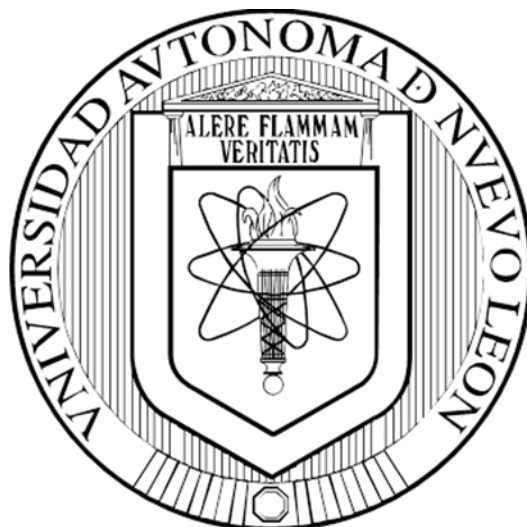


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**



“Determinación de la frecuencia alélica y genotípica de los polimorfismos A3813G y A4895G del gen *CNR1* y su asociación con el efecto analgésico del paracetamol en una población del noreste de México”

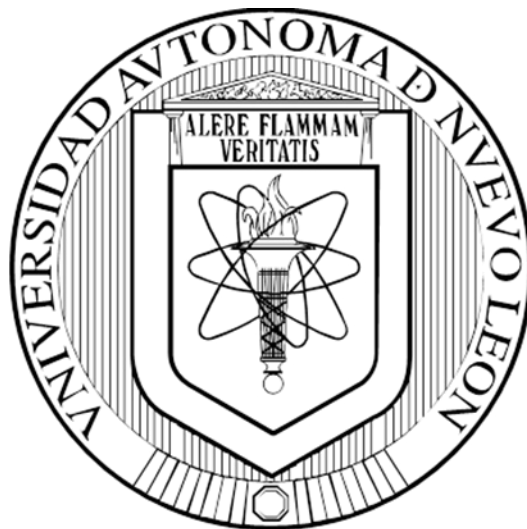
POR

IBT ISMAEL ALEJANDRO RODRÍGUEZ RODRÍGUEZ

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN FARMACIA**

AGOSTO, 2018

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
SUBDIRECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO



“Determinación de la frecuencia alélica y genotípica de los polimorfismos A3813G y A4895G del gen *CNR1* y su asociación con el efecto analgésico del paracetamol en una población del noreste de México”

Por

IBT Ismael Alejandro Rodríguez Rodríguez

**Como requisito parcial para obtener el Grado de
Maestría en Ciencias con Orientación en Farmacia**

Agosto, 2018

Determinación de la frecuencia alélica y genotípica de los polimorfismos
A3813G y A4895G del gen *CNR1* y su asociación con el efecto analgésico
del paracetamol en una población del noreste de México

Revisión de la Tesis

DR. OMAR GONZÁLEZ SANTIAGO

Director

DRA. YOLANDA A GRACIA VÁSQUEZ

Comité tutorial

DRA. EIZABETH OROZCO BELTRAN

Comité tutorial

DR. EDER U ARREDONDO ESPINOZA

Comité tutorial

RESUMEN

IBT Ismael A Rodríguez Rodríguez

Fecha de Graduación: Agosto 2018

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Ciencias Químicas

Título del Estudio: Determinación de la frecuencia alélica y genotípica de los polimorfismos A3813G y A4895G del gen CNR1 y su asociación con el efecto analgésico del paracetamol en una población del noreste de México

Número de páginas: 110

Candidato al grado de Maestría en
Ciencias con Orientación en Farmacia

Propósito y Método del Estudio: El dolor es una experiencia sensorial y emocional desagradable asociada con un daño tisular, real o potencial, o descrita en términos de dicho daño. Debido a que el dolor es una experiencia subjetiva, diversos sistemas tienen la capacidad de modularlo, entre estos se encuentran el opioide, adrenérgico, colinérgico y gabaérgico. Recientemente se ha encontrado evidencia de que el sistema endocannabinoide también participa en la modulación del dolor. El objetivo de este estudio fue investigar la frecuencia alélica y genotípica de los polimorfismos A3813G y A4895G del gen que codifica para el receptor cannabinoide tipo 1 (CNR1) y su asociación con la respuesta analgésica del paracetamol en una población del noreste de México. Se invitó a participar a 200 individuos sanos no emparentados. La genotipificación de los polimorfismos fue por la técnica RFLP mientras que la tolerancia al dolor se evaluó con la prueba Cold Pressure test. La frecuencia alélica del polimorfismo A4895G fue de 0.59 y 0.41 para el alelo A y G respectivamente, mientras que la frecuencia genotípica fue de 38, 111 y 9 para los genotipos AA, AG y GG respectivamente. La muestra no se encontró en equilibrio con Hardy-Weinberg. Por otro lado, la frecuencia alélica del polimorfismo A3813G fue de 0.93 y 0.07 para el alelo A y G respectivamente, mientras que la frecuencia genotípica fue de 173, 26 y 1 para los genotipos AA, AG y GG respectivamente. La muestra se encontró en equilibrio con Hardy-Weinberg. No se observó una diferencia en la tolerancia al dolor entre los alelos ni entre los genotipos. **Contribuciones y Conclusiones:** Los polimorfismos A3813G y A4895G del gen que codifica para el receptor cannabinoide tipo 1 no están asociados con la tolerancia del dolor.

Dr Omar González Santiago
Director de Tesis

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Ingeniería Genética y Genómica bajo la dirección del Dr. Omar González Santiago y en el Laboratorio de Análisis Clínicos QFB. Iris Guajardo Guajardo, ambos laboratorios pertenecientes a la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

AGRADECIMIENTOS



Se agradece a la Universidad Autónoma de Nuevo León por el financiamiento del proyecto.



Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada.



A la Facultad de Ciencias Químicas por la Infraestructura y facilidades otorgadas para el desarrollo del presente trabajo de investigación.



A la Universidad Médica de Lublin por abrirme las puertas para realizar una estancia de investigación en sus instalaciones.

DEDICATORIA

A mis padres, Cecilio y Alma Nora quienes me han apoyado y acompañado en todas mis decisiones personales y académicas.

A mi hermana Alma Cecilia, quien ha compartido esta vida conmigo desde el inicio y de quién he aprendido mucho.

A Marlena, una persona muy especial en mi vida y quien me ha demostrado que la misma está llena de aventuras.

A mis amigos, quienes han estado conmigo y me han escuchado en distintas etapas de mi vida: Luis, Tadeo, Máximo y Carlos.

A mis compañeros de posgrado, con quienes he compartido valiosas experiencias.

Al Dr. Adolfo Rivero-Müller y a su esposa Beata por adoptarme como uno de sus estudiantes, las amenas conversaciones respecto a la ciencia y su importancia en la vida diaria.

A todos los Doctores y asesores que me dieron la oportunidad de llevar a cabo este trabajo de investigación en la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

TABLA DE CONTENIDO

| Capítulo | Página |
|--|--------|
| 1. INTRODUCCIÓN..... | 1 |
| 1.1. Definición y clasificación del dolor | 1 |
| 1.1.1. Según su fisiopatología..... | 1 |
| 1.1.2. Según el tiempo de duración | 2 |
| 1.2. Epidemiología del dolor | 2 |
| 1.3. Fisiopatología del dolor | 3 |
| 1.3.1. Transducción | 5 |
| 1.3.2. Transmisión | 5 |
| 1.3.3. Modulación..... | 6 |
| 1.3.4. Percepción | 6 |
| 1.4. Evaluación del dolor | 7 |
| 1.5. Tratamiento del dolor..... | 9 |
| 1.5.1. Terapia no farmacológica | 9 |
| 1.5.2. Terapia farmacológica | 9 |
| 1.5.2.1. Paracetamol | 12 |
| 1.6. El sistema endocannabinoide..... | 14 |
| 1.6.1. Descubrimiento | 14 |
| 1.6.2. Elementos que lo conforman | 15 |
| 1.6.3. Los receptores cannabinoides | 16 |
| 1.6.4. Señalización mediada por receptores cannabinoides..... | 17 |
| 1.6.5. Potencial terapéutico ligado a los receptores cannabinoides..... | 18 |

| | |
|--|----|
| 1.6.6. El sistema endocannabinoide en el fenómeno nociceptivo | 19 |
| 1.6.7. El sistema endocannabinoide y el metabolismo energético..... | 21 |
| 1.7. Genética del dolor | 22 |
| 1.7.1. Polimorfismo | 23 |
| 1.7.2. Implicaciones genéticas del gen <i>CNR1</i> en el dolor..... | 23 |
| 1.8. Genética de los desórdenes metabólicos..... | 24 |
| 1.8.1. El gen <i>CNR1</i> en la homeostasis energética..... | 25 |
| 1.9. Localización y caracterización del gen <i>CNR1</i> | 26 |
| 1.10. Antecedentes | 27 |
| 1.11. Justificación..... | 31 |
| 1.12. Hipótesis..... | 31 |
| 1.13. Objetivos..... | 32 |
| 1.13.1. Objetivo general..... | 32 |
| 1.13.2. Objetivos específicos | 32 |
| | |
| 2. MATERIALES Y MÉTODOS..... | 34 |
| 2.1. Metodología general..... | 34 |
| 2.2. Ubicación..... | 35 |
| 2.3. Equipo | 35 |
| 2.4. Metodología..... | 36 |
| 2.4.1. Reclutamiento de sujetos..... | 36 |
| 2.4.2. Criterios de inclusión..... | 36 |
| 2.4.3. Criterios de exclusión..... | 36 |
| 2.4.4. Aspectos éticos..... | 37 |
| 2.4.5. Obtención de muestras y análisis bioquímico | 37 |
| 2.4.6. Evaluación del dolor en frío a través de la prueba CPT | 37 |
| 2.4.7. Extracción de ADN de sangre periférica | 38 |
| 2.4.8. Determinación de frecuencias alélicas y genotípicas de | |

| | |
|---|----|
| los polimorfismos A3813G y A4895G en voluntarios sanos..... | 40 |
| 2.4.9. Análisis estadístico..... | 43 |
| 2.4.10. Estudio clínico doble ciego controlado por placebo..... | 43 |
| 2.4.11. Estudio del efecto genotípico del polimorfismo A3813G sobre la funcionalidad terapéutica del paracetamol..... | 45 |
| 3. RESULTADOS..... | 46 |
| 3.1. Caracterización de la muestra..... | 46 |
| 3.2. Análisis bioquímico..... | 46 |
| 3.3. Determinación de frecuencias alélicas y genotípicas | 47 |
| 3.3.1. Polimorfismo A4895G..... | 48 |
| 3.3.2. Polimorfismo A3813G..... | 49 |
| 3.3.3. Frecuencia alélica, genotípica y prueba de bondad de ajuste..... | 50 |
| 3.4. Valoración del estado de ánimo a través de la encuesta EVEA..... | 50 |
| 3.5. Prueba CPT de resistencia al frío..... | 52 |
| 3.6. Relación del polimorfismo A3813G con el dolor..... | 53 |
| 3.7. Relación del polimorfismo A3813G con los parámetros bioquímicos analizados..... | 54 |
| 3.8. Regresión logística ajustada..... | 55 |
| 3.9. Resultados del estudio clínico..... | 56 |
| 4. DISCUSIÓN | 59 |
| 5. CONCLUSIONES | 67 |
| 6. PERSPECTIVAS | 69 |
| REFERENCIAS | 70 |

LISTA DE TABLAS

| Tabla | Página |
|---|--------|
| 1. Factores sociodemográficos asociados a la prevalencia del dolor crónico ... | 3 |
| 2. Características de las fibras nerviosas conductoras del estímulo nociceptivo | 5 |
| 3. Metodologías empleadas en la cuantificación del dolor | 7 |
| 4. Mecanismos de acción de los fármacos y adyuvantes empleados en la terapia farmacológica del dolor | 10 |
| 5. Elementos del sistema endocannabinoide | 15 |
| 6. Evidencia de la regulación de la nocicepción efectuada por el sistema endocannabinoide en modelos animales de rata y ratón | 19 |
| 7. Genes y sus polimorfismos asociados a la modulación y percepción del dolor | 23 |
| 8. Prevalencia y % de heredabilidad reportadas para los factores que componen el síndrome metabólico | 25 |
| 9. Lista de equipo empleado y su localización | 35 |
| 10. Cantidades en μL para preparar la mezcla de reacción para la PCR | 41 |
| 11. Configuración del programa utilizado en el termociclador para cada fragmento de cada polimorfismo | 41 |
| 12. Secuencia de primers utilizados | 42 |
| 13. Elementos y cantidades de la mezcla de reacción para la digestión enzimática | 42 |
| 14. Bandas esperadas para cada polimorfismo y la enzima empleada en la digestión | 43 |

| | |
|---|----|
| 15. Datos generales de la población estudiada | 46 |
| 16. Estadística descriptiva de los resultados del análisis bioquímico | 47 |
| 17. Análisis de la frecuencia alélica, genotípica y prueba de bondad de ajuste del número de muestra estudiada | 50 |
| 18. Estadística descriptiva de los datos de la encuesta EVEA | 52 |
| 19. Análisis de varianza de las medias correspondientes a los cuatro estados de ánimo | 52 |
| 20. Pruebas simultáneas de Tukey para diferencias de las medias | 52 |
| 21. $\bar{x} \pm s$ del umbral, tolerancia y la escala VAS obtenidos durante la prueba CPT | 53 |
| 22. Análisis del dolor inducido de acuerdo al género | 53 |
| 23. Resultados para el umbral, la tolerancia y la escala VAS | 54 |
| 24. Resultados de la <i>t</i> -student entre las medias de los genotipos A/A y A/G obtenidas del análisis bioquímico | 54 |
| 25. Valores <i>p</i> obtenidos de la regresión logística para el polimorfismo A3813G | 55 |
| 26. Valores <i>p</i> obtenidos de la regresión logística para el polimorfismo A4895G | 55 |
| 27. Resultados del ensayo clínico | 56 |

LISTA DE FIGURAS

| Figura | Página |
|---|--------|
| 1. Fisiopatología del dolor | 4 |
| 2. Escala VAS usada en la descripción del dolor..... | 7 |
| 3. Escalera del tratamiento farmacológico del dolor propuesta por la OMS ... | 10 |
| 4. Estructura química de los ligandos endógenos AEA (a) y 2-AG (b) | 16 |
| 5. Representación esquemática de un receptor acoplado a proteínas G | 17 |
| 6. Representación tridimensional del receptor CB1 | 17 |
| 7. Rutas de señalización activadas por el receptor CB1 | 18 |
| 8. Mecanismo de señalización del sistema endocannabinoide en el SNC | 21 |
| 9. Representación de la localización de los polimorfismos A3813G y A4895G en el gen <i>CNR1</i> en el exón 4 | 27 |
| 10. Metodología general de la investigación | 34 |
| 11. Representación del procedimiento llevado a cabo durante el estudio clínico | 44 |
| 12. Banda correspondiente a ADN genómico | 47 |
| 13. Amplificación del fragmento de 346 pb para el polimorfismo A4895G | 48 |
| 14. Digestión del fragmento <i>FokI</i> | 48 |
| 15. Amplificación del fragmento de 347 pb correspondiente al polimorfismo A3813G | 49 |
| 16. Digestión del fragmento con <i>HinfI</i> | 49 |
| 17. Resultados de la encuesta de valoración del estado de ánimo (escala del 1 “nulo” al 10 “elevado”) | 51 |
| 18. Representación gráfica del (a) Umbral, (b) la Tolerancia y (c) VAS | |

| | |
|---|----|
| registrados luego de la administración de paracetamol para los genotipos A/A y A/G..... | 57 |
| 19. Representación gráfica del (a) Umbral, (b) la Tolerancia y (c) VAS registrados luego de la administración de placebo para los genotipos A/A y A/G | 58 |

NOMENCLATURA

| | |
|---------|--|
| A | Adenina |
| AA | Ácido araquidónico |
| AEA | Araquidonoiletanol amina |
| AINE | Antiinflamatorio no esteroideo |
| AMPc | Adenosín monofosfato cíclico |
| ANOVA | Análisis de la varianza |
| CACNA1A | Gen que codifica para la subunidad α 1A del canal del voltaje de calcio |
| CB1 | Receptor cannabinoide tipo 1 |
| CB2 | Receptor cannabinoide tipo 2 |
| CNR1 | Gen que codifica para el receptor cannabinoide tipo 1 |
| COX | Ciclooxigenasa |
| COX-2 | Ciclooxigenasa tipo 2 |
| CPT | Prueba de resistencia al frío |
| CT | Colesterol total |
| DAG | Diacilglicerol |
| DGL | Diacilglicerol lipasa |
| dNTP | Desoxirribonucleótido trifosfato |
| DSI | Despolarización inducida por la supresión de la inhibición |
| EDTA | Ácido etilendiaminotetraacético |

| | |
|-------------------|---|
| ERK | Quinasas reguladas por señales extracelulares |
| EVEA | Evaluación del estado de ánimo |
| FAAH | Amida hidrolasa de ácidos grasos |
| G | Guanina |
| GABA | Ácido – γ – aminobutírico |
| GRIA3 | Gen que codifica para el receptor de glutamato 3 |
| GSK | GlaxoSmithKline |
| HCM | Hormona concentradora de melanocortina |
| HDL | Lipoproteínas de alta densidad |
| HW | Ley de Hardy – Weinberg |
| IASP | Asociación Internacional del estudio del dolor |
| IMC | Índice de masa corporal |
| JNK | Quinasas c – Jun N – terminal |
| KCNQ | Gen que codifica para el canal de voltaje de potasio de la subfamilia Q |
| Kg | Kilogramo |
| Kg/m ² | Kilogramos por metro cuadrado |
| LCR | Líquido cefalorraquídeo |
| LD | Desequilibrio de ligamiento |
| LDL | Lipoproteínas de baja densidad |
| LTL | Lesión térmica leve |
| m | Metros |
| MAGL | Monoacilglicerol lipasa |
| MAOI | Inhibidor de la monoamina oxidasa |
| mGluR | Receptores metabotrópicos de glutamato |
| min | Minutos |

| | |
|------------------|---|
| miRNA | Micro RNA |
| mM | Milimolar |
| mm | Milímetros |
| MPQ | Cuestionario del dolor de McGill |
| MQ | Mili-Q |
| mRNA | RNA mensajero |
| NAPE | N-araquidonoil-fosfatidiletanolamina |
| ng | Nanogramo |
| NMDA | N-metil-D-aspartato |
| OMS | Organización Mundial de la Salud |
| OPRD1 | Gen que codifica para el receptor opioide δ -1 |
| OPRK1 | Gen que codifica para el receptor opioide κ -1 |
| OPRM1 | Gen que codifica para el receptor opioide μ -1 |
| P2RX7 | Gen que codifica para el receptor purinérgico P2X 7 |
| PAG | Sustancia gris periacueductal |
| pb | Pares de bases |
| PCR | Reacción en Cadena de la Polimerasa |
| PGE ₂ | Prostaglandina E ₂ |
| PKC | Proteína quinasa C |
| PLC | Fosfolipasa C |
| pmol | Picomolar |
| PRGC | Péptido relacionado con el gen de la calcitonina |
| RFLP | Polimorfismo de los fragmentos de restricción |
| QFB | Químico Farmacéutico Biólogo |
| RNA | Ácido ribonucleico |

| | |
|-----------------|--|
| RVM | Bulbo rostral ventromedial |
| s | Segundos |
| SCN10A | Gen que codifica para la subunidad α del canal de voltaje de sodio 10 |
| SCN9A | Gen que codifica para la subunidad α del canal de voltaje de sodio 9 |
| SDS | Dodecilsulfato sódico |
| SE _x | Error estándar |
| SNC | Sistema Nervioso Central |
| SNP | Polimorfismo de nucleótido sencillo |
| SNRI | Inhibidor selectivo de la recaptación de serotonina y norepinefrina |
| SPC | Estimulación de la espina dorsal |
| TACR1 | Gen que codifica para el receptor de taquiquininas 1 |
| TCA | Antidepresivos tricíclicos |
| TCC | Traumatismo craneal cerrado |
| TE | Tris EDTA |
| TENS | Estimulación nerviosa eléctrica transcutánea |
| TG | Triglicéridos |
| THC | Tetrahidrocannabinol |
| Thr | Treonina |
| TRPA1 | Gen que codifica para el receptor de potencial transitorio A1 |
| TRPM8 | Gen que codifica para el receptor de potencial transitorio M8 |
| TRPV1 | Gen que codifica para el receptor de potencial transitorio V1 |
| TSNT | Tritón, SDS, NaCl y Tris-HCL |
| U | Unidades |
| V | Voltios |

| | |
|---------------|------------------------------------|
| VLDL | Lipoproteínas de muy baja densidad |
| VAS | Escala analógica visual |
| 2-AG | 2-araquidonoilglicerol |
| \bar{x} | Media |
| χ^2 | Ji-cuadrada |
| μL | Microlitros |
| μM | Micromolar |
| s | Desviación estándar |
| % | Porcentaje |
| ° C | Grados centígrados |

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1.1 Definición y clasificación del dolor

La Asociación Internacional del Estudio del Dolor (IASP, por sus siglas en inglés) en 1986, define al dolor como “una experiencia sensorial y emocional no placentera asociada con un daño tisular, real o potencial, o descrita en términos de dicho daño”. El dolor se puede clasificar en base a su fisiopatología (nociceptivo o neuropático) y su duración (agudo o crónico)¹.

