noxious stimulus was applied with a hemostat damped (20 cm Rochester Dean Hemostatic forceps) on the tail at a specific end-tidal concentration of each volatile agent. The tail was clamped to the first ratchet lock for 60 seconds. The tail was always stimulated proximally to the previous test site. A positive motor response was considered if jerking or twisting motion of the head, body, or movement of the extremities was observed. Negative responses included lack of movement of the head and limbs, muscle rigidity, shivering, tail movement, swallowing, and chewing.

If the response was negative, the concentration of isoflurane was decreased by 10% and maintained at this concentration for at least 15 minutes, before repeated application of the stimulus. When a positive response was elicited, the concentration of the volatile anesthetic was increased by 10%. The MAC_{ISO} was calculated as the mean value between the highest concentration that permitted movement in response to the stimulus and the lowest concentration that prevented such movement. In each rat, the MAC was evaluated in duplicate. The person assessing the response was blinded with respect to the drugs administered to each rat.

The isoflurane MAC values were corrected to sea level by use of the formula (barometric pressure of location / 760 mmHg) x obtained MAC value. The mean barometric pressure was obtained from the official city meteorological station for the altitude at which the experiment was performed (2,680 m above sea level) and was 556 mmHg. At the end of each experiment, the animals were euthanized with pentobarbital given intravenously (Anestosal, Pfizer, México) to animals deeply anaesthetized with the inhalant agent.

Experimental design

The 48 rats were randomly assigned to one of six groups ($n = 8$) using a random number generator (Excel 2007, Microsoft Office). Morphine $3 \text{ mg kg}^{-1} \text{ IV}$ (Graten, PiSA, México) was administered and the MAC determined (morphine group, $n = 8$). The acetaminophen group ($n = 8$) received $300 \text{ mg kg}^{-1} \text{ IV}$ of acetaminophen (Tempra IV, Bristol-Myers Squibb, Italy), the tramadol group ($n = 8$) received $10 \text{ mg kg}^{-1} \text{ IV}$ of tramadol (tramadol, AMSA, México) the acetaminophen + morphine group ($n = 8$) received $300 \text{ mg kg}^{-1} \text{ IV}$ of acetaminophen + $3 \text{ mg kg}^{-1} \text{ IV}$ of morphine and the acetaminophen + tramadol group ($n = 8$) received $300 \text{ mg kg}^{-1} \text{ IV}$ of acetaminophen + $10 \text{ mg kg}^{-1} \text{ IV}$ of tramadol. All drugs were administered into the tail vein within a period of 3–5 minutes to reduce cardiovascular and respiratory effects. The MAC of isoflurane was determined without prior drug administration (Control MAC_{ISO} group, $n = 8$). Forty-five minutes later the inspired concentration of isoflurane was adjusted to 1.3%. The $MAC_{ISO + Treatment}$ determination was initiated 45 minutes after the administration of drugs and after the inspired concentration of isoflurane had been adjusted to 1.3%.

Table 1. Effect of acetaminophen alone and in combination with morphine and tramadol on the minimum alveolar concentration of isoflurane in rats.

Group	MAC	% MAC reduction	P-value
Control MAC _{ISO} group	1.32 ± 0.06	-	-
MAC _{ISO} +Acetaminophen	1.31 ± 0.05	0.76	0.98
MAC _{ISO} +Tramadol	0.99 ± 0.01*	25	< 0.0001
MAC _{ISO} +Morphine	0.97 ± 0.02*	26.5	< 0.0001
MAC _{ISO} +Acetaminophen/Tramadol	0.99 ± 0.009*	25	< 0.0001
MAC _{ISO} +Acetaminophen/Morphine	0.98 ± 0.04*	25.7	< 0.0001

*Statistically significant compared to the control group and the acetaminophen group (p < 0.05).

doi:10.1371/journal.pone.0143710.t001

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using Prism 6 (GraphPad Software, Inc., USA). The Shapiro-Wilk test was used for the assessment of data normality. Data are reported as mean ± standard deviation (SD). Analysis of variance was performed and post hoc comparison of the groups was performed using the Holm-Sidak test. Values were considered statistically different when p < 0.05.

Results

The time from the adjustment of the inspired concentration of isoflurane to 1.3% until MAC determination was 96 ± 10 min in the Control MAC_{ISO} group, the application of four stimuli being required. The time from the administration of drugs and the adjustment of the inspired concentration of isoflurane to 1.3% until MAC determination was 118 ± 1.4 min in the MAC_{ISO} + Treatment group, the application of six stimuli being required.

The mean ± SD Control MAC_{ISO} group value determined was 1.32% ± 0.06%. After acetaminophen administration the MAC_{ISO} + Treatment value was 1.31% ± 0.05%; this was not significantly different to the Control MAC_{ISO} group (p = 0.98). Morphine and tramadol were found to be equipotent, and decreased the MAC_{ISO} to 0.97% ± 0.02% and 0.99% ± 0.01%, respectively. These values were not significantly different from each other, but they were both significantly different from the Control MAC_{ISO} group (p = 0.0001). During the administration of morphine and tramadol, a decrease in arterial pressure and transient bradypnea was observed.

The administration of acetaminophen + morphine and acetaminophen + tramadol reduced the MAC_{ISO} to a level similar to that observed when only morphine or tramadol was administered. The values are shown in the Table 1 (S1 Table). The blood gas values, which were within normal parameters are shown in Table 2 (S2 Table).

Table 2. Blood gas, bicarbonate and lactate values obtained when determining the MAC in the different treatment groups.

Variable	Control MAC _{ISO} group	Acetaminophen	Tramadol	Morphine	Acetaminophen Tramadol	Acetaminophen Morphine
pH	7.3 ± 0.02	7.3 ± 0.005	7.3 ± 0.01	7.3 ± 0.005	7.3 ± 0.01	7.3 ± 0.01
PaO ₂ mmHg	289.3 ± 15	284.9 ± 7	270.4 ± 3	279.4 ± 10	285.9 ± 14	286.8 ± 13
PaCO ₂ mmHg	37.89 ± 0.15	40.09 ± 1	38.06 ± 2	37.06 ± 0.87	39.09 ± 3	40.09 ± 4
HCO ₃ mmHg	25.31 ± 0.31	24.43 ± 0.44	25.06 ± 0.37	23.06 ± 0.11	24.43 ± 0.42	23.43 ± 0.16
Lactate mmol/L	1.23 ± 0.05	1.35 ± 0.009	1.13 ± 0.008	1.13 ± 0.005	1.35 ± 0.007	1.35 ± 0.01

doi:10.1371/journal.pone.0143710.t002

Discussion

For the evaluation of analgesic efficacy resulting from the coadministration of NSAIDs and opioids, visual scales have been used, but these evaluations have been carried out in the post-surgical period [19,20,24]. The method used to evaluate the analgesic efficacy of a drug or combinations during general anesthesia assess the ability of drugs to reduce the MAC of inhalational anesthetics [22,23], which is defined as the end-tidal pressure of inhalant anesthetics necessary to avoid movement in 50% of individuals exposed to a supramaximal noxious stimulus [30].

This study shows the interaction in terms of MAC between acetaminophen, morphine and an atypical opioid, tramadol [25] in rats anesthetized with isoflurane.

