



**UNIVERSIDAD DE CHILE**

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS  
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS



“EFECTO ANTINOCICEPTIVO E INTERACCIÓN DE UN  
ANTAGONISTA COMPETITIVO Y UNO NO COMPETITIVO  
DEL RECEPTOR NMDA EN UN MODELO DE DOLOR  
CRÓNICO EN RATA”

**ANDREA PAZ VERGARA PADILLA**

Memoria para optar al Título  
Profesional de Médico  
Veterinario. Departamento de  
Ciencias Biológicas Animales.

PROFESOR GUÍA: Prof. Dr. ALEJANDRO HERNÁNDEZ  
KUNSTMANN

**SANTIAGO, CHILE**  
2007



**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS  
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS



**“EFECTO ANTINOCICEPTIVO E INTERACCIÓN DE UN  
ANTAGONISTA COMPETITIVO Y UNO NO COMPETITIVO  
DEL RECEPTOR NMDA EN UN MODELO DE DOLOR  
CRÓNICO EN RATA”**

**ANDREA PAZ VERGARA PADILLA**

Memoria para optar al Título  
Profesional de Médico  
Veterinario. Departamento de  
Ciencias Biológicas Animales.

NOTA FINAL: .....

NOTA                      FIRMA

PROFESOR GUÍA	: ALEJANDRO HERNÁNDEZ	.....	.....
PROFESOR CONSEJERO	: VICTOR HUGO PARRAGUEZ	.....	.....
PROFESOR CONSEJERO	: ENZO BOSCO	.....	.....

**SANTIAGO, CHILE**  
**2007**

# ÍNDICE

	<i>Página</i>
<b>I. RESUMEN</b> .....	vii
<b>II. ABSTRACT</b> .....	viii
<b>III. INTRODUCCION</b> .....	1
<b>IV. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b> .....	5
1. Definiciones .....	5
1.1 Dolor .....	5
1.2 Nocicepción .....	6
1.3 Analgesia .....	6
1.4 Antinocicepción .....	6
1.5 <i>Wind-up</i> .....	7
2. Vías del dolor .....	7
2.1 Estructuras periféricas .....	8
2.2 Aferencias nociceptivas .....	8
2.3 Sinapsis central .....	9
3. Modulación del dolor .....	13
4. Neuroplasticidad .....	15
4.1 Cambios plásticos tempranos .....	16
4.2 Cambios plásticos tardíos .....	19
5. Receptor NMDA .....	22
6. Fármacos utilizados en el presente estudio .....	25
6.1 Ketamina .....	25
6.2 ( $\pm$ ) CPP .....	26
7. Cuadro de monoartritis en ratas como modelo de dolor crónico .....	27
<b>III. HIPÓTESIS</b> .....	29

1. Objetivo General .....	29
2. Objetivos Específicos .....	29
<b>V. MATERIALES Y METODOS .....</b>	<b>31</b>
1. Muestra .....	31
2. Preparación del Adyuvante de Freund .....	32
3. Inducción del cuadro monoartrítico .....	32
4. Grupos Experimentales.....	33
5. Fármacos utilizados.....	33
6. Instrumentos de electrofisiología y monitorización.....	35
7. Procedimientos preliminares .....	35
8. Metodología algesimétrica .....	36
9. Dosis Empleadas .....	37
10. Expresión de Resultados .....	39
<b>VI. RESULTADOS .....</b>	<b>40</b>
<b>A. REFLEJO NOCICEPTIVO C .....</b>	<b>40</b>
1. Efecto de la administración de cloruro de sodio intratecal .....	40
2. Efecto de la administración de ketamina intratecal .....	40
3. Efecto de la administración de ( $\pm$ ) CPP intratecal .....	41
4. Efecto de la administración de la combinación ketamina /( $\pm$ ) CPP intratecal .....	41
5. Análisis isoblográfico de la asociación de ketamina /( $\pm$ ) CPP en el reflejo.....	42
<b>B. WIND-UP .....</b>	<b>42</b>
1. Efecto de la administración de cloruro de sodio intratecal .....	42
2. Efecto de la administración de ketamina intratecal .....	43
3. Efecto de la administración de ( $\pm$ ) CPP intratecal .....	43

4. Efecto de la administración de la combinación ketamina /( $\pm$ ) CPP intratecal .....	44
5. Análisis isobolográfico de la asociación de ketamina /( $\pm$ ) CPP en el reflejo.....	45
<b>VII. DISCUSIÓN .....</b>	<b>54</b>
<b>VIII. CONCLUSIONES .....</b>	<b>60</b>
<b>XI. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS .....</b>	<b>62</b>

## I. RESUMEN

El receptor NMDA puede ser funcionalmente modulado por ligandos que actúan en diversos sitios del receptor. En el presente estudio se investigó la acción antinociceptiva de fármacos que actúan en distintos sitios de modulación del receptor: ( $\pm$ ) CPP (bloqueador competitivo del sitio de glutamato), ketamina (bloqueador no competitivo del receptor), así como de combinaciones equianalgésicas de ( $\pm$ ) CPP y ketamina, administrados por vía intratecal. Se utilizaron ratas Sprague-Dawley macho a las que se les indujo monoartritis mediante la administración intra-articular de adyuvante de Freund completo. La nocicepción fue evaluada electrofisiológicamente bajo anestesia, mediante el test de reflejo nociceptivo C y el wind-up espinal. Los resultados mostraron que en las ratas monoartríticas los fármacos y sus combinaciones indujeron efectos antinociceptivo dosis-dependiente de magnitud variable: ( $\pm$ ) CPP fue más potente que ketamina; la combinación ( $\pm$ ) CPP/ketamina mostró solo un efecto aditivo. Se concluye que la utilización de antagonistas competitivos y no competitivos del receptor NMDA o de sus combinaciones frente a dolor artrítico es actualmente no viable, porque aquellos fármacos más activos presentan efectos colaterales psicodislépticos a las dosis que producirían un efecto antinociceptivo substancial. La combinación de estos fármacos, por vía intratecal y en animales anestesiados, no representa una alternativa superior a los fármacos individuales.

## II. ABSTRACT

The NMDA receptor can be functionally modulated by ligands acting on different places of the receptor. In the present study was investigated the nociceptive action of NMDA receptor modulatory drugs: ( $\pm$ ) CPP (competitive blocker of the glutamate site), ketamine (non competitive blocker of the NMDA receptor), as well as equianalgesic combinations of ( $\pm$ ) CPP and ketamine, administered by intrathecal injections. Sprague-Dawley male rats with monoarthritis induced by intra-articular administration of complete Freund adjuvant were used. Nociception was electrophysiologically evaluated under anesthesia by recording the C nociceptive reflex and the spinal wind-up. Results showed that in monoarthritic rats the studied drugs and their combinations induced dose-dependent antinociceptive effects of variable magnitude: ( $\pm$ ) CPP was more powerful than ketamine and the combination ( $\pm$ )CPP/ketamine only showed an additive effect. It is suggested that the use of competitive and non competitive antagonists of the NMDA receptor or their combination in cases of chronic pain is currently non viable because the most active drugs display psychodisleptic collateral effects at doses that would produce a substantial antinociceptive effect. It is concluded that the combination of these drugs by intrathecal injections on anesthetized animals does not represent a superior alternative than individual drugs.

### III. INTRODUCCIÓN

El dolor es uno de los principales motivos de consulta en clínica, tanto humana como veterinaria. Normalmente se manifiesta como un síntoma complejo que afecta a todos los individuos en algún momento de su vida. Toda percepción dolorosa involucra aspectos físicos y emocionales, pudiendo alterar el estado psicofísico y social de quien lo padece. Actualmente el dolor se ha convertido en una problemática de salud pública mundial, debido a los grandes costos económicos y sociales que representa su tratamiento, además de la gran cantidad de pacientes que presentan cuadros clínicos con dolor asociado. Por lo tanto, es importante contar con tratamientos efectivos para evitar el dolor, sobre todo para el caso de aquellos pacientes que presentan dolores refractarios a los tratamientos actuales. El conocimiento a nivel básico de los fenómenos involucrados en la percepción del dolor es un requisito para identificar nuevos fármacos que ayuden a su alivio.

Varios criterios han sido utilizados para clasificar el dolor, pero el más común es aquel que lo clasifica respecto al tiempo que éste permanece con relación al daño tisular que lo origina. De acuerdo a este criterio el dolor se clasifica en dolor agudo y dolor crónico. Actualmente sabemos que estos dos cuadros se diferencian no sólo en su duración temporal sino también en su origen fisiopatológico (Cerveró y Laird, 1995).

El dolor agudo es la consecuencia inmediata de la activación de las vías del dolor (sistema nociceptivo), provocado por un daño tisular y que cursa en forma temporal relacionándose directamente con el daño que lo origina. Es decir una vez que el daño tisular ha sido reparado el dolor desaparece. Por lo tanto, se le ha asignado un rol fisiológico de protección o alerta frente a algún daño real o potencial.

En contraste, el dolor crónico no posee una función protectora y más que un síntoma es, en sí mismo, una patología que se prolonga en el tiempo aún después de que la lesión que lo originó inicialmente ha sido remitida o reparada. Este tipo de dolor, suele ser refractario a los tratamientos utilizados en el dolor agudo y presenta síntomas psicológicos asociados tales como ansiedad, agresividad y depresión (Paeile y Bilbeny, 2005<sup>1</sup>).

El conocimiento actual de las vías de conducción del dolor ha clarificado varios conceptos que es necesario tener presente frente a un cuadro doloroso y muy especialmente en un cuadro de dolor crónico. En dichas vías, existen numerosos centros de procesamiento de la información captada en la periferia, es decir, en la terminación libre de la primera neurona aferente (fibra A $\delta$  o C). Entre los centros de procesamiento de la información dolorosa son relevantes el asta posterior (o dorsal) de la médula espinal, el bulbo raquídeo y sus sinapsis con la formación reticular, tálamo, hipotálamo y corteza cerebral.

El asta dorsal de la médula espinal es el primer centro de procesamiento o modulación de los estímulos nociceptivos, produciéndose a este nivel la liberación de neurotransmisores y neuromoduladores que, en el caso del dolor crónico (estímulo mantenido), van a inducir cambios en los patrones de descarga de la segunda neurona, los cuales en muchas oportunidades persisten aún cuando la noxa periférica haya desaparecido. Esta plasticidad del sistema nervioso central (SNC) conlleva problemas terapéuticos de difícil solución, como es el caso de la neuralgia post-herpética y de las neuralgias por tratamiento con fármacos antineoplásicos.

En la actualidad, la farmacología constituye la principal herramienta para el tratamiento del dolor a través de distintos tipos de agentes farmacológicos, entre ellos: agonistas opioides, antiinflamatorios no esteroideos, antidepresivos tricíclicos, anticonvulsivantes, agonistas adrenérgicos  $\alpha_2$ , bloqueadores de canales de calcio voltaje-dependientes, etc. Aunque con estos tratamientos se tiene un buen resultado en los cuadros de dolor agudo, el dolor crónico aún permanece intratable en una significativa proporción de los pacientes.

El receptor N-metil-D-aspartato (NMDA) para glutamato ha demostrado tener un rol relevante en el dolor crónico; este receptor se relaciona con los cambios plásticos que ocurren a nivel medular durante el dolor crónico (Dickenson, 1996). De hecho, fármacos antagonistas del receptor NMDA han surgido como los más promisorios para el tratamiento de este problema. Por esta razón interesa estudiar el efecto antinociceptivo

(antinocicepción corresponde a la abolición de las respuestas reflejas evocadas por la aplicación de estímulos nocivos (Paeile y Bilbeny, 2005<sup>2</sup>) de fármacos a los que se les describe acción sobre el receptor NMDA, como es la ketamina [2-(2-clorofenil)-(1-metilamino)-ciclohexanona] y el ( $\pm$ ) CPP [ácido 3-(2-carboxipiperazin-4) propil 1-fosfónico] en un modelo de dolor crónico, como es la rata monoartrítica. Como se sabe, estos fármacos actúan en sitios distintos del mismo receptor y se ha comprobado que drogas que actúan de esa manera pueden inducir efectos aditivos o sinérgicos en los organismos. La búsqueda de este tipo de interacciones entre distintos fármacos es un importante objetivo de la farmacología clínica actual, por cuanto esta estrategia permite aumentar los efectos farmacológicos deseados, al mismo tiempo que se minimizan los efectos indeseados, en la medida que es posible utilizar drogas en dosis significativamente menores.

## IV. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 1. Definiciones

#### 1.1 Dolor:

La International Association for the Study of Pain (IASP) ha definido el dolor como: *“Una experiencia sensorial y emocional desagradable, asociada a un daño tisular existente o potencial, o descrita en términos de ese daño (Paeile y Bilbeny, 2005<sup>1</sup>).*

Por su parte, la American Veterinary Medicine Association en el Colloquium on Recognition and Alleviation of Animal Pain and Distress (1987), concluyó que: *“El dolor en animales es una experiencia sensorial y emocional aversiva, que evoca acciones motoras protectoras, que resultan en evitación aprendida y que pueden modificar rasgos de conducta especie-específicos, incluyendo comportamiento social”* (American Veterinary Medical Association, 1987).

Si bien se trata de definiciones que buscan explicar desde distintos puntos de vista la percepción humana y animal de esta modalidad sensorial, ambas muestran elementos comunes. En efecto, estas definiciones son concordantes en mostrar al dolor como un fenómeno subjetivo e individual, de carácter eminentemente clínico y que no

sólo posee un componente sensitivo desagradable, sino que también muestra un componente emocional negativo (distrés).

### **1.2 Nocicepción:**

Es la respuesta neural que aparece tras la injuria tisular. Implica la transmisión y procesamiento de la información sensorial relacionada a la injuria y sus respuestas reflejas medibles. Este término se utiliza preferentemente para referirse a situaciones experimentales, donde el estudio de conductas estereotipadas o de respuestas reflejas sólo permite estimar la magnitud del componente senso-discriminativo del dolor, pero no del componente afectivo-emotivo presente en el dolor verdadero (Paeile y Bilbeny, 2005<sup>2</sup>).

### **1.3 Analgesia:**

Es la ausencia o bien la reducción del dolor percibido (Russo y Brose, 1998).

### **1.4 Antinocicepción:**

Es la abolición de las respuestas reflejas y conductuales evocadas por la aplicación de estímulos nocivos (Paeile y Bilbeny, 2005<sup>2</sup>). Puede entenderse entonces que analgesia y antinocicepción son fenómenos distintos, originados a partir de una interferencia sobre el procesamiento de la información nociceptiva, pero que no

necesariamente operan de la misma manera sobre la percepción afectiva y sensitiva final del estímulo nocivo.