1.1.1 Según su fisiopatología

El dolor se clasifica en nociceptivo y neuropático. El primero resulta del daño tisular real o de estímulos que generan daño en los tejidos². En el segundo, la principal característica es que las fibras nerviosas se encuentran dañadas resultando en una alteración del balance entre las señales sensoriales dolorosas y no dolorosas².

1.1.2 Según el tiempo de duración

El dolor se clasifica en agudo y crónico, el agudo ha sido definido como “dolor de aparición reciente y de probable duración limitada, que usualmente tiene una relación causal y temporal a la lesión o la enfermedad”³. El crónico ha sido definido como “un dolor continuo con duración mayor a 12 semanas o que persiste como consecuencia de una lesión”⁴.

1.2 Epidemiología del dolor

La prevalencia del dolor es afectada por diversos factores como el método de recolección de datos, las características demográficas de la población estudiada o la variación geográfica^{5, 6}. Representa un problema clínico, social y económico.

En México el 91 % de la población experimenta dolor y el 85 % de las personas reportaron un impacto negativo en actividades laborales y sociales⁶, en la población asiática la prevalencia del dolor crónico varía del 7.1 al 90.8 % entre los adultos⁵, mientras que en Europa el rango se encuentra entre el 2 y 50 %⁷. Los estudios en España han determinado que el dolor crónico es más común en mujeres (31.4 %) que en hombres (14.8 %) y en la población mayor a los 65 años (39.5 %) en comparación con la población joven (8.5 %) y el estudio a nivel nacional realizado en el 2015 reportó una prevalencia del 16.6 %, de los cuales

el 50 % de los sujetos reportó limitaciones en sus actividades diarias, el 30 % reportó depresión o ansiedad y el 47.2 % reportó que el dolor también afectaba su vida familiar⁸.

La estimación más reciente del impacto financiero en Europa es de 200 billones de Euros por año y en Estados Unidos de América es de 150 billones de dólares por año⁹. Los factores sociodemográficos asociados con el dolor crónico se describen en la **Tabla 1**.

TABLA 1

Factores sociodemográficos asociados a la prevalencia del dolor crónico¹⁰

| Factores sociodemográficos asociados al dolor crónico | Efecto sobre la prevalencia | Referencia |
|--|---|-------------------|
| Género femenino | Se reporta mayor intensidad y menor tolerancia. | 10 |
| Edad adulta | Se reporta que la prevalencia se eleva con la edad. | 8, 11 |
| Bajo nivel socioeconómico | La prevalencia del dolor crónico se relaciona de manera inversamente proporcional a mejores condiciones socioeconómicas. | 12 |
| Base geográfica y cultural | La variación geográfica y cultural afecta la prevalencia de dolor crónico. | 13 |
| Estatus laboral y factores de ocupación | El impacto del dolor crónico sobre las actividades diarias se ve influenciado por factores de riesgo laboral. | 14 |
| Historial de abuso o violencia interpersonal | La evidencia reportada sugiere que el dolor es más común en personas que reportar un historial de abuso o violencia a cualquier edad. | 15 |

1.3 Fisiopatología del dolor

Los organismos perciben dolor a través de un proceso conocido como nocicepción, el cual consiste en cuatro pasos casi simultáneos: transducción,

transmisión, modulación y percepción^{16, 17}. El proceso general se puede apreciar en la **Figura 1**.

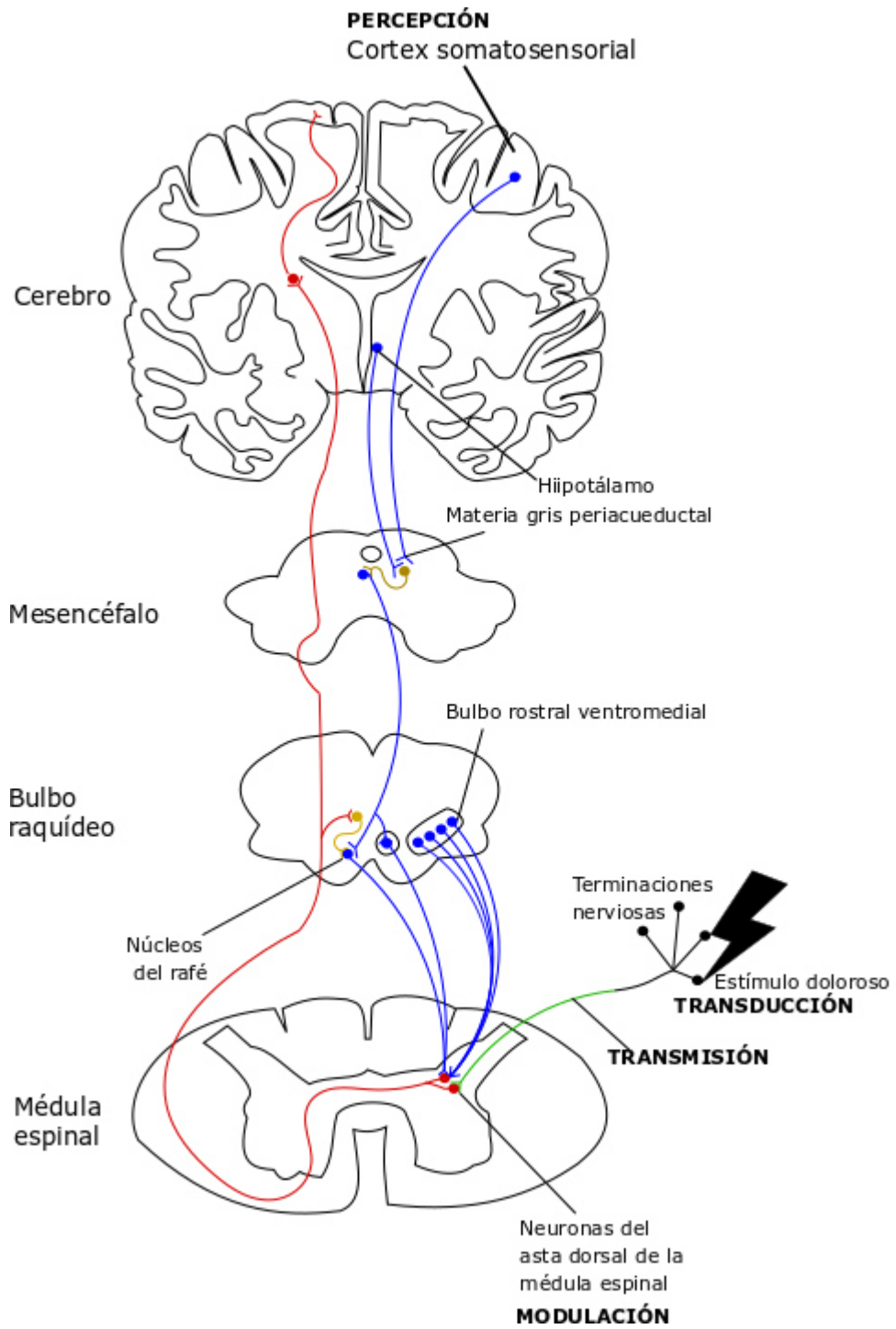


Figura 1. Fisiopatología del dolor. En color rojo pueden apreciarse las vías ascendentes y en color azul las vías descendentes del dolor¹⁸.

1.3.1 Transducción

Es el proceso por el cual el estímulo nociceptivo es convertido a una señal eléctrica en los nociceptores, su activación es llevada a cabo a través de mediadores que actúan sobre receptores específicos o canales iónicos de la membrana, generando como resultado una modificación de su permeabilidad iónica y la génesis de impulsos nerviosos que viajan al sistema nervioso central (SNC)^{16, 17}.

1.3.2 Transmisión

Es el proceso por el cual los estímulos nociceptivos son transportados a través de las fibras C o fibras A – δ al asta dorsal de la médula espinal, donde se liberan los neurotransmisores del dolor: glutamato, sustancia P y el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (PRGC)¹⁷, la liberación de estos neurotransmisores activan las neuronas de segundo orden, las cuales pueden ser de 3 tipos: neuronas con proyección supraespinal, propioespinales o interneuronas modulares inhibitorias o excitatorias¹⁶. Las características de las fibras nociceptivas son resumidas en la **Tabla 2**.

TABLA 2

Características de las fibras nerviosas conductoras del estímulo nociceptivo¹⁶

| Fibras nociceptivas | Tipo | Velocidad (m/s) | Diámetro (µm) |
|----------------------------|-------------|------------------------|----------------------|
| Fibras A – δ | Mielínicas | 4 – 30 | 1 – 5 |
| Fibras C | Amielínicas | 0.4 – 2 | 0.3 – 1.5 |

1.3.3 Modulación

El sistema de modulación se conforma de neuronas dentro de la superficie de la médula espinal y tractos neurales descendentes, su activación involucra la liberación de neurotransmisores los cuales son capaces de disminuir la liberación de neurotransmisores excitatorios¹⁶. Como sistemas moduladores se encuentran las proyecciones de fibras centrípetas de grueso calibre (periféricas), y las descendentes desde niveles superiores encefálicos como la sustancia gris periacueductal (PAG, por sus siglas en inglés) y el bulbo rostral ventromedial (RVM, por sus siglas en inglés). Los sistemas inhibitorios mejor conocidos son: los opioides, el α -adrenérgico, el colinérgico y el gabaérgico¹⁸.

1.3.4 Percepción

Es el resultado final de la señal nociceptiva en regiones específicas de la corteza cerebral: corteza somatosensorial primaria, secundaria, opérculo parietal, ínsula, corteza cingular anterior, corteza pre frontal¹⁶.

1.4 Evaluación del dolor

Con la finalidad de medir objetivamente el dolor se han creado distintas escalas, sus características y ejemplos son explicadas detalladamente en la **Tabla 3**. Los datos de la tabla fueron obtenidos del reporte presentado durante la reunión de expertos en la evaluación y diagnóstico del dolor de la Universidad de Salamanca¹⁹.

La escala analógico visual (VAS) ha sido ampliamente utilizada para la recolección de datos al utilizar el modelo de dolor experimental Cold Pressor Task (CPT); en esta prueba la escala va de 0 (ausencia de dolor) hasta 10 (dolor extremo)^{20,21}. Un ejemplo de la escala analógica visual se muestra en la **Figura 2**.

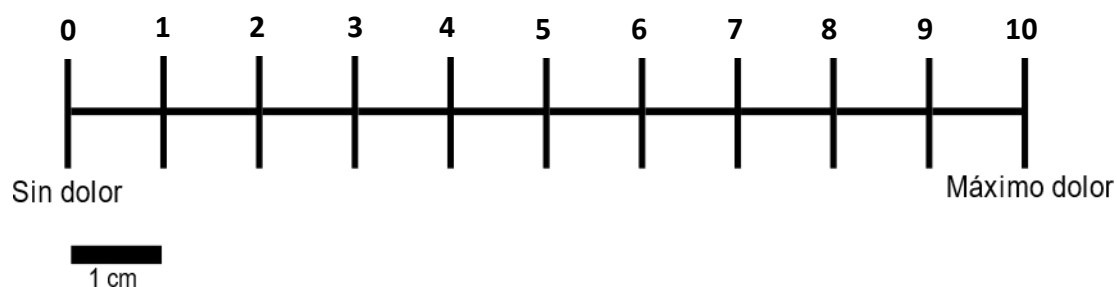


Figura 2. Escala VAS usada en la descripción del dolor

TABLA 3

Metodologías empleadas en la cuantificación del dolor^{19,20}

| Metodología | Técnica | Ejemplo |
|-----------------------------|--|---|
| Evaluación verbal del dolor | Uso y aplicación de mnemotécnicas para evaluar el dolor en sujetos. | La mnemotecnica: A.L.I.C.I.A. A.- Aparición L.- Localización I.- Intensidad C.- Características I.- Irradiación A.- Agravantes y atenuantes |
| Autoinformes | Técnicas que intentan valorar los datos subjetivos de los sujetos y transformarlos en datos cuantitativos. Puede ser unidimensional (intensidad del dolor) y multidimensional (incluye los componentes sensorial, afectivo y cognitivo). | Técnicas unidimensionales: a) Escalas verbales b) Escalas numéricas c) Escala analógico visual d) Escalas gráficas |
| | | Técnicas multidimensionales: a) Cuestionario del dolor de McGill (MPQ) b) Test de Latineen c) Cuestionario de Nottingham d) Test de Karnofsky |
| Auto-registros | Son procedimientos donde el sujeto registra la aparición de ciertas conductas. | Diario del dolor, escala de Branca-Vaona y el indicador del patrón de actividad |
| Valoración fisiológica | Se basa en los cambios fisiológicos que produce el dolor en la homeostasis del cuerpo humano. | Estudio de las respuestas autonómicas: a) Termografía. |
| | | Estudios neurofisiológicos: a) Electromiografía, electro neurografía b) Potenciales evocados somato sensoriales. |
| | | Estudios bioquímicos: a) Determinación plasmática de cortisol. b) Determinación en líquido cefalorraquídeo (LCR) de opioides endógenos. |

(Villoria, C. 2007)¹⁹

1.5 Tratamiento del dolor

El dolor puede ser tratado por métodos farmacológicos y no farmacológicos²².

1.5.1 Terapia no farmacológica

Tiene como objetivo tratar las dimensiones: afectiva, cognitiva y sociocultural del dolor²³. Los tratamientos de tipo no farmacológico se dividen en: terapias periféricas, estimulación nerviosa eléctrica transcutánea (TENS), tratamiento caliente-frío, acupuntura, ejercicio, posicionamiento, descanso, masaje, hidroterapia, terapias cognitivo-conductuales (relajación, distracción, meditación, yoga, hipnosis, terapia de comportamiento), otros (reflexología, tratamiento herbal, aromaterapia, terapia musical)²³.

1.5.2 Terapia farmacológica

Los analgésicos se dividen en tres grupos: no opiáceos (el paracetamol, los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs): ibuprofeno y naproxeno sódico, y los salicilatos: ácido acetilsalicílico (aspirina), ácido salicílico, diflunisal, salicilato de magnesio y el ácido benzoico, los cuales son miembros de los AINEs),

opiáceos (morfina, fentanilo, oxicodona, meperidina, metadona) y adyuvantes (carbamazepina, gabapentina, lidocaína). La organización mundial de la salud (OMS) ha propuesto la “escalera del dolor”²⁴ la cual se muestra en la **Figura 3**. Los mecanismos de acción de los fármacos utilizados en el tratamiento farmacológico del dolor son descritos de manera detallada en la **Tabla 4**.

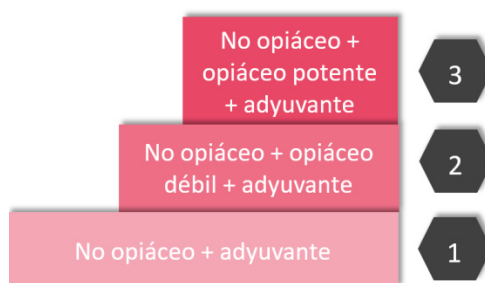


Figura 3. Escalera del tratamiento farmacológico del dolor propuesto por la OMS²⁴

TABLA 4

Mecanismos de acción de los fármacos y adyuvantes empleados en la terapia farmacológica del dolor

| Tipo | Ejemplos | Mecanismo de acción | Ref |
|--------------------|---|--|--------|
| No opiáceos | Paracetamol | Su mecanismo no se encuentra del todo claro; sin embargo, se sabe que activa las vías serotoninérgicas de descenso del dolor; además uno de sus metabolitos, el AM404 inhibe la recaptación de anandamida, incrementando la activación del receptor CB1 en la membrana post-sináptica | 25 |
| | AINEs | La inhibición de enzima ciclooxigenasa (COX), específicamente la isoforma 2 (COX-2), provocando la subsecuente inhibición de la síntesis de prostaglandinas, específicamente PGE ₂ , asociada a la aparición de síntomas clásicos de inflamación: enrojecimiento, hinchazón y dolor. | 26, 27 |
| Opiáceos | Morfina Fentanilo Oxicodona Meperidina Metadona | Los opioides producen su efecto a nivel celular por medio de la activación de receptores opioides: mu (μ), delta (δ) y kappa (κ), esto ocasiona el cierre de canales de calcio sensibles al voltaje y la estimulación del flujo de potasio generando una hiperpolarización y reducción de adenosina cíclica, provocando la disminución de la excitabilidad neuronal y deteniendo el paso de impulsos nociceptivos ascendentes. | 28 |

TABLA 4

(Continuación)

| Tipo | Ejemplos | Mecanismo de acción | Ref |
|-------------------|--|--|-----|
| | Antiepilépticos | El mecanismo de acción de estos fármacos se asocia a cambios de expresión de las subunidades de canales de calcio y sodio; sin embargo, no está del todo claro. | 29 |
| | Carbamazepina | Bloquea los canales de sodio inhibiendo la despolarización y además intensifica la liberación de GABA, además suprimen la liberación de Glutamato, inhibiendo así la vía de ascenso del dolor. | 30 |
| | Fenitoína | Se encuentra posicionado como un bloqueador arquetípico de los canales de sodio, al igual que la carbamazepina, inhibiendo la despolarización y produciendo así anti nocicepción. | 31 |
| | Gabapentina Pregabalina | Ambos fármacos actúan bloqueando los canales de calcio y suprimiendo la liberación de Glutamato, evitando así el ascenso del dolor. La Gabapentina además bloquea los canales de sodio, inhibiendo la despolarización. | 30 |
| | Antidepresivos | Son un grupo de fármacos que incluyen una gran variedad de agentes químicos, caracterizados por su estructura y / o mecanismo farmacológico. | 30 |
| Adyuvantes | Tricíclicos (TCAs) - Amitriptilina - Amoxapina - Doxepina | Inhiben la recaptación de norepinefrina, serotonina y acetilcolina en la membrana presináptica, lo cual incrementa el nivel de serotonina en el espacio sináptico. | 30 |
| | Inhibidores de la monoamina oxidasa (MAOIs) - Furazolidona - Sulfato de fenelzina - Nialamida | Inhiben la actividad de la monoamina oxidasa, lo cual incrementa los niveles de serotonina en el espacio sináptico. | 30 |
| | Inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina y norepinefrina (SNRIs) - Venlafaxina - Milnacipran - Duloxetina | Elevan los niveles de serotonina y norepinefrina en el espacio sináptico, además incrementan la disponibilidad de norepinefrina supra espinal, lo cual se piensa que incrementa la activación de receptores opioides endógenos, bloqueadores de canales de sodio e inhibidores de receptores N-metil-D-aspartato, entre otros. | 30 |

1.5.2.1 Paracetamol

El paracetamol es utilizado debido a sus características analgésicas, antipiréticas y su amplio perfil de seguridad, sin embargo, su mecanismo de acción aún no se ha comprendido completamente³².

Existen varios mecanismos moleculares previamente propuestos por diversos grupos de investigación, los cuales implican la participación de diversos sistemas periféricos y centrales, entre ellos la inhibición de las ciclooxigenasas, la activación de las vías de descenso serotoninérgicas, las vías opioides, la inhibición de la producción de óxido nítrico y la activación de los canales TRPA1 por sus metabolitos a nivel espinal³³.