In the present study, the Control MAC_{ISO} was similar to the isoflurane MAC reported by Criado et al. [29] who reported a value of $1.29\% \pm 0.08\%$, and the value reported by Wolff et al. [31] of $1.38\% \pm 0.05\%$. Similarly, the values determined for the MAC_{ISO} after morphine and tramadol were similar to those reported previously [31].

In the present experiment, we did not observe any interaction between acetaminophen and morphine or tramadol, which contrasts with the results reported by Benito et al. [32], where it was found that acetaminophen at the same doses used in this study potentiated the sevoflurane MAC reduction produced by remifentanyl in rats.

There have been various studies on MAC sparing effects of different analgesic drugs [33,34,35,36]. However, the type of interaction that occurs between opioids and NSAIDs in terms of the reduction in the MAC of inhalational anesthetics has not shown consistent results. Vaughan et al. [37] identified a mechanism by which the inhibition of cyclooxygenase (COX) by NSAIDs potentiates the action of μ -receptor agonists in rats, by inhibiting GABAergic synaptic transmission in the opioid receptor-rich midbrain region periaqueductal grey area. One year later, it was shown that this synergistic effect is generated by the inhibition of COX-1 and not of COX-2 [38]. However, one study which evaluated the effect of selective COX-2 NSAIDs, such as meloxicam and carprofen in dogs [39], reported an additive effect in reducing the MAC of sevoflurane caused by butorphanol, a synthetic opioid which exerts its effects mainly at κ -opioid receptors. On the other hand, Santos et al. [40] reported a lack of interaction between meloxicam and morphine in reducing the isoflurane MAC in rats. Likewise, it has been reported that a COX-1 preferential flunixin, meglumine, does not potentiate the effect of morphine in reducing the isoflurane MAC [41]. This is in contrast to the potentiating effect of aspirin on morphine in reducing the isoflurane MAC reported by Gomez de Segura et al. [21].

In light of this information, it is possible that the type of interaction between NSAIDs and inhalational anesthetics is influenced by the type of halogenated drug. The difference between our study and that by Benito et al. [32] was that in our study, the effect of acetaminophen was evaluated in the MAC of isoflurane and not of sevoflurane and the difference in the halogenated anesthetic used may be the factor which caused the different effects observed. Similarly, the mechanisms by which NSAIDs potentiate the effect of opioids in terms of MAC do not correspond with the selectivity of NSAIDs for the different types of cyclooxygenase.

All these data suggest that the mechanism of action by which NSAIDs generate the potentiation of the effect of opiates on the MAC of inhalational anesthetics is variable and dependent on species susceptibility, the type of opioid, and other mechanisms by which these drugs may interact. Also, considering that NSAIDs are a large group of drugs with different mechanisms of action, caution should be employed in generalizing the type of interactions they can generate when combined with opiates.

Conclusions

This study shows that acetaminophen does not reduce the MAC of isoflurane and does not potentiate the effect of morphine and tramadol in reducing the minimum alveolar concentration of isoflurane in rats. Therefore, acetaminophen does not present a sparing effect for morphine or tramadol in rats anesthetized with isoflurane.

Supporting Information

S1 Table. MAC of each of the individuals.

(DOCX)

S2 Table. Blood gases, bicarbonate and lactate in each individual when determining the MAC in the different groups.

(DOCX)

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: JRCM JAI RMM PSA SRM CMAA. Performed the experiments: JRCM JAI RMM PSA SRM. Analyzed the data: JRCM JAI RMM PSA SRM CMAA. Contributed reagents/materials/analysis tools: JRCM JAI RMM PSA SRM. Wrote the paper: JRCM JAI RMM PSA SRM CMAA.

References

1. Jahr JS, Lee VK. Intravenous acetaminophen. *Anesthesiol Clin*. 2010; 28: 619–645. doi: [10.1016/j.anclin.2010.08.006](https://doi.org/10.1016/j.anclin.2010.08.006) PMID: [21074742](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21074742/)
2. Bebenista MJ, Nowak JZ. Paracetamol: mechanism of action, applications and safety concern. *Acta Pol Pharm*. 2014; 71: 11–23. PMID: [24779190](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24779190/)
3. Vane JR. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nature*. 1971; 231: 232–235.
4. Flower RJ, Vane JR. Inhibition of prostaglandin synthetase in brain explains the anti-pyretic activity of paracetamol (4-acetamidophenol). *Nature*. 1972; 240: 410–411. PMID: [4564318](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4564318/)
5. Chandrasekharan NV, Dai H, Roos LT, Evanson NK, Tomsik J, Elton TS, et al. COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002; 99:13926–13931. PMID: [12242329](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12242329/)
6. Kis B, Snipes JA, Busija DW. Acetaminophen and the cyclooxygenase-3 puzzle: sorting out facts, fictions, and uncertainties. *J Pharmacol Exp Ther* 2005; 315: 1–7. PMID: [15879007](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15879007/)
7. Botting RM. Inhibitors of cyclooxygenases: mechanism, selectivity and uses. *J Physiol Pharmacol*. 2006; 57: 113–124. PMID: [17218763](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17218763/)
8. Hinz B, Cheremina O, Brune K. Acetaminophen (paracetamol) is a selective cyclooxygenase-2 inhibitor in man. *FASEB J*. 2008; 22: 383–390. PMID: [17884974](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17884974/)
9. Björnsson GA, Haanaes HR, Skoglund LA. A randomized, double-blind crossover trial of paracetamol 1000 mg four times daily vs ibuprofen 600 mg: effect on swelling and other postoperative events after third molar surgery. *Br J Clin Pharmacol*. 2003; 55: 405–412. PMID: [12680890](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12680890/)
10. Graham GG, Scott KF. Mechanism of action of paracetamol and related analgesics. *Inflammopharmacology*. 2003; 11: 401–413. PMID: [15035793](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15035793/)
11. Högestätt ED, Jönsson BAG, Emund A, Andersson DA, Björk H, Alexander JP, et al. Conversion of acetaminophen to the bioactive N-acetylphenolamine AM04 via fatty acid amide hydrolase-dependent arachidonic acid conjugation in the nervous system. *J Biol Chem*. 2005; 280: 31405–31412. PMID: [15987694](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15987694/)
12. Bertolini A, Ferrari A, Ottani A, Guerzoni S, Tacchi R, Leone S. Paracetamol: new vistas of an old drug. *CNS Drug Rev*. 2006; 12: 250–275. PMID: [17227290](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17227290/)
13. Alloui A, Chassaing C, Schmidt J, Ardid D, Dubray C, Cloarec A, et al. Paracetamol exerts a spinal, tropisetron-reversible, antinociceptive effect in an inflammatory pain model in rats. *Eur J Pharmacol*. 2002; 443: 71–77. PMID: [12044794](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12044794/)