### **1.5. *Wind-up*:**

Fenómeno neurofisiológico que se produce cuando un estímulo nociceptivo se repite a una alta frecuencia (mayor a 0.3 Hz), con lo cual se genera una respuesta que aumenta progresivamente, al menos durante las primeras estimulaciones (Paeile y Bilbeny, 2005<sup>1</sup>).

## **2. Vías del Dolor**

En el manejo terapéutico del dolor es imprescindible un correcto diagnóstico y un conocimiento de su neuroanatomía y neurofisiología, por lo que es importante revisar estos aspectos en forma general. Al respecto podemos decir, en forma simplificada, que para percibir dolor son necesarias estructuras periféricas que actúen como receptores del estímulo, una vía de transmisión de la información dolorosa hacia la médula espinal constituida por vías sensoriales aferentes y la conducción de la información hacia centros superiores a través de vías ascendentes, donde se interpreta el estímulo. El flujo de la información del dolor es regulado a diferentes niveles: en la superficie del cuerpo, en la médula espinal y por vías descendentes desde el tronco del encéfalo hasta la

médula espinal. Actualmente, se reconoce que también existe regulación de la información dolorosa a nivel del encéfalo. La regulación puede ser de tipo inhibitoria o facilitatoria (Paeile y Bilbeny, 2005<sup>2</sup>).

## **2.1 Estructuras periféricas**

En nuestro organismo existe una gran cantidad de receptores sensoriales para el dolor o nociceptores, que corresponden a los terminales axónicos de la primera neurona de la vía del dolor, cuyo cuerpo axonal se ubica en un ganglio raquídeo. La característica esencial de estos nociceptores es su capacidad para diferenciar entre estímulos inocuos y estímulos nocivos, ya que poseen un umbral de estimulación elevado y responden frente a estímulos de una intensidad elevada. Este umbral no es constante y depende de la ubicación del receptor (Russo y Brose, 1998).

La función de estos nociceptores es transformar estímulos locales (químicos, mecánicos y térmicos) en potenciales de acción que se propagan por las fibras sensoriales aferentes primarias, hacia el sistema nervioso central.

## **2.2 Aferencias nociceptivas**

Los impulsos dolorosos desde los nociceptores, se transmiten hacia la médula espinal principalmente a través de dos fibras: fibras A $\delta$  y C. Las **fibras A $\delta$** , tienen un diámetro de 1-5 micrometros ( $\mu\text{m}$ ) y una delgada capa de mielina, su velocidad de

transmisión es de 4-30 metros/segundo (m/s) y su umbral de estimulación es bajo. Son las encargadas de llevar la información de estímulos mecánicos y/o térmicos. Las **fibras C** tienen 0.3-1.5  $\mu\text{m}$  de diámetro, son amielínicas y tienen por lo tanto una velocidad de conducción lenta de 0.3-2 m/s. Poseen un umbral de estimulación alto, se activan con estímulos intensos o repetitivos y generan un dolor continuo y mal localizado. Son polimodales, es decir, transmiten estímulos mecánicos, químicos y térmicos.

La diferencia en la velocidad de conducción entre las fibras A $\delta$  y C explica la duplicidad de una percepción dolorosa. Una percepción inicial bien localizada, breve y punzante que es conocida como epicrítica, transmitida por las fibras A $\delta$ , y otra profunda, difusa, generalmente mal tolerada por el paciente, conocida como protopática transmitida por las fibras C (Paeile y Bilbeny, 2005<sup>2</sup>).

Los somas de las neuronas que forman aferencias nociceptivas se ubican en los ganglios raquídeos y sus axones alcanzan la médula espinal a través de la raíz dorsal terminando en la sustancia gris del asta posterior.

### **2.3 Sinapsis central**

La primera neurona de la vía nociceptiva hace sinapsis con una segunda neurona en distintas zonas del asta posterior. La sustancia gris de la médula espinal ha sido dividida según el esquema laminar de Rexed en diez láminas o capas (I al X), donde las seis primeras corresponden al asta posterior, aunque funcionalmente también se puede

incluir parte de la lámina X que se sitúa alrededor del canal central. Las fibras A $\delta$ , hacen sinapsis en la médula espinal principalmente en la lámina I y algunas ramas más profundas alcanzan la lámina V. Las fibras C en cambio, terminan casi exclusivamente en la lámina II y solo unas pocas poseen terminaciones en la zona ventral de la lámina I y dorsal de la lámina III.

Las sinapsis que se realizan en las láminas I y II son en su mayoría con neuronas nociceptivas específicas, que responden exclusivamente a la activación de aferencias nociceptivas y poseen campos receptivos limitados, por lo que son importantes en la localización fina de estímulos periféricos nocivos. En cambio, las sinapsis que se realizan en las láminas III y V son principalmente con neuronas de segundo orden no específicas, que se sensibilizan frente a una estimulación repetitiva y que se conocen como neuronas convergentes.

Las sinapsis entre fibra aferente y neurona de segundo orden están moduladas por interneuronas que también reciben información de las fibras A $\beta$  no nociceptivas (tacto, presión) y es esta interacción neuronal lo que permitió a Melzak y Wall proponer su teoría de la compuerta de regulación de la respuesta nociceptiva (Paeile y Bilbeny, 2005<sup>2</sup>). Debemos mencionar que estas fibras sensoriales no nociceptivas A $\beta$  entran al asta posterior, a la sustancia blanca y siguen por ella para formar los cordones posteriores o haces de Goll y Burdach, y durante su recorrido emiten colaterales que

sinaptan con las neuronas de la sustancia gelatinosa, contribuyendo así al control segmentario del dolor.

Las neuronas de segundo orden de la médula espinal cruzan la línea media y ascienden en tractos, formando vías ascendentes que se dirigen principalmente hacia el tálamo (Russo y Brose, 1998) (Fig. 1).

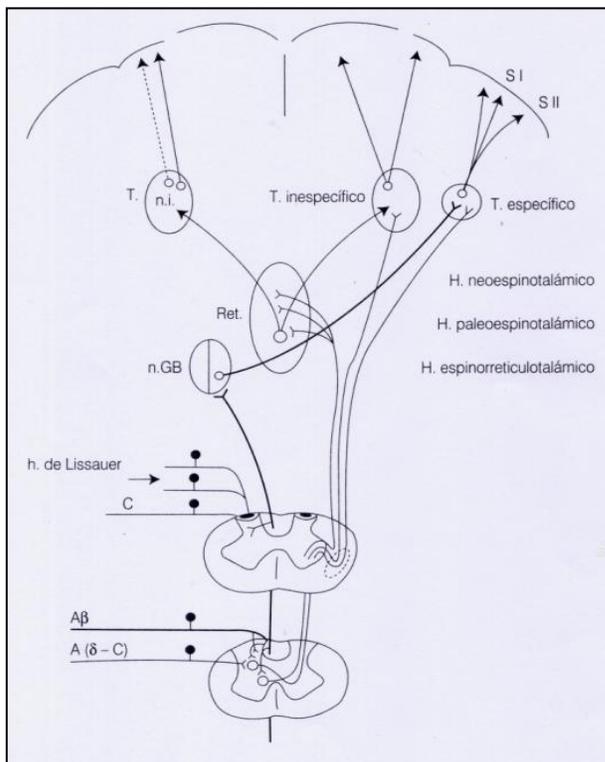


Figura 1

Esquema de las vías del dolor. Haces ascendentes e ingreso de las fibras  $A\alpha$ ,  $A\delta$ ,  $A\beta$ , y C al asta posterior. Sinapsis del haz espinoreticulotalámico con la formación reticular (Ret). Núcleos talámicos inespecíficos (T.n.i.). Núcleos talámicos específicos (T.e.). Núcleos de Goll y Burdach (n. GB). SI-SII áreas somestésicas o parietales ascendentes (Paeile y Bilbeny, 2005<sup>2</sup>).

Los axones de las neuronas periféricas una vez que entran a la médula espinal y alcanzan la sustancia blanca, se ramifican en colaterales ascendentes y descendentes hacia uno o dos segmentos de la médula espinal antes de penetrar a la sustancia gris del asta dorsal, lo que explica en parte el fenómeno de dolor referido o irradiado (Paeile y Bilbeny, 2005<sup>2</sup>).

Los axones de las neuronas de segundo orden se cruzan en la región comprendida entre el canal central de la médula o conducto del epéndimo y la comisura gris anterior para ascender hacia los centros superiores, dando origen a tres haces: los haces **Neo-espinotalámico** y **Paleo-espinotalámico**, que conforman la vía Espinotalámica y el haz **Espino-reticulotalámico**.

- El haz neo-espinotalámico hace sinapsis con los núcleos ventral posterior y posterolateral del tálamo y de allí va hacia la corteza parietal. Es importante en la ubicación topográfica del dolor.
- El haz paleo-espinotalámico se proyecta en forma bilateral a los núcleos inespecíficos del tálamo y luego a zonas frontales de la corteza, adquiriendo importancia en la evaluación cualitativa del dolor.
- El haz espino-reticulotalámico hace sinapsis con la formación reticular a distintos niveles: bulbo, protuberancia, mesencéfalo y sustancia gris periacueductal y de allí se dirige en forma bilateral hacia los núcleos inespecíficos del tálamo. Este

haz es el encargado del componente afectivo del dolor (sistema límbico) (Paeile y Bilbeny, 2005<sup>2</sup>).

### **3. Modulación del dolor**

Como se ha mencionado anteriormente los estímulos nociceptivos activan simultáneamente mecanismos de modulación de la respuesta en la periferia, a nivel espinal y supraespinal.

En la periferia, el daño tisular produce la liberación de una serie de sustancias químicas con capacidad algogénica en el entorno de las terminaciones periféricas (algogénico corresponde a algo que produce dolor, Medciclopedia, 2006), entre ellas encontramos: iones ( $H^+$  y  $K^+$ ), aminas (histamina, serotonina, noradrenalina), citoquinas, eicosanoides (prostaglandinas, leucotrienos), cininas (bradicinina) y péptidos (sustancia P, somatostatina, entre otros). Todas estas sustancias pueden excitar directamente la membrana del nociceptor polimodal, o modificar su sensibilidad frente a otros agentes (Dickenson, 1996).

Estos mecanismos excitatorios e inhibitorios periféricos determinan las características de la señal o impulso nociceptivo que alcanza la médula espinal. Desde el punto de vista terapéutico puede ser importante el bloqueo o reducción de la activación

de estos nociceptores en la periferia para prevenir alteraciones centrales que pueden originar cuadros de dolor crónico de difícil tratamiento.

En la médula espinal existe una sinapsis entre la primera y la segunda neurona de la vía del dolor. Esta sinapsis está modulada por interneuronas intrínsecas del asta medular, las cuales utilizan neurotransmisores excitatorios (como el glutamato y la sustancia P) e inhibitorios (como las encefalinas, dinorfinas y ácido gamma amino butírico) para realizar su acción. Además, estas interneuronas inhibitorias pueden ser activadas por fibras aferentes no nociceptivas ( $A\beta$ ), lo que explica el por qué cuando se presenta un dolor, éste disminuye frente a un estímulo táctil.

Otra forma de control del dolor es mediante vías descendentes supraespinales que se proyectan a las láminas superficiales del asta dorsal, lo que es llamado control suprasegmentario del dolor. Estos sistemas reguladores descendentes, provenientes tanto del tronco encefálico (núcleos del rafe, núcleo locus coeruleus y sustancia gris periacueductal) como de otras estructuras cerebrales (ciertas zonas del hipotálamo y la corteza cerebral) juegan un rol importante en la modulación e integración de las señales nociceptivas, principalmente en forma inhibitoria, a través de neuronas serotoninérgicas, noradrenérgicas y en menor número por vías dopaminérgicas (Millán, 2002).

#### 4. Neuroplasticidad

Una característica esencial del sistema nervioso y que explica por qué un dolor agudo puede mantenerse en el tiempo transformándose en un cuadro crónico de difícil tratamiento, es la plasticidad neural. Este término se refiere a un conjunto de cambios que ocurren en el sistema nervioso frente a un *input* nociceptivo mantenido en el tiempo (Raigorodsky y Urca, 1990). Los cambios al sistema nervioso se inician como un fenómeno electrofisiológico de potenciación sináptica a nivel de las neuronas intrínsecas del asta dorsal, denominado “wind-up” (que se produce cuando un estímulo de una frecuencia mayor a 0.3 Hz estimula las fibras C y se manifiesta como una respuesta que aumenta en forma progresiva). Este fenómeno conlleva cambios plásticos tempranos en diversos sistemas de señalización intracelular, para dar lugar posteriormente a modificaciones en la expresión génica de las neuronas que llevan, finalmente, a cambios duraderos en la estructura y función del sistema nociceptivo, modificaciones que constituyen cambios plásticos tardíos. Desde el punto de vista conductual, estos cambios plásticos tempranos y tardíos que suceden en las neuronas nociceptivas espinales, se expresan como hiperalgesia (aumento exagerado de la respuesta frente a estímulos nociceptivos) y alodinia (dolor inducido por estímulos normalmente inocuos) ambos síntomas característicos de un cuadro de dolor crónico (Coderre *et al.*, 1993).

#### 4.1. Cambios plásticos tempranos:

En condiciones de reposo, las neuronas del asta dorsal mantienen receptores NMDA inactivos, debido a que su canal para iones  $\text{Ca}^{2+}$  se encuentra bloqueado por un ión  $\text{Mg}^{2+}$  unido a un sitio del canal en el dominio de transmembrana. En este escenario, el glutamato excitado por las fibras nociceptivas aferentes A $\delta$  y C activa a los receptores no-NMDA, pero no a los receptores NMDA, evocando sólo breves despolarizaciones de las neuronas postsinápticas del asta dorsal (dolor agudo) (Paeile y Bilbeny, 2005<sup>3</sup>).

Al producirse una estimulación eléctrica repetitiva de las fibras nociceptivas aferentes o wind-up, se generará una despolarización acumulativa en las neuronas postsinápticas, fenómeno que hará descender el potencial de membrana algunos milivoltios y que finalmente permitirá remover al ión  $\text{Mg}^{2+}$  (el cual es voltaje-dependiente) desde el canal del receptor NMDA. De esta manera se activará el receptor permitiendo la entrada masiva de calcio hacia el intracelular (Ji *et al*, 2003).