Recientemente ha sido determinado que una de las vías más importantes a través de las cuales este fármaco ejerce su función analgésica se encuentra relacionada con el sistema endocannabinoide, a partir de su metabolización a nivel central³³, donde interviene con la recaptación y degradación de la anandamida³⁴.

El metabolito N-araquidonoilfenolamina (AM404) del paracetamol es producido tanto en el cerebro como en la médula espinal luego de la desacetilación de su amina primaria (*p*-aminofenol) y su posterior conjugación con la enzima FAAH; posee una alta afinidad por el receptor TRPV1 y una baja afinidad por el receptor CB1. De acuerdo a la literatura reportada, desempeña una función importante en el mecanismo por el cual el paracetamol produce

analgesia, debido a que inhibe al transportador de membrana de la anandamida (AMT), incrementando así los niveles de este endocannabinoide endógeno y de esta manera potenciando la activación del receptor CB1³⁵.

El paracetamol es absorbido en el tracto gastrointestinal en humanos y su biodisponibilidad se ha estimado de 63 – 89 %; su velocidad de absorción es independiente de la dosis y posee una vida media en plasma de 2.7 minutos. El volumen de distribución se ha reportado de 0.7 – 1.0 kg⁻¹ y su vida media se encuentra alrededor de las 2 horas; su metabolización ocurre principalmente en el hígado, siendo este conjugado con los ácidos glucurónico (60 %) y sulfúrico (35 %) o cisteína (3 %), para ser eliminado a través de la orina luego de un período de 24 horas (90 – 100 %). Sólo una pequeña cantidad del fármaco es metabolizado por el citocromo P-450 para dar lugar a N-acetil-p-amino-benzoquinonaimina (NAPQI), el cual es responsable de producir falla hepática en los casos más severos³⁶. El grado de eficacia del paracetamol es equiparable con los estándares equivalentes de los AINEs tanto para el tratamiento de dolor cónico y agudo; su uso concomitante con opioides y otros analgésicos reduce efectos secundarios, incrementa su eficacia y mejora la satisfacción del paciente³⁷.

La dosis autorizada del paracetamol es la misma para todas las vías de administración en adultos con un peso mayor a los 50 kg (es decir, 1 g hasta por cuatro veces al día), requiriéndose un tiempo de reposo de 4 horas entre cada

administración y de 6 h para aquellos pacientes que presenten insuficiencia renal (depuración de creatinina $\leq 30 \text{ ml min}^{-1}$)²⁵.

1.6 El sistema endocannabinoide

El sistema endocannabinoide es un regulador homeostático de la actividad de los neurotransmisores³⁸ y su función juega un rol importante en la memoria, regulación del dolor, estado de ánimo, sistema de recompensa cerebral, adicción, procesos metabólicos como la lipólisis, el metabolismo de la glucosa y el balance energético³⁹.

1.6.1 Descubrimiento

El hallazgo de este sistema se encuentra relacionado al de los fitocannabinoides por Raphael Mechoulam y Gaoni en 1964⁴⁰, luego se observó la relación de estos compuestos con la inhibición de la acumulación del adenosín monofosfato cíclico (AMPc), posteriormente se identificaron los receptores cannabinoides: tipo 1 (CB1) por Gerard *et al.*, 1991⁴¹ y Matsuda *et al.*, 1990⁴² y tipo 2 (CB2) por Munro, 1993⁴³.

El primer ligando endógeno del sistema endocannabinoide, el araquidonoil-etanolamina, anadamida o AEA, fue encontrado en cerebro porcino⁴⁴, seguido de la 2-araquidonoilglicerol o 2-AG^{45,46}, ambos son derivados

del ácido araquidónico (AA)⁴⁷. AEA posee una mayor afinidad que 2-AG⁴⁷ sobre CB1.

1.6.2 Elementos que lo conforman

Estos son resumidos en la **Tabla 5**.

TABLA 5

Elementos del sistema endocannabinoide³⁹

| Función | Molécula |
|---|--|
| Receptores cannabinoides | CB1 y CB2 |
| Ligandos endógenos | AEA y 2-AG |
| Precursor biosintético de la anandamida | N-araquidonoil-fosfatidiletanolamina (NAPE) |
| Enzima biosintética de anandamida | Fosfolipasa D selectiva para NAPE |
| Precursor biosintético de 2-AG | Diacilglicerol (DAG) con AA en la posición 2 |
| Enzima biosintética de 2-AG | Diacilglicerol lipasa (DGL) |
| Degradación de la anandamida | Amida hidrolasa de ácidos grasos (FAAH) |
| Degradación de 2-AG | Monoacilglicerol lipasa (MAGL) |

Una similitud estructural entre AEA y 2-AG es un AA conjugado a una molécula adicional en el ácido carboxílico (etanolamina y glicerol, respectivamente)⁴⁷, dichas estructuras se muestran en la **Figura 4**. Debido a su carácter lipídico, su acción es de tipo paracrina (célula a célula) o autocrina (misma célula)³⁹.

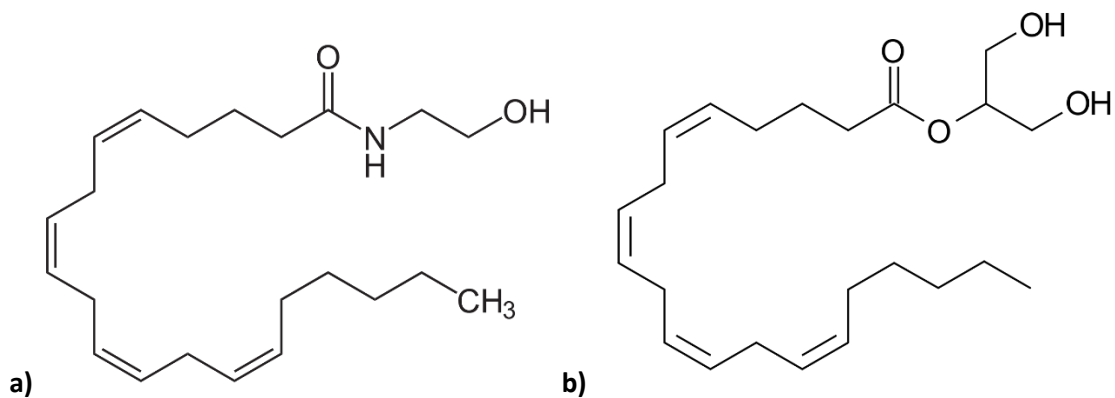


Figura 4. Estructura química de los ligandos endógenos AEA (a) y 2-AG (b)

1.6.3 Los receptores cannabinoides

Se conforman de un polipéptido con siete regiones transmembranales α -hélice, un extremo N-terminal glicosilado y un extremo C-terminal intracelular (véase **Figura 5**); se encuentran acoplados a proteínas G, principalmente Gi/o. El receptor CB1 está expresado principalmente en la región post sináptica, donde media la liberación y recaptación de varios neurotransmisores, también ha sido observado en tejidos metabólicamente relevantes como el hígado, el músculo esquelético, el tejido adiposo y páncreas. CB2 se expresa principalmente en sistemas periféricos, en células del sistema inmune y afectan la liberación de mensajeros químicos, se ha encontrado además en: cerebro, tejido adiposo, músculo esquelético y el páncreas⁴⁸. La estructura tridimensional del receptor CB1 se muestra en la **Figura 6**.

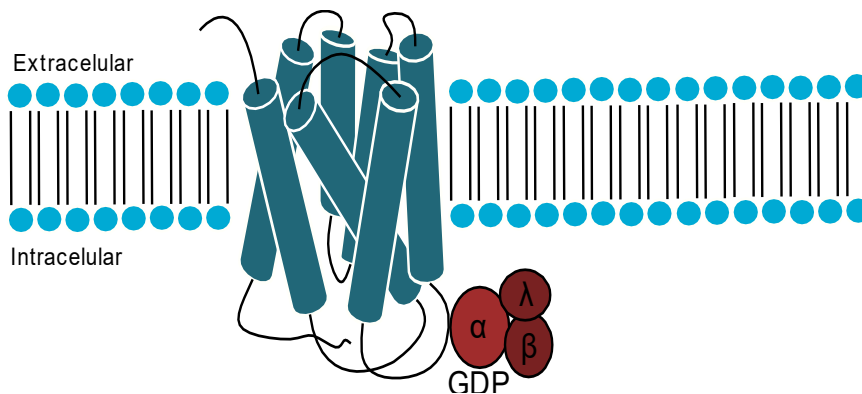


Figura 5. Representación esquemática de un receptor acoplado a proteínas G⁴⁹

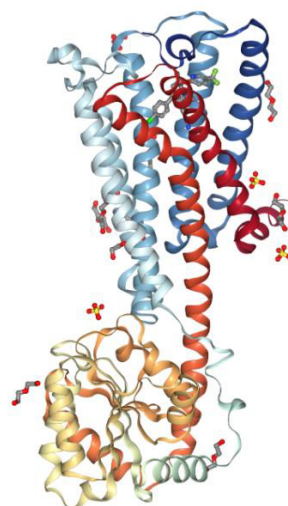


Figura 6. Representación tridimensional del receptor CB1^{50,51,52}

1.6.4 Señalización mediada por receptores cannabinoides

Su activación desencadena la inhibición de la adenilil ciclasa, por lo que el nivel de AMPc celular disminuye. El receptor CB1 está también acoplado a canales iónicos de Ca^{2+} y K^{+53} . Las rutas de señalización de los receptores cannabinoides se muestran en la **Figura 7**.

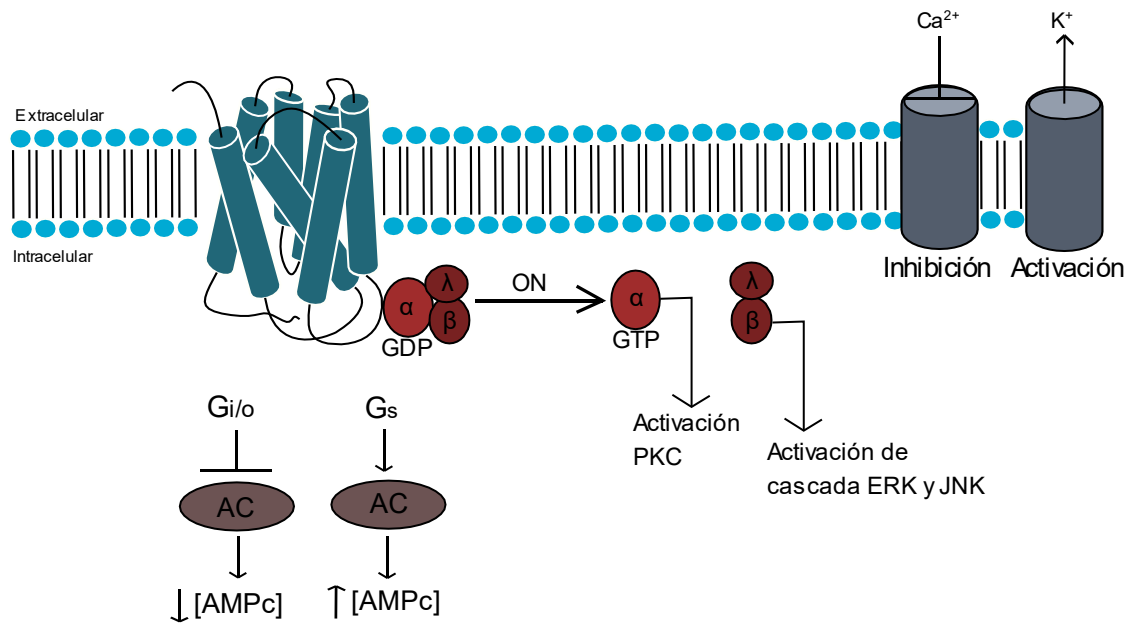


Figura 7. Rutas de señalización activadas por el receptor CB1⁵³

1.6.5 Potencial terapéutico ligado a los receptores cannabinoides

Las condiciones a las que han sido ligadas son las siguientes⁵⁴: obesidad, desordenes metabólicos, anorexia, dolor e inflamación, neurotoxicidad, esclerosis múltiple, desordenes de movimiento como la enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington y el síndrome de Taurette, enfermedad de Alzheimer, epilepsia, ansiedad y depresión, esquizofrenia, insomnio, adicción a las drogas y al alcohol, náuseas, enfermedades cardiovasculares, asma, cáncer, glaucoma y retinopatía, hepatitis y cirrosis, enfermedad de inflamación del intestino, artritis y osteoporosis. Existe gran cantidad de evidencia que relaciona al sistema endocannabinoide en el fenómeno nociceptivo, haciéndolo un importante objetivo de estudio.

1.6.6 El sistema endocannabinoide en el fenómeno nociceptivo

La evidencia se resume en la **Tabla 6**.

TABLA 6

Evidencia de la regulación de la nocicepción efectuada por el sistema endocannabinoide en modelos animales de rata y ratón^{55,56}

| Agente | Modelo animal | Prueba de dolor | Modelo de dolor | Resultados |
|--------------------------------------|---------------|-----------------------------------|----------------------------------|--|
| AEA | Rata | Alodinia térmica | Inflamatorio, agudo/inflamatorio | Disminución de hiperalgesia |
| 2-AG | Ratón | TCC | Agudo/inflamatorio | Inhibición de las citocinas proinflamatorias |
| AEA/2-AG | Rata | TCC - alodinia térmica/mecánica | Neuropático | Antinocicepción |
| UR8597 (inhibidor de FAAH) | Ratón | TCC - alodinia térmica/frío | Neuropático | Atenuación de la alodinia |
| OL135 (inhibidor de FAAH) + AEA/2-AG | Ratón | LTL - alodinia mecánica | Agudo | Atenuación de la alodinia |
| $\Delta 9$ -THC | Rata | Alodinia térmica | Agudo | Antinocicepción |
| SPC | Rata | Lesión parcial del nervio ciático | Neuropático | Antinocicepción prolongada |

TCC, traumatismo craneal cerrado; LTL, lesión térmica leve; SPC, estimulación de la médula espinal.

Su efecto analgésico en modelos de dolor (mecánico, térmico y químico) ha sido previamente comprobado, siendo similar al de los opioides, inclusive se han observado mejores resultados en modelos de dolor crónico (inflamatorio y neuropático)⁵⁵.

Los endocannabinoides regulan la liberación de varios neurotransmisores como GABA y glutamato⁵⁵, a través de un proceso conocido como

despolarización inducida por la supresión de la inhibición (DSI, por sus siglas en inglés), de esta forma el sistema endocannabinoide desinhibe y potencia las vías descendientes del dolor, las cuales incluyen las neuronas localizadas en PAG y RVM, y se encuentran proyectadas en el asta dorsal de la médula espinal⁵⁶. La analgesia regulada por este sistema es dependiente de la activación de los receptores metabotrópicos de glutamato (mGluR) y receptores N-metil-D-aspartato (NMDA)⁵⁷.

El proceso de señalización del sistema endocannabinoide comienza con la activación de los receptores metabotrópicos de glutamato (mGluR), lo cual dispara la activación de la ruta fosfolipasa C (PLC) y DGL en donde se produce 2-AG a través de la degradación de DAG por la enzima DGL- α ; posterior a su síntesis 2-AG sale a través de un receptor no identificado y activa el receptor CB1, accediendo finalmente a la neurona presináptica a través de un receptor desconocido para ser degradada por la enzima MGL, dando como producto una molécula de ácido araquidónico y una de glicerol.

La metabolización de AEA es llevada a cabo por la enzima FAAH, produciendo una molécula de ácido araquidónico y una de etanolamina. La activación del receptor CB1 detiene el flujo de Ca^{2+} al interior de la neurona presináptica y así evita la salida de moléculas como el glutamato o GABA⁵⁸. Este mecanismo se muestra detalladamente en la **Figura 8**.

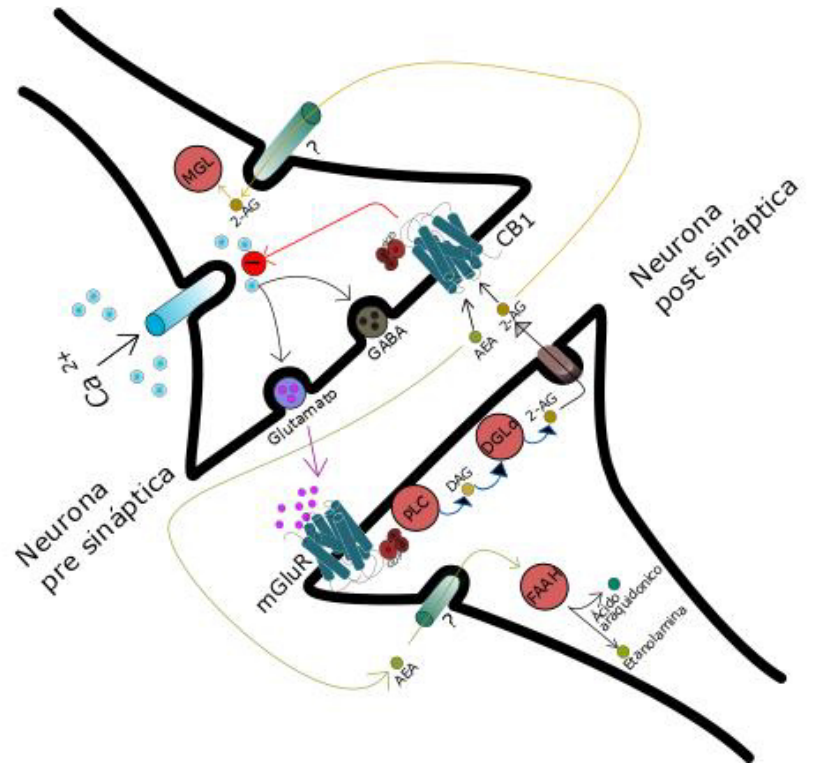


Figura 8. Mecanismo de señalización del sistema endocannabinoide en el SNC

1.6.7 El sistema endocannabinoide y el metabolismo energético

La primera evidencia existente de la relación entre este sistema con el metabolismo fue observada en la India 5000 AC., donde la marihuana se utilizaba como terapia contra la falta de apetito⁵⁹, desde entonces se han estudiado los mecanismos de regulación de energía en el cuerpo humano y ahora se sabe que existen varias regiones centrales involucradas y cuya actividad se encuentra mediada por la activación o bloqueo del receptor CB1. Entre ellas están: el núcleo accumbens, área relacionada al grado de motivación de ingesta de alimentos, la vía mesolímbica, región encargada de los sistemas de recompensa activados por

alimentos considerados como “ricos o deliciosos”, el sistema límbico, región donde ocurre la interacción entre endocannabinoides, leptina y la Hormona Concentradora de Melanocortina (HCM), cuya sobre estimulación produce la sensación de hambre, entre otras⁵³.

El bloqueo del receptor CB1 ocasiona una reducción en la ingesta de alimentos y una pérdida de peso significativa, mientras que su sobre activación produce efectos contrarios y una sobre estimulación de la liberación de AEA y 2-AG; su presencia en tejidos periféricos, como el músculo, el páncreas y el tejido adiposo indica que interviene en procesos de homeostasis de la energía. La desregulación de este sistema puede ocasionar tolerancia a la glucosa y / o la insulina, así como acelerar la producción de ácidos grasos monoinsaturados⁶⁰ y finalmente ocasionar una “tormenta metabólica” sistémica que conlleva a la patogénesis de hiperglicemia y dislipidemia⁶¹.

1.7 Genética del dolor

La eficacia del tratamiento farmacológico del dolor presenta variabilidad entre individuos debido a la mutabilidad genética de los mecanismos involucrados en el proceso nociceptivo⁶². Los genes y algunos polimorfismos involucrados en la percepción y modulación del dolor se muestran en la **Tabla 7**.

TABLA 7.