14. Nakamura K, Li YQ, Kaneko T, Kato H, Negishi M. Prostaglandin EP3 receptor protein in serotonin and catecholamine cell groups: a double immunofluorescence study in the rat brain. *Neuroscience*. 2001; 103: 763–775. PMID: [11274793](#)
15. Smith HS. Potential analgesic mechanisms of acetaminophen. *Pain Physician*. 2009; 12: 269–280. PMID: [19165309](#)
16. Pini LA, Vitale G, Ottani A, Sandrini M. Naloxone-reversible antinociception by paracetamol in the rat. *J Pharmacol Exp Ther*. 1997; 280: 934–940. PMID: [9023309](#)
17. Bujalska M. Effect of nitric oxide synthase inhibition on antinociceptive action of different doses of acetaminophen. *Pol J Pharmacol*. 2004; 56: 605–610. PMID: [15591650](#)
18. Beaver WT. Combination analgesics. *Am J Med*. 1984; 10: 38–53.
19. Cobby TF, Crighton IM, Kyriakides K, Hobbs GJ. Rectal paracetamol has a significant morphine-sparing effect after hysterectomy. *Br J Anaesth*. 1999; 83: 253–256. PMID: [10618939](#)
20. Delbos A, Boccard E. The morphine-sparing effect of propacetamol in the orthopedic postoperative pain. *J Pain Symptom Manage*. 1995; 10: 279–286. PMID: [7541435](#)
21. Gómez de Segura IA, Criado AB, Santos M, Tendillo FJ. Aspirin synergistically potentiates isoflurane minimum alveolar concentration reduction produced by morphine in the rat. *Anesthesiology*. 1998; 89: 1489–1494. PMID: [9856724](#)
22. Quasha AL, Eger EI, Tinker JH. Determination and applications of MAC. *Anesthesiology*. 1980; 53: 314–334.
23. Docquier MA, Lavand'homme P, Ledermann C, Collet V, De Kock M. Can determining the minimum alveolar anesthetic concentration of volatile anesthetic be used as an objective tool to assess antinociception in animals? *Anesth Analg*. 2003; 97: 1033–1039. PMID: [14500153](#)
24. Remy C, Marret E, Bonnet F. Effects of acetaminophen on morphine side-effects and consumption after major surgery: meta-analysis of randomized controlled trials. *Br J Anaesth*. 2005; 94: 505–513. PMID: [15681586](#)
25. Lewis Kelly S, Han Nina H. Tramadol: a new centrally acting analgesic. *Am J Health Syst Pharm*. 1997; 54: 643–652. PMID: [9075493](#)
26. Dhillon S. Tramadol/paracetamol fixed-dose combination. *Clin Drug Invest*. 2010; 30: 711–738.
27. Schug SA. Combination analgesia in 2005—a rational approach: focus on paracetamol-tramadol. *Clin Rheumatol*. 2006; 25: 16–21.
28. Alfano G, Grieco M, Forino A, Meglio G, Pace MC, Iannotti M. Analgesia with paracetamol/tramadol vs. paracetamol/codeine in one day-surgery: a randomized open study. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2011; 15: 205–210. PMID: [21434488](#)
29. Criado AB, Gómez de Segura IA. Reduction of isoflurane MAC by fentanyl or remifentanyl in rats. *Vet Anaesth Analg*. 2003; 30: 250–256. PMID: [12925182](#)
30. Eger EI, Saidman LJ, Brandstater B. Minimum alveolar anesthetic concentration: a standard of anesthetic potency. *Anesthesiology*. 1965; 26: 756–763. PMID: [5844267](#)
31. De Wolff MH, Leather HA, Wouters PF. Effects of tramadol on minimum alveolar concentration (MAC) of isoflurane in rats. *Br J Anaesth*. 1999; 83: 780–783. PMID: [10690143](#)
32. Benito J, Aguado D, Abreu MB, Garcia-Fernandez J, Gómez de Segura IA. Remifentanyl and cyclooxygenase inhibitors interactions in the minimum alveolar concentration of sevoflurane in the rat. *Br J Anaesth*. 2010; 105: 810–817. doi: [10.1093/bja/aeq241](#) PMID: [20861096](#)
33. Gutiérrez-Blanco E, Victoria-Mora JM, Ibancovich-Camarillo JA, Sauri-Aroco CH, Bollo-González ME, Acevedo-Arcique CM, Marin-Cano G, Steagall PV. Evaluation of the isoflurane-sparing effects of fentanyl, lidocaine, ketamine, dexmedetomidine, or the combination lidocaine-ketamine-dexmedetomidine during ovariohysterectomy in dogs. *Vet Anaesth Analg*. 2013; 40: 599–609. doi: [10.1111/vaa.12079](#) PMID: [23910822](#)
34. Krych HK, Steffey EP, Mama KR, Stanley SD. Effects of high plasma fentanyl concentrations on minimum alveolar concentration of isoflurane in horses. *Am J Vet Res*. 2009; 70: 1193–1200. doi: [10.2460/ajvr.70.10.1193](#) PMID: [19795933](#)
35. Steagall PV, Teixeira Neto FJ, Minto BW, Campagnol D, Corêa M. Evaluation of the isoflurane-sparing effects of lidocaine and fentanyl during surgery in dogs. *J Am Vet Med Assoc*. 2006; 229: 522–527. PMID: [16910849](#)
36. Turner PV, Kerr CL, Healy AJ, Taylor WM. Effect of meloxicam and butorphanol on minimum alveolar concentration of isoflurane in rabbits. *Am J Vet Res*. 2006; 67: 770–774. PMID: [16649908](#)
37. Vaughan CW, Ingram SL, Connor MA, Christie MJ. How opioids inhibit GABA-mediated neurotransmission. *Nature*. 1997; 390: 611–614. PMID: [9403690](#)

38. Vaughan CW. Enhancement of opioid inhibition of GABAergic synaptic transmission by cyclo-oxygenase inhibitors in rat periaqueductal grey neurons. *Br J Pharmacol.* 1998; 123: 1479–1481. PMID: [9605550](#)
39. Yamashita K, Okano Y, Yamashita M, Umar MA, Kushiro T, Muir WW. Effects of Caprofen and Meloxicam with or without butorphanol on the minimum alveolar concentration of sevoflurane in dogs. *J Vet Med Sci.* 2008; 70: 29–35. PMID: [18250569](#)
40. Santos M, Kunkar V, Garcia-Iturralde P, Tendillo FJ. Meloxicam, a specific COX-2 inhibitor, does not enhance the isoflurane minimum alveolar concentration reduction produced by morphine in the rat. *Anesth Analg.* 2004; 98: 359–363. PMID: [14742370](#)
41. Doherty TJ, Will WA, Rohrbach BW, Geiser DR. Effect of morphine and flunixin meglumine on isoflurane minimum alveolar concentration in goats. *Vet Anaesth Analg.* 2004; 31: 97–101. PMID: [15053747](#)

9.2. Artículo Científico Número 2. Enviado

PLOS ONE

Isoflurane MAC and sparing effect of morphine and dexmedetomidine in rats chronically treated with the synthetic cannabinoid WIN 55,212-2