Los iones  $\text{Ca}^{2+}$  intracelulares se unen y activan a la proteína calmodulina, la que a su vez activa a una proteína cinasa dependiente de calmodulina (CaMKII). Esta cinasa, además de autofosforilarse, puede fosforilar a diversas proteínas intracelulares y de membrana, entre las cuales se cuentan los receptores AMPA (no-NMDA). Una vez fosforilados, los receptores AMPA permiten la entrada de iones  $\text{Na}^+$ , aún en ausencia de activación de glutamato, lo que conduce a una mayor actividad de los receptores

NMDA, con mayor entrada de calcio. De esta manera se ha creado un caracol intracelular de re-excitación de los receptores NMDA (retroalimentación positiva), que permite que la descarga incremente cada vez más a medida que la estimulación eléctrica repetitiva progresa, acumulándose cada vez más iones  $\text{Ca}^{2+}$  en el compartimiento intracelular. Más aún, el caracol intracelular de re-excitación de los receptores NMDA es capaz de mantener la descarga neuronal (wind-up), aún en ausencia de estimulación periférica (Paeile y Bilbeny, 2005<sup>3</sup>, Ji *et al.*, 2003).

Este caracol de re-excitación intracelular es magnificado y potenciado por la acción adicional de algunos neuropéptidos excitados desde las fibras nociceptivas aferentes, los que generan un conjunto de proteínas cinasas las cuales ejercen, a su vez, acciones reforzadoras del bucle de re-excitación intracelular, fosforilando los receptores NMDA y aumentando así la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a las neuronas postsinápticas del asta dorsal.

Finalmente, CaMKII es capaz de fosforilar a la enzima óxido nítrico sintasa, generando así óxido nítrico (ON). Esta molécula es capaz de actuar como mensajero retrógrado, aumentando la liberación de glutamato desde los aferentes nociceptivos primarios, a través de un mecanismo que involucra consecutivamente la activación de la enzima soluble guanilato ciclasa, generación de GMPc y activación de una proteína cinasa G (PKG), la que es capaz de inducir la liberación de glutamato. Asimismo, CaMKII también fosforila a la enzima fosfolipasa A2, la que aumenta la síntesis de

ácido araquidónico citosólico, elevándose a su vez la producción de prostaglandinas. Estas moléculas, especialmente prostaglandina E2, pueden también actuar como mediadores retrógrados, uniéndose a receptores EP1 y EP3 de membrana existentes en los axones nociceptivos aferentes, aumentando así la entrada de iones  $\text{Ca}^{2+}$  y por consiguiente la liberación de glutamato. De esta manera, se ha creado ahora otro caracol de re-excitación de los receptores NMDA (retroalimentación positiva), que involucra a los mediadores retrógrados ON y prostaglandinas. Este es un caracol extracelular, capaz de mantener la descarga de la neurona postsináptica (wind-up) en ausencia de estimulación periférica (Paeile y Bilbeny, 2005<sup>3</sup>, Ji *et al.*, 2003, Woolf y Costigan, 1999, Le Bars y Willer, 2004).

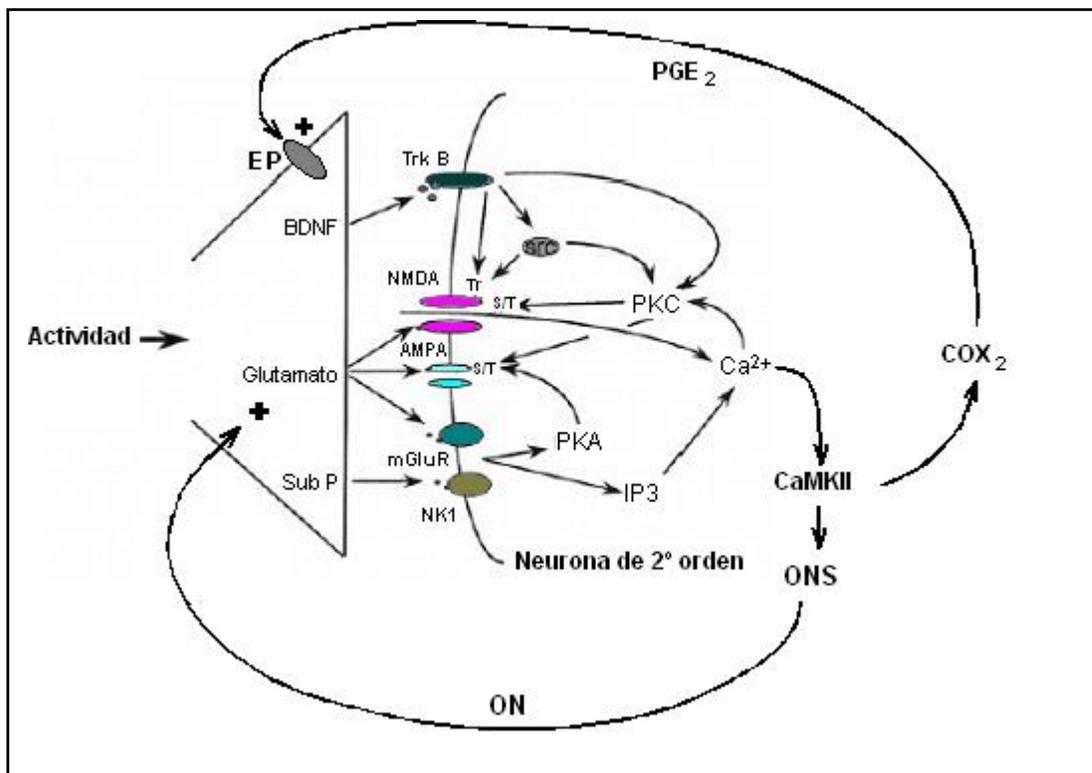


Figura 2

Representación esquemática que muestra los neurotransmisores, receptores y vías respectivas de transducción de señales intracelulares involucrados en los cambios plásticos tempranos (Woolf y Costigan, 1999).

#### 4.2 Cambios plásticos tardíos:

Estos consisten en modificaciones de la expresión génica de las neuronas del asta dorsal, inducidos por la activación de los receptores para glutamato y otros neurotransmisores liberados por las fibras nociceptivas aferentes (Fig. 3), que conducen

a cambios duraderos, tanto en la conectividad sináptica espinal, como en la función nociceptiva (hiperalgesia y alodinia). El desarrollo de estos cambios requiere de la activación de cascadas de transducción que señalizan al núcleo de las neuronas intrínsecas espinales. Estas cascadas incluyen a la proteína cinasa PKA y a las proteínas cinasas activadas por mitógenos Erk, p38 y JNK, las que fosforilan la proteína de transcripción CREB a nivel intranuclear. CREB se une a los promotores de los genes de expresión temprana c-fos y c-jun, determinando la síntesis de los productos de esos genes, las proteínas c-Fos y c-Jun. Estas se dimerizan, activando río abajo muchos otros genes. La activación de esos genes se traduce finalmente en un incremento de la síntesis de proteínas implicadas en la remodelación fenotípica de las neuronas postsinápticas del asta dorsal (desarrollo de procesos y espinas dendríticas), remodelación que permitirá alojar nuevas conexiones sinápticas que se irán formando a medida que los axones aferentes incrementan su arborización mediante crecimiento por brotes, en respuesta a la injuria periférica. Estas nuevas conexiones sinápticas ocurren numerosamente entre axones A $\beta$  y neuronas convergentes del asta dorsal, generando alodinia por excitación aumentada de dichas neuronas mediante “inputs” inocuos. La activación génica en estas neuronas también se traduce en un aumento de la síntesis e inserción de canales dependientes de voltaje pronociceptivos (canales de calcio) en la membrana neuronal, en un aumento de los receptores postsinápticos para neurotransmisores pronociceptivos, así como en un incremento de la síntesis de enzimas inducibles, implicadas en la síntesis de

mediadores pronociceptivos como COX<sub>2</sub> y NOS. Estos dos mediadores pueden eventualmente salir de la neurona postsináptica espinal e inducir cambios en los terminales nociceptivos aferentes, en forma retrógrada (Paeile y Bilbeny, 2005, Ji *et al*, 2003, Wolf y Costigan, 1999).

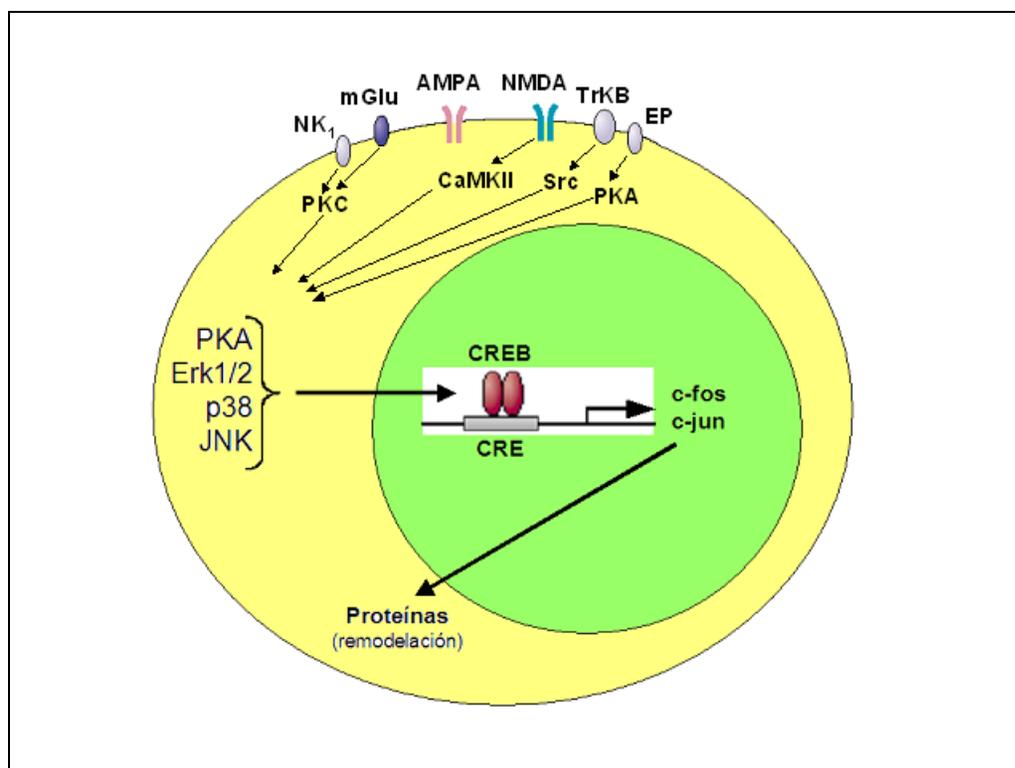


Figura 3

Representación esquemática que muestra las cascadas de transducción intracelular implicadas en el desarrollo de cambios plásticos tardíos (Paeile y Bilbeny, 2005<sup>3</sup>).

## 5. Receptor NMDA

Como se ha descrito en el punto anterior, el receptor NMDA tiene un rol protagónico en los fenómenos de potenciación de la respuesta dolorosa y el efecto analgésico de los antagonistas de estos receptores ha sido puesto en manifiesto, principalmente en estudios conductuales en modelos animales de dolor crónico (Wolf y Thompson, 1991, Stucky *et al.*, 2001). Estructuralmente este receptor (Figura 4), está formado por dos tipos de subunidades NR1 y NR2, que se disponen en forma tetramérica (2NR1 + 2NR2) o pentamérica (3NR1 + 2NR2). El Receptor NMDA presenta en su estructura diversos sitios de modulación por ligandos (Chizh, 2002, Tuersky, 1990). Estos sitios son:

- (i) Sitio extracelular de reconocimiento del neurotransmisor (glutamato), el cual puede ser bloqueado por antagonistas competitivos tales como ( $\pm$ ) CPP, dando como resultado un bloqueo de la corriente de calcio y por lo tanto del proceso de transducción intracelular.
- (ii) Sitio para fenciclidina (PCP) situado dentro del canal del receptor, el cual une ligandos tales como ketamina, lo que resulta en antagonismo no-competitivo de la funcionalidad del receptor NMDA.

- (iii) Sitio extracelular para glicina, el que es insensible a estriquina y esencial para la funcionalidad del receptor. Este sitio puede ser antagonizado por el ácido 5,7-dicloro quinurénico (DCQ).
- (iv) Sitio extracelular para poliaminas, el cual es antagonizado por altas concentraciones de N,N'-bis-(3-aminopropil) ciclohexano-1,4-diamina (DCD). Los antagonistas que se unen a este sitio bloquean no competitivamente la funcionalidad del receptor al interactuar con la subunidad NR2B, una de las 4 subunidades que componen el receptor.

Estudios clínicos muestran que muchos antagonistas no competitivos y competitivos del receptor NMDA, ya ensayados clínicamente o en desarrollo, pueden tener utilidad frente a diversos cuadros de dolor crónico (Tursky, 1990, Lipton y Rosenberg, 1994). Sin embargo, la mayoría de estos estudios indican que tales tratamientos no están exentos de reacciones adversas psicodislépticas, muchas veces de gran severidad, lo que impide su administración continuada en cuadros de dolor crónico, reservándose su uso clínico como co-analgésicos de los opioides, donde las dosis administradas son significativamente menores (Hewitt, 2000).

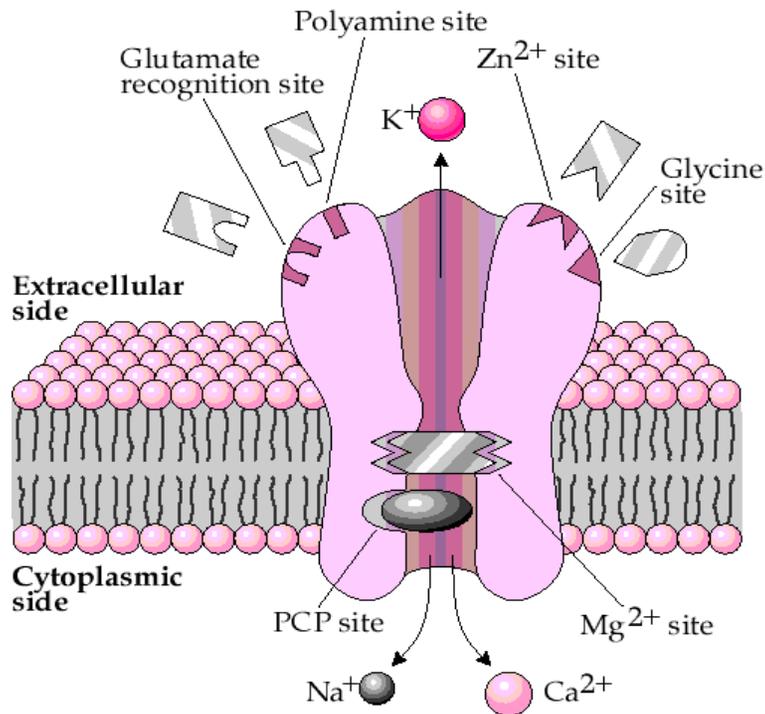


Figura 4

Representación esquemática del receptor NMDA (Feldman y Quenzer, 1994).