Genes y sus polimorfismos asociados a la modulación y percepción del dolor^{63, 18, 64, 65, 66, 67}

| Función específica | Genes asociados al dolor | Polimorfismos |
|-----------------------|--|---|
| Transducción | Calor: <i>TRPV1</i> , | <i>TRPV1</i> : I585V, rs8065080 (C/T) |
| | Frío: <i>TRPM8</i> , <i>TRPA1</i> | <i>TRPA1</i> : G38218A (mRNA) |
| Modulación | Central: <i>OPRD1/K1/M1</i> , <i>CNR1</i> , | <i>OPRD1</i> : T921C, <i>OPRK1</i> : rs6473799 (A/G) <i>OPRM1</i> : A118G <i>CNR1</i> : rs806378 (C/T) |
| | Periférica: <i>COX-2</i> , <i>TNF</i> , | <i>COX-2</i> : rs2383515 (G/T), rs2206593 (A/G) <i>TNF</i> : G-308A |
| | Microglia: <i>P2RX7</i> | <i>P2RX7</i> : rs1718125 (A/G) |
| Conducción | Canales de Na ⁺ : <i>SCN10A</i> , <i>SCN9A</i> | <i>SCN10A</i> : T3218C <i>SCN9A</i> : C3496T |
| | Canales de K ⁺ : <i>KCNQ</i> | <i>KCNQ</i> : No se encontró literatura. |
| Transmisión sináptica | Receptores de neurotransmisores: <i>GRIA3</i> , <i>TACR1</i> | <i>GRIA3</i> : T-1952C |
| | Canales de Ca ²⁺ : <i>CACNA1A</i> | <i>CACNA1A</i> : Thr698Thr |

1.7.1 Polimorfismo

Es la ocurrencia de alelos múltiples en un locus, donde al menos dos alelos aparecen con una frecuencia > 1%, los más frecuentes son los polimorfismos de nucleótido sencillo (SNP, por sus siglas en inglés)⁶³.

1.7.2 Implicaciones genéticas del gen *CNR1* en el dolor

La variación genética del receptor *CNR1* ha sido asociado a la modulación de la percepción del dolor crónico en diversas enfermedades: síndrome del colon irritable⁶⁸, migraña⁶⁹ y fibromialgia⁷⁰.

1.8 Genética de los desórdenes metabólicos

El término “síndrome metabólico” fue propuesto por la OMS en 1998 para identificar al conjunto de factores de riesgo cardiovascular, entre ellos: obesidad abdominal, hipertensión, dislipidemia e intolerancia a la glucosa en una misma persona⁷¹. La misma OMS estableció los componentes de este síndrome:

- a) Hipertensión definida como tratamiento antihipertensivo y / o presión arterial $> 160 / 90$ mm Hg.
- b) Dislipidemia definida como triglicéridos en plasma elevados (> 1.7 mmol / L) y / o bajas concentraciones de colesterol HDL (< 0.9 mmol / L en hombres, < 1.0 mmol / L en mujeres).
- c) Obesidad definida como alto Índice de Masa Corporal (IMC) (> 30) y / o índice cintura/cadera elevado (0 a 90 en hombres, 0 a 85 en mujeres).
- d) Microalbuminuria (excreción urinaria de albúmina durante la noche a una velocidad > 20 mg / min).

Para que una persona padezca el síndrome metabólico deberá por lo menos presentar dos de las características previamente mencionadas y además una de las características siguientes:

- a) Presentar diabetes tipo 2 o intolerancia a la glucosa
- b) Presentar resistencia a la insulina

En la **Tabla 8** se muestran los distintos factores de riesgo cardiovasculares y aquellos que forman parte del conjunto de factores presentes en el síndrome metabólico, la prevalencia a nivel mundial reportada en diversas investigaciones y su componente de heredabilidad o atribución a factores genéticos expresado en %^{71, 72, 73, 74, 75, 76, 77}.

TABLA 8.

Prevalencia y % de heredabilidad reportadas para los factores que componen el síndrome metabólico

| Factor de riesgo | Prevalencia reportada (%) | % de heredabilidad |
|------------------------------|----------------------------------|---------------------------|
| Resistencia a la insulina | 20 – 40 | 20 - 45 |
| Hipertensión | 31 | 40 - 50 |
| Bajo nivel de colesterol HDL | 55.4 – 67.6 | 40 - 60 |
| Dislipidemia | 35.5 | 20 - 43 |
| Microalbuminuria | 39 | 30 |
| Grasa corporal | 13* | 40 |
| Obesidad abdominal | | 60 |

*Este valor indica la prevalencia de personas obesas en el mundo reportada por la OMS para el 2016⁷⁸.

1.8.1 El gen *CNR1* en la homeostasis energética

Las variantes genéticas en este gen han demostrado ser de gran relevancia debido a su asociación con diversos factores y medidas antropométricas relacionados a la obesidad.

La evidencia existente sugiere que la variabilidad del gen *CNR1* que codifica para el receptor CB1 contribuye claramente a la aparición de desórdenes relacionados a esta afección⁷⁹, haciéndole al igual que al dolor un importante objeto de estudio.

1.9 Localización y caracterización del gen *CNR1*

Se encuentra en el cromosoma 6, específicamente en la banda citogenética 6q14 – q15 y es transcrito de la banda negativa (orientación 3' a 5'). El gen contiene 4 exones, la región codificante se encuentra en el extremo 5' del exón 4. Su medida es de 26, 882 pares de bases⁸⁰.

El polimorfismo A3813G (rs12720071), ocurre en la posición 88141462 del cromosoma 6, presenta un cambio de adenina a guanina en la posición 3813 de la secuencia codificante del receptor CB1. No se tiene mucha información al respecto del cambio de la secuencia de aminoácidos. Los posibles genotipos pueden ser: A/A, A/G y G/G⁸¹.

El polimorfismo A4895G (rs806368), ocurre en la posición 88140381 del cromosoma 6, presenta un cambio de adenina a guanina en la posición 4895 de la secuencia codificante del receptor CB1. No se conoce el efecto sobre la secuencia de aminoácidos. Los posibles genotipos pueden ser A/A, A/G, G/G⁸². La representación gráfica de la localización de los polimorfismos se muestra en la **Figura 9**.

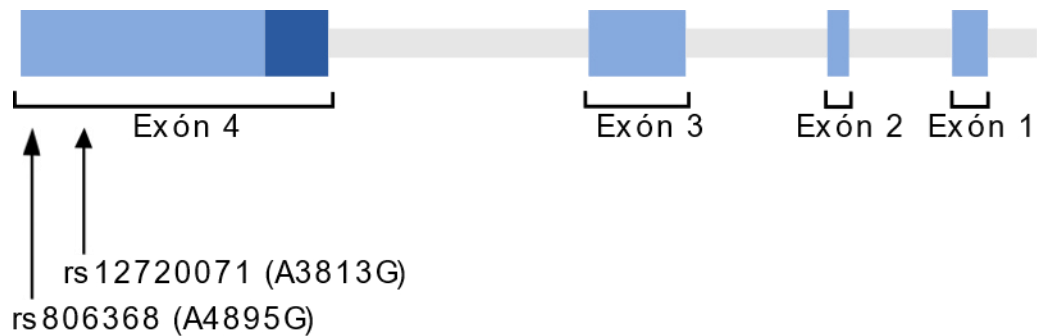


Figura 9. Representación de la localización de los polimorfismos A3813G y A4895G en el gen *CNR1* en el exón 4. La región que codifica al receptor se ha señalado en color azul oscuro.

1.10 Antecedentes

Hasta el momento, no se ha reportado una asociación de los polimorfismos estudiados en la presente investigación y el dolor. Los antecedentes existentes son presentados a continuación:

En el 2007, Russo⁸³ y colaboradores llevaron a cabo un estudio en una población italiana y otra inglesa y encontraron que el alelo A3813G de *CNR1* estaba asociado con un aumento en la circunferencia de la cintura.

En el 2010, Bordicchia⁸⁴ y colaboradores llevaron a cabo un estudio en 280 pacientes que presentaban obesidad e hipertensión y encontraron que los pacientes con el polimorfismo A3813G del *CNR1* tenían una menor prevalencia del síndrome metabólico.

De Luis y colaboradores⁸⁵, en el 2010, condujeron un estudio con 60 pacientes diabéticos y observaron que no había una asociación significativa entre el polimorfismo G1359A del gen *CNR1* y el factor de riesgo cardiovascular, la ingesta alimentaria y la concentración de adipocitos.

En el 2010, Storr⁸⁶ y colaboradores realizaron un estudio con 579 sujetos y observaron que los individuos con el homocigoto A/A del polimorfismo G1359A de gen *CNR1* eran más susceptibles a padecer colitis ulcerosa mientras que los individuos con el homocigoto G/G eran más susceptibles a padecer la enfermedad de Crohn.

Milewicz⁸² y colaboradores, en el año 2011, llevaron a cabo un estudio en Polonia para determinar si la variación genética del gen *CNR1* podría tener un efecto en la distribución de grasa o en desordenes metabólicas en mujeres postmenopáusicas, encontraron que el alelo A3813G no se asociaba con una alta masa corporal; sin embargo, se relacionaba con un mayor depósito de grasa androide.

Tayel⁸⁷ y colaboradores, en el 2013 realizaron un estudio en 95 sujetos y encontraron que el genotipo G/G del polimorfismo G1359A del gen *CNR1* se encontraba asociado a la enfermedad de la arteria coronaria y a diabetes mellitus tipo 2.

Lenarcik⁸⁸ y colaboradores, en el 2014, llevaron a cabo un estudio en Polonia con 298 mujeres y los polimorfismos del gen *CNR1* (A4895G, rs12720071, rs1049353, rs806381, rs10485170 y rs6454674), encontraron que el genotipo G/G del polimorfismo rs10485170 se asociaba al padecimiento del síndrome de ovario poliquístico.

De Luis⁸⁹ y colaboradores, en el 2014, llevaron un estudio con 86 pacientes que presentaban diabetes mellitus tipo 2 y obesidad, encontraron una asociación del alelo A del polimorfismo G1359A con el incremento de resistencia a insulina seguida de la pérdida de peso por el uso de liraglutida en pacientes obesos con diabetes mellitus tipo 2, además, aquellos que no portaban este alelo, mostraron mejora en niveles de colesterol luego de la pérdida de peso.

Ignatowska⁹⁰ y colaboradores, en el 2015, sintetizaron y estudiaron el compuesto ZCZ011, observaron que el mismo aumenta la acción de los agonistas ortostéricos CP55, 940 y AEA potenciando su unión al receptor CB1 en modelos *in vivo* e *in vitro*, además observaron que su administración produce un efecto antinociceptivo en el modelo de lesión nerviosa de constricción crónica de dolor neuropático y el modelo de carragenina de dolor inflamatorio.

GlaxoSmithKline Consumer Healthcare Holdings Limited (GSK) y Voltaren condujeron un estudio sobre el impacto y la prevalencia del dolor a nivel mundial, el cual consideró una muestra de 7000 adultos provenientes de 4 continentes y

14 diferentes países, concluyeron que por lo menos un 88 % de la población mundial experimenta dolor corporal y 8 de cada 10 personas dicen ser afectadas en su vida diaria de manera negativa⁶.

En el 2016⁹¹, De Luis y colaboradores, estudiaron la relación del polimorfismo G1359A con la ingesta de macronutrientes en mujeres con obesidad y encontraron que los niveles de triglicéridos y lipoproteínas de alta densidad (HDL) eran más altos en los portadores del alelo A que los niveles de los no portadores.

En el 2016⁹², Marumatsu y colaboradores, reportaron que el perfil de concentración – tiempo del metabolito AM404 es equiparable al perfil de todos los demás metabolitos del paracetamol, así como de la concentración de este fármaco en la sangre.

En el 2017⁹³, Saliba y colaboradores reportaron que el AM404 inhibe la síntesis de prostaglandina E₂, F₂ y D₂; además observaron la reducción reversible de la actividad de COX-1 y COX-2 en cultivos de células microgliales.

Sharma y colaboradores⁹⁴, en el 2017, demostraron por primera vez la conversión de paracetamol al metabolito AM404 y observaron su presencia en fluido cerebroespinal en humanos.

En el 2018, Klinger-Grantz⁹⁵ y colaboradores, demostraron que el metabolito AM404 produce antihiperalgnesia dosis dependiente a través de la activación indirecta de receptores CB1 localizados en el RVM.

1.11 Justificación

El dolor es un grave problema, su prevalencia según reportes recientes indican que el 88 % de la población lo padecen, los costos generados y su impacto negativo sobre la sociedad supera aquellos generados por el cáncer, la diabetes y las enfermedades cardiovasculares.

Según la evidencia, el ECS se asocia al dolor; sin embargo, no existen reportes de asociación de los polimorfismos del *CNR1* antes mencionados con la modulación del dolor a través del efecto analgésico del paracetamol.

1.12 Hipótesis

Los polimorfismos A3813G y A4895G del receptor cannabinoide tipo 1 (CB1) se asocian con la respuesta analgésica del paracetamol en una población del noreste de México.

Hipótesis nula: Los polimorfismos A3813G y A4895G del receptor cannabinoide tipo 1 (CB1) no se asocian con la repuesta analgésica del paracetamol en una población del noreste de México.

1.13 Objetivos

1.13.1 Objetivo general

Determinar la frecuencia alélica y genotípica de los polimorfismos A3813G y A4895G del gen que codifica para el receptor cannabinoide tipo 1 (*CNR1*) y su asociación con la repuesta analgésica del paracetamol en una población del noreste de México.

1.13.2 Objetivos específicos

- Reclutar sujetos y obtener su consentimiento informado.
- Determinar las frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos A3813G y A4895G en voluntarios sanos.
- Establecer la correlación entre los polimorfismos previamente mencionados y el efecto analgésico del paracetamol.

- Asociar las variantes alélicas del gen receptor cannabinoide tipo 1 (*CNR1*) con la variación del efecto analgésico del paracetamol en una población del noreste de México.
- Evaluar la percepción del dolor a través de la prueba CPT a voluntarios sanos que ingirieron paracetamol.
- Asociar las variantes polimórficas con los resultados del análisis bioquímico.

CAPÍTULO 2

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Metodología general

La metodología general de este proyecto de investigación se muestra en la **Figura 10**.

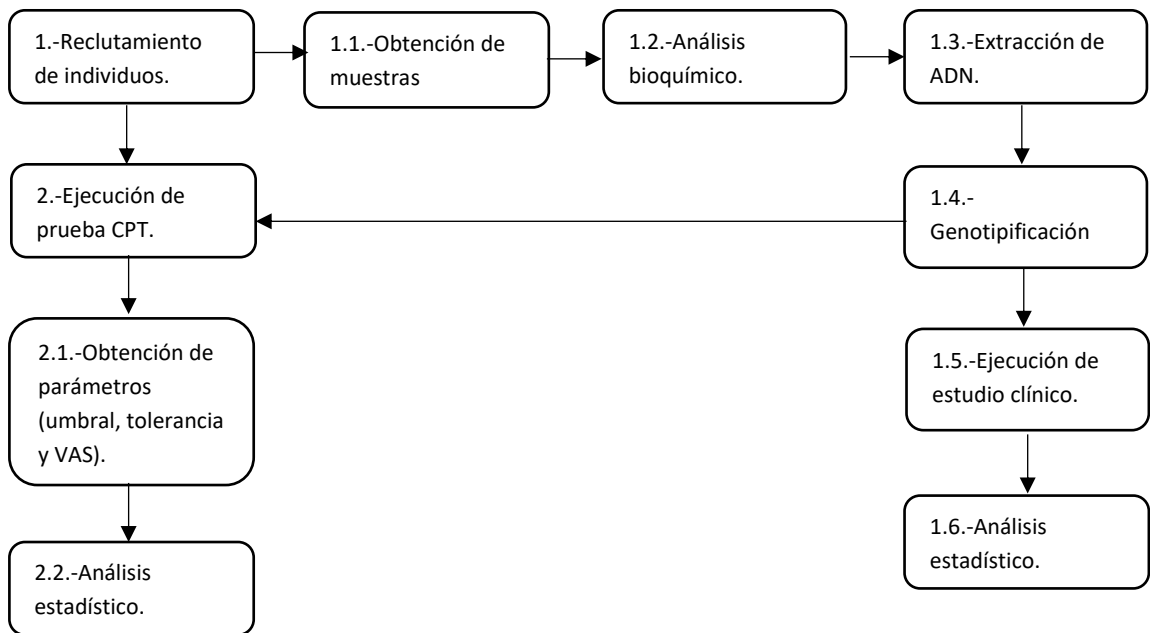


Figura 10. Metodología general de la investigación

2.2 Ubicación

El trabajo de investigación fue realizado en el Laboratorio de Ingeniería Genética y Genómica que se encuentra dentro de las instalaciones de la División de Estudios de posgrado de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, la prueba CPT, el análisis de lípidos y el ensayo clínico se llevaron a cabo en el Laboratorio de Análisis Clínicos “QFB. Iris Guajardo Guajardo”.

2.3 Equipo

El condensado del equipo requerido para este proyecto y su localización se muestran en la **Tabla 9**.

TABLA 9

Lista de equipo empleado y su localización

| Material | Localización |
|--|---|
| MiniPCR | Laboratorio de Ingeniería Genética y Genómica |
| Microcentrífuga | |
| Vortex | |
| Cámara de electroforesis | |
| Fotodocumentador | |
| Balanza analítica | |
| Micropipetas (10, 200 y 1000 µL) | |
| Tubos Eppendorf (1.5 mL) | |
| Celdas para Espectrofotómetro UV-Vis | |
| Cápsulas de paracetamol (500 mg) | |
| Analizador Automático de Química Sanguínea | Laboratorio de Análisis Clínicos QFB. Iris Guajardo Guajardo de la Facultad de Ciencias Químicas, UANL. |
| Contenedor para prueba CPT | |

2.4 Metodología

2.4.1 Reclutamiento de sujetos

Se llevó a cabo un muestreo aleatorio simple con 200 voluntarios de la Facultad de Ciencias Químicas para el reporte de frecuencias alélicas y genotípicas, de los cuales, solo aquellos que cumplieron con los criterios mostrados a continuación fueron seleccionados para realizar la prueba CPT y el estudio clínico:

2.4.2 Criterios de inclusión

- Hombres y mujeres entre 18 y 35 años.
- Firmaron un consentimiento informado.
- Se encontraban en buen estado de salud.

2.4.3 Criterios de exclusión.

- Presentaban un padecimiento de síndrome doloroso (ej. dolor de cabeza).
- Consumieron fármacos 1 semana previa al estudio.

- Consumieron productos con cafeína y paracetamol 24 horas previas al estudio y durante el estudio (ej. té, chocolate, etc.) o cualquier fármaco que interfiera en la percepción de dolor.
- Consumieron alimentos 1 hora previo al estudio.

2.4.4 Aspectos éticos

El estudio se llevó a cabo bajo los lineamientos de la Declaración de Helsinki de 1964. Los derechos y la confidencialidad de los voluntarios fueron respetados bajo un consentimiento informado.

2.4.5 Obtención de muestras y análisis bioquímico

La obtención de muestras y su análisis fueron realizados por el personal del Laboratorio de Análisis Clínicos QFB. Iris Guajardo Guajardo de la Facultad de Ciencias Químicas, UANL. Los datos fueron entregados directamente al encargado del proyecto para su posterior análisis.

2.4.6 Evaluación del dolor en frío a través de la prueba CPT

El procedimiento que se siguió fue el siguiente:

1. El sujeto se presentó al laboratorio donde se llevó a cabo la prueba.

2. Se dieron las instrucciones generales de la prueba.
3. El sujeto firmó el consentimiento informado.
4. El sujeto llenó la encuesta de evaluación del estado de ánimo (EVEA).
5. El sujeto introdujo la mano no dominante en un recipiente con agua cuya temperatura se encontraba dentro del rango de 0 a 4 °C.
6. El sujeto reportó los parámetros de umbral y tolerancia de dolor de manera verbal. Se entiende como umbral al momento en el que el sujeto comienza a experimentar dolor y como tolerancia al momento en el que el sujeto ya no puede soportar ese dolor. Ambos resultados fueron registrados con un segundero. Cada voluntario reportó la cantidad de dolor percibida al retirar la mano del agua fría a través de la escala VAS.

2.4.7 Extracción de ADN de sangre periférica

Se extrajeron aproximadamente 4 mL de sangre periférica y se colocaron en un vacutainer, posteriormente este se centrifugó durante 10 min a 13,200 rpm para extraer el botón leucocitario, el cual se depositó en un tubo eppendorf de 1.5 mL. El tubo eppendorf se centrifugó durante 10 min a 13,200 rpm y se extrajo por segunda ocasión el botón leucocitario, posteriormente se llevó a cabo la ruptura celular con TSNT (tritón, SDS, NaCl y Tris-HCl), para lo cual se agregaron 350 µL de este buffer y se aplicó vórtex durante 10 s.