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	PONE-D-17-35949R1
Article Type:	Research Article
Full Title:	Isoflurane MAC and sparing effect of morphine and dexmedetomidine in rats chronically treated with the synthetic cannabinoid WIN 55,212-2
Short Title:	Isoflurane MAC, sparing effect of morphine and dexmedetomidine in rats treated with WIN 55,212-2
Corresponding Author:	José A Ibancovich, Ph.D Universidad Autónoma del Estado de México Toluca, Estado de Mexico MEXICO
Keywords:	MAC Isoflurane Morphine Dexmedetomidine WIN 55,212-2
Abstract:	<p>Background: The isoflurane MAC and the effect of morphine and dexmedetomidine were measured in rats chronically treated with WIN 55,212-2.</p> <p>Methods: The isoflurane minimum alveolar concentration (MAC) was determined in 72 male rats from alveolar gas samples at time of tail clamping under the following conditions: MACIsoflurane Control group, rats treated 21 days with vehicle (MACIsoflurane+Vehicle), rats treated for 21 days with WIN 55,212-2 (MACIsoflurane+WIN55), 8 days after stopping treatment (MACIsoflurane+WIN558), and 30 minutes after administering antagonist (MACIsoflurane+WIN55+Antagonist) in rats treated with WIN 55,212-2. The effect of morphine (MACIsoflurane+Morphine) and dexmedetomidine (MACIsoflurane+Dexmedetomidine) on isoflurane MAC in untreated rats and rats treated with WIN 55,212-2 (MACIsoflurane+WIN55+Morphine) and (MACIsoflurane+WIN55+Dexmedetomidine) was measured.</p> <p>Results: There were no significant differences between the MACIsofluraneControl and MACIsoflurane+Vehicle groups. In the MACIsoflurane+WIN55 group, increase of 1.32 ± 0.06 to 1.69 ± 0.09. After 8 days without treatment, MAC did not decrease. Statistical differences were observed between the MACIsoflurane+WIN55+Antagonist and MACIsoflurane+WIN55 groups. In the MACIsoflurane+Morphine group, there was a decrease of 1.32 ± 0.06 to 0.97 ± 0.02 in MAC and the MACIsoflurane+WIN55+Morphine showed a decrease of 1.69 ± 0.09 to 1.55 ± 0.08. The MACIsoflurane+Dexmedetomidine group showed of 1.32 ± 0.06 to 0.68 ± 0.10 decrease in MAC and the MACIsoflurane+WIN55+Dexmedetomidine group showed a decrease of 1.69 ± 0.09 to 0.67 ± 0.08.</p> <p>Conclusions: The administration of WIN 55,212-2 increases the MAC of isoflurane in rats, antagonism partially decreased the MAC. The effect of morphine on MAC of isoflurane is lower in rats treated with WIN 55,212-2.</p>
Order of Authors:	<p>Julio R Chavez-Monteagudo</p> <p>José A Ibancovich, Ph.D</p> <p>Jorge Osorio-Avalos</p> <p>Pedro Sanchez-Aparicio</p> <p>Sergio Recillas-Morales</p> <p>Rafael Moran-Muñoz</p> <p>Carlos Manuel Acevedo-Arcique</p>

Opposed Reviewers:	<p>Jose A Ibancovich, PhD Universidad Autonoma del Estado de Mexico ibanvet@gmail.com the authors do not oppose any reviewer and only the field has been filled in order to comply with the requirement</p>
Response to Reviewers:	<p>Response to reviewers</p> <p>The abbreviation to isoflurane MAC and its derivations should be shortened. Suggestion MACISO for control, MACISO+VEH for isoflurane + vehicle, MACISO+WIN55, MACISO+WIN55_8D, MACISO+WIN55+ANT, MACISO+MOR, MACISO+DEX, MACISO+MOR+WIN55, MACISO+DEX+WIN55.</p> <p>Abbreviations have been corrected throughout the document. Thank you for your comment.</p> <p>Abstract:</p> <p>Line 31: No need to say that MAC was measured from alveolar gas samples. In fact, the samples were not alveolar but end expiratory samples.</p> <p>The paragraph has been corrected. Thank you for your comment.</p> <p>Line 38: Results poorly described. What is the value of isoflurane MAC (control)? The percentage changes in MAC should be also presented. Consider omitting the MAC od isoflurane+vehicle in the abstract since it is not part of the main results.</p> <p>The value of MACISO + VEH has been removed. Thank you for your comment.</p> <p>MAC control correspond to MACISO, this has been corrected in the manuscript.</p> <p>Thank you for your comments.</p> <p>Line 46: conclusion does not include the results from dexmedetomidine.</p> <p>The conclusion has been changed and it has been placed.</p>
	<p>The administration of WIN 55,212-2 increases the MAC of isoflurane in rats, antagonism partially decreased the MAC. Morphine does not decrease the minimum alveolar concentration of isoflurane in rats treated chronically with WIN55,212-2. Dexmedetomidine maintains its sparing effect on the minimum alveolar concentration of isoflurane in rats treated chronically with WIN55,212-2. Thank you for your comments.</p> <p>Introduction:</p> <p>Line 56: De abbreviation comes within parenthesis when mentioned at the first time. The authors should reverse the order, Written description outside of parenthesis and the abbreviation within parenthesis.</p> <p>The placement of the parenthesis has been corrected. Thank you for your comment.</p> <p>Lines 56 and 57: CB1 and CB2 were not defined.</p> <p>We thank the reviewer, the CB1 and CB2 receptors has been defined properly.</p> <p>Lines 58-62: Very long sentence with very loose meaning. The authors need to be more objective on what kind of effects and manipulations of the ECS were performed and the results found on the previous studies. Otherwise, it is very hard to interpret the relevance of this study.</p> <p>We thank the reviewer for the observation.</p>

9.3. Artículo Científico Número 2. Carta al editor



10. Discusión

La CAM es definida como la concentración alveolar de un anestésico inhalatorio necesario para evitar el movimiento en el 50% de los sujetos expuestos a un estímulo nocivo supramáximo (Eger et al. 1965). La medición de la CAM es utilizada como un método que permite estudiar los efectos que diferentes sustancias provocan en los requerimientos de anestésicos inhalatorios (Valverde et al. 2003). A pesar que el consumo de cannabinoides es cada vez más frecuente (UNODC 2018), solo existen reportes de la administración aguda y a corto plazo del efecto que los cannabinoides provocan en la CAM de los anestésicos inhalatorios y no se sabe que consideraciones se deberán de tener en pacientes que consuman constantemente estas sustancias y sean sometidos a anestesia con inhalatorios y como se verán afectados los requerimientos de los agentes anestésicos. De igual manera, el efecto de la morfina y la dexmedetomidina sobre la CAM de los anestésicos inhalatorios es desconocido en individuos que han sido sometidos al efecto constante de cannabinoides. En esta investigación, podemos observar que la administración durante 21 días del cannabinoide sintético WIN 55,212-2 incrementa la CAM de isoflurano en ratas, sin embargo, esta observación no refleja necesariamente el efecto que el consumo ocasional de *Cannabis sativa* podría generar en el ser humano ya que el Δ^9 -THC es un fitocannabinoide agonista parcial del receptor CB1 (Gaoni et al. 1964) y el WIN 55,212-2 es un cannabinoide sintético agonista total del receptor CB1/CB2 (Pertwee et al. 2010), por lo tanto, la eficacia del agonista cannabinoide y el tiempo de exposición, podría influir en el efecto sobre los requerimientos de los anestésicos inhalatorios. Sin embargo, el consumo de cannabinoides sintéticos (clasificados como nuevas sustancias psicoactivas) podría generar efectos similares sobre la CAM de los anestésicos inhalatorios, ya que éstos son igual o más eficaces en la estimulación de los receptores cannabinoides (Pertwee et al. 2010).