El hecho de que el receptor NMDA, por una parte cumpla un rol primordial en la sensibilización central subyacente a los procesos de dolor crónico, y por otra, presente a lo menos cuatro sitios de modulación susceptibles a ser bloqueados, lo convierte en un blanco preferencial para ensayar distintos fármacos, con capacidad de actuar a distintos niveles del receptor.

## 6. Fármacos utilizados en el presente estudio

### 6.1 KETAMINA.

Dentro de los bloqueadores del receptor NMDA la ketamina es uno de los más utilizados. Es un derivado de la fenciclidina, que se comporta como anestésico general de acción corta (Dickenson, 1997). Es un antagonista no competitivo del receptor NMDA, que se une al sitio para fenciclidina en el interior del canal de calcio. Su acción anestésica se caracteriza por un estado similar al cataléptico, con pérdida de conciencia, inmovilidad, amnesia y analgesia, que se ha denominado *anestesia disociativa*. A pesar que se conoce hace ya varios años que la ketamina es antagonista del receptor NMDA (Zhuo, 1998), el rol de este receptor en la nocicepción es un descubrimiento más reciente (Chia *et al.*, 1998, Susuki *et al.*, 1999). Debido a esto último, no fue sino hasta hace poco tiempo, que los efectos antinociceptivos de este fármaco fueron explotados usando ketamina en dosis subanestésicas, especialmente para el manejo de ciertos tipos de dolor. Existen evidencias que en el dolor crónico la ketamina, por cualquier vía de administración, presenta significativos efectos sinérgicos con opioides, anestésicos locales, y una variedad de otros fármacos (Errando *et al.*, 2004, Harris *et al.*, 1986). En modelos experimentales conductuales se ha visto que disminuye la hiperalgesia mecánica y térmica y también la alodinia (Woolf y Thompson, 1991). La ketamina se administra por vía endovenosa o intramuscular; por su elevada liposolubilidad pasa con

rapidez a los órganos más irrigados, incluido el cerebro, donde alcanza elevadas concentraciones en los primeros minutos post inyección. Se metaboliza en el hígado, eliminándose por la orina en forma inalterada sólo en un 4%.

## **6.2 ( $\pm$ ) CPP**

Posee enantiómeros D y L, es uno de los más potentes inhibidores competitivos del receptor (Anis *et al.*, 1986). Frente a la estimulación repetida de fibras de pequeño calibre en la médula espinal, se produce un aumento progresivo en la descarga del potencial de acción. El ( $\pm$ ) CPP no modifica la línea base, pero reduce la facilitación del reflejo flexor producido por una estimulación eléctrica repetitiva o por la aplicación de aceite de mostaza, que es un irritante químico. Esto indica nuevamente su efecto antagonista del receptor NMDA, ya que es este receptor el que está involucrado en la inducción y mantención de la sensibilización central. La sensibilización central, como ya se ha dicho, participa en la hipersensibilización de los estados de dolor crónico o persistente, por lo tanto, el ( $\pm$ ) CPP al ser un antagonista NMDA, podría potencialmente ser usado en analgesia en clínica (Thommmson *et al.*, 1985).

## 7. Cuadro de monoartritis en ratas como modelo de dolor crónico

La inducción de artritis en ratas ha sido utilizada desde hace muchos años para el estudio del dolor y fármacos analgésicos. Para este fin, se han administrado inyecciones intraarticulares de levadura, carragenina, cristales de urato o de caolín. Sin embargo, tales métodos producen una reacción inflamatoria de muy corta duración (hasta una semana), lo cual limita su uso para el estudio del dolor crónico inflamatorio. Por el contrario, la administración de adyuvante de Freund completo (AFC), el cual corresponde a una suspensión de paredes bacterianas de *Mycobacterium* sp., induce en la rata un cuadro artrítico de una duración mucho más prolongada (meses). Tal cuadro comparte además numerosas características bioquímicas, clínicas y patológicas con la artritis reumatoidea humana, la cual es prototipo del dolor crónico inflamatorio (Butler *et al.*, 1992, Paeile y Bilbeny, 2005<sup>4</sup>).

Tras la aplicación de AFC en la rata, pueden inducirse dos tipos de cuadro artrítico: uno poliartístico severo, cuando el AFC es inyectado en la base de la cola y otro monoartístico, al inyectarlo en la cavidad de la articulación tibio-tarsal. El cuadro poliartístico produce en el animal un gran compromiso sistémico, observándose una renuencia al movimiento, pérdida de peso, afectación del pelaje y agresividad. En el cuadro monoartístico en cambio, el compromiso sistémico es prácticamente inexistente, lo cual se verifica por la ausencia de cambios significativos en la ganancia de peso.

Adicionalmente, el animal es capaz de desarrollar una conducta adaptativa antálgica, desplazándose con la pata afectada elevada (Paeile y Bilbeny, 2005<sup>4</sup>). En conclusión, las características del cuadro monoartrítico suponen claras ventajas éticas y técnicas respecto al cuadro poliartrítico, por lo cual, en el último tiempo, este modelo ha sido considerado la mejor alternativa para estudios conductuales y electrofisiológicos de la fisiofarmacología del dolor y ha sido extensamente utilizado en estos tipos de estudios (Laurido *et al.*, 2001, Pelissier *et al.*, 2001, Butler y Weil-Fugazza, 1994).

## **V. HIPÓTESIS**

La administración conjunta de fármacos antagonistas de distintos sitios de modulación del receptor NMDA produce efectos antinociceptivos sinérgicos en ratas con dolor crónico monoartrítico.

## **VI. OBJETIVOS**

### **1. Objetivo General**

Estudiar la acción antinociceptiva de fármacos antagonistas del NMDA y la interacción entre ellos en ratas con dolor crónico monoartrítico.

### **2. Objetivos Específicos**

**2.1.** Evaluar el efecto antinociceptivo de diferentes dosis intratecales de ketamina en ratas monoartríticas.

**2.2.** Evaluar el efecto antinociceptivo de diferentes dosis intratecales de ( $\pm$ ) CPP en ratas monoartríticas.

**2.3.** Evaluar el efecto antinociceptivo de diferentes combinaciones de dosis de ketamina y ( $\pm$ ) CPP, administrados conjuntamente en ratas monoartríticas.

**2.4.** Comparar los efectos antinociceptivos de ketamina, ( $\pm$ ) CPP y de la asociación ketamina/( $\pm$ ) CPP.

## VII. MATERIALES Y MÉTODOS

### 1. Muestra

Los experimentos se realizaron en ratas machos adultas de la cepa *Sprague-Dawley*, monoartríticas, de 250 a 350 gramos, criadas con un régimen de luz de 12 hrs. por día y alimentadas a base de alimento comercial para ratas (*Champion*<sup>®</sup>) y agua *ad-libitum*. En resguardo del bienestar de los animales usados en este trabajo se aplicaron rigurosamente las normas éticas de experimentación animal estipuladas por la International Association for the Study of Pain (The committee for research and ethical issues of I.A.S.P., 1980). Esto especialmente en lo que se refiere a utilizar un número mínimo de animales, emplear cada animal en un solo experimento, no prolongar excesivamente el ensayo algesimétrico y sacrificar los animales de forma humanitaria inmediatamente después del ensayo, para lo que se administró un anestésico general en sobredosis (10 g/kg de uretano i.p.).

En los grupos experimentales se utilizaron ratas con una artritis inducida según la técnica indicada por Butler *et al.*, 1992. Esta técnica emplea ratas que han alcanzando dos meses de edad o 150 g de peso, siendo en este momento inoculadas en su articulación tibio-tarsal derecha con un volumen de 50 µl de adyuvante completo de

Freund, el cual contiene 300 µg de *Mycobacterium butiricum*. Tal procedimiento produce un cuadro artrítico localizado, que se torna estable alrededor de la 4ta semana post-inoculación. En este trabajo se utilizaron las ratas con artritis inducida una vez que completaron 4 semanas luego de la administración del adyuvante.

## **2. Preparación del Adyuvante de Freund**

Se mezclaron 6 ml de aceite mineral, 4 ml de cloruro de sodio 0.9% y 1 ml de Tween 80; se agitó durante 5 min. y luego se añadieron 60 mg de restos liofilizados de *Mycobacterium butiricum* sin dejar de agitar, de acuerdo al protocolo descrito por Butler *et al.*, 1992. Posteriormente, esta mezcla se autoclavó a 120° C por 20 min. y se guardó a temperatura ambiente hasta su uso. Previamente a la inyección se debió homogeneizar la solución, manteniendo una agitación continua.

## **3. Inducción del cuadro monoartrítico**

Luego de la administración del adyuvante de Freund, se observó una inflamación aguda localizada en la articulación tibio-tarsal, que se prolongó por dos semanas. A partir de la tercera semana la inflamación se estabilizó y la condición general de la rata se mantuvo sin diferencias con las ratas normales, pero se observó un aumento

significativo del diámetro de la articulación comprometida y la movilidad habitual del animal se redujo. A partir de la cuarta semana, las ratas tratadas se utilizaron como modelo de dolor crónico

#### **4. Grupos Experimentales**

Los grupos experimentales, estuvieron constituidos a lo menos por 5 animales para el grupo de suero fisiológico y para cada dosis de fármaco estudiada.

#### **5. Fármacos utilizados**

- Ketamina: *Imalgene 1000*<sup>®</sup>, Laboratorio Rodia Merieux de Chile.
- (±) CPP (ácido 3-(2-carboxipiperazin-4) propil 1-fosfónico), Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.
- Uretano, Laboratorio Merck
- Atropina clorhidrato, Laboratorio Sanderson S.A.
- Cloruro de sodio, Laboratorio Sanderson S.A.

Los fármacos se administraron diluidos en cloruro de sodio al 0,9%. La administración intratecal se realizó directamente, mediante una inyección transcutánea

en el espacio intervertebral entre la quinta y sexta vértebras lumbares, según la técnica descrita por Mestre *et al.*, 1994 (Fig. 5). Las dosis seleccionadas fueron calculadas para estar contenidas siempre en 10 uL de suero fisiológico y éste fue el volumen inyectado para cada rata.

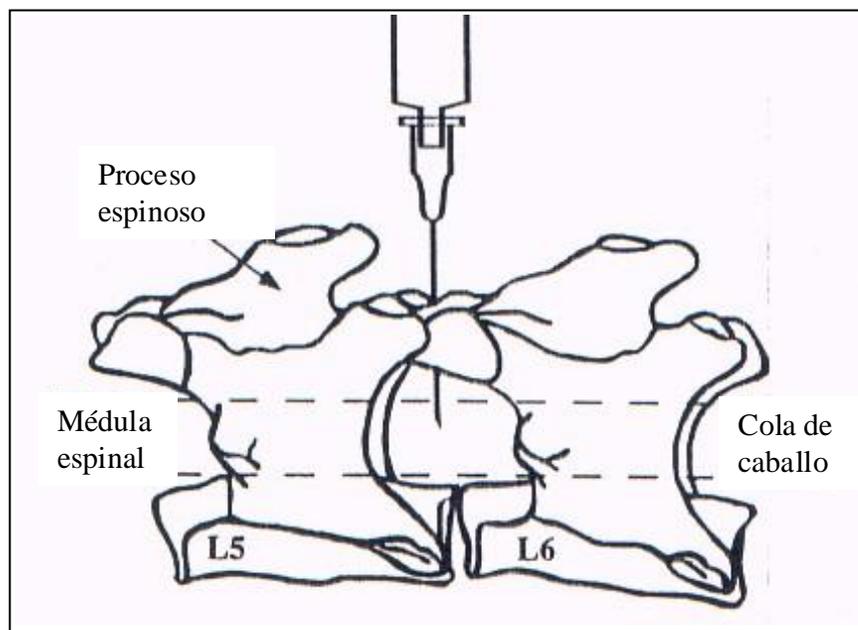


Figura 5

Técnica de administración intratecal de fármacos entre las vértebras lumbares 5 y 6 (L5 y L6) (Mestre *et al.*, 1994).

## 6. Instrumentos de electrofisiología y monitorización

- Electroodos de platino de estimulación y registro
- Electroestimulador Grass S-11.
- Unidad de corriente constante Grass CCU-1.
- Pre-amplificador Grass P-511.
- Computador I-Mac, programa CHART v4.2, con equipo de digitalización PowerLab 2/20.

## 7. Procedimientos preliminares

Inicialmente las ratas fueron inyectadas con uretano al 25% adaptando la dosis al peso de la rata (1,5 g/kg), vía intraperitoneal y con atropina subcutánea 1mg/kg de peso, para evitar posibles complicaciones con las secreciones bronquiales. Al cabo de 20 minutos, la rata quedó en un nivel de anestesia superficial que permitió poner los electrodos en los orjejos 4 y 5, territorio inervado por el nervio sural, para cuantificar la actividad electromiográfica que se registró desde el músculo *biceps femoris* ipsilateral y que posteriormente se registró en un computador usando el programa CHART v4.2.

## 8. Metodología algesimétrica

El método que se usó para cuantificar la actividad antinociceptiva de los fármacos antes mencionados, es el propuesto por Falinower, *et al.*, 1994. Esta metodología consiste fundamentalmente en la medición del reflejo de retirada, provocado por la estimulación eléctrica de las fibras C del nervio sural del miembro posterior de la pata de la rata anestesiada. La estimulación nociceptiva se realizó en el territorio que inerva el nervio sural en los orjejos 4 y 5 (los orjejos corresponden a los dedos del pie del animal) mediante dos finos electrodos de platino, comandados desde un estimulador ajustado para entregar estímulos de 2 milisegundos (ms) de duración, a una frecuencia que varía entre 0,1 y 1,0 Hz., según el tipo de estimulación requerida. Una unidad de corriente constante conectada en serie, permitió manejar la intensidad de estimulación. La respuesta muscular se estudió por la actividad electromiográfica (EMG) que desarrolló el músculo *biceps femoris* ipsilateral al estímulo, la cual se registró mediante un par de electrodos de platino que se insertaron en el músculo a través de la piel. Luego la señal se amplificó con un pre-amplificador y se digitalizó usando el PowerLab 2/20 y finalmente fue procesada mediante el programa computacional CHART v4.2. Sólo se registró entre los 150 y 450 ms, ya que es en este período en el que aparecen las respuestas provocadas por la estimulación lenta conducida por las fibras C.