Luego de la ruptura celular se llevó a cabo el procedimiento de extracción y purificación, para lo cual se utilizó la metodología de fenol – cloroformo, para esto fueron agregados 250 μL de fenol y 150 μL de cloroformo a la solución y se aplicó vórtex durante 10 s y posteriormente fueron agregados 200 μL de buffer TE (tris – EDTA), se aplicó vórtex durante 1 s y se centrifugó durante 11 min a 13,200 rpm.

El procedimiento de fenol – cloroformo se repitió y finalmente se extrajo el sobrenadante, el cual fue colocado en un tubo eppendorf nuevo, se agregó 1 mL de etanol absoluto frío (4 °C) y la solución fue mezclada por inversión e incubada a – 20 °C durante 1 h, posteriormente se centrifugó durante 11 min a 13,200 rpm, se decantó previniendo desechar el ovillo de ADN y se agregaron 500 μL de etanol al 75 % para realizar un lavado y remover las proteínas restantes.

Finalmente, la solución fue centrifugada durante 6 min a 13,200 rpm, el etanol restante fue evaporado y el ADN se resuspendió en 200 μL de agua MQ y se almacenó a – 20 °C para procedimientos posteriores.

2.4.8 Determinación de frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos A3813G y A4895G en voluntarios sanos

La determinación de frecuencias alélicas y genotípicas se realizó a partir de la metodología PCR – RFLP y el procedimiento general fue el siguiente:

1. Amplificación de fragmentos por reacción en cadena de la polimerasa (PCR).
2. Electroforesis en gel de agarosa de la muestra amplificada.
3. Digestión enzimática de las muestras.
4. Genotipificación de las muestras por electroforesis en gel de agarosa y análisis de los polimorfismos de longitud de los fragmentos de restricción (RFLP).
5. Conteo directo de los resultados para determinar frecuencias alélicas y genotípicas.

PCR⁹⁶. Se colocó una placa de 96 pocillos en un cubo de hielo como soporte para los tubos de 0.2 mL, se agregaron los siguientes reactivos de PCR en el siguiente orden: agua estéril, buffer, desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTP's), MgCl₂, primers y ADN, para cada muestra se generó un control negativo a través de la introducción de los reactivos, sólo que el ADN no es añadido a la reacción; se utilizó agua estéril para completar a 25 µL y se añadió la enzima Taq DNA polimerasa a la mezcla de reacción, para asegurar una mezcla homogénea se realizó un mezclado con la micropipeta de al menos 10 veces. Al finalizar la

reacción se procedió a colocar los tubos a -20 °C para posteriormente realizar la digestión enzimática según el fragmento amplificado.

En la **Tabla 10** se muestran las cantidades y concentraciones utilizadas para preparar la mezcla de reacción. La configuración del programa en el termociclador que se utilizó para cada polimorfismo es descrita en la **Tabla 11** y en la **Tabla 12** se muestran los primers utilizados para cada polimorfismo.

TABLA 10

Cantidades en μL para preparar la mezcla de reacción para la PCR

| Elemento de la mezcla de reacción | Cantidad (μL) | Concentración |
|-----------------------------------|----------------------------|-------------------|
| Agua estéril | 13 | - |
| Buffer | 2.5 | 10 X |
| dNTP's | 2.5 | 200 μM |
| MgCl ₂ | 1 | 15 mM |
| Primer Forward | 0.5 | 20 – 50 pmol |
| Primer Reverse | 0.5 | 20 – 50 pmol |
| ADN Taq polimerasa | 1 | 0.5 – 2.5 U |
| ADN | 4 | 1000 ng |
| Total | 25 | - |

TABLA 11

Configuración del programa utilizado en el termociclador para cada fragmento de cada polimorfismo

| Polimorfismo | Ciclos | Perfil térmico | Tiempo | Temperatura (°C) |
|--------------|--------|---------------------------|--------|------------------|
| A3813G | 1 | Desnaturalización inicial | 3 min | 95 |
| | 35 | Desnaturalización | 30 s | 95 |
| | 35 | Alineamiento | 30 s | 58 |
| | 35 | Extensión | 30 s | 72 |
| | 1 | Extensión final | 10 min | 72 |
| A4895G | 1 | Desnaturalización inicial | 3 min | 95 |
| | 35 | Desnaturalización | 30 s | 95 |
| | 35 | Alineamiento | 30 s | 58 |
| | 35 | Extensión | 30 s | 72 |
| | 1 | Extensión final | 10 min | 72 |

TABLA 12

Secuencia de primers utilizados

| Polimorfismo | Primers | Referencia |
|--------------|--|------------|
| A3813G | 5'-GATGAAGGCTCAGGGTGCTAGAGG 5'-TAGTGCTGTCAGCCCCATTGTCCC | 63 |
| A4895G | 5'-GAGACCACCCATATCATGCACACA 5'-AACTCTGATCCCCAGTAGGCCTAG | 63 |

Electroforesis en gel de agarosa. Se colocó la muestra, la cual contiene el buffer de carga y un colorante en uno de los pocillos del gel, cuya concentración se ajustó al 2%⁹⁷ y se aplicaron 120 voltios durante 30 minutos, posteriormente se visualizó el ADN utilizando un transiluminador con luz ultravioleta, y se fotodocumentaron las bandas obtenidas.

Digestión enzimática⁹⁸. Se preparó la mezcla de reacción para la digestión del ADN generado en la PCR colocando: agua estéril libre de DNAsas, buffer, producto de la PCR, enzima de restricción y un control negativo, el cual no contenía ADN. Se incubaron los tubos de reacción por 16 horas a 37 °C. La preparación de la digestión se muestra en la **Tabla 13**.

TABLA 13

Elementos y cantidades de la mezcla de reacción para la digestión enzimática

| Elemento de la mezcla de reacción | Cantidad (µL) |
|-----------------------------------|---------------|
| Agua estéril | 1.5 |
| Buffer | 1.5 |
| ADN producto de PCR | 10 |
| Enzima | 0.5 |
| Total | 13.5 |

Análisis de polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción. El análisis de los fragmentos generados se realizó a través de una electroforesis en gel de agarosa (3 – 5 %). Las bandas esperadas, así como la enzima utilizada para la digestión se describen en la **Tabla 14**.

TABLA 14

Bandas esperadas para cada polimorfismo y la enzima empleada en la digestión

| Polimorfismo | Enzima | Bandas esperadas (pb) |
|--------------|--------------|---|
| A3813G | <i>Hinfl</i> | A: 233 + 144 G: 347 A/G: 233, 144 + 347 |
| A4895G | <i>FokI</i> | G: 271 + 75 A: 346 A/G: 271, 75 + 346 |

2.4.9 Análisis estadístico

La determinación de frecuencias alélicas se realizó por conteo directo. Las frecuencias genotípicas esperadas se calcularon por el método Hardy-Weinberg, la prueba de bondad de ajuste ji cuadrada (χ^2), *t*-student, ANOVA y Tukey o Duncan como análisis *post-hoc*. La asociación de los polimorfismos con la variación en la percepción del dolor se observó a través de pruebas *t*-student y una regresión logística ajustada.

2.4.10 Estudio clínico doble ciego controlado por placebo

Para el estudio clínico se involucraron un total de 14 sujetos, de los cuales 7 poseían el genotipo A/A y 7 el genotipo A/G del polimorfismo A3813G. A cada

uno de los sujetos se les asignó dos días distintos para llevar a cabo el ensayo, el cual consistió en la administración de 1 g de paracetamol o placebo de manera separada; con la finalidad de evitar un sesgo en los resultados, la persona encargada de la administración y asignación de las cápsulas a ingerir sólo contaba con números de folio asignados a cada tipo: paracetamol (A) y placebo (B). La descripción gráfica del procedimiento del estudio clínico se muestra en la

Figura 11.

La administración del fármaco o el placebo se realizó en $t = 0$ en todas las ocasiones, cada prueba CPT fue realizada por triplicado, con un tiempo de 1 min de descanso entre cada una.

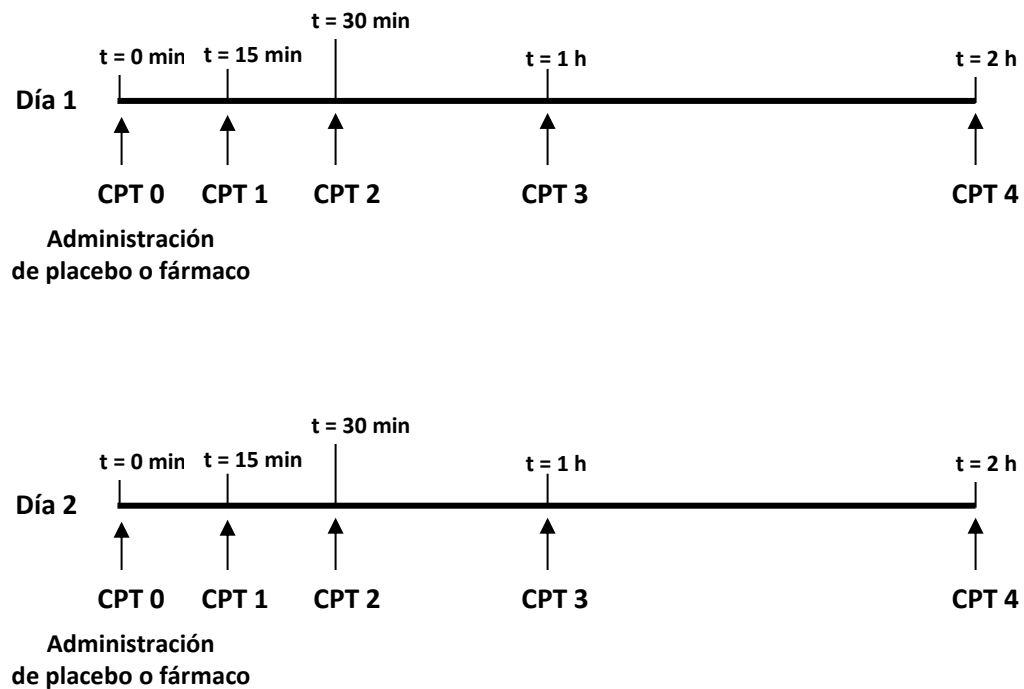


Figura 11. Representación del procedimiento llevado a cabo durante el estudio clínico

2.4.11 Estudio del efecto genotípico del polimorfismo A3813G sobre la funcionalidad terapéutica del paracetamol

El análisis del efecto de los genotipos del polimorfismo A3813G sobre la funcionalidad del efecto terapéutico del paracetamol se analizó por medio de pruebas *t*-student.

CAPÍTULO 3

RESULTADOS

3.1 Caracterización de la muestra

Se reclutaron 200 individuos de los cuales un 58 % correspondieron al sexo femenino y 42 % al sexo masculino. El rango de edades se encontró entre 18 y 26 años. En la **Tabla 15**. Se muestran datos generales de la población estudiada.

TABLA 15

Datos generales de la población estudiada

| Variable | $\bar{x} \pm s$ |
|--------------------------|-------------------|
| Edad (años) | 18.36 \pm 1.28 |
| Peso (Kg) | 68.17 \pm 18.08 |
| Estatura (m) | 1.66 \pm 0.09 |
| IMC (kg/m ²) | 24.37 \pm 5.79 |

3.2 Análisis bioquímico

En la **Tabla 16** se describe la estadística descriptiva (valores mínimos, máximos, \bar{x} , s y errores estándar (SE_x) de los resultados obtenidos del análisis

bioquímico de las muestras de sangre periférica, así como sus valores de referencia, los cuales han sido proveídos por el laboratorio.

TABLA 16

Estadística descriptiva de los resultados del análisis bioquímico

| Parámetro (mg / dL) | Min | Max | $\bar{x} \pm s$ | SE _x | Referencia (mg / dL) |
|---------------------|-------|--------|-----------------|-----------------|----------------------|
| CT | 95.00 | 254.00 | 159.61 ± 30.92 | 2.27 | 140 – 200 |
| HDL | 25.00 | 111.00 | 57.37 ± 15.75 | 1.16 | 30 – 70 |
| LDL | 23.00 | 168.00 | 86.95 ± 28.95 | 2.13 | < 150 |
| TG | 30.00 | 927.00 | 87.63 ± 73.06 | 5.36 | < 150 |
| VLDL | 6.00 | 62.00 | 16.68 ± 8.423 | 0.619 | 6 - 30 |
| Índice aterogénico | 0.300 | 4.50 | 1.64 ± 0.79 | 0.05 | 1.0 – 3.2 |
| CT / HDL | 1.50 | 6.60 | 2.94 ± 0.91 | 0.06 | < 4.4 |

3.3 Determinación de frecuencias alélicas y genotípicas

Se extrajeron y purificaron 200 muestras de ADN, la presencia de ADN genómico se comprobó por electroforesis en gel de agarosa al 1 % (**Figura 12.**). La banda correspondiente a ADN genómico pudo ser observada en las 200 muestras.

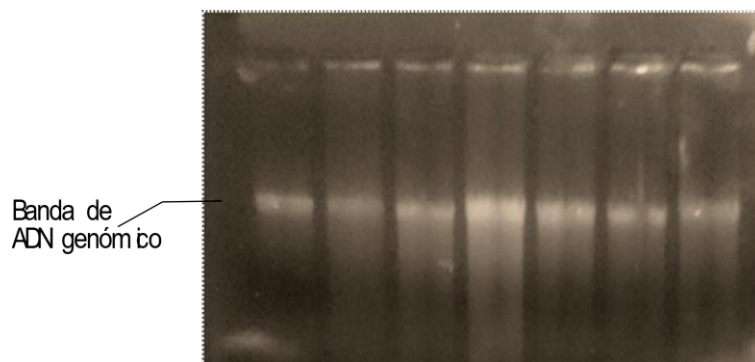


Figura 12. Banda correspondiente a ADN genómico

3.3.1 Polimorfismo A4895G

La amplificación de este polimorfismo resulta en una banda de 346 pb, la cual fue observada por electroforesis en gel de agarosa al 2 % (véase **Figura 13.**). El resultado del corte enzimático aparece en la **Figura 14**, la banda de 75 pb aparece al tener bandas de 346 pb y 271 pb, pero en algunos casos es difícil de apreciar debido a su corta longitud.

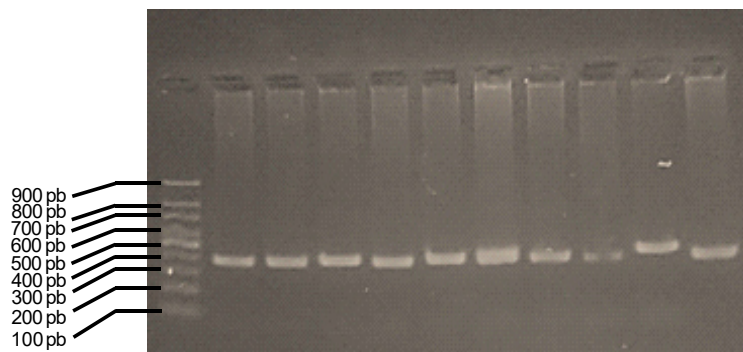


Figura 13. Amplificación del fragmento de 346 pb para el polimorfismo A4895G

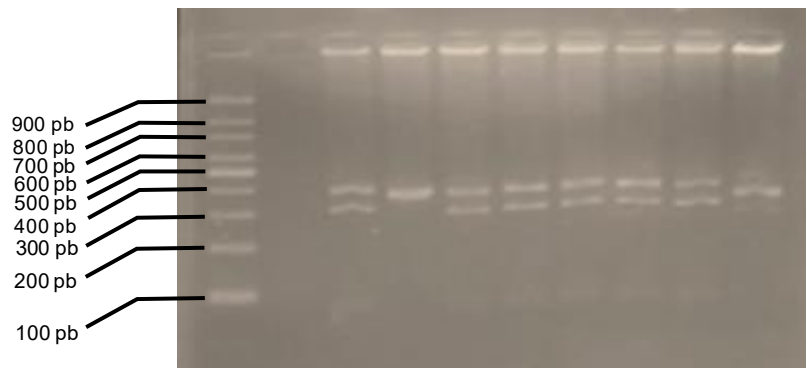


Figura 14. Digestión del fragmento con *FokI*

3.3.2 Polimorfismo A3813G

La amplificación de este polimorfismo resulta en una banda de 347 pb, la cual fue apreciada en electroforesis de gel de agarosa al 2 % (véase **Figura 15.**).

El resultado del corte enzimático del fragmento aparece en la **Figura 16.**

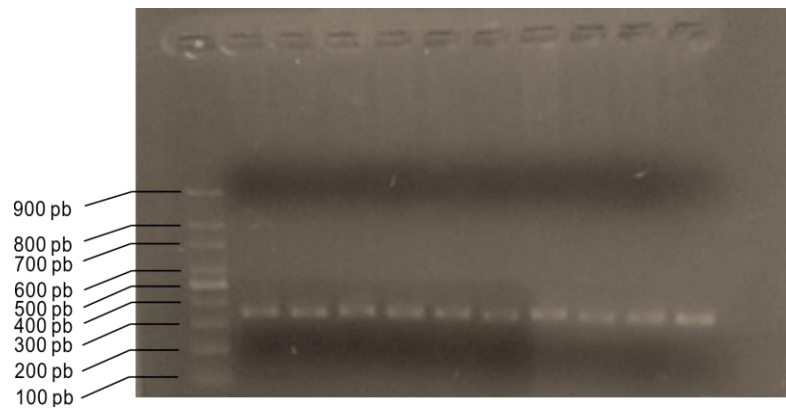


Figura 15. Amplificación del fragmento de 347 pb correspondiente al polimorfismo A3813G

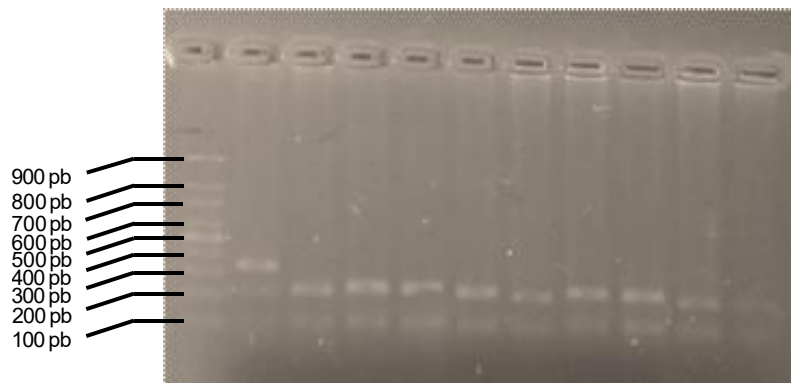


Figura 16. Digestión del fragmento con *HinfI*

3.3.3 Frecuencia alélica, genotípica y prueba de bondad de ajuste

La frecuencia alélica para cada polimorfismo, así como la frecuencia genotípica y el resultado de la prueba de bondad de ajuste se muestran en la **Tabla 17**.

TABLA 17

Análisis de la frecuencia alélica, genotípica y prueba de bondad de ajuste del número de muestra estudiada

| Polimorfismo | Número de muestra | Frecuencia alélica | | Frecuencia genotípica | | | Prueba de bondad de ajuste | Conclusión |
|--------------|-------------------|--------------------|------|-----------------------|-----|----|----------------------------|--|
| | N | A | G | AA | AG | GG | X ² | |
| A4895G | 158 | 0.59 | 0.41 | 38 | 111 | 9 | 32.57 | No se encuentra en equilibrio de HW ($x^2 \geq 3.841$, $p < 0.05$). |
| A3813G | 200 | 0.93 | 0.07 | 173 | 26 | 1 | 0.0004 | Se encuentra en equilibrio de HW ($x^2 \leq 3.841$, $p > 0.05$). |

*HW (Hardey-Weinberg)

3.4 Valoración del estado de ánimo a través de la encuesta EVEA

Los resultados de la EVEA de los 74 sujetos de estudio se muestran en la **Figura 17**, dicha encuesta se aplicó antes de la ejecución de la prueba CPT con el fin de evaluar el estado de ánimo de cada sujeto al momento de realizar la prueba de resistencia al frío. En esta figura se observa que el estado de ánimo predominante fue la alegría (\bar{x} : 5.22, s: 2.09) y el menos predominante fue la Hostilidad (\bar{x} : 2.53, s: 2.41).

En la **Tabla 18** se muestra la estadística descriptiva correspondiente a los resultados de la encuesta EVEA. Para determinar si existía una diferencia significativa entre las medias resultantes de los cuatro estados de ánimo se realizó un ANOVA de un solo factor.