Debido a que el cannabinoide sintético se suspendió en Tween 80 con solución salina (0.9%), comparamos el grupo control CAM_{ISO} con el grupo al cual solo se administró la solución vehículo (CAM_{ISO+VEH}) y no observamos diferencias estadísticamente significativas, Por lo tanto, concluimos que el aumento de la CAM de isoflurano es provocado completamente por la administración durante 21 días del cannabinoide sintético WIN 55,212-2 y la solución vehículo no tiene efecto sobre la CAM.

El incremento de la CAM de isoflurano puede ser explicado a través de observaciones realizadas por Miller *et al* en 1968, las cuales por medio de la administración de alfa-metildopa, iproniazida y reserpina, sugieren que los requisitos de los anestésicos inhalatorios están relacionados con los niveles de norepinefrina, de este modo, los fármacos que disminuyen las concentraciones de norepinefrina en el sistema nervioso central tienen la capacidad de disminuir la CAM, por el contrario, los que incrementan estos niveles provocan un aumento en los requerimientos anestésicos. Del mismo modo, se ha reportado que la administración aguda de anfetamina (Johnston et al. 1972) y cocaína (Stoelting et al. 1975) incrementa la CAM de halotano en perros debido al incremento de la concentración de catecolaminas en el sistema nervioso central. Una investigación realizada por Page *et al* en 2007 señala que ratas tratadas durante 8 días con WIN 55,212-2 presentan un incremento en la actividad noradrenérgica, dichos investigadores demostraron que la administración repetida de WIN 55,212-2 estimula los receptores cannabinoides CB1 en cuerpos celulares del *locus coeruleus* (LC) y en terminales nerviosas que contienen norepinefrina generando adaptaciones celulares que se correlaciona con aumentos en la TH (tirosina hidroxilasa/enzima sintetizadora de catecolaminas) en el LC y un aumento del eflujo de norepinefrina, también, se observó que después de 8 días de haber suspendido el tratamiento, estos niveles regresan a los del grupo control. En nuestro estudio, la observación del incremento de la CAM_{ISO} después de 21 días de tratamiento con WIN 55,212-2 nos llevó a evaluar si dicho efecto seguía presente después de 8 días de suspender el cannabinoide y también a determinar si el receptor CB₁ estaba implicado en el incremento de la CAM_{ISO}. Al realizar la medición de la CAM después de 8 días de suspender la administración del cannabinoide (grupo CAM_{ISO+WIN8D}) no encontramos diferencias estadísticamente significativas al compararlo con el grupo CAM_{ISO+WIN55}. Por lo tanto, el incremento de la CAM de isoflurano provocado por la administración de WIN 55,212-2 no disminuye después de 8 días de suspender la administración del cannabinoide. Esta diferencia con los estudios realizados por Page *et al* en 2007 podría ser consecuencia al mayor tiempo de exposición al cannabinoide utilizado en nuestro estudio y posiblemente será necesario más tiempo para la disminución de la actividad noradrenérgica (Kobayashi et al 1974). Para determinar si el efecto del WIN 55,212-2 sobre la CAM de isoflurano es transitorio serán necesarios otros experimentos.

Por otro lado, se ha identificado que los receptores denominados TASK son mediadores importantes del efecto de anestésicos por inhalación (isoflurano) y también son sensibles al efecto de cannabinoides. De igual manera, estos receptores son influenciados por los niveles de norepinefrina (Linden et al. 2006). Por lo tanto, el incremento de catecolaminas tiene efecto sobre los receptores TASK y modifica la sensibilidad a los anestésicos inhalatorios. También observamos que el antagonista SR161714A disminuye parcialmente el efecto del cannabinoide sobre la CAM de isoflurano. Es probable que este efecto se deba a que los receptores TASK también están involucrados en el incremento de la CAM y no sólo los receptores a cannabinoides. Nuestro diseño experimental, no permite determinar el mecanismo por el cual el WIN 55,212-2 incrementa la CAM de isoflurano en ratas.

Por otro lado, estudios previos han reportado que la administración aguda y subaguda de Δ 9-THC disminuye la CAM de halotano en perros (Stoelting et al. 1973) así como una disminución de la CAM de ciclopropano en ratas (Vitez et al. 1973) tratadas de manera aguda y crónica (durante una semana) con Δ 9-THC. Esta discrepancia con nuestros resultados puede ser explicado a través de las observaciones realizadas por Mechoulam y por Marciano en 2003, los cuales señalan que los cannabinoides presentan efectos paradójicos en el sistema nervioso central de los mamíferos. Howlett en el 2002 reporta que los cannabinoides provocan a corto plazo efectos inhibitorios bloqueando la liberación de glutamato, por el contrario, la estimulación global prolongada de los receptores CB1 provocada por la administración exógena de cannabinoides podría bloquear la liberación del neurotransmisor inhibitor GABA, este efecto es dependiente del circuito neuronal al cual estimule, ya sea inhibitorio o excitatorio. El aumento de la CAM de isoflurano sugiere que la administración sistémica y sostenida en el tiempo del WIN 55,212-2, a diferencia de la administración aguda, provoca efectos excitatorios reflejándose como un aumento de los requerimientos anestésicos.

En las ratas tratadas crónicamente con el cannabinoide se observó que la morfina disminuyó su efecto ahorrador de isoflurano, ya que en ratas sin tratamiento previo la disminución de la CAM fue mayor y coincide con lo reportado previamente (Gómez de Segura et al. 1998). En estudios previos, se observó que los receptores TASK no están implicados en el efecto de la morfina (Linden et al. 2007). Es importante señalar que existen reportes de un efecto de

tolerancia cruzada entre compuestos de naturaleza opioide y cannabinoide. Se ha observado que la administración de Δ^9 -THC induce tolerancia a los efectos analgésicos (Kaymakcalan et al. 1972) y cardiovasculares (Hine et al. 1985) de la morfina, de igual manera, se ha reportado que la administración crónica de morfina desarrolla tolerancia a los efectos analgésicos del Δ^9 -THC (Bloom et al. 1978). Los mecanismos por los cuales se genera este efecto es complejo y aun no es del todo claro (Corchero et al. 2004). De acuerdo a esto, la disminución del efecto ahorrador de la morfina sobre la CAM de isoflurano en ratas tratadas crónicamente con WIN 55,212-2 podría sugerir en términos de CAM un efecto de tolerancia cruzada entre el cannabinoide y la morfina.

Finalmente, observamos que el efecto ahorrador de la dexmedetomidina sobre la CAM de isoflurano es mayor en ratas tratadas crónicamente con WIN 55,212-2.

Cuando la transmisión de norepinefrina se suprime totalmente, la CAM de halotano y ciclopropano se reduce en un máximo del 40% (Roizen et al. 1978). La dexmedetomidina reduce significativamente los niveles circulantes de norepinefrina (Janke et al. 2006) y disminuye la CAM de halotano hasta un 90% (Segal et al. 1988), por lo tanto, el mecanismo por el cual la dexmedetomidina disminuye los requerimientos de los anestésicos inhalatorios implica mecanismos adicionales a la inhibición de noradrenalina en el sistema nervioso central y a la estimulación de los receptores α_2 -adrenérgicos ya que se ha demostrado, a través de la administración de yumbina y atipamezol (antagonistas de los receptores α_2 -adrenérgicos), que el bloqueo de estos receptores por si solos no tiene efecto sobre la CAM de los anestésicos inhalatorios (Eger et al. 2003). De igual manera, en un estudio realizado por Linden et al en 2006, se demostró que la dexmedetomidina disminuye su efecto de sedación en ratones sin receptores TASK. Estos investigadores llegaron a la conclusión que los receptores TASK y no solo los α_2 -adrenérgicos, están involucrados en el mecanismo de acción de la dexmedetomidina.