Luego de un período de estabilización de 15 minutos como mínimo, se procedió a buscar el umbral de estimulación, y una vez determinado, se aplicó a la rata una estimulación de dos veces el umbral a una frecuencia de 0,1 Hz. por otros 15 minutos. Luego, se inició el experimento con una estimulación de doble umbral (el que se mantuvo constante a lo largo de todo el experimento) y una frecuencia de 1,0 Hz. para lograr el fenómeno neurofisiológico de *wind-up*, y se obtuvo valores basales tanto para el reflejo C como para el *wind-up*. Posteriormente, se inyectó vía intratecal el suero o los fármacos en estudio y se realizaron mediciones a los cinco, quince y treinta minutos, efectuando en cada uno de ellos un reflejo C y un *wind-up*. En cada animal se ensayó una dosis de un determinado fármaco.

## **9. Dosis Empleadas**

Las dosis de ketamina y ( $\pm$ ) CPP empleadas fueron escogidas considerando los efectos obtenidos en trabajos similares publicados en la literatura, buscando magnitudes de efecto antinociceptivo que permitieron realizar una curva de relación dosis-efecto. En cada caso, se calculó la dosis que produjo el 12,5% del efecto antinociceptivo máximo, dosis efectiva 12,5 ( $DE_{12,5}$ ), la que fue obtenida mediante un programa Excel (existente en la página web [http://icbm.cl/prog\\_farm\\_mol\\_clin/isobologram\\_calculations/](http://icbm.cl/prog_farm_mol_clin/isobologram_calculations/)), modificación del método propuesto por Tallarida, 2000.

Para evaluar la posible interacción entre ketamina y ( $\pm$ ) CPP, se utilizó el mismo programa Excel, que permite realizar un análisis isoblográfico para las diferentes combinaciones, tal como lo describió Tallarida, 2000. Para tal efecto, se utilizaron proporciones fijas de ketamina y ( $\pm$ ) CPP. El isoblograma fue construido conectando la  $DE_{12,5}$  de ketamina en la abscisa con la  $DE_{12,5}$  de ( $\pm$ ) CPP en la ordenada, para obtener la línea de aditividad.

Una vez obtenida la  $DE_{12,5}$  experimental y su intervalo de confianza asociado, se comparó a la  $DE_{12,5}$  de adición teórica ( $DE_{12,5}$  add) mediante un test  $t$  de Student. La  $DE_{12,5}$  de adición teórica se obtuvo a través del cálculo:  $DE_{12,5}$  add =  $DE_{12,5}$  fármaco A ( $P1 + R * P2$ ) donde  $R$  es la relación de potencia del fármaco A (sólo ketamina) al fármaco B (sólo ( $\pm$ ) CPP),  $P1$  es la proporción de fármaco A, y  $P2$  es la proporción del fármaco B en la mezcla total. En el presente estudio, las proporciones en relación fija fueron seleccionadas mediante una primera combinación de dosis con la  $DE_{12,5}$  de A y B y luego  $1/2$ ,  $1/8$  ó  $1/32$  de la  $DE_{12,5}$ , obtenida en las ratas monoartríticas, con lo cual se construyó la curva dosis-respuesta de la asociación.

## 10. Expresión de Resultados

Los resultados se expresaron como una media del porcentaje del efecto antinociceptivo  $\pm$  error estándar (ES) para cada grupo de animales, respecto a la basal, obtenida previa a la inyección de suero o de cada uno de los fármacos en estudio, según el caso, ya que cada animal constituyó su propio control.

La cuantificación del efecto antinociceptivo (% EA) de los fármacos ensayados, se calculó como un porcentaje de variación del área bajo la curva (ABC) respecto al valor inicial (basal) para cada rata, tanto para el reflejo C como para el *wind-up*, con la fórmula siguiente:

$$\% \text{ EA} = 100 - (ABC_{\text{post}} / ABC_{\text{pre}}) * 100$$

donde  $ABC_{\text{post}}$  y  $ABC_{\text{pre}}$  son las integrales aproximadas de las curvas obtenidas por el método de los trapecios, post y pre inyección del fármaco respectivamente.

Los datos fueron analizados utilizando análisis de varianza (ANOVA) de una vía seguido del test de Tukey-Kramer para comparaciones múltiples entre grupos. Para todos los resultados el nivel de significancia se estableció en  $p < 0,05$  y se graficó de la siguiente forma:  $p < 0,05 = *$ ,  $p < 0,01 = **$  y  $p < 0,001 = ***$ .

## VIII. RESULTADOS

### A. REFLEJO NOCICEPTIVO C

#### 1. Efecto de la administración de cloruro de sodio intratecal

La administración de cloruro de sodio al 0,9%, en la rata monoartrítica, produjo una variación de la integral del reflejo C (ABC) de  $-3,35 \pm 6,54$  % (n = 10), la que no fue estadísticamente significativa respecto a su basal.

#### 2. Efecto de la administración de ketamina intratecal

En la rata monoartrítica, la administración intratecal de ketamina produjo una disminución dosis-dependiente de la respuesta nociceptiva. Las dosis de 10, 30, y 100  $\mu\text{g}$  produjeron una disminución de efecto de  $1,64 \pm 1,69$  % (n = 7),  $11,46 \pm 3,50$  % (n = 8) y  $19,09 \pm 7,28$  % (n = 6) respectivamente, resultados que no fueron significativos respecto a los controles. La dosis de 300 y 600  $\mu\text{g}$  mostraron un cambio estadísticamente significativo del ABC en el reflejo C, con una disminución del  $24,90 \pm 7,14$  % (n = 7) ( $P < 0,01$ ) y  $36,79 \pm 8,52$  % (n = 8) ( $P < 0,001$ ) respectivamente (Fig. 6A). Se calculó la

DE<sub>12,5</sub> la que fue de 42,89 µg/rata de ketamina con un intervalo de confianza del 95% entre 25,02 µg/rata y 73,52 µg/rata (Fig. 6B).

### **3. Efecto de la administración de (±) CPP intratecal**

En la rata monoartrítica la inyección intratecal de (±) CPP produjo una disminución dosis-dependiente de la ABC. La magnitud de esta variación con la dosis de 2,5 µg, 7,5 µg y 25,0 µg fue de  $-6,98 \pm 12,91$  % (n = 8),  $10,17 \pm 8,79$  % (n = 11) y  $28,76 \pm 10,64$  % (n = 9) respectivamente, las que no fueron significativamente diferentes a su control pre inyección. La dosis de 75,0 µg produjo una disminución de  $54,89 \pm 10,92$ % (n = 7), disminución que fue estadísticamente significativa (P < 0,01) respecto al control. (Fig. 7A). Se calculó la dosis efectiva 12,5 (DE<sub>12,5</sub>), la que fue de 8,27 µg/rata con un intervalo de confianza del 95% entre 4,53 µg/rata y 15,11 µg/rata (Fig. 7B).

### **4. Efecto de la administración de la combinación ketamina/(±) CPP intratecal**

En la rata monoartrítica, la administración intratecal de la combinación ketamina/(±) CPP produjo una disminución dosis-dependiente de la respuesta nociceptiva. Las dosis de 25,58, 51,16, 76,74 y 102,32 (21,45/4,13, 42,89/8,27, 64,34/12,40 y 85,78/16,54 de cada fármaco respectivamente) produjeron una

disminución de efecto de  $26,58 \pm 8,47$  % (n = 5) (P < 0,05),  $41,56 \pm 7,93$  % (n = 5) (P < 0,001),  $68,21 \pm 4,48$  % (n = 4) (P < 0,001) y  $77,43 \pm 2,13$  % (n = 5) (P < 0,01) respectivamente (Fig. 8A). Se calculó la  $DE_{12,5}$  la que fue de 19,16  $\mu\text{g/rata}$  de ketamina/( $\pm$ ) CPP con un intervalo de confianza al 95% de 13,98 y 26,16 (Fig. 8B), mostrando sólo un efecto aditivo respecto a la administración de cada fármaco por separado.

## **5. Análisis isoblográfico de la asociación de ketamina /(±) CPP en el reflejo.**

La dosis efectiva 12,5 ( $DE_{12,5}$ ) de la combinación ketamina/( $\pm$ ) CPP en las ratas monoartríticas produjo solamente un efecto aditivo en el reflejo (Fig. 9).

## **B. WIND-UP**

### **1. Efecto de la administración de cloruro de sodio intratecal**

La administración de cloruro de sodio al 0,9%, en las ratas monoartríticas, produjo una variación del ABC para el *wind-up* de  $2,08 \pm 5,88$  % (n =10), la que no fue estadísticamente significativa respecto a su propio control.

## 2. Efecto de la administración de ketamina intratecal

En la rata monoartrítica, la administración intratecal de ketamina produjo una disminución dosis-dependiente de la respuesta nociceptiva en el *wind-up*. Las dosis de 10, 30, 100 y 300  $\mu\text{g}$  produjeron una disminución de efecto de  $6,67 \pm 6,50 \%$  ( $n = 8$ ),  $10,51 \pm 5,31 \%$  ( $n = 6$ ),  $22,77 \pm 4,88 \%$  ( $n = 7$ ) y  $28,37 \pm 8,41 \%$  ( $n = 8$ ) respectivamente, resultados que no fueron significativos respecto a los controles. La dosis de 600  $\mu\text{g}$  mostró un cambio estadísticamente significativo ( $p < 0,05$ ) del ABC en el *wind-up*, con una disminución del  $33,60 \pm 8,76\%$  ( $n = 6$ ) (Fig. 10A). Se calculó la  $DE_{12,5}$  la que fue de 27,32  $\mu\text{g/rata}$  de ketamina con un intervalo de confianza del 95% entre 10,89  $\mu\text{g/rata}$  y 68,10  $\mu\text{g/rata}$  (Fig. 10B).

## 3. Efecto de la administración de ( $\pm$ ) CPP intratecal

En la rata monoartrítica la inyección intratecal de ( $\pm$ ) CPP produjo una disminución dosis-dependiente de la integral del *wind-up* (ABC). La magnitud de esta variación con la dosis de 2,5  $\mu\text{g}$  y 7,5  $\mu\text{g}$  fue de  $14,36 \pm 10,55 \%$  ( $n = 8$ ) y  $22,29 \pm 7,66 \%$  ( $n = 7$ ) respectivamente, las que no fueron significativamente diferentes a su control pre inyección. Las dosis de 25,0 y 75,0  $\mu\text{g}$  produjeron una disminución de  $56,68 \pm 12,12 \%$  ( $n = 7$ ) y  $53,82 \pm 12,93 \%$  ( $n = 5$ ) respectivamente, disminuciones que fueron

estadísticamente significativas ( $P < 0,01$ ) respecto a sus controles (Fig. 11A). Se calculó la dosis efectiva 12,5 ( $DE_{12,5}$ ), la que fue de  $2,56 \mu\text{g/rata}$ , con un intervalo de confianza del 95% entre  $1,16 \mu\text{g/rata}$  y  $5,62 \mu\text{g/rata}$  (Fig. 11B).

#### **4. Efecto de la administración de combinación ketamina /( $\pm$ ) CPP intratecal**

En la rata monoartrítica, la administración intratecal de la combinación ketamina/( $\pm$ ) CPP produjo una disminución dosis-dependiente de la respuesta nociceptiva en el *wind-up*. Las dosis de  $25,58 \mu\text{g}$  ( $21,45/4,13$ ) y  $51,16 \mu\text{g}$  ( $42,89/8,27$ ) produjeron una disminución de efecto en el *wind-up* de  $5,83 \pm 8,59 \%$  ( $n = 5$ ) y  $24,47 \pm 9,96 \%$  ( $n = 5$ ) respectivamente, las que no fueron diferentes al control. Las dosis de  $76,74 \mu\text{g}$  ( $64,34/12,40$ ) y  $102,32 \mu\text{g}$  ( $85,78/16,54$ ) de ketamina/( $\pm$ ) CPP respectivamente, produjeron una disminución significativa del *wind-up* de  $65,07 \pm 1,53\%$  ( $n = 4$ ;  $P < 0,001$ ) y  $85,92 \pm 2,68 \%$  ( $n = 5$ ;  $P < 0,001$ ), respectivamente (Fig. 12A). Se calculó la  $DE_{12,5}$  la que fue de  $16,18 \mu\text{g/rata}$  de ketamina/( $\pm$ ) CPP, con un intervalo de confianza al 95% de  $13,08$  y  $20,01$  (Fig. 12B).

**5. Análisis isobolográfico de la asociación ( $\pm$ ) CPP/ketamina en el *wind-up*.**

La dosis efectiva 12,5 ( $DE_{12,5}$ ) de la combinación ketamina/ $(\pm)$  CPP en las ratas monoartríticas produjo solamente un efecto aditivo en el *wind-up* (Fig. 13).

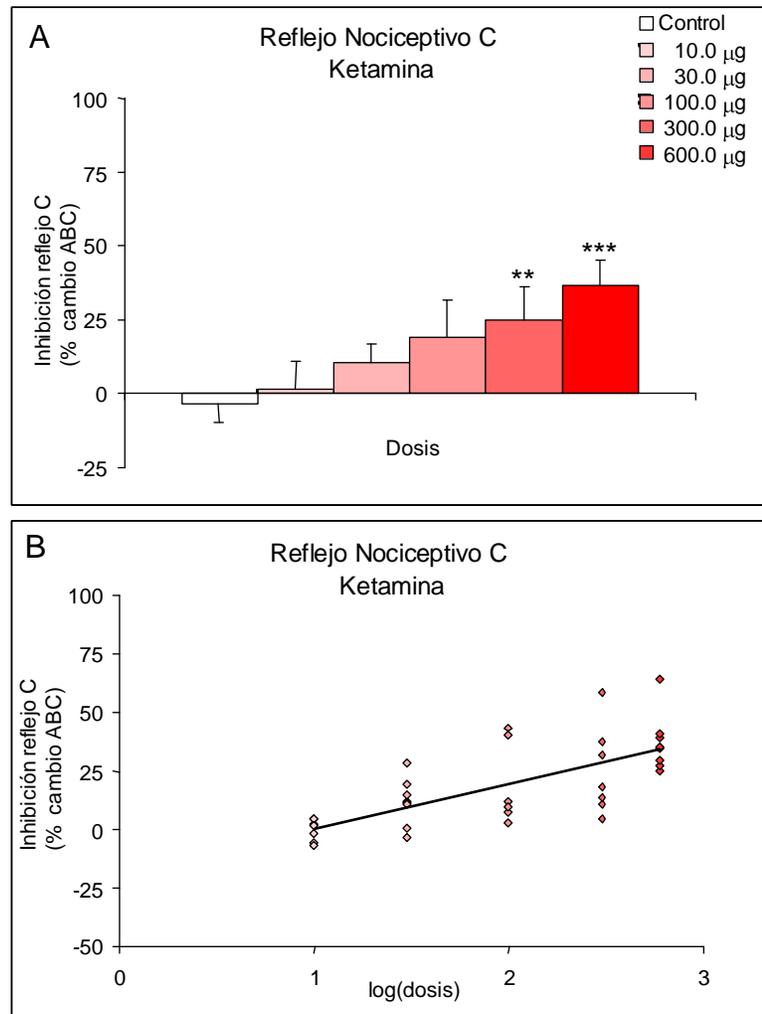


Figura 6

A. Área bajo la curva del efecto antinociceptivo en el reflejo C de ketamina i.t. en la rata monoartrítica comparado a NaCl al 0,9%. Las significancias respecto al control están indicadas por asteriscos. B. Curva dosis-respuesta del efecto ketamina i.t. en ratas monoartríticas expresado en logaritmo de la dosis. La  $DE_{12,5}$  para ketamina intratecal fue de 42,89  $\mu\text{g}/\text{rata}$  con un intervalo de confianza del 95% entre 25,02  $\mu\text{g}/\text{rata}$  y 73,52  $\mu\text{g}/\text{rata}$ .