Los resultados del ANOVA indicaron que las medias son diferentes entre sí ($p < 0.001$) y la prueba de Tukey determinó que la media correspondiente a la alegría es diferente, a todas las demás ($p < 0.004$ en todos los casos) al igual que la correspondiente a la ansiedad ($p < 0.012$ en todos los casos); sin embargo, las medias de depresión y hostilidad no son diferentes entre sí ($p > 0.05$). El ANOVA se muestra en la **Tabla 19** y las pruebas simultáneas de Tukey para diferencias de las medias aparecen en la **Tabla 20**.

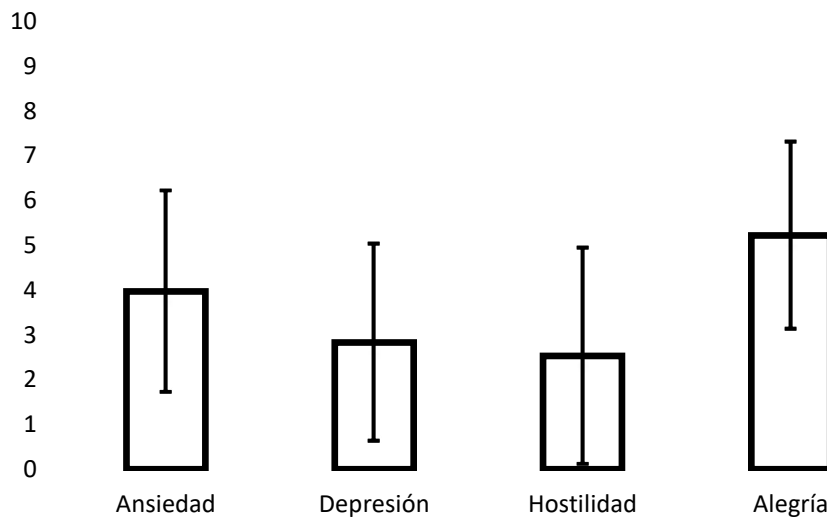


Figura 17. Resultados de la encuesta de valoración del estado de ánimo (escala del 1 "nulo" al 10 "elevado")

TABLA 18

Estadística descriptiva de los datos de la encuesta EVEA

| Estado de ánimo | N | Min | Máx | $\bar{x} \pm s$ |
|-----------------|----|------|-----|-----------------|
| Ansiedad | 74 | 0 | 10 | 3.97 \pm 2.25 |
| Depresión | | 0 | 9.5 | 2.83 \pm 2.20 |
| Hostilidad | | 0 | 9.5 | 2.53 \pm 2.41 |
| Alegría | | 1.25 | 10 | 5.22 \pm 2.09 |

TABLA 19

Análisis de varianza de las medias correspondientes a los cuatro estados de ánimo

| Fuente | GL | SC. Ajust. | MC Ajust. | Valor F | Valor p |
|--------|-----|------------|-----------|---------|---------|
| Factor | 3 | 330.4 | 110.132 | 21.84 | < 0.001 |
| Error | 292 | 1472.5 | 5.043 | | |
| Total | 195 | 1802.9 | | | |

TABLA 20

Pruebas simultáneas de Tukey para diferencias de las medias

| Diferencia de niveles | Diferencia de las medias | EE de diferencia | Valor t | Valor p ajustado |
|------------------------|--------------------------|------------------|---------|------------------|
| Depresión - Ansiedad | -1.131 | 0.369 | -3.06 | 0.012 |
| Hostilidad - Ansiedad | -1.431 | 0.369 | -3.88 | 0.001 |
| Alegría - Ansiedad | 1.252 | 0.369 | -3.39 | 0.004 |
| Hostilidad - Depresión | -0.300 | 0.369 | -0.81 | 0.848 |
| Alegría - Depresión | 2.383 | 0.369 | 6.45 | < 0.001 |
| Alegría - Hostilidad | 2.683 | 0.369 | 7.27 | < 0.001 |

3.5 Prueba CPT de resistencia al frío

Los valores de la media y la desviación estándar resultantes en la prueba CPT del umbral, tolerancia y la escala VAS se describen en la **Tabla 21**. El total de sujetos involucrados fue de 74. El análisis de acuerdo al género reveló que no

existe diferencia significativa en los valores percibidos de dolor entre hombres (n = 30) ni mujeres (n = 44) ($p > 0.05$), estos resultados se muestran en la **Tabla 22**.

TABLA 21

$\bar{x} \pm s$ del umbral, tolerancia y la escala VAS obtenidos durante la prueba CPT

| Variable | $\bar{x} \pm s$ de la muestra |
|----------------|-------------------------------|
| Umbral (s) | 44.9 \pm 49.1 |
| Tolerancia (s) | 104.2 \pm 77.6 |
| VAS | 7.9 \pm 1.8 |

TABLA 22

Análisis del dolor inducido de acuerdo al género

| Variable | Género | | Valor p |
|-----------------------|------------------------------|-----------------------------|-----------|
| | Masculino $\bar{x} \pm s$ | Femenino $\bar{x} \pm s$ | |
| Umbral (s) | 45.72 \pm 50.27 | 49.49 \pm 55.29 | 0.766 |
| Tolerancia (s) | 100.45 \pm 68.448 | 131.88 \pm 119.74 | 0.078 |
| VAS | 66.33 \pm 22.28 | 64.25 \pm 24.68 | 0.707 |

3.6 Relación del polimorfismo A3813G con el dolor

La relación del polimorfismo A3813G con el umbral, tolerancia y la escala VAS del dolor se analizó a través de la prueba t -student. El genotipo GG no fue considerado para el análisis debido a su baja prevalencia. Los resultados se muestran en la **Tabla 23**. Los resultados de la prueba t -student indican que no existe diferencia significativa observable ($p > 0.05$) entre los grupos A/A y A/G para cada parámetro.

TABLA 23

Resultados para el umbral, la tolerancia y la escala VAS

| Parámetro | Grupos $\bar{x} \pm s$ | | Estadístico de prueba |
|------------|---------------------------|-------------|-----------------------|
| | A/A | A/G | Valor <i>p</i> |
| Umbral | 42.24 ± 47.25 | 62.8 ± 63.7 | 0.096 |
| Tolerancia | 104.5 ± 79.4 | 165 ± 148 | 0.138 |
| VAS | 7.98 ± 1.78 | 7.35 ± 2.24 | 0.306 |

3.7 Relación del polimorfismo A3813G con los parámetros bioquímicos analizados

Se realizó una *t*-student para analizar si existían diferencias significativas entre las medias de los genotipos para cada parámetro bioquímico, los resultados son mostrados en la **Tabla 24**.

Se observa que las diferencias entre las medias de los genotipos para los parámetros: HDL, TG y VLDL son significativas ($p < 0.05$).

TABLA 24

Resultados de la *t*-student entre las medias de los genotipos A/A y A/G obtenidas del análisis bioquímico

| Parámetro | Grupos $\bar{x} \pm s$ | | Estadístico de prueba |
|--------------------|---------------------------|---------------|-----------------------|
| | A/A | A/G | <i>p</i> |
| CT | 161.1 ± 30.8 | 150.9 ± 29.7 | 0.134 |
| HDL | 57.94 ± 16.397 | 53.30 ± 9.99 | 0.033 |
| LDL | 86.83 ± 29.23 | 84.13 ± 25.85 | 0.648 |
| TG | 85.26 ± 39.69 | 67.13 ± 30.13 | 0.007 |
| VLDL | 17.13 ± 8.64 | 13.43 ± 6.03 | 0.007 |
| Índice aterogénico | 1.65 ± 0.81 | 1.63 ± 0.633 | 0.896 |
| CT / HDL | 2.95 ± 0.94 | 2.9 ± 0.70 | 0.751 |

3.8 Regresión logística ajustada

La regresión logística se aplicó para conocer el impacto de los polimorfismos y las covariables del estado de ánimo (ansiedad, depresión, hostilidad y alegría) en los parámetros analizados del dolor; Los valores p para las variables empleadas en el modelo se muestran en la **Tabla 25** para el polimorfismo A3813G y en la **Tabla 26** para el polimorfismo A4895G. Estos resultados indican que los factores no tienen una relación significativa con los parámetros estudiados del dolor ($p > 0.05$).

TABLA 25

Valores p obtenidos de la regresión logística para el polimorfismo A3813G

| Factores | Valor p | | |
|------------|-----------|------------|-------|
| | Umbral | Tolerancia | VAS |
| Ansiedad | 0.120 | 0.069 | 0.224 |
| Depresión | 0.059 | 0.471 | 0.192 |
| Hostilidad | 0.069 | 0.142 | 0.259 |
| Alegría | 0.220 | 0.356 | 0.233 |
| A3813G | 0.182 | 0.520 | 0.245 |

TABLA 26

Valores p obtenidos de la regresión logística para el polimorfismo A3813G

| Factores | Valor p | | |
|------------|-----------|------------|-------|
| | Umbral | Tolerancia | VAS |
| Ansiedad | 0.065 | 0.072 | 0.054 |
| Depresión | 0.438 | 0.911 | 0.765 |
| Hostilidad | 0.050 | 0.331 | 0.480 |
| Alegría | 0.444 | 0.530 | 0.353 |
| A4895G | 0.291 | 0.454 | 0.285 |

3.9 Resultados del estudio clínico

En el estudio clínico fueron tomados en cuenta un total de 14 sujetos, 7 de los cuales poseían el genotipo A/A y 7 el genotipo A/G del polimorfismo A3813G. Los resultados obtenidos en este ensayo clínico se muestran en la **Tabla 27** y sus representaciones gráficas aparecen en la **Figura 18** (paracetamol) y **Figura 19** (placebo). La diferencia del umbral entre ambos genotipos (35.23 y 30.00 de A/A y A/G, respectivamente) es significativa en la prueba CPT realizada a los 15 minutos ($p < 0.05$).

TABLA 27

Resultados del ensayo clínico

| Variable | T (min) | Paracetamol | | | Placebo | | |
|------------|---------|------------------------|------------------------|------|------------------------|------------------------|-------------|
| | | A/A $\bar{x} \pm s$ | A/G $\bar{x} \pm s$ | p | A/A $\bar{x} \pm s$ | A/G $\bar{x} \pm s$ | p |
| Umbral | 0 | 20.11 ± 18.41 | 24.01 ± 15.25 | 0.66 | 20.2 ± 25.68 | 17.9 ± 4.54 | 0.82 |
| | 15 | 35.23 ± 41.65 | 30.00 ± 19.64 | 0.76 | 17.1 ± 9.63 | 35 ± 18.86 | 0.03 |
| | 30 | 34.26 ± 29.53 | 41.61 ± 34.32 | 0.65 | 29.2 ± 40.10 | 50.5 ± 41.56 | 0.32 |
| | 60 | 30.70 ± 24.90 | 36.69 ± 32.31 | 0.68 | 28 ± 38.17 | 28.4 ± 14.02 | 0.98 |
| | 120 | 31.66 ± 21.17 | 28.59 ± 22.43 | 0.81 | 30.8 ± 43.57 | 28.4 ± 19.35 | 0.89 |
| Tolerancia | 0 | 38.07 ± 27.24 | 55.29 ± 30.54 | 0.25 | 39.9 ± 46.77 | 50.2 ± 40.83 | 0.65 |
| | 15 | 54.71 ± 44.09 | 76.68 ± 52.53 | 0.38 | 40.8 ± 27.06 | 72.9 ± 45.18 | 0.09 |
| | 30 | 62.88 ± 44.85 | 74.56 ± 44.03 | 0.61 | 46 ± 48.34 | 68.6 ± 38.76 | 0.33 |
| | 60 | 62.83 ± 43.83 | 78.92 ± 50.34 | 0.51 | 45.3 ± 43.32 | 63.3 ± 40.95 | 0.41 |
| | 120 | 57.77 ± 46.56 | 70.26 ± 56.80 | 0.64 | 45.9 ± 48.03 | 62.6 ± 41.18 | 0.48 |
| VAS | 0 | 7.46 ± 1.42 | 6.86 ± 1.41 | 0.41 | 7.6 ± 1.00 | 7.5 ± 0.74 | 0.8 |
| | 15 | 7.50 ± 1.47 | 6.29 ± 1.53 | 0.13 | 7.6 ± 1.14 | 7.4 ± 1.10 | 0.71 |
| | 30 | 6.89 ± 1.75 | 6.48 ± 1.89 | 0.66 | 7.2 ± 1.80 | 7.2 ± 0.96 | 0.94 |
| | 60 | 6.89 ± 1.94 | 6.14 ± 2.26 | 0.49 | 7.4 ± 1.71 | 7 ± 1.14 | 0.6 |
| | 120 | 7.07 ± 1.95 | 6.52 ± 1.70 | 0.56 | 7.4 ± 1.83 | 6.9 ± 1.34 | 0.58 |

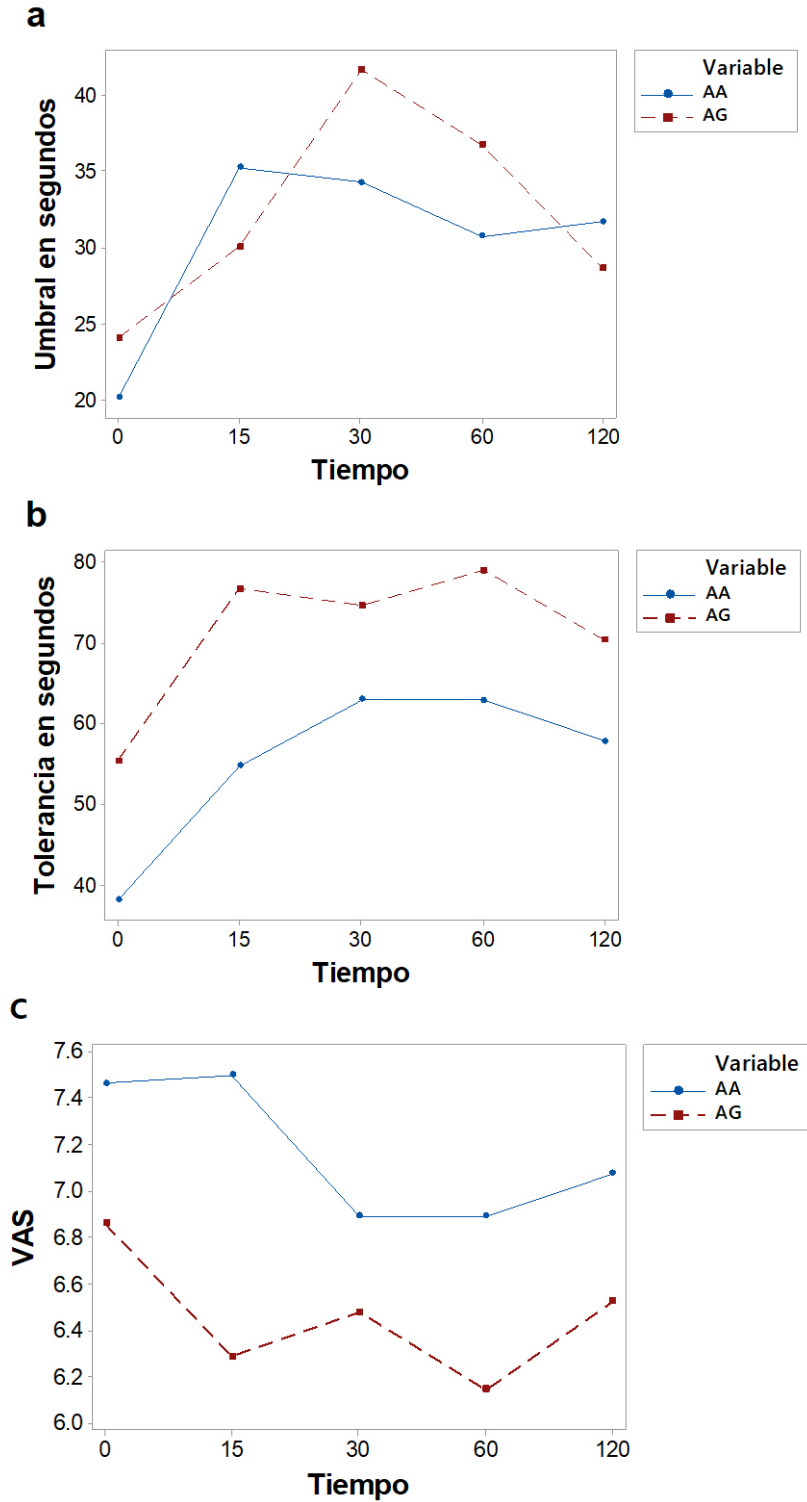


Figura 18. Representación gráfica del (a) Umbral, (b) la Tolerancia y (c) VAS registrados luego de la administración de paracetamol para los genotipos A/A y A/G.

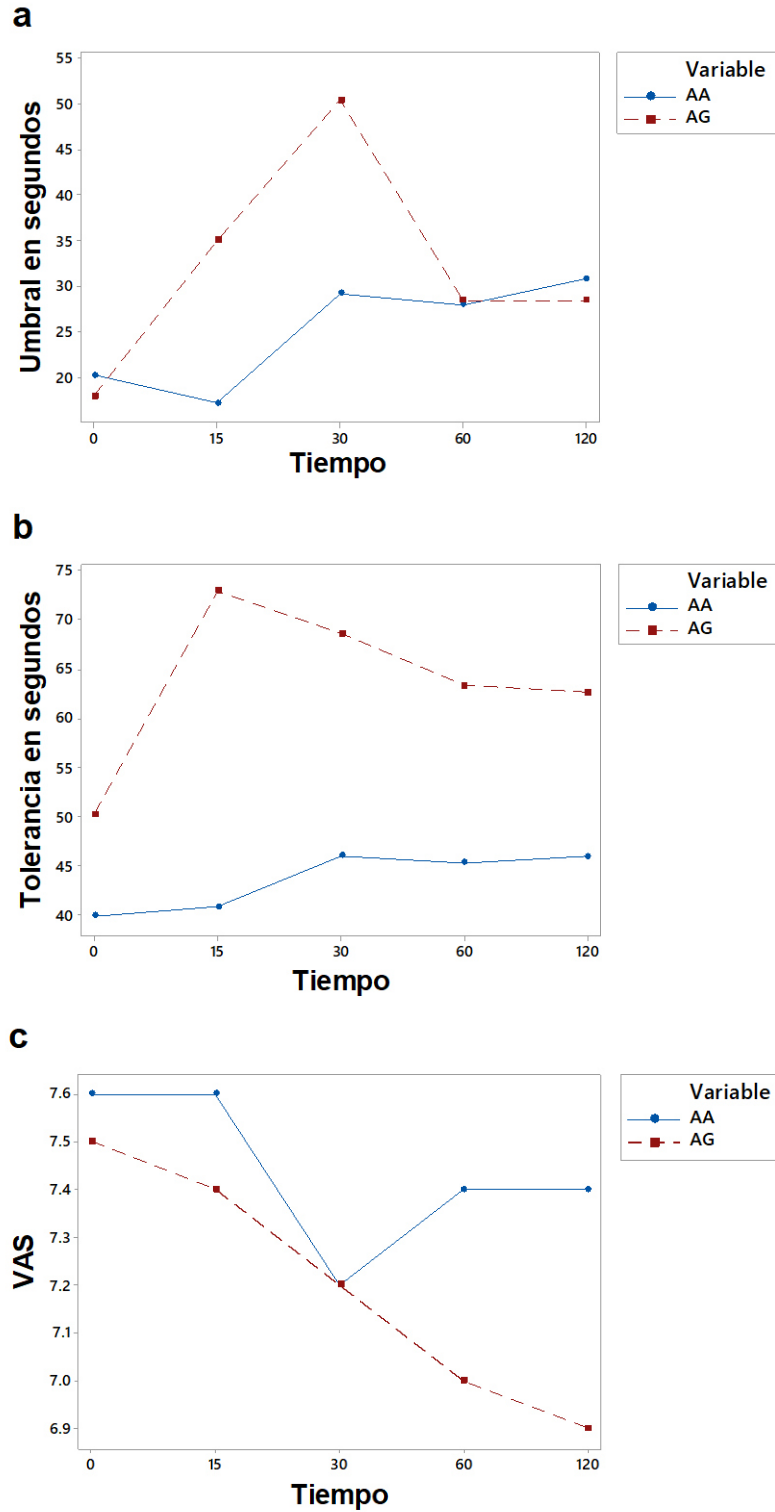


Figura 19. Representación gráfica del (a) Umbral, (b) la Tolerancia y (c) VAS registrados luego de la administración de placebo para los genotipos A/A y A/G.