Nuestro estudio demuestra que la administración continua del cannabinoide sintético incrementa el efecto que la dexmedetomidina tiene sobre la CAM de isoflurano, pero no está diseñado para determinar el mecanismo por el cual esto ocurre. Sin embargo, existen reportes de un efecto supra-aditivo por la administración conjunta de agonistas cannabinoides y dexmedetomidina (Tham et al. 2005), dicho estudio tampoco determina el mecanismo por el cual se da este efecto.

Por lo tanto, será importante considerar la posibilidad de un incremento de los requerimientos anestésicos por inhalación en individuos que consuman o estén bajo tratamiento con algún tipo de cannabinoide. Estos pacientes podrían presentar respuestas diferentes a las dosis habituales de morfina y dexmedetomidina durante la anestesia con isoflurano.

11. Conclusiones

1. La administración durante 21 días del cannabinoide sintético WIN 55,212-2 incrementa la concentración alveolar mínima de isoflurano en ratas; este efecto no disminuye después de 8 días de haber suspendido el tratamiento.
2. El antagonismo del receptor CB1 modifica parcialmente el efecto sobre la CAM de isoflurano.
3. El efecto de la morfina sobre la CAM de isoflurano es menor en ratas tratadas crónicamente con WIN 55,212-2.
4. La dexmedetomidina incrementa el efecto ahorrador de isoflurano en ratas tratadas crónicamente con el cannabinoide sintético WIN 55,212-2.

12. Bibliografia

- Aantaa R, Kanto J, Scheinin M. Dexmedetomidine, an alpha2-adrenoceptor agonist, reduces aesthetic requirements for patients undergoing minor gynecologic surgery. *Anesthesiology*. 1990; 73:230-235.
- Aantaa R, Jalonen J. Perioperative use of alpha2-adrenoceptor –agonists and the cardiac patient. *Eur J Anaesthesiol*. 2006; 23:361-372.
- Aho M, Lehtinen AM, Erkola O. The effect of intravenously administered dexmedetomidine on perioperative hemodynamics and isoflurane requirements in patients undergoing abdominal hysterectomy. *Anesthesiology*. 1991; 74:997-1002.
- Aho M, Erkola O, Kallito A. Comparison of dexmedetomidine and midazolam sedation and antagonism of dexmedetomidine with atipamezole. *J Clin Anesth*. 1993; 5:194-203.
- Angst MS, Ramaswamy B, Davies MF, Maze M. Comparative analgesic and mental effects of increasing plasma concentrations of dexmedetomidine and alfentanil in humans. *Anesthesiology*. 2004; 101:744-752
- Angst MS, Lazzeroni LC, Phillips NG. Aversive and reinforcing opioid effects: a pharmacogenomic twin study. *Anesthesiology*. 2012; 117:22-37.
- Angst MS, Phillips NG, Drover DR. Pain sensitivity and opioid analgesia: a pharmacogenomic twin study. *Pain*. 2012B; 153:1397-1409.
- Antognini JF, Schwartz K. Exaggerated anesthetic requirements in the preferentially anesthetized brain. *Anesthesiology*. 1993; 79:1244-1249
- Bertaccini EJ, Trudell JR, Franks NP. The common chemical motifs within anesthetic binding sites. *Anesth Analg*. 2007; 104:318-324
- Bloom AS, Dewey WL: A comparison of some pharmacological actions of morphine and delta9-tetrahydrocannabinol in the mouse. *Psychopharmacology* 1978; 57:243-8
- Bloor BC, Flacke WE. Reduction in halothane anesthetic requirement by clonidine, an alpha-adrenergic agonist. *Anesth Analg*. 1982; 61:741-745.
- Brown AJ. Novel cannabinoid receptors. *Br J Pharmacol* 2007; 152: 567-75.

- Chavez JR, Ibancovich JA, Sanchez-Aparicio P, Acevedo-Arcique CM, Moran-Muñoz R, Recillas-Morales S: Effect of Acetaminophen Alone and in Combination with Morphine and Tramadol on the Minimum Alveolar Concentration of Isoflurane in Rats. *PLoS One* 2015; 25:1-9
- C. Howlett AC, Barth F, Bonner TI, Cabral G, Casellas P, Devane WA, Felder CC, Herkenham M, Mackie K, Martin BR, Mechoulam R, Pertwee RG: International Union of Pharmacology . XXVII. Classification of cannabinoid receptors. *Pharmacol Rev* 2002; 54:161-202
- Corchero J, Manzanares J, Fuentes JA: Cannabinoid/Opioid Crosstalk in the Central Nervous System. *Crit Rev Neurobiol* 2004; 16:159-72
- Debon R, Boselli E, Guyot R. Chronopharmacology of intratecal sufentanil for labor analgesia: daily variations in duration of action. *Anesthesiology*. 2004; 101:978-982.
- Devane WA, Dysarz FA 3rd, Johnson MR, Melvin LS, Howlett AC: Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. *Mol Pharmacol* 1988; 34:605–13
- Devane WA, Hanuš L, Breuer A, Pertwee RG, Stevenson LA, Griffin G, Gibson D, Mandelbaum A, Etinger A, Mechoulam R: Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science* 1992; 258:1946–9
- Di Marzo V, Breivogel CS, Tao Q, Bridgen DT, Razdan RK, Zimmer AM, Zimmer A, Martin BR. Levels, metabolism, and pharmacological activity of anandamide in CB (1) cannabinoid receptor knockout mice: evidence for non-CB (2) receptor-mediated actions of anandamide in mouse brain. *J Neurochem* 2000b; 75: 2434-44.
- Dogrul A, Seyrek M. Systemic morphine produce antinociception mediated by spinal 5-HT₇, but not 5-HT_{1A} and 5-HT₂ receptors in the spinal cord. *Br J Pharmacol* 2006;149:498-505.
- Dyck JB, Maze M, Haack C. Computer-controlled infusion of intravenous dexmedetomidine hydrochloride in adult human volunteers. *Anesthesiology*. 1993; 78:821-828.
- Eger EI, Saidman LJ, Brandstater B: Minimum alveolar anesthetic concentration: a standard of anesthetic potency. *Anesthesiology* 1965; 26:756–63.
- Eger II EI, Xing Y, Laster MJ, Sonner JM: α -2 Adrenoreceptors Probably Do Not Mediate the Immobility Produced by Inhaled Anesthetics. *Anesth Analg* 2003; 96:1661-4