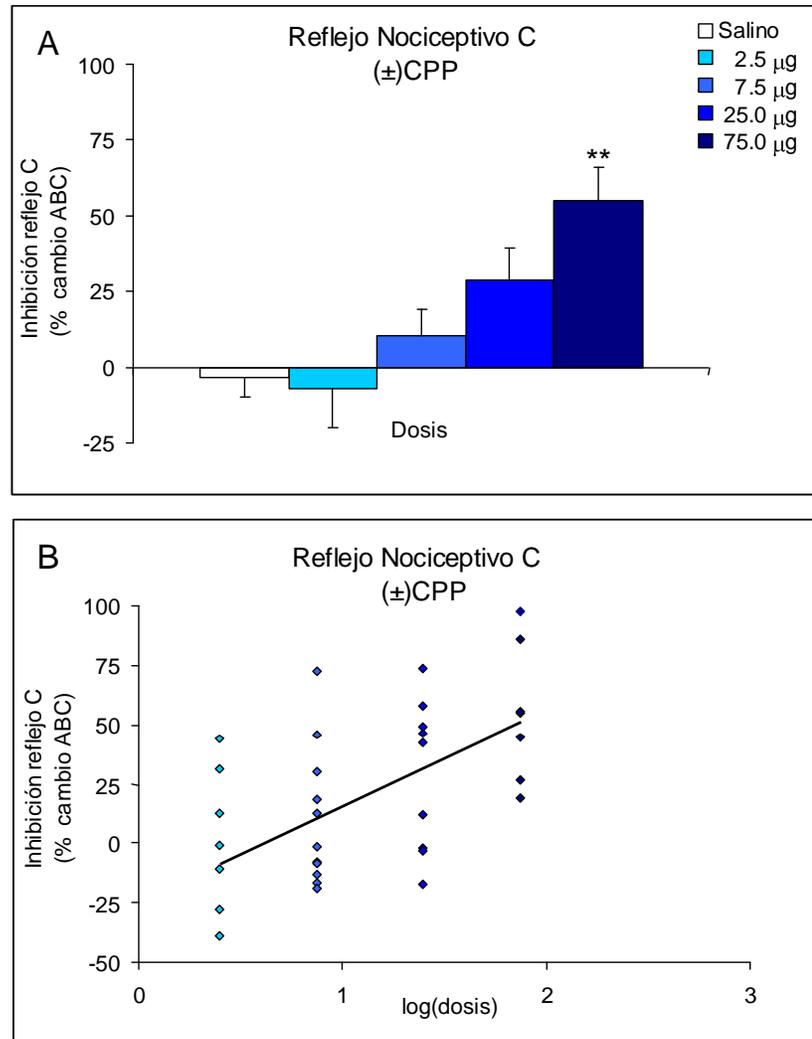


Figura 7

A. Área bajo la curva del efecto antinociceptivo en el reflejo C de ( $\pm$ ) CPP i.t. en la rata monoartrítica comparado a NaCl al 0,9%. Las significancias respecto al control están indicadas por asteriscos. B. Curva dosis-respuesta del efecto ( $\pm$ ) CPP i.t. en ratas monoartríticas expresado en logaritmo de la dosis. La dosis efectiva  $DE_{12,5}$  para ( $\pm$ ) CPP intratecal fue de 8,27  $\mu$ g/rata con un intervalo de confianza del 95% entre 4,53  $\mu$ g/rata y 15,11  $\mu$ g/rata.

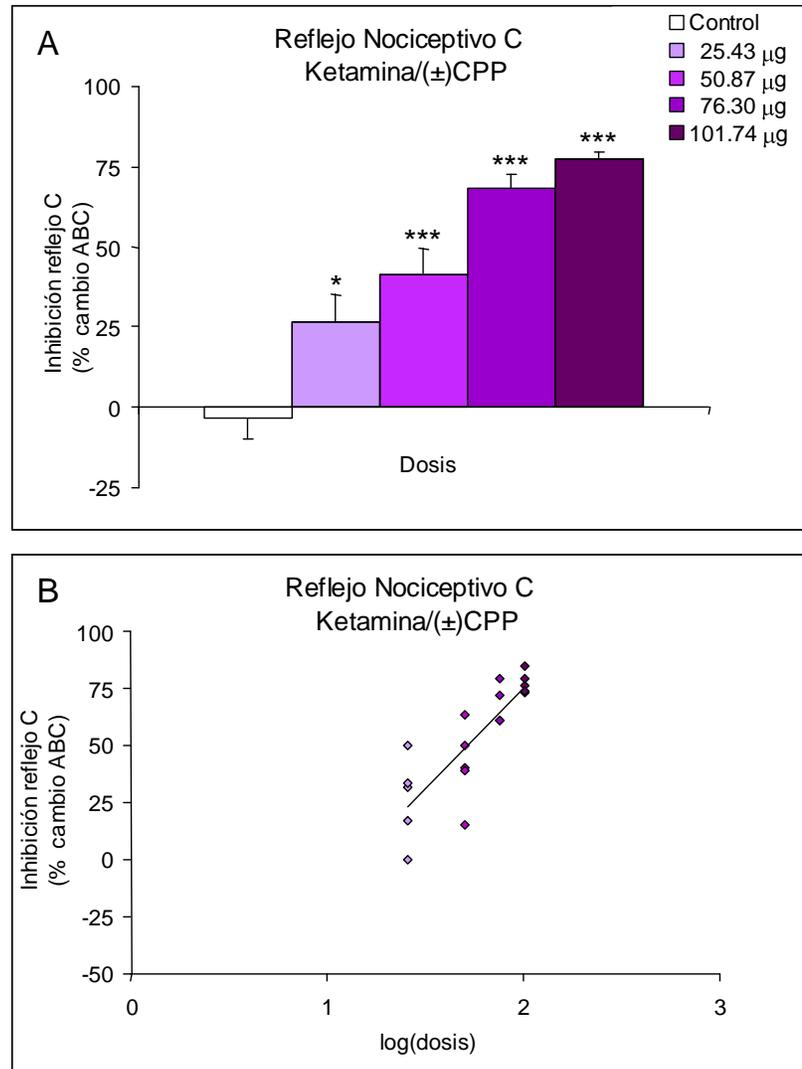


Figura 8

A. Área bajo la curva del efecto antinociceptivo en el reflejo C de (±) CPP/ketamina i.t. en la rata monoartrítica comparado a NaCl al 0,9%. Las significancias respecto al control están indicadas por asteriscos. B. Curva dosis-respuesta del efecto (±) CPP i.t. en ratas monoartríticas expresado en logaritmo de la dosis. La  $DE_{12,5}$  de (±) CPP/ketamina fue de 19,16 μg/rata, con un intervalo de confianza al 95% de 13,98 y 26,16.

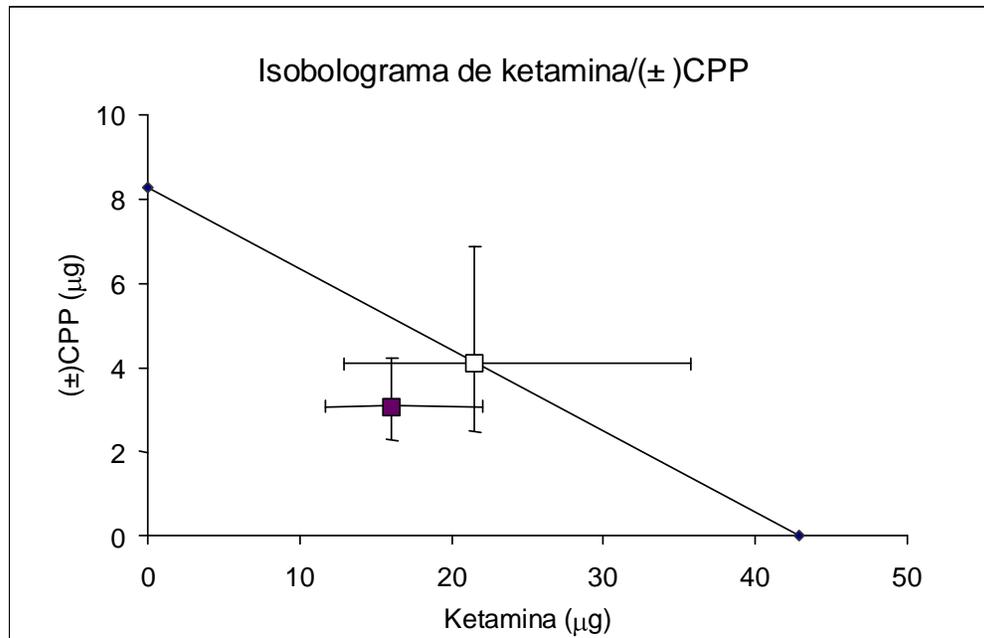


Figura 9

Isoblograma para la co-administración de ketamina y ( $\pm$ ) CPP. El cuadrado cerrado corresponde al punto experimental con el límite de confianza del 95% y el cuadrado abierto corresponde al cálculo teórico del punto aditivo. Los límites de confianza para ambos puntos están graficados en los cuadrados correspondientes. La combinación muestra sólo un efecto aditivo respecto a la administración de cada fármaco por separado.

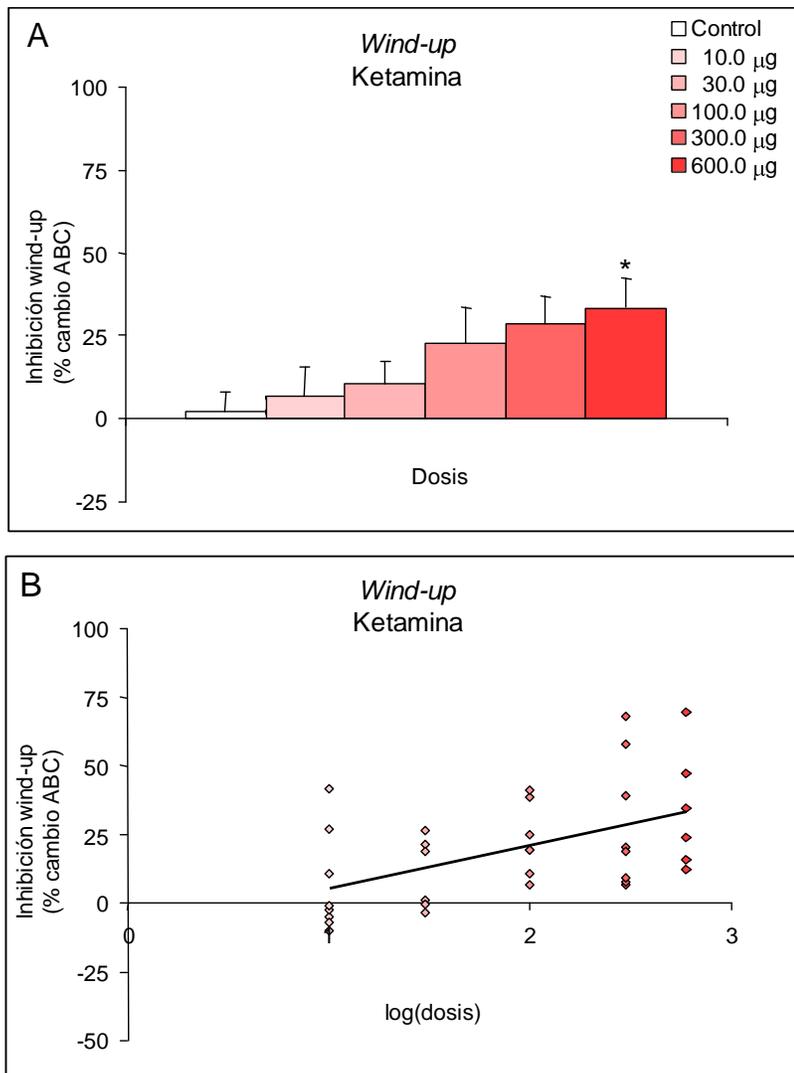


Figura 10

A. Área bajo la curva del efecto antinociceptivo en el *wind-up* de ( $\pm$ ) CPP i.t. en la rata monoartrítica comparado a NaCl al 0,9%. Las significancias respecto al control están indicadas por asteriscos. B. Curva dosis-respuesta del efecto ( $\pm$ ) CPP i.t. en ratas monoartríticas expresado en logaritmo de la dosis. La  $DE_{12,5}$  de ( $\pm$ ) CPP intratecal fue de 2,56  $\mu$ g/rata con un intervalo de confianza del 95% entre 1,16  $\mu$ g/rata y 5,62  $\mu$ g/rata.