CAPÍTULO 4

DISCUSIÓN

A través de este proyecto de investigación se estudió la relación de dos polimorfismos del gen *CNR1* que codifica para el receptor CB1 (A3813G y A4895G) con el dolor y sus posibles implicaciones en el requerimiento de analgésicos de una población del noreste de México.

Se encontró que el polimorfismo A4895G muestra una desviación significativa del equilibrio de Hardy - Weinberg por lo cual fue excluido en los análisis posteriores; la frecuencia del alelo G del polimorfismo A3813G resultó de 0.07 y de 0.93 para el alelo A, este resultado coincide con los publicados por Ho y colaboradores (2011), donde reportan que la frecuencia del alelo G de 0.077 en una población caucásica⁹⁹, además, Krebs y colaboradores (2011) reportan una frecuencia para del alelo G de 0.1¹⁰⁰ en una población de origen caucásico. Russo y colaboradores (2007) realizaron el estudio de dos poblaciones europeas independientes y encontraron una frecuencia para el alelo A de 0.89 y 0.90 y para el alelo G de 0.1 y 0.11 respectivamente¹⁰¹. Jaeger y colaboradores (2008) encontraron que la frecuencia del alelo G para este polimorfismo es de 0.11 y para el alelo A es de 0.89¹⁰².

Los resultados indican una frecuencia similar a la población caucásica, pero se puede observar una reducción del 30 % en la frecuencia del alelo G en la población estudiada en comparación con la población europea.

La prueba de dolor (CPT) nos permitió analizar tres parámetros relevantes relacionados a la nocicepción en cada voluntario: el umbral, que es la mínima sensación de dolor que un sujeto es capaz de identificar a partir de un estímulo, la tolerancia, que es máxima cantidad de dolor que un sujeto es capaz de soportar y la percepción, que es el grado de dolor que un sujeto piensa experimentar de acuerdo a experiencias previas. Estos parámetros varían de individuo a individuo dependiendo de factores genéticos y sociales¹⁰³.

Una cantidad considerable de estudios que llevan a cabo el análisis de estos parámetros a partir de la misma metodología han sido publicados; sin embargo, es difícil realizar una comparación de sus resultados con los obtenidos en este proyecto de investigación, debido a las diferentes variables empleadas, tanto en el protocolo de la prueba CPT así como en la selección de sujetos de estudio, puesto que a partir de los resultados se sabe que el género¹⁰⁴, la concentración de estrógeno en la sangre¹⁰⁵, el consumo de alimentos¹⁰⁶, la altura en mujeres¹⁰⁷, edad¹⁰⁸ y la calidad de sueño¹⁰⁹, entre otros, son factores que afectan los resultados de la prueba de manera significativa.

A diferencia de lo reportado en la literatura, los resultados obtenidos en esta investigación indican que no existen diferencias significativas entre los valores de dolor inducido en hombres y mujeres, por lo que se podría determinar que ambos poseen valores similares de umbral, tolerancia y percepción. Investigaciones previas han encontrado que el género masculino posee valores de umbral y tolerancia mayores a los del género femenino¹⁰⁴, debido a diversas razones, entre ellas la motivación o represión del dolor debido a una influencia socio – cultural y psicológica, por otra parte, la cantidad de dolor percibido en el género femenino se ve alterado de acuerdo a las concentraciones de estrógeno en la sangre; sin embargo, este dato no fue considerado para este estudio y no es posible determinar su efecto sobre los resultados obtenidos.

Uno de los motivos por los cuales no se ha encontrado una diferencia significativa en los valores reportados por ambos géneros es que previo al estudio se mencionó la importancia del reporte correcto de los parámetros requeridos del dolor, eliminando así la variable de presión socio - cultural y evitando el posible sesgo de los datos.

Los resultados de la prueba *t*-student sugieren que no existe una diferencia significativa ($p > 0.05$) entre las medias de los genotipos AA y AG para cada parámetro del dolor, probablemente debido a que este fenómeno se encuentra

regulado por diversos genes en diferentes alelos a través de distintos loci y sus combinaciones; en muchas ocasiones su efecto individual es débil¹¹⁰.

Estos resultados no implican que el gen *CNR1* no interviene en la nocicepción, puesto que los estudios acerca del tema son limitados⁹⁹. Se ha demostrado que varios de los SNP's presentes en el gen *CNR1* se encuentran en desequilibrio de ligamiento (LD, por sus siglas en inglés), entre ellos los SNP's A4895G, A3813G y G1359A, lo cual indica que son heredados juntos con mayor frecuencia, sugiriendo un efecto sinérgico¹¹¹.

En la encuesta EVEA se obtuvieron resultados que indican que los sujetos presentaban alegría como el estado de ánimo predominante, con una media superior a 5. Estos datos corroboran la idea de que los estados positivos son frecuentes y característicos de las personas normales, tal como ha sido mencionado en la literatura¹¹². La ansiedad tuvo el segundo resultado más alto, lo cual se debió muy probablemente a que los voluntarios se encontraban a punto de realizar una prueba en donde experimentarían un dolor controlado, tal y como se les explicó al momento de su llegada al laboratorio, incrementando como consecuencia los valores de ansiedad. Tanto la depresión y la hostilidad fueron aquellos estados de ánimo con las medias más bajas, obteniendo la depresión un valor ligeramente mayor a la hostilidad, pero sin llegar a ser una diferencia significativa ($p > 0.05$), indicando una probable relación entre ambos estados de ánimo, dando lugar a emociones complejas¹¹³.

En la regresión lineal ajustada, se observó que ni las covariables ni el polimorfismo tienen un impacto significativo en la percepción de dolor, en contraste con la evidencia existente, la cual establece que el estado de ánimo de una persona altera la forma en la que el dolor es percibido, y el estado de ánimo de los individuos se ve modificado de igual forma por factores ambientales, genéticos y sociales.

Es probable que la diferencia de la frecuencia del alelo G entre la población estudiada y la población europea no explique la diferencia en la percepción del dolor entre las mismas; sin embargo, esta podría explicar el riesgo de padecer otras afecciones relacionadas al SNC, ya que este ha sido asociado a la reducción de la materia blanca en el SNC y el incremento del riesgo de padecer esquizofrenia⁹⁹.

En el ensayo clínico no se observaron diferencias significativas ($p > 0.05$) en el umbral, la tolerancia y VAS del dolor luego de la administración de paracetamol a sujetos con los genotipos A/A y A/G del polimorfismo A3813G, esto confirma los resultados previamente obtenidos, en donde no se ha encontrado una asociación entre este SNP y el dolor, además, estos mismos resultados se obtienen en la regresión lineal ajustada, en donde ninguna de las covariables, incluyendo el polimorfismo, presentan una asociación significativa ($p > 0.05$, en todos los casos).

Luego de la administración del placebo existe una diferencia significativa ($p < 0.05$) en los valores de tolerancia obtenidos en la prueba CPT realizada a los 15 minutos, pero al observar las representaciones gráficas correspondientes al umbral, es posible observar que esta diferencia significativa ha resultado debido a factores externos que no han sido cuantificados en este estudio, puesto que no es posible observar una línea de tendencia definida, como lo es posible con las representaciones gráficas de los valores resultantes de la administración del analgésico, en donde incluso la línea de tendencia observada es equiparable con las características farmacocinéticas de este fármaco, el cual genera su efecto en los primeros 40 minutos, con un efecto máximo luego de 1 hora de administración, el cual se prolonga durante 4 – 6 horas¹¹⁴.

Otros grupos de investigación han estudiado el efecto placebo sobre la percepción de la intensidad del dolor, estos lo han relacionado a la diferencia entre los resultados de dolor anticipado vs dolor percibido reportado por cada sujeto, lo cual ha sido asociado a la activación del núcleo accumbens y el sistema dopaminérgico en esta región¹¹⁵.

De acuerdo a la prueba *t*-student realizada a los parámetros bioquímicos se observa que existe una clara asociación entre el polimorfismo A3813G y los valores elevados de colesterol HDL ($p = 0.033$), triglicéridos ($p = 0.007$) y VLDL ($p = 0.007$).

El genotipo homocigoto A/A se asocia con mayores valores de colesterol HDL (57.94 vs 53.30 mg / dL) mientras que el genotipo heterocigoto A/G se asocia con menores valores de triglicéridos (67.13 vs 85.26 mg / dL) y VLDL (13.43 vs 17.13 mg / dL); el alelo G ha sido previamente relacionado al aumento del espesor del pliegue cutáneo subescapular y el incremento en la circunferencia de la cintura⁸³, así como con un alto depósito de grasa androide⁸², lo cual concuerda con nuestros resultados.

A pesar de la poca evidencia existente de las variantes polimórficas del gen *CNR1* y su relación con los fenotipos específicos del dolor¹¹⁶, este ha sido reportado como uno de los más importantes en la regulación del padecimiento doloroso, en este caso, la falta de significancia se debe posiblemente a las limitaciones del estudio, ya que no se ha podido comprobar el mecanismo por el cual los SNP's considerados intervienen en este complejo proceso fisiológico y sus interacciones con otros elementos funcionales del sistema endocannabinoide.

La presencia de SNP's en la región 3'UTR podrían ocasionar una modificación en la expresión del receptor CB1, como resultado de la alteración de la secuencia de anclaje a miRNA's, modificación de señales de poliadenilación o disminución de la eficiencia de traducción, lo cual ocasiona una disminución de la regulación de su expresión y por tanto un incremento en la concentración del receptor CB1 en la membrana^{117, 118, 119}.

Chiarlone y colaboradores demostraron a través de varios sistemas *in vitro* e *in vivo* que la señalización de la activación del receptor CB1 se ve alterada por el miRNA let-7d, así como miR-124, el cual se encuentra ligado al sistema opioide; sin embargo, este cambio en la señalización ocurre debido a su efecto sobre el mRNA que codifica las proteínas que regulan su expresión, en vez de afectar directamente el mRNA que codifica para el receptor en sí¹²⁰.

CAPÍTULO 5

CONCLUSIONES

El cálculo de equilibrio de Hardy – Weinberg y X^2 determinaron que el polimorfismo A4895G no se encontraba en equilibrio, por otro lado, el polimorfismo A3813G sí. La frecuencia alélica del polimorfismo A3813G resultó ser de 0.93 para el alelo A y 0.07 para el alelo G y su frecuencia genotípica resultó de 173 para el genotipo A/A, 26 para el genotipo A/G y 1 para el genotipo G/G.

La prueba *t*-student realizada entre los genotipos A/A y A/G del polimorfismo A3813G determinó que no existe una diferencia significativa entre los mismos para los parámetros estudiados del dolor (tolerancia, umbral y VAS), además se encontró que el género no tiene una relación significativa con ninguno de los parámetros del dolor.

La prueba *t*-student realizada entre los genotipos A/A y A/G del polimorfismo A3813G determinó que este polimorfismo se encuentra asociado a los valores de: HDL, triglicéridos y VLDL, con una significancia del 5 %, de acuerdo a los resultados obtenidos del análisis bioquímico.

El análisis de la encuesta EVEA mostró que los voluntarios poseían un grado elevado de alegría al momento de realizar la prueba CPT, seguido de la ansiedad y finalmente la hostilidad y la depresión.

La regresión lineal ajustada para el polimorfismo A4895G no mostró una relación significativa entre este, los diversos estados de ánimo y los parámetros estudiados del dolor; los mismos resultados fueron obtenidos para el polimorfismo A3813G.

El estudio clínico demostró que no existe una alteración significativa del efecto terapéutico del paracetamol asociado al polimorfismo A3813G.

CAPÍTULO 6

PERSPECTIVAS

Es imprescindible continuar con el estudio de los polimorfismos que conforman el gen *CNR1* y aquellos genes que participan en este proceso fisiológico; en estudios posteriores es necesario el uso de herramientas de medición del dolor y del estado de ánimo con un mayor nivel de confiabilidad y el empleo de técnicas que permitan observar cambios a nivel molecular los cambios en la función, estabilidad y especificidad que ocurren en los elementos del sistema endocannabinoide en presencia de variantes polimórficas. Una asociación más clara entre los factores genéticos de este sistema, sus variantes polimórficas y la interacción con factores externos como el estado de ánimo permite el desarrollo de fármacos con mayor potencia, selectividad, menos efectos secundarios e incluso la práctica de la medicina personalizada en el tratamiento de los diversos tipos de dolor.

REFERENCIAS

1. Moayedi M, Davis K. "Theories of pain: from specificity to gate control". *Journal of Neurophysiology* 109 :5-12. (2013).
2. Nicholson, Bruce. "Differential diagnosis: Nociceptive and neuropathic pain". *The American journal of managed care* 12(1): S256-S262. (2006).
3. Brennan F, Carr D, Cousins M. "Pain Management: A Fundamental Human Right". *Anesthesia & Analgesia* 105(1): 205-221. (2007).
4. Surah A, Baranidharan G, Morley S. "Chronic pain and depression". *Continuing Education in Anaesthesia Critical Care & Pain* 14(2): 85-89. (2014).
5. Mohamed Zaki L, Hairi N. "A Systematic Review of the Prevalence and Measurement of Chronic Pain in Asian Adults". *Pain Management Nursing* 16(3): 440-452. (2015).

6. GSK. "The Global Pain Index: an insight into the world of pain". Fecha de acceso: 26 September 2016 (<http://www.gsk.com/en-gb/behind-the-science/patients-and-consumers/the-global-pain-index-an-insight-into-the-world-of-pain/>).
7. Reid K, Harker J, Bala M, Truyers C, Kellen E, Bekkering G, Kleijnen J. "Epidemiology of chronic non-cancer pain in Europe: narrative review of prevalence, pain treatments and pain impact". *Curr Med Res Opin.* 27(2): 449-462. (2011).
8. Dueñas M, Salazar A, Ojeda B, Fernández-Palacín F, Micó J, Torres L, Failde I. "A Nationwide Study of Chronic Pain Prevalence in the General Spanish Population: Identifying Clinical Subgroups Through Cluster Analysis". *Pain Medicine* 16(4): 811-822. (2015).
9. van Hecke O, Torrance N, Smith B. "Chronic pain epidemiology and its clinical relevance". *Br J Anaesth* 111(1): 13-18. (2013).
10. Wiesenfeld-Hallin Z. "Sex differences in pain perception". *Gen Med* 2(3): 137-145. (2005).

11. Elliott A, Smith B, Penny K, Cairns Smith W, Alastair Chambers W. "The epidemiology of chronic pain in the community". *The Lancet* 354(9186): 1248-1252. (1999).
12. Brekke M, Hjortdahl P, Kvien T. "Severity of musculoskeletal pain: relations to socioeconomic inequality". *Social Science & Medicine* 54(2): 221-228. (2002).
13. Breivik H, Collett B, Ventafridda V, Cohen R, Gallacher D. "Survey of chronic pain in Europe: Prevalence, impact on daily life, and treatment". *European Journal of Pain* 10(4): 287-287. (2006).
14. Shaw W, Linton S, Pransky G. "Reducing Sickness Absence from Work due to Low Back Pain: How Well do Intervention Strategies Match Modifiable Risk Factors?". *J Occup Rehabil* 16(4): 591-605. (2006).
15. Ellsberg M, Jansen H, Heise L, Watts C, Garcia-Moreno C. "Intimate partner violence and women's physical and mental health in the WHO multi-country study on women's health and domestic violence: an observational study". *The Lancet* 371(9619): 1165-1172. (2008).

16. Romera, E., Perena, M., Perena, M., & Rodrigo, M. "Neurofisiología del dolor". *Rev. Soc. Esp. Dolor* 7(2): 11-17. (2000).
17. López, U. "Fisiopatología y terapéutica del dolor perioperatorio". *Revista Mexicana De Anestesiología* 31(1): S231 - S234. (2008).
18. Cashman J. "The Mechanisms of Action of NSAIDs in Analgesia". *Drugs* 52(Supplement 5): 13-23. (1996).
19. Villoria, C. "Evaluación y Diagnóstico del Dolor. Reunión de Expertos. In Evaluación y Diagnóstico del Dolor". *Universidad de Salamanca* (p. 153) (2007).
20. Compton, RN, PhD P, Griffis, CRNA, PhD C, Crabb Breen, PhD E, Torrington, MD M, Sadakane, BS R, Tefera, MS E, Irwin, MD M. "Opioid treatment of experimental pain activates nuclear factor-κB". *J Opioid Manag* 11(2): 115. (2015).

21. Trost Z, Strachan E, Sullivan M, Vervoort T, Avery A, Afari N. "Heritability of pain catastrophizing and associations with experimental pain outcomes". *Pain* 156(3): 514-520. (2015).
22. Jacobson, S. "Common medical pains". *Paediatrics And Child Health* 12(2): 105-109. (2007).
23. Demir Y. "Non-Pharmacological Therapies in Pain Management". *Pain Management - Current Issues and Opinions*. (2012).
24. Francesca F, Bader P, Ehtle D, Giunta F, Williams J. "EAU Guidelines on Pain Management". *Eur Urol* 44(4): 383-389. (2003).
25. Sharma C, Mehta V. "Paracetamol: mechanisms and updates". *Continuing Education in Anaesthesia Critical Care & Pain* 14(4): 153-158. (2014).
26. Osafo N, Agyare C, Obiri D, Antwi A. "Mechanism of Action of Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs". *Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs*. (2017).

27. Ricciotti E, FitzGerald G. "Prostaglandins and Inflammation". *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 31(5): 986-1000. (2011).
28. Mallet C, Eschalier A, Daulhac L. "Paracetamol: Update on its Analgesic Mechanism of Action". *Pain Relief - From Analgesics to Alternative Therapies*. (2017).
29. Ryder S, Stannard C. "Treatment of chronic pain: antidepressant, antiepileptic and antiarrhythmic drugs". *Continuing Education in Anaesthesia Critical Care & Pain* 5(1): 18-21. (2005).
30. Sardar K, Rashid M, Khandoker M, Khan A. "Anticonvulsants and Antidepressants in Chronic Pain Management". *Journal on Recent Advances in Pain* 2(3): 90-93. (2016).
31. Jan, M., & Keppel, H. "Topical Phenytoin in Painful Diabetic Neuropathy: Rationale to Select a Non-selective Sodium Channel Blocker". *Clinical Research In Neurology* 1(1): 1-5. (2018).

32. Toussaint K, Yang X, Zielinski M, Reigle K, Sacavage S, Nagar S, Raffa R. "What do we (not) know about how paracetamol (acetaminophen) works?". *J Clin Pharm Ther* 35(6): 617-638. (2010).
33. ANDERSON, B. "Paracetamol (Acetaminophen): mechanisms of action". *Pediatric Anesthesia* 18(10), 915-921. (2008).
34. Schultz S, DeSilva M, Gu T, Qiang M, Whang K. "Effects of the Analgesic Acetaminophen (Paracetamol) and its para-Aminophenol Metabolite on Viability of Mouse-Cultured Cortical Neurons". *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 110(2): 141-144. (2011).
35. Giuffrida A, Rodriguez de Fonseca F, Nava F, Loubet-Lescoulié P, Piomelli D. "Elevated circulating levels of anandamide after administration of the transport inhibitor, AM404". *Eur J Pharmacol* 408(2): 161-168. (2000).
36. Ward B, Alexander-Williams J. "Paracetamol revisited: A review of the pharmacokinetics and pharmacodynamics". *Acute Pain* 2(3): 139-149. (1999).

37. Apfel C, Turan A, Souza K, Pergolizzi J, Hornuss C. "Intravenous acetaminophen reduces postoperative nausea and vomiting: A systematic review and meta-analysis". *Pain* 154(5): 677-689. (2013).
38. Di Marzo V. "The endocannabinoid system: Its general strategy of action, tools for its pharmacological manipulation and potential therapeutic exploitation". *Pharmacol Res* 60(2): 77-84. (2009).
39. Thai, A., Talavera, F. and Chausmer, A. "Endocannabinoids: Overview, History, Chemical Structure". Fecha de acceso: 28 de marzo del 2018. (<https://emedicine.medscape.com/article/1361971-overview#a4>).
40. Gaoni Y, Mechoulam R. "Isolation, Structure, and Partial Synthesis of an Active Constituent of Hashish". *J Am Chem Soc* 86(8):1646-1647. (1964).
41. Gérard GM, Mollereau C, Vassart G, Parmentier M. "Molecular cloning of a human cannabinoid receptor which is also expressed in testis". *Biochem J* 79 (Pt 1): 129-34. (1991).