- Engelhard K, Werner C, Eberspacher E. The effect of the alpha2-agonist dexmedetomidine and the N-methyl-d-aspartate antagonist S(+)-ketamine on the expression of apoptosis-regulating proteins after incomplete cerebral ischemia and reperfusion in rats. *Anesth Analg*. 2003; 96:524-531.
- Fakuda K, Kato S, Morikawa H. Functional coupling of the delta-, m-, and kappa-opioid receptors to mitogen-activated protein kinase and arachidonate release in chinese hamster ovary cells. *J Neurochem*. 1996; 67:1309-1316.
- Fields HL, Heinricher MM, Mason P. Neurotransmitters in nociceptive modulatory circuits. *Annu Rev Neurosci*. 1991; 14:219-245.
- Frankhauser. M. 202. Chapter 4: history of cannabis in Western medicine. In: Grotenhermen. F., Russo. R (Eds.), *Cannabis and Cannabinoids: Pharmacology, Toxicology and Therapeutic Potential*. The Haworth Integrative Healing Press, New York, pp. 37-51.
- Freund TF, Katona I, Piomelli D. Role of endogenous cannabinoids in synaptic signaling. *Physiol Rev* 2003; 83: 1017-66.
- Gaoni Y, Mechoulam R: Isolation, structure and partial synthesis of an active constituent of hashish. *J Am Chem Soc* 1964; 86:1646-7
- Gerlach AT, Dasta JF. Dexmedetomidine: an updated review. *Ann Pharmacother*. 2007; 41: 245-252.
- Glass M, Northup JK. Agonist selective regulation of G proteins by cannabinoid CB (1) and CB (2) receptors. *Mol Pharmacol* 1999; 56: 1362-9.
- Gómez de Segura IA, Criado AB, Santos M, Tendillo FJ: Aspirin synergistically potentiates isoflurane minimum alveolar concentration reduction produced by morphine in the rat. *Anesthesiology* 1998; 89:1489-94
- Gourlay GK, Plummer JL, Cherry DA. Chronopharmacokinetic variability in plasma morphine concentrations following oral doses of morphine solution. *Pain*. 1995; 61:375-381.
- Guo TZ, Jiang JY, Buttermann AE, Maze M. Dexmedetomidine injection into the locus ceruleus produces antinociception. *Anesthesiology*. 1996; 84:873-881.
- Gupta A, Bodin L, Holmstrom B, Berggren L. A systematic review of the peripheral analgesic effects of intraarticular morphine. *Anesth Analg*. 2001; 93:761-770.

- Hampson RE, Deadwyler SA. Cannabinoids, hippocampal function and memory. *Life Sci* 1999; 65: 715-23.
- Herkenham M, Lynn AB, Johnson MR, Melvin LS, de Costa BR, Rice KC. Characterization and localization of cannabinoid receptors in rat brain: a quantitative in vitro autoradiographic study. *J Neurosci* 1991; 11: 563-83.
- Hine B: Morphine and delta 9-tetrahydrocannabinol: two way cross tolerance for antinociceptive and heart rate responses in the rat. *Psychopharmacology* 1985; 87:34-8
- Howlett Ac, Barth F, Bonner TI, Cabral G, Casellas P, Devane WA, Felder CC, Herkenham M, Mackie K, Martin BR, Mechoulam R, Pertwee RG. International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. *Pharmacol Rev* 2002; 54: 161-202.
- Ishii H, Kohno T, Yamakura T. Action of dexmedetomidine on the substantia gelatinosa neurons of the rat spinal cord. *Eur J Neurosci*.2008; 27:3182-3190.
- Janke EL, Samra S: Dexmedetomidine and neuroprotection. *Seminars in anesthesia, perioperative medicine, and pain* 2006; 25:71-6
- Johnston RR, Way WL, Miller RD: Alteration of anesthetic requirement by amphetamine. *Anesthesiology* 1972; 36:357-63
- Kaymakcalan S, Deneau GA: Some pharmacologic properties of synthetic delta9-tetrahydrocannabinol (THC). *Acta Med Turcica suppl* 1972; 1:5-27
- Kest B, Sarton E, Dahan A. Gender differences in opioid mediated analgesia: animal and human studies. *Anesthesiology*. 2000; 93:539-547.
- Kharasch ED. Adverse drug reactions with halogenated anesthetics. *Clin Pharmacol Ther*. 2008; 84:158-162.
- Kobayashi RM, Palkovits M, Kopin IJ, et al: Biochemical mapping of noradrenergic nerves arising from the rat locus coeruleus. *Brain Res* 1974; 77:269-79
- Lauckner JE, Hille B, Mackie K. The cannabinoid agonist WIN55, 212-2 increases intracellular calcium via CB1 receptor coupling to Gq/11 G proteins. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005; 102: 19144-9.

- Li. H.I. 1974. An archaeological and historical account of cannabis in China. *Economic Botany* 28. 437-448.
- Linden AM, Aller MI, Leppä E, Vekovischeva O, Aitta-aho T, Veale EL, Mathie A, Rosenberg P, Wisden W, Korpi ER. The in vivo contributions of TASK-1 containing channels to the actions of inhalation anesthetics, the α_2 adrenergic sedative dexmedetomidine, and cannabinoid agonists. *JPET*; 317:615-626, 2006
- Linden AM, Sandu C, Aller MI, Vekovischeva OY, Rosenberg PH, Wisden W, Korpi ER: TASK-3 Knockout mice exhibit exaggerated nocturnal activity, impairments in cognitive functions, and reduced sensitivity to inhalation anesthetics. *JPET*; 323:924-934, 2007
- Lotsch J. Pleiotropic effects of morphine-6beta-glucuronide. *Anesthesiology*. 2009; 110:1209-1210.
- Manning BH, Morgan MJ, Franklin KB. Morphine analgesia in the formalin test: evidence for forebrain and midbrain sites of action. *Neuroscience*. 1994; 63:289-294.
- Manning BH, Mayer DJ. The central nucleus of the amygdala contributes to the production of morphine antinociception in the rat tail-flick test. *J Neurosci*. 1995;15:8199-8213.
- Manning BH, Mayer DJ. The central nucleus of the amygdala contributes to the production of morphine antinociception in the formalin test. *Pain*. 1995; 63:141-152.
- Mansour A, Fox CA, Akil H, Watson SJ. Opioid-receptor mRNA expression in the rat CNS: anatomical and functional implications. *Trends Neurosci*. 1995; 18:22-29.
- Marsicano G, Goodenough S, Monory K, Hermann H, Eder M, Cannich A, Azad SC, Cascio MG, Gutiérrez SO, van der Stelt M, López-Rodríguez ML, Casanova E, Schütz G, Zieglgänsberger W, Di Marzo V, Behl C, Lutz B: CB1 cannabinoid receptors and on demand defense against excitotoxicity. *Science* 2003; 302:84-8
- Matthies BK, Franklin KB. Formalin pain is expressed in decerebrate rats but not attenuated by morphine. *Pain*. 1992;51:199-206.
- Maze M, Tranquilli W. Alpha-2 adrenoceptor agonists: defining the role in clinical anesthesia. *Anesthesiology*. 1991; 74:581-605.
- Mckim. W.A. 2000. *Drugs and Behavior. An Introduction to Behavioral Pharmacology*. 4th ed. Prentice-Hall. Upper Saddle River, 400 p.

Mechoulam R. The pharmacology of cannabis sativa. In: Mechoulam R, editor. Cannabinoids as therapeutic agents. Boca Raton, FL: CRC Press, 1986, pp 1-16

Mechoulam R, Ben-Shabat S, Hanuš L, Ligumsky M, Kaminski NE, Schatz AR, Gopher A, Almog S, Martin BR, 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, Lichtman AH: Stout Guards of the Central Nervous System. *Science* 2003; 302:65–7

Meunier JC, Mollereau C, Toll L. Isolation and structure of the endogenous agonist of opioid receptor-like ORL1 receptor. *Nature*. 1995; 377:532-535.