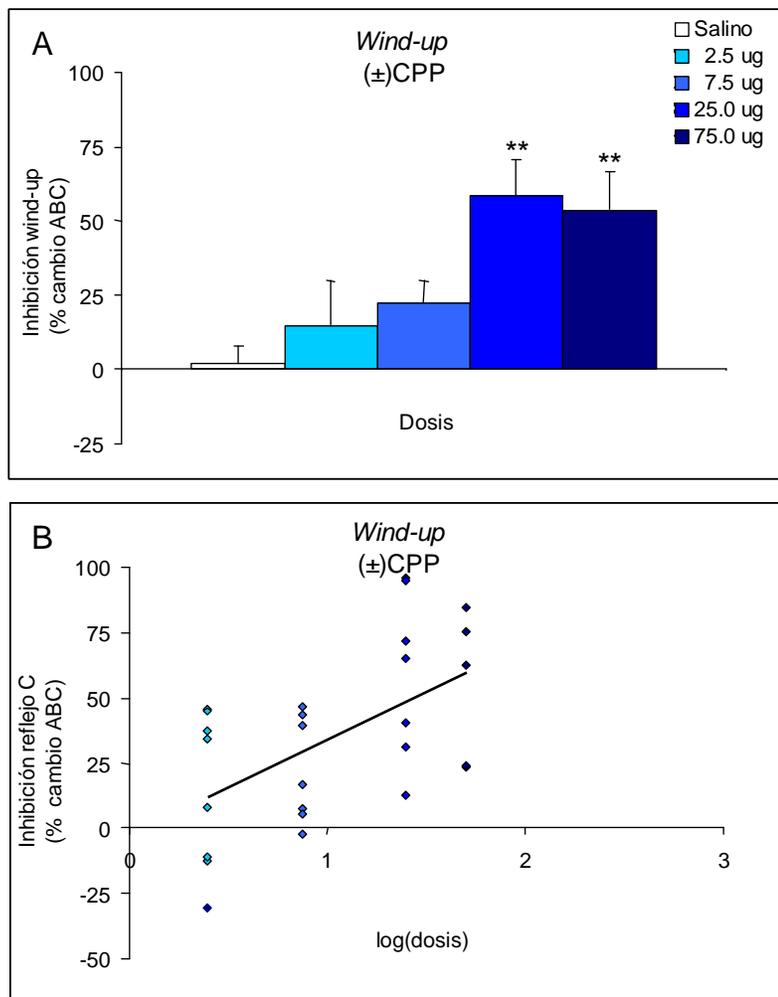


Figura 11

A. Área bajo la curva del efecto antinociceptivo en el *wind-up* de ketamina i.t. en la rata monoartrítica comparado a NaCl al 0,9%. Las significancias respecto al control están indicadas por asteriscos. B. Curva dosis-respuesta del efecto ketamina i.t. en ratas monoartríticas expresado en logaritmo de la dosis. La  $DE_{12,5}$  de ketamina intratecal fue de 27,32  $\mu$ g/rata de ketamina con un intervalo de confianza del 95% entre 10,89  $\mu$ g/rata y 68,10  $\mu$ g/rata.

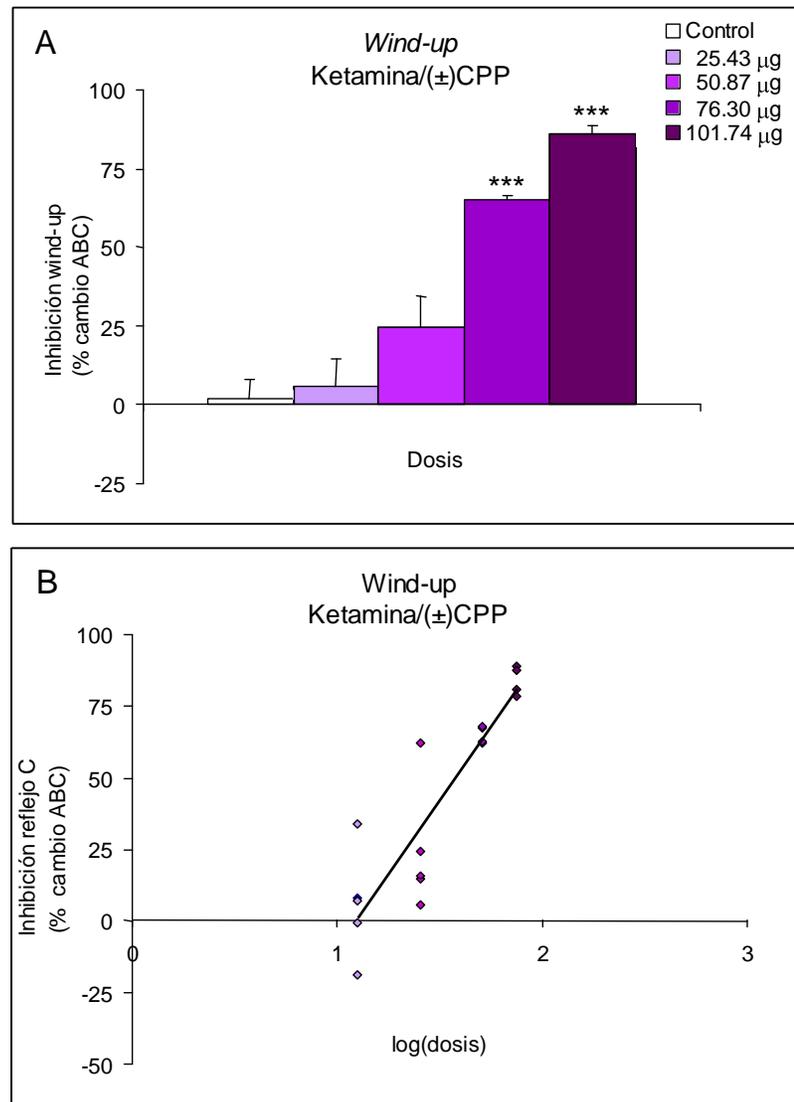


Figura 12

A. Área bajo la curva del efecto antinociceptivo en el *wind-up* de (±) CPP/ketamina i.t. en la rata monoartrítica comparado a NaCl al 0,9%. Las significancias respecto al control están indicadas por asteriscos. B. Curva dosis-respuesta del efecto ketamina/(±) CPP i.t. en ratas monoartríticas expresado en logaritmo de la dosis. La  $DE_{12,5}$  de (±) CPP /ketamina fue de 16,18 μg/rata con un intervalo de confianza al 95% de 13,08 y 20,01.

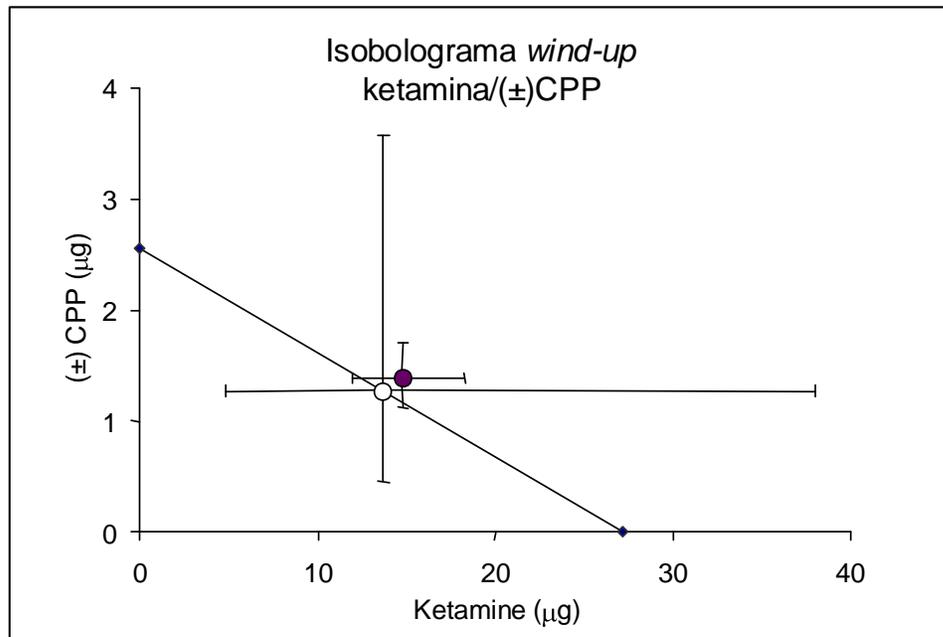


Figura 13

Isoblograma para la co-administración de ketamina y (±) CPP en el *wind-up*. El cuadrado cerrado corresponde al punto experimental con el límite de confianza del 95% y el cuadrado abierto corresponde al cálculo teórico del punto aditivo. Los límites de confianza para ambos puntos están graficados en los cuadrados correspondientes. La combinación muestra sólo un efecto aditivo respecto a la administración de cada fármaco por separado.

## IX. DISCUSIÓN

La hipótesis de este estudio postula que la administración conjunta de fármacos antagonistas de distintos sitios de modulación del receptor NMDA, produce efectos sinérgicos en ratas con dolor crónico monoartrítico.

Para verificar esta hipótesis se debió emplear un método adecuado para evaluar antinocicepción. El reflejo de fibras C constituye un test apropiado para evaluar el efecto de drogas antinociceptivas de acción central en dolor de tipo crónico, ya que este método permite estimular directamente el nervio sural a intensidades conocidas y repetibles, evitando así la medición de eventuales efectos periféricos en las terminaciones libres o en el tejido circundante. Asimismo, aumentando la frecuencia de estimulación (*wind-up*), se pudo evaluar los efectos de las drogas sobre los eventos adaptativos originados por el incremento del *input* nociceptivo que conlleva el dolor crónico. Estas características hacen que el reflejo de fibras C y el *wind-up* espinal sean un método algesimétrico objetivo, que ha sido utilizado con éxito en la medición del dolor por diversos autores.

Los resultados obtenidos muestran que en las ratas monoartríticas, tanto ( $\pm$ ) CPP como ketamina, ejercieron un efecto antinociceptivo moderado en el reflejo integrado C, obtenido por estimulación a baja frecuencia, así como en el *wind-up* obtenido por estimulación de alta frecuencia. Al respecto, sólo la dosis mayor de ( $\pm$ ) CPP y ketamina fue capaz de provocar un efecto antinociceptivo significativo en ambos tests. La

moderada acción antinociceptiva de los fármacos observada en el reflejo C, se debe probablemente al rol menor que juegan los receptores NMDA frente a estímulos nociceptivos aislados (dolor fásico o agudo). En efecto, la literatura señala que los receptores NMDA solo se hacen funcionales frente a estimulación repetida, una vez que el bloqueo que ejerce el ión magnesio ha sido retirado (Woolf y Thompson, 1991), lo que concuerda con el escaso efecto antinociceptivo que ejercen los antagonistas del receptor NMDA en condiciones de dolor agudo (Neira y Ortega, 2004, Parsons, 2001). A pesar de ello, los efectos antinociceptivos ejercidos por ( $\pm$ ) CPP y ketamina fueron dosis-dependientes, cinética que es compatible con efectos farmacológicos dependientes de receptores, donde los receptores están en cantidades finitas y el ligando se aumenta paulatinamente (Miranda y Pinardi, 1997). Cuando se estimuló en forma repetida el nervio sural (*wind-up*), estímulo semejante al dolor crónico, se observó un ligero aumento del efecto de estos fármacos, mostrando que no bastaría bloquear un sitio individual de modulación del receptor NMDA para que se inactive totalmente el efecto del glutamato, que es el responsable final de los fenómenos adaptativos observados en el dolor crónico.

Los resultados también mostraron que el efecto antinociceptivo de los dos antagonistas del receptor NMDA utilizados, varía dependiendo del mecanismo de acción. Así, la dosis de ( $\pm$ ) CPP y ketamina que redujo en 12,5% ( $DE_{12,5}$ ) el área bajo la curva del reflejo integrado C fue 8,27 y 42,59  $\mu\text{g/rata i.t.}$ , respectivamente. Es probable

que la mayor efectividad de ( $\pm$ ) CPP para deprimir el reflejo C, en comparación a ketamina, se deba a su capacidad de competir con el glutamato endógeno en el sitio de reconocimiento del receptor NMDA, mecanismo que le permite operar en todos los receptores NMDA disponibles. En cambio, ketamina sólo se une a receptores NMDA cuyo canal se encuentra en estado activado, lo que puede reducir sus posibilidades de acción.

A pesar de la mayor eficacia que mostró ( $\pm$ ) CPP en comparación a ketamina, indicada por una menor  $DE_{12.5}$ , los efectos de ambos fármacos deben ser categorizados como pobres. En efecto, ( $\pm$ ) CPP deprimió en algo más de 50% el reflejo C y el *wind-up* espinal sólo con las dosis mayores utilizadas, mientras que ketamina nunca alcanzó un 50% de efectividad; todo esto a pesar que las dosis de ambos fármacos se elevaron hasta el nivel tóxico cero (determinado por la aparición de parálisis flácida del tren posterior, observada en tests conductuales realizados anteriormente en este laboratorio), lo que obligó a expresar sus eficacias en términos de  $DE_{12.5}$ .

Ambos fármacos, ( $\pm$ ) CPP y ketamina, han sido ya utilizados por vía intratecal en humanos para la farmacoterapia del dolor, con éxito variable. ( $\pm$ ) CPP i.t. se utilizó para el tratamiento de dolor neurogénico con resultados limitados (Kristensen *et al.*, 1992), mientras que ketamina i.t. combinada con morfina se ha empleado en el tratamiento de dolor neuropático de origen oncológico (Vranken *et al.*, 2005) y en combinación con anestésicos locales para tratar algunas formas de dolor postoperatorio

(Togal *et al.*, 2004), con cierto éxito que podría ser debido a un efecto sinérgico entre ellos. Estos resultados, aunque fragmentarios, apuntan a una analgesia moderada de estos fármacos en la clínica, del mismo modo que en el presente estudio.

Las combinaciones de dosis equiefectivas de ( $\pm$ ) CPP y ketamina, utilizadas en este estudio, produjeron una acción antinociceptiva sinérgica sólo de tipo aditivo, tanto en el reflejo integrado C como en el wind-up espinal. Teóricamente, podrían conseguirse efectos sinérgicos supra-aditivos cuando se administran simultáneamente dos drogas antinociceptivas que actúan en substratos anatómica y/o funcionalmente diferentes, los cuales pueden representar diferentes neuronas, diferentes receptores en una misma neurona, e incluso sitios diferentes de ligamen en un mismo receptor. Al respecto, estudios isoblográficos han demostrado que la combinación de antagonistas del receptor NMDA con antagonistas de receptores para taquicininas (Ren *et al.*, 1996) o con agonistas opioides (Horvarth *et al.*, 2001, Chen *et al.*, 2002, Pelissier *et al.*, 2001, Snijdelaar *et al.*, 2005), gabaérgicos (Nishiyama *et al.*, 1999) y  $\alpha_2$  adrenérgicos (Nishiyama *et al.*, 2001), producen antinocicepción supra-aditiva. Asimismo, se ha descrito que la administración intratecal de espermina (un modulador del sitio de poliaminas en el receptor NMDA) aumentó el efecto antinociceptivo de la administración intratecal de MK-801, un antagonista no competitivo del receptor NMDA, en el test de formalina (Coderre, 1993). Del mismo modo, la administración intratecal de ACEA 1021 (antagonista del sitio de glicina del receptor NMDA)

incrementó el efecto antinociceptivo de AP5 (antagonista competitivo del receptor NMDA), en dolor de origen térmico (Nishiyama, 2000). Sin embargo, en esos estudios no se resolvió si la naturaleza de las interacciones era aditiva o supra-aditiva. Los presentes resultados sugieren que la asociación intratecal de antagonistas competitivos y no competitivos del receptor NMDA, conduce solo a efectos antinociceptivos aditivos (sinergia de adición), al menos en animales monoartríticos anestesiados sometidos al paradigma del reflejo nociceptivo C.