42. Matsuda L, Lolait S, Brownstein M, Young A, Bonner T. "Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA". *Nature* 346(6284): 561-564. (1990).
43. Munro S, Thomas K, Abu-Shaar M. "Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids". *Nature* 365(6441): 61-65. (1993).
44. Devane W, Hanus L, Breuer A, Pertwee R, Stevenson L, Griffin G, Gibson D, Mandelbaum A, Etinger A, Mechoulam R. "Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor". *Science* 258(5090): 1946-1949. (1992).
45. Mechoulam R, Ben-Shabat S, Hanus L, Ligumsky M, Kaminski N, Schatz A, Gopher A, Almog S, Martin B, Compton D, Pertwee R, Griffin G, Bayewitch M, Barg J, Vogel Z. "Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors". *Biochem Pharmacol* 50(1): 83-90. (1995).
46. Sugiura T, Kondo S, Sukagawa A, Nakane S, Shinoda A, Itoh K, Yamashita A, Waku K. "2-Arachidonoylglycerol: A Possible Endogenous Cannabinoid Receptor Ligand in Brain". *Biochem Biophys Res Commun* 215(1): 89-97. (1995).

47. Barinaga M. "NEUROBIOLOGY: How Cannabinoids Work in the Brain". *Science* 291(5513): 2530-2531. (2001).
48. SVIZENSKA I, DUBOVY P, SULCOVA A. "Cannabinoid receptors 1 and 2 (CB1 and CB2), their distribution, ligands and functional involvement in nervous system structures — A short review". *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 90(4):501-511 (2008).
49. Loo, Jason. "Molecular modelling of the cannabinoid receptors: structure-based design, synthesis and pharmacological evaluation of novel ligands based on the fenofibrate scaffold". *Nottingham ePrints*. (2015).
50. Montero C, Campillo N, Goya P, Páez J. "Homology models of the cannabinoid CB1 and CB2 receptors. A docking analysis study". *Eur J Med Chem* 40(1):75-83. (2005).
51. Rose A, Bradley A, Valasatava Y, Duarte J, Prlić A, Rose P. "Web-based molecular graphics for large complexes". *Proceedings of the 21st International Conference on Web3D Technology - Web3D '16*. (2016).

52. Rose A, Hildebrand P. NGL “Viewer: a web application for molecular visualization”. *Nucleic Acids Res* 43(W1): W576-W579. (2015).
53. Sastre C. “Estudio neuropatológico y funcional del sistema endocannabinoide glial en procesos neuroinflamatorios”. *EPrints Complutense*. (2009).
54. Foulkes T, Wood J. “Pain Genes”. *PLoS Genet* 4(7):e1000086. (2008).
55. Zogopoulos P, Vasileiou I, Patsouris E, Theocharis S. “The role of endocannabinoids in pain modulation”. *Fundam Clin Pharmacol* 27(1): 64-80. (2013).
56. Sun L, Tai L, Qiu Q, Mitchell R, Fleetwood-Walker S, Joosten E, Cheung C. “Endocannabinoid activation of CB1 receptors contributes to long-lasting reversal of neuropathic pain by repetitive spinal cord stimulation”. *European Journal of Pain* 21(5): 804-814. (2017).
57. Palazzo E, Luongo L, Novellis V, Rossi F, Maione S. “The Role of Cannabinoid Receptors in the Descending Modulation of Pain”. *Pharmaceuticals* 3(8): 2661-2673. (2010).

58. Russo E, Hohmann A. "Role of Cannabinoids in Pain Management". *Comprehensive Treatment of Chronic Pain by Medical, Interventional, and Integrative Approaches* 181-197. (2012).
59. Peters H, Nahas G. "A Brief History of Four Millennia (B.C. 2000—A.D. 1974)". *Marihuana and Medicine* 3-7. (1999).
60. Nogueiras R, Diaz-Arteaga A, Lockie S, Velásquez D, Tschop J, López M, Cadwell C, Diéguez C, Tschöp M. "The endocannabinoid system: Role in glucose and energy metabolism". *Pharmacol Res* 60(2): 93-98. (2009).
61. Lipina C, Rastedt W, Irving A, Hundal H. "Endocannabinoids in obesity: brewing up the perfect metabolic storm?". *Wiley Interdisciplinary Reviews: Membrane Transport and Signaling* 2(2): 49-63. (2013).
62. Světlík S, Hronová K, Bakhouché H, Matoušková O, Slanař O. "Pharmacogenetics of Chronic Pain and Its Treatment". *Mediators Inflamm* 2013: 1-23. (2013).

63. Caratachea, A. (2007). "Polimorfismos genéticos: Importancia y aplicaciones". *Rev Inst Natl Enf Resp Mex* 20(3): 213-221. (2007).
64. Duan G, Han C, Wang Q, Guo S, Zhang Y, Ying Y, Huang P, Zhang L, Macala L, Shah P, Zhang M, Li N, Dib-Hajj S, Waxman S, Zhang X. "A *SCN10A* SNP biases human pain sensitivity". *Mol Pain* 12: 1-16. (2016).
65. Reimann F, Cox J, Belfer I, Diatchenko L, Zaykin D, McHale D, Drenth J, Dai F, Wheeler J, Sanders F, Wood L, Wu T, Karppinen J, Nikolajsen L, Mannikko M, Max M, Kiselycznyk C, Poddar M, te Morsche R, Smith S, Gibson D, Kelempisioti A, Maixner W, Gribble F, Woods C. "Pain perception is altered by a nucleotide polymorphism in *SCN9A*". *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107(11): 5148-5153. (2010).
66. Maher B, Lea R, Follett J, Cox H, Fernandez F, Esposito T, Gianfrancesco F, Haupt L, Griffiths L. "Association of a *GRIA3* Gene Polymorphism with Migraine in an Australian Case-Control Cohort". *Headache: The Journal of Head and Face Pain* 53(8): 1245-1249. (2013).

67. Meamar, R., Soltani, N., Mohammadi, N., & Ostadsharif, M. "Thr698Thr (nt2369) polymorphism on *CACNA1A* gene and head pain severity in familial migraine". *Journal Of Research In Medical Sciences* 18(13): 11-18. (2013).
68. Camilleri M. "Genetics of human gastrointestinal sensation". *Neurogastroenterology & Motility* 25(6): 458-466. (2013).
69. Juhasz G, Lazary J, Chase D, Pegg E, Downey D, Toth Z, Stones K, Platt H, Mekli K, Payton A, Anderson I, Deakin J, Bagdy G. "Variations in the cannabinoid receptor 1 gene predispose to migraine". *Neurosci Lett* 461(2): 116-120. (2009).
70. Smith S, Maixner D, Fillingim R, Slade G, Gracely R, Ambrose K, Zaykin D, Hyde C, John S, Tan K, Maixner W, Diatchenko L. "Large candidate gene association study reveals genetic risk factors and therapeutic targets for fibromyalgia". *Arthritis & Rheumatism* 64(2): 584-593. (2012).
71. Groop L. "Genetics of the metabolic syndrome". *British Journal of Nutrition* 83(S1). (2000).

72. Brown A, Walker M. "Genetics of Insulin Resistance and the Metabolic Syndrome". *Curr Cardiol Rep* 18(8). (2016).
73. Weissglas-Volkov, D., & Pajukanta, P. "Genetic causes of high and low serum HDL-cholesterol". *Journal Of Lipid Research* 51(8): 2032-2057. (2010).
74. Mills K, Bundy J, Kelly T, Reed J, Kearney P, Reynolds K, Chen J, He J. "Global Disparities of Hypertension Prevalence and Control Clinical Perspective". *Circulation* 134(6): 441-450. (2016).
75. Ge P, Dong C, Ren X, Weiderpass E, Zhang C, Fan H, Zhang J, Zhang Y, Xi J. "The High Prevalence of Low HDL-Cholesterol Levels and Dyslipidemia in Rural Populations in Northwestern China". *PLoS ONE* 10(12): e0144104. (2015).
76. Qi L, Ding X, Tang W, Li Q, Mao D, Wang Y. "Prevalence and Risk Factors Associated with Dyslipidemia in Chongqing, China". *Int J Environ Res Public Health* 12(10): 13455-13465. (2015).

77. Rossing P. "Diabetic Nephropathy: Worldwide epidemic and effects of current treatment on natural history". *Curr Diab Rep* 6(6): 479-483. (2006).
78. WHO. "Obesity and overweight". Fecha de acceso: 14 de junio del 2018. (<http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>).
79. Baye T, Zhang Y, Smith E, Hillard C, Gunnell J, Myklebust J, James R, Kissebah A, Olivier M, Wilke R. "Genetic variation in cannabinoid receptor 1 (CNR1) is associated with derangements in lipid homeostasis, independent of body mass index". *Pharmacogenomics* 9(11): 1647-1656. (2008).
80. Genecards. "Cannabinoid receptor type 1 (Protein Coding)". Fecha de acceso: 24 de septiembre del 2016. (<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CNR1>).
81. NCBI. "Reference SNP (refSNP) Cluster Report: rs12720071". Fecha de acceso: 26 de septiembre del 2016. (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=12720071).

82. Milewicz A, Tworowska-Bardzińska U, Jędrzejuk D, Lwow F, Dunajska K, Łaczmanski Ł, Pawlak M. "Are endocannabinoid type 1 receptor gene (CNR1) polymorphisms associated with obesity and metabolic syndrome in postmenopausal Polish women?". *Int J Obes* 35(3): 373-377. (2010).
83. Russo P, Strazzullo P, Cappuccio F, Tregouet D, Lauria F, Loguercio M, Barba G, Versiero M, Siani A. "Genetic Variations at the Endocannabinoid Type 1 Receptor Gene (CNR1) Are Associated with Obesity Phenotypes in Men". *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 92(6): 2382-2386. (2007).
84. Bordicchia M, Battistoni I, Mancinelli L, Giannini E, Refi G, Minardi D, Muzzonigro G, Mazzucchelli R, Montironi R, Piscitelli F, Petrosino S, Dessì-Fulgheri P, Rappelli A, Di Marzo V, Sarzani R. "Cannabinoid CB1 receptor expression in relation to visceral adipose depots, endocannabinoid levels, microvascular damage, and the presence of the Cnr1 A3813G variant in humans". *Metabolism* 59(5): 734-741. (2010).
85. de Luis, D., Sagrado, M., Aller, R., & Romero, E. "G1359A polymorphism of the cannabinoid receptor gene (CNR1) and insulin resistance in patients with diabetes mellitus type 2". *Nutricion Hospitalaria: Organo Oficial De La Sociedad Espanola De Nutricion Parenteral Y Enteral* 25(1): 34-38. (2010).

86. Storr M, Emmerdinger D, Diegelmann J, Pfennig S, Ochsenkühn T, Göke B, Lohse P, Brand S. "The Cannabinoid 1 Receptor (CNR1) 1359 G/A Polymorphism Modulates Susceptibility to Ulcerative Colitis and the Phenotype in Crohn's Disease". *PLoS ONE* 5(2): e9453. (2010).
87. Tayel, I., Alrefai, A., Ibrahim, W., & Elbarbary, H. "Association of G1359A polymorphism of the endocannabinoid type 1 receptor (CNR1) with coronary artery disease with type 2 diabetes mellitus *cnr1* in CAD and T2DM". *International Journal Of Current Research* 5(11): 3447-3452. (2013).
88. Lenarcik-Kabza A, Łaczmanski Ł, Milewicz A, Bidzińska-Speichert B, Pawlak M, Kolackov K, Kulczkowska-Płaksej J, Trzmiel-Bira A, Brona A. "Wpływ polimorfizmu genu receptora endokannabinoidowego 1 na parametry antropometryczne i metaboliczne u kobiet z zespołem wielotorbielowatych jajników". *Endokrynol Pol* 65(3): 181-188. (2014).
89. de Luis, D., Ovalle, H., Soto, G., Izaola, O., de la Fuente, B. and Romero, E. "Role of Genetic Variation in the Cannabinoid Receptor Gene (CNR1) (G1359A Polymorphism) on Weight Loss and Cardiovascular Risk Factors

After Liraglutide Treatment in Obese Patients with Diabetes Mellitus Type 2". *Journal of Investigative Medicine* 62(2): 324-327. (2014).

90. Ignatowska-Jankowska B, Baillie G, Kinsey S, Crowe M, Ghosh S, Owens R, Damaj I, Poklis J, Wiley J, Zanda M, Zanato C, Greig I, Lichtman A, Ross R. "A Cannabinoid CB1 Receptor-Positive Allosteric Modulator Reduces Neuropathic Pain in the Mouse with No Psychoactive Effects". *Neuropsychopharmacology* 40(13):2948-2959. (2015).

91. de Luis, D., Izaola, O., Aller, R., Lopez, J., Torres, B., Diaz, G., Gomez, E. and Romero, E. "Association of G1359A polymorphism of the cannabinoid receptor gene (CNR1) with macronutrient intakes in obese females". *Journal of Human Nutrition and Dietetics* 29(1): 118-123. (2016).

92. Muramatsu S, Shiraishi S, Miyano K, Sudo Y, Toda A, Mogi M, Hara M, Yokoyama A, Kawasaki Y, Taniguchi M, Uezono Y. "Metabolism of AM404 From Acetaminophen at Human Therapeutic Dosages in the Rat Brain". *Anesth Pain Med* 6(1): e32873. (2016).

93. Saliba S, Marcotegui A, Fortwängler E, Ditrich J, Perazzo J, Muñoz E, de Oliveira A, Fiebich B. "AM404, paracetamol metabolite, prevents

prostaglandin synthesis in activated microglia by inhibiting COX activity". *J Neuroinflammation* 14(1). (2017).

94. Sharma C, Long J, Shah S, Rahman J, Perrett D, Ayoub S, Mehta V. "First evidence of the conversion of paracetamol to AM404 in human cerebrospinal fluid". *J Pain Res* Volume 10: 2703-2709. (2017).

95. Klinger-Gratz P, Ralvenius W, Neumann E, Kato A, Nyilas R, Lele Z, Katona I, Zeilhofer H. "Acetaminophen Relieves Inflammatory Pain through CB1 Cannabinoid Receptors in the Rostral Ventromedial Medulla". *The Journal of Neuroscience* 38(2): 322-334. (2017).

96. Lorenz T. Polymerase Chain Reaction: "Basic Protocol Plus Troubleshooting and Optimization Strategies". *Journal of Visualized Experiments* (63): 3998. (2012).

97. Romero, A., Díaz, A., Aguilar, B., & Munive, M. "Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos". INECC-SEMARNAT 27-51. (2014).

98. Ota M, Fukushima H, Kulski J, Inoko H. "Single nucleotide polymorphism detection by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism". *Nat Protoc* 2(11): 2857-2864. (2007).
99. Ho B, Wassink T, Ziebell S, Andreasen N. "Cannabinoid receptor 1 gene polymorphisms and marijuana misuse interactions on white matter and cognitive deficits in schizophrenia. *Schizophr". Res* 128(1-3): 66-75. (2011).
100. Krebs M, Morvan Y, Jay T, Gaillard R, Kebir O. "Psychotomimetic effects at initiation of cannabis use are associated with cannabinoid receptor 1 (CNR1) variants in healthy students". *Mol Psychiatry* 19(4):402-403. (2014).
101. Russo P, Strazzullo P, Cappuccio F, Tregouet D, Lauria F, Loguercio M, Barba G, Versiero M, Siani A. "Genetic Variations at the Endocannabinoid Type 1 Receptor Gene (CNR1) Are Associated with Obesity Phenotypes in Men". *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 92(6): 2382-2386. (2007).
102. Jaeger J, Mattevi V, Callegari-Jacques S, Hutz M. "Cannabinoid Type-1 Receptor Gene Polymorphisms Are Associated with Central

Obesity in a Southern Brazilian Population". *Dis Markers* 25(1): 67-74. (2008).

103. Engebretsen S, Frigessi A, Engø-Monsen K, Furberg A, Stubhaug A, de Blasio B, Nielsen C. "The peer effect on pain tolerance". *Scand J Pain* 18(3): 467-477. (2018).
104. Silva L, Melo E, Costa T, Nogueira P, Silva J, Hazime F. "Influence of gender on cold-induced pain". *Revista Dor* 17(4): 266-269. (2016).
105. Hellström B, Lundberg U. "Pain perception to the cold pressor test during the menstrual cycle in relation to estrogen levels and a comparison with men". *Integrative Physiological and Behavioral Science* 35(2): 132-141. (2000).
106. Anjana Y, Reetu K. "EFFECT OF FOOD INTAKE ON PAIN PERCEPTION IN HEALTHY HUMAN SUBJECTS". *Journal of Evolution of Medical and Dental Sciences* 3(29): 7984-7988. (2014).

107. Tashani O, Alabas O, Johnson M. "Cold pressor pain responses in healthy libyans: Effect of sex/gender, anxiety, and body size". *Gen Med* 7(4):309-319. (2010).
108. Koenig J, Jarczok M, Ellis R, Bach C, Thayer J, Hillecke T. "Two-Week Test-Retest Stability of the Cold Pressor Task Procedure at two different Temperatures as a Measure of Pain Threshold and Tolerance". *Pain Practice* 14(3): E126-E135. (2013).
109. Zahari Z, Lee C, Tan S, Mohamad N, Lee Y, Ismail R. "Relationship between cold pressor pain-sensitivity and sleep quality in opioid-dependent males on methadone treatment". *PeerJ* 3: e839. (2015).
110. Lötsch J, Doehring A, Mogil J, Arndt T, Geisslinger G, Ultsch A. "Functional genomics of pain in analgesic drug development and therapy". *Pharmacol Ther* 139(1): 60-70. (2013).
111. Hillard C, Weinlander K, Stuhr K. "Contributions of endocannabinoid signaling to psychiatric disorders in humans: genetic and biochemical evidence". *Neuroscience* 204: 207-229. (2012).

112. Ponocny I, Weismayer C, Stross B, Dressler S. "Are Most People Happy? Exploring the Meaning of Subjective Well-Being Ratings". *J Happiness Stud* 17(6): 2635-2653. (2015).
113. Sedeño T, Castro W, Pérez J. "La escala de valoración del estado de ánimo (EVEA) análisis de la estructura factorial y de la capacidad para detectar cambios en estados de ánimo". *Análisis Y Modificación De La Conducta* 36(153 - 154): 19 - 32. (2010).
114. Moller P, Sindet-Pedersen S, Petersen C, Juhl G, Dillenschneider A, Skoglund L. "Onset of acetaminophen analgesia: comparison of oral and intravenous routes after third molar surgery". *Br J Anaesth* 94(5): 642-648. (2005).
115. Scott D, Stohler C, Egnatuk C, Wang H, Koeppe R, Zubieta J. "Individual Differences in Reward Responding Explain Placebo-Induced Expectations and Effects". *Neuron* 55(2) :325-336. (2007).
116. Tegeder I, Lötsch J. "Current evidence for a modulation of low back pain by human genetic variants". *J Cell Mol Med* 13(8b): 1605-1619. (2009).

117. Fang Z, Rajewsky N. "The Impact of miRNA Target Sites in Coding Sequences and in 3'UTRs". *PLoS ONE* 6(3): e18067. (2011).
118. McDonald M, Ajit S. "MicroRNA Biology and Pain". *Prog Mol Biol Transl Sci* 215-249. (2015).
119. Zuo L, Kranzler H, Luo X, Yang B, Weiss R, Brady K, Poling J, Farrer L, Gelernter J. "Interaction between Two Independent CNR1 Variants Increases Risk for Cocaine Dependence in European Americans: A Replication Study in Family-Based Sample and Population-Based Sample". *Neuropsychopharmacology* 34(6):1504-1513. (2008).
120. Chiarlone A, Börner C, Martín-Gómez L, Jiménez-González A, García-Concejo A, García-Bermejo M, Lorente M, Blázquez C, García-Taboada E, de Haro A, Martella E, Höllt V, Rodríguez R, Galve-Roperh I, Kraus J, Guzmán M. "MicroRNA let-7d is a target of cannabinoid CB 1 receptor and controls cannabinoid signaling". *Neuropharmacology* 108:345-352. (2016).