Miller RD, Way WL, Eger EI II: The effects of alpha-methylodopa, reserpine, guanethidine and iproniazid on minimum alveolar anesthesia requirement (MAC). *Anesthesiology* 1968; 29:1153-8

Minami M, Satoh M. Molecular biology of the opioid receptors: structures, functions and distributions. *Neurosci Res*. 1995; 23:121-145.

Munro S, Thomas KL, Abu-Shaar M: Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature* 1993; 365:61–5

Nakata M, Yada T. Suppression of response to foreign substances by intestinal macrophages. *Anticancer Res* 2007; 27: 3723-7.

O’Sullivan SE. Cannabinoids go nuclear: evidence for activation of peroxisome proliferator activated receptors. *Br J Pharmacol* 2007; 152: 576-82.

Pacher P, Kunos G: Modulating the endocannabinoid system in human health and disease successes and failures. *FEBS J* 2013; 280:1918–43

Page ME, Oropeza VC, Sparks SE, Qian Y, Menko AS, Van Bockstaele EJ: Repeated cannabinoid administration increases indices of noradrenergic activity in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 2007; 86:162-8

Pan ZZ, Tershner SA, Fields HL. Cellular mechanism for anti-analgesic action of agonists of the kappa-opioid receptor. *Nature*. 1997; 389:382-385.

Patel AJ, Honore E, Lesage F. Inhalational anesthetics activate two-pore-domain background K-channels. *Nat Neurosci*. 1999; 2:422-426.

- Pertwee RG. Pharmacology of cannabinoid CB1 and CB2 receptors. *Pharmacol Ther* 1997; 74: 129-80.
- Pertwee RG. GPR55: a new member of the cannabinoid receptor clan. *Br J Pharmacol* 2007; 152: 984-6.
- Pertwee RG. Ligands that target cannabinoid receptors in the brain: from THC to anandamide and beyond. *Addict Biol* 2008; 13: 147-59.
- Pertwee RG, Howlett AC, Abood ME, Alexander SPH, Di Marzo V, Elphick MR, Greasley PJ, Hansen HS, Kunos G, Mackie K, Mechoulam R, Ross RA: International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXIX. Cannabinoid Receptors and Their Ligands: Beyond CB₁ and CB₂. *Pharmacol Rev* 2010; 62:588-631
- Quasha AL, Eger EI, Tinker JH: Determination and applications of MAC. *Anesthesiology* 1980; 53: 314-34
- Reinscheid RK, Nothacker HP, Bourson A. A neuropeptide that activates an opioidlike G protein-coupled receptor. *Science*. 1995; 270:792-794.
- Rioja E, Santos M, Martinez Taboada F, Ibancovich JA, Tendillo Fj: Cardiorespiratory and minimum alveolar concentration sparing effects of a continuous intravenous infusion of dexmedetomidine in halothane or isoflurane anaesthetized rats. *Lab Anim* 2006; 40:9-15
- Roizen MF, White PF, Eger EI, Brownstein M: Effects of ablation of serotonin or norepinephrine brain stem areas on halothane and cyclopropane MACs in rats. *Anesthesiology* 1978; 78:252-5
- Romberg R, Olofsen E, Sarton E. Pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling of morphine-6-glucuronide induced analgesia in healthy volunteers: absence of sex differences. *Anesthesiology*. 2004; 100:120-133.
- Rudolph U, Antkowiak B. Molecular and neuronal substrates for general anaesthetics. *Nat Rev Neurosci* 2004; 5:709-720.
- Sarton E, Olofsen E, Romberg R. Sex differences in morphine analgesia: an experimental study in healthy volunteers. *Anesthesiology*. 2000; 93:1245-1254.
- Scavone BM, McCarthy RJ, Wong CA, Sullivan JT. The influence of time of day of administration on duration of opioid labor analgesia. *Anesth Anal*. 2010; 111:986-991.

- Segal IS, Vickery RG, Walton JK, Doze VA, Maze M: Dexmedetomidine diminishes halothane anesthetic requirements in rats through a postsynaptic α_2 -adrenergic receptor. *Anesthesiology* 1988; 69:818-23
- Stevens WC. New halogenated anesthetics: enflurane and isoflurane. *Calif Med.* 1972; 117:47.
- Stein C. The control of pain in peripheral tissue by opioids. *N Engl J Med.* 1995; 332:1685-1690.
- Stoelting RK, Martz RC, Gartner J, Creasser C, Brown DJ, Forney RB: Effects of Delta-9-tetrahydrocannabinol on Halothane MAC in Dogs. *Anesthesiology* 1973; 38:521-4
- Stoelting RK, Creasser CW, Martz RZ: Effect of cocaine administration on halothane MAC in dogs. *Anesth Analg* 1975; 54:422-4
- Talke P, Bickler PE. Effects of dexmedetomidine on hypoxia-evoked glutamate release and glutamate receptor activity in hippocampal slices. *Anesthesiology.* 1996; 85:551-557.
- Tanda G, Pontieri FE, Chiara GD: Cannabinoid and Heroin Activation of Mesolimbic Dopamine Transmission by a Common μ_1 Opioid Receptor Mechanism. *Science* 1997; 276:2048-50
- Tham SM, Angus JA, Tudor EM, Wright CE. Synergistic and additive interactions of the cannabinoid agonist CP55, 949 with μ opioid receptor and α_2 -adrenoceptor agonists in acute pain models in mice. *BJF* 2005; 144: 875-884
- Tobias JD. Dexmedetomidine: applications in pediatric critical care and pediatric anesthesiology. *Pediatr Crit Care Med.* 2007; 8:115-131.
- Tsou K, Brown S, Sañudo-Peña MC, Mackie K, Walker JM. Immunohistochemical distribution of cannabinoid CB1 receptors in the rat central nervous system. *Neuroscience* 1998; 83: 393-411.
- United Nations Office on Drugs and Crime, World Drug Report 2018 (United Nations publication, Sales No. E.16.XI.7)
- UNODC, Global SMART Update Volume 16, September 2016
- Valverde A, Morey TE, Hernández J, Davies W: Validation of several types of noxious stimuli for use in determining the minimum alveolar concentration for inhalation anesthetics in dogs and rabbits. *AJVR* 2003; 64:957-62

- Virtanen R, Savola JM, Saano V, Nyman L. Characterization of the selectivity, specificity and potency of medetomidine as an α_2 -adrenoceptor agonist. *Eur J Pharmacol.* 1988; 150:9-14.
- Vitez TS, Way WL, Miller RD, Eger II EI: Effects of Delta-9-tetrahydrocannabinol on Cyclopropane MAC in the Rat. *Anesthesiology* 1973; 38:525-7
- Wandless AL, Smart D, Lambert DG. Fentanyl increases intracellular Ca^{2+} concentrations in SH-SY5Y cells. *Br J Anaesth.* 1996; 76:461-463
- Zoratti C, Kipmen-Korgun D, Osibow K, Malli R, Graier WF. Anandamine initiates Ca^{2+} signaling via CB2 receptor linked to phospholipase C in calf pulmonary endothelial cells. *Br J Pharmacol* 2003; 140: 1351-62.