En conclusión, los resultados obtenidos en el presente estudio niegan la hipótesis de que el efecto antinociceptivo de los antagonistas de receptores NMDA pueda mejorarse mediante la utilización de combinaciones de fármacos que actúen en sitios distintos del receptor, al menos cuando ellos son administrados por vía intratecal y en pruebas algesimétricas que utilizan animales anestesiados. En consecuencia, los presentes resultados argumentan desfavorablemente en relación a la posible utilización de asociaciones de antagonistas del receptor NMDA en futuras aplicaciones de orden clínico, con el objeto de reducir las dosis de cada fármaco necesarias para inducir analgesia y disminuir al mismo tiempo los efectos colaterales psicodislépticos a niveles quizás tolerables. Ciertamente se requiere de mayor investigación para obtener resultados concluyentes, en animales concientes y bajo administración sistémica de las drogas, así como estudiar en detalle las diversas asociaciones de fármacos que modulan

los receptores NMDA, con el objeto de intentar optimizar la analgesia y disminuir las reacciones adversas.

## X. CONCLUSIONES

1. En las ratas monoartríticas el reflejo C presenta moderada sensibilidad a ( $\pm$ ) CPP ( $DE_{12,5} = 8,27 \mu\text{g i.t.}$ ), sensibilidad que se incrementa frente al ensayo de estimulación repetitiva o *wind-up* ( $DE_{12,5} = 2,56 \mu\text{g i.t.}$ ). Estas observaciones indican que los antagonistas competitivos de glutamato inhiben moderadamente la transmisión nociceptiva de baja y alta frecuencia a nivel espinal en animales con monoartritis experimental, sugiriendo que la utilización de este tipo de fármacos (en dosis bajas no psicoactivas) puede representar una estrategia terapéutica válida, aunque insuficiente, para enfrentar en la clínica episodios de dolor artrítico.
2. En los animales monoartríticos el reflejo C presenta una pobre sensibilidad a ketamina ( $DE_{12,5} = 42,89 \mu\text{g i.t.}$ ), sensibilidad que mejora levemente frente al ensayo de estimulación repetitiva o *wind-up* ( $DE_{12,5} = 27,32 \mu\text{g i.t.}$ ). Este resultado indica que los antagonistas no competitivos del receptor NMDA que bloquean el canal sólo en receptores activados por glutamato, son incapaces de inhibir adecuadamente la transmisión nociceptiva de baja y alta frecuencia a nivel espinal en modelos de dolor monoartrítico y, por lo tanto, no constituyen una alternativa terapéutica para la artritis.

3. La combinación intratecal de ( $\pm$ ) CPP y ketamina produjo sólo sinergia aditiva en las ratas monoartríticas ( $DE_{12,5} = 42,59 \mu\text{g i.t.}$  en el reflejo integrado C, y  $DE_{12,5} = 42,59 \mu\text{g i.t.}$  en el *wind-up* espinal), la que no difiere estadísticamente de las  $DE_{12,5}$  de ( $\pm$ ) CPP y de ketamina en estos mismos parámetros. Este resultado indica que la asociación de antagonistas competitivos y no competitivos del receptor NMDA no representa una mejor alternativa que la administración de los fármacos individuales, al menos por vía intratecal y en animales anestesiados, lo que argumenta desfavorablemente en relación al uso de este tipo asociación de fármacos en clínica.

## XI. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

**American Veterinary Medical Association.** 1987. Proc. Colloquium on Recognition and Alleviation of Animal Pain and Distress. J Am Vet Med Assoc; 191:1186-1191.

**Anis, N.A., Berry, S.C., Burton, N.R. and Lodge, D.** 1983. The dissociative anaesthetics, ketamine and phenciclidine, selectively reduce excitation of central mammalian neurones by *N*-methyl-aspartate. Br. J. Pharmacol. 79: 565-575.

**Butler S.H., Godefroy F., Besson J.M. and Weil-Fugazza J.** 1992. A limited arthritic model for chronic pain studies in the rat. Pain 48:73-81.

**Butler S.H. and Weil-Fugazza J.** 1994. The foot bend procedure as test for chronic studies in a model of monoarthritis in the rat. Pharmacol Commun. 4: 327-34.

**Cerveró F. and Laird J.M.A.** 1995. Fisiología del dolor En: Aliaga L., et al (eds). Tratamiento del dolor teoría y práctica. Primera edición. Editorial MCR, Barcelona, 424 p., p. 9-25. Cap. 2.

**Coderre, T.J.** 1993. Potent analgesia induced in rats by combined action at PCP and polyamine recognition sites of the NMDA receptor complex. *Eur. J. Neurosci.* 5:390-393.

**Coderre T.J., Katz J., Vaccarino A.L. and Melzack R.** 1993. Contribution of central neuroplasticity to pathological pain: review of clinical and experimental evidence. *Pain* 52: 259-85.

**Chen, Y., Chan, S.Y., Ho, P.C.** 2002. Isobolographic analysis of the analgesic interactions between ketamine and tramadol. *J. Pharm. Pharmacol.* 54:623-631.

**Chia, Y.Y., Liu, K., Liu, Y.C., Chang, H. C. and Wong, C.S.** 1998. Adding ketamine in a multimodal patient-controlled epidural regimen reduces postoperative pain and analgesic consumption. *Anesth. Analg.* 86: 1245-1249.

**Chizh B.A.** 2002. Novel approaches to targeting glutamate receptors for the treatment of chronic pain: Review article. *Amino Acids* 23: 169-176.

**Dickenson A.H.** 1996. Pharmacology of pain transmission and control. En: Campbell J.N., ed. *Pain 1996 - an updated review*, Seattle, IASP Press, 581 p., p. 113-121.

**Dickenson, A.H.** 1997. NMDA receptor antagonists: interactions with opioids. *Acta Anaesthesiol. Scand.* 41: 112-115.

**Errando C.L., Sifre C. y Moliner S.** 2004. Utilización de ketamina para anestesia subaracnoidea durante hipovolemia. Estudio experimental preliminar en cerdos. *Rev. Esp. Anesthesiol. Reanim.* 51: 3-11.

**Falinower, S., Willer, J., Junien, J. and Le Bars, D.** 1994. A C-fibre reflex modulated by heterotopic noxious somatic stimuli in the rat. *J. Neurophysiol.* 72: 194-213.

**Feldman, R.S. Meyer, J.S. and Quenzer, L.F.** 1997. Principles of Neuropsychopharmacology. 10, 391-454.

**Harris, E.W., Ganong, A.H., Monaghan, D.T, Watkins, J.C. and Cotman, C.W.** 1986. Action of 3-((±)-2-carboxypiperazin-4-yl)-propyl-1-phosphonic acid (CPP): a new and highly potent antagonist of N-methyl-D-aspartate receptors in the hippocampus. *Brain Res.* 382: 174 – 177.

**Hewitt, D.J.** 2000. The use of NMDA-receptor antagonists in the treatment of chronic pain. *Clin. J. Pain* 16 Suppl: S73-S79.

**Horvath, G., Joo, G., Dobos, I., Klimscha, W., Toth, G., Benedek, G.** 2001. The synergistic antinociceptive interactions of endomorphin-1 with dexmedetomidine and/or S(+)-ketamine in rats. *Anesth. Analg.* 93:1018-1024.

**Ji R., Kohno T., Moore K and Woolf C.J.** 2003. Central sensitization and LTP: do pain and memory share similar mechanisms?. *Trends in Neurosciences* Vol.26 No.12: 696-705.

**Kristensen, J.D., Svensson, B., Gordh, T. Jr.** 1992. The NMDA-receptor antagonist CPP abolishes neurogenic 'wind-up pain' after intrathecal administration in humans. *Pain* 51: 249-253.

**Laurido C, Pelissier T, Pérez H, Flores F, Hernández A.** 2001 Effect of ketamine on spinal cord nociceptive transmission in normal and monoarthritic rats. *Neuroreport*, vol.12 (8):1551-1554.

**Le Bars D. and Willer J.C.** 2004. *Physiologie de la douleur.* EMC-Anesthésie Réanimation 1: 227–266.

**Lipton, S.A. and Rosenberg, P.A.** 1994. Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders. N. Engl. J. Med. 330: 613-622.

**Mediclopedia.** 2006. <http://www.iqb.es/diccio/a/al.htm>.

**Mestre, C., Pelissier, T., Fialip, J., Wilcox, G., Eschalier, A.** 1994. A method to perform direct transcutaneous intrathecal injection in rats. J. Pharmacol. Toxicol. Methods 32: 197-200.

**Millán M.J.** 2002. Descending control of pain. Progress in Neurobiology; 66: 355-477.

**Miranda, H., Pinardi, G.** 1997. Farmacodinamia. Editorial Mediterráneo, Chile.

**Neira, F., Ortega, J.L.** 2004. NMDA glutamatergic receptor antagonists for the management of chronic pain. Rev. Soc. Esp. Dolor 11: 210-222.

**Nishiyama, T., Gyermek, L., Lee, C., Kawasaki-Yatsugi, S., Yamaguchi, T.** 1999. Analgesic interaction between intrathecal midazolam and glutamate receptor antagonists on thermal-induced pain in rats. Anesthesiology 91:531-537.

**Nishiyama, T.** 2000. Interaction among NMDA receptor-, NMDA glycine site- and AMPA receptor antagonists in spinally mediated analgesia. *Can. J. Anaesth.* 47:693-698.

**Nishiyama, T., Gyermek, L., Lee, C., Kawasaki-Yatsugi, S., Yamaguchi, T., Hanaoka, K.** 2001. The analgesic interaction between intrathecal clonidine and glutamate receptor antagonists on thermal and formalin-induced pain in rats. *Anesth. Analg.* 92:725-732.

**Paeile J. y Bilbeny N<sup>1</sup>.** 2005. *El Dolor, de lo molecular a lo clínico*, Tercera edición, Ed. Mediterráneo, Santiago - Buenos Aires, 702 p., p. 23-41. Cap. 1.

**Paeile J. y Bilbeny N<sup>2</sup>.** 2005. *El Dolor, de lo molecular a lo clínico*, Tercera edición, Ed. Mediterráneo, Santiago - Buenos Aires, 702 p., p. 43-52. Cap. 2.

**Paeile J. y Bilbeny N<sup>3</sup>.** 2005. *El Dolor, de lo molecular a lo clínico*, Tercera edición, Ed. Mediterráneo, Santiago - Buenos Aires, 702 p., p. 53-70. Cap. 3.

**Paeile J. y Bilbeny N<sup>4</sup>.** 2005. *El Dolor, de lo molecular a lo clínico*, Tercera edición, Ed. Mediterráneo, Santiago - Buenos Aires, 702 p., p. 271-282. Cap. 19.

**Parsons, C.G.** 2001. NMDA receptors as targets for drug action in neuropathic pain.

Eur. J. Pharmacol. 429: 71-78.

**Pelissier, T., Hernandez, A., Mestre, C., Eschalier, A., Laurido, C., Paeile, C.,**

**Alvarez, P., Soto-Moyano, R.** 2001. Antinociceptive effect of clomipramine in monoarthritic rats as revealed by the paw pressure test and the C-fiber-evoked reflex.

Eur. J. Pharmacol. 416:51-57.

**Raigorodsky G. and Urca G.** 1990. Spinal antinociceptive effects of excitatory amino

acid antagonists: quisqualate modulates the action of N-methyl-D-aspartate. Eur. J.

Pharmacol. 182: 37-47.

**Ren, K., Iadarola, M.J., Dubner, R.** 1996. An isobolographic analysis of the effects of

N-methyl-D-aspartate and NK1 tachykinin receptor antagonists on inflammatory

hyperalgesia in the rat. Br. J. Pharmacol. 117:196-202.

**Russo C.M. and Brose W.G.** 1998. Chronic Pain. Annu. Rev. Medicine 49:123-133.

**Snijdelaar, D.G., van Rijn, C.M., Vinken, P., Meert, T.F.** 2005. Effects of pre-treatment with amantadine on morphine induced antinociception during second phase formalin responses in rats. *Pain* 119:159-167.

**Stucky, C. Gold, M. and Zhang, X.** 2001. Mechanisms of pain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98: 11845-11846.

**Suzuki, M., Tsueda, K., Lansing, P.S., Tolan, M.M., Fuhrman, T.M., Ignacio, C.I. and Sheppard, R.A.** 1999. Small-dose ketamine enhances morphine-induced analgesia after outpatient surgery. *Anesth. Analg.* 89: 98-103.

**Tallarida, R.J.** 2000. Drug synergism and dose-effect data análisis. Boca Raton, Chapman Hall/CRC Press, p. 57-75.

**The committee for research and ethical issues of I.A.S.P.** 1980. Ethical standards for investigations of experimental pain in animals. *Pain* 9:141-143.

**Thommson, A.M., West, D.C. and Lodge, D.** 1985. An *N*-methyl aspartate receptor-mediated synapse in a rat cerebral cortex: a site of action of ketamine? *Nature* 313: 479-481.

**Togal, T., Demirbilek, S., Koroglu, A., Yapici, E., Ersoy, O.** 2004. Effects of S(+) ketamine added to bupivacaine for spinal anaesthesia for prostate surgery in elderly patients. *Eur. J. Anaesthesiol.* 21: 193-197.

**Turski L.** 1990. N-methyl-D-aspartate receptor complex. Different sites for regulation and clinical consequences. *Arzneim. Forsch. Drug Res.* 40: 511-514.

**Vranken, J.H., Troost, D., Wegener, J.T., Kruis, M.R., van der Vegt, M.H.** 2005. Neuropathological findings after continuous intrathecal administration of S(+)-ketamine for the management of neuropathic cancer pain. *Pain* 117: 231-235.

**Woolf C.J. and Thompson S.W.** 1991. The induction and maintenance of central sensitization is dependent on N-methyl-D-aspartic acid receptor activation; implications for the treatment of post-injury pain hypersensitivity states. *Pain* 44: 293-299.

**Woolf C.J. and Costigan M.** 1999. Transcriptional and posttranslational plasticity and the generation of inflammatory pain. *Proc. Natl. Acad. Sci.* Vol. 96, pp. 7723–7730.

**Zhuo, M.** 1998. NMDA receptor-dependent long term hyperalgesia after tail amputation in mice. *Eur. J. Pharmacol.* 349: 211-220.

## **FINANCIAMIENTO**

Este trabajo de Investigación ha sido financiado por el Proyecto Fondecyt 1040873.