



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA

**“MODULACIÓN NITRIDÉRGICA DE LA ANALGESIA DE TRAMADOL EN
DOLOR EXPERIMENTAL OROFACIAL”**

Claudia Andrea Fernández Vargas

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN
REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE
CIRUJANO-DENTISTA

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Hugo Miranda G.

TUTOR ASOCIADO

Dr. Fernando Sierralta G.

Santiago-Chile

2011



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA

**“MODULACIÓN NITRIDÉRGICA DE LA ANALGESIA DE TRAMADOL EN
DOLOR EXPERIMENTAL OROFACIAL”**

Claudia Andrea Fernández Vargas

**TRABAJO DE INVESTIGACIÓN
REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE
CIRUJANO-DENTISTA**

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Hugo Miranda G.

TUTOR ASOCIADO

Dr. Fernando Sierralta G.

Santiago-Chile

2011

DEDICATORIA

A mi madre, por su amor infinito.

A mi padre, por sus enseñanzas.

A mis hermanos, por crecer junto a mí y enseñarme a valorar el regalo más bello de la vida...la familia

A Fernando, por ser un gran compañero, porque con su sabiduría ha llenado de luz mi camino.

A Dios, porque somos uno.

AGRADECIMIENTOS

A los Sres. José López y Alejandro Correa por su constante apoyo y colaboración desinteresada.

Al Dr. Hugo Miranda por su compromiso con la investigación e inconmensurable generosidad, por su enorme riqueza como educador, y sobre todo, por ser un gran ser humano.

A todos quienes conforman el Laboratorio de Farmacología por hacer posible este estudio.

RESUMEN

La percepción de la sensación dolorosa es un proceso complejo en el que intervienen múltiples mecanismos bioquímicos. A raíz de esto es que el área farmacológica, en su intención de constituir un aporte en la práctica médica, se esfuerza por descubrir nuevas asociaciones medicamentosas que permitan combatir el dolor disminuyendo al máximo la posibilidad de generar reacciones adversas. Siguiendo esta línea, en la presente investigación se evalúa la participación del sistema nitridérgico en la actividad antinociceptiva de tramadol, a través de uno de los principales inhibidores de la enzima óxido nítrico sintasa (NOS): L-NAME. Para esto se utilizaron ratones a los que se les inyectó de forma intraperitoneal solución salina, tramadol y L-NAME, antes de realizar el test algesiométrico orofacial de la formalina. El test consistió en inyectar 20 μ L de formalina al 1% a nivel subcutáneo en el labio superior, para luego medir el tiempo de frotamiento del área perinasal, durante los 5 minutos inmediatos a la inyección, que corresponde a la fase I (algesia aguda) y desde los 20 a 30 minutos post inyección (fase II o algésica-inflamatoria). Para la evaluación de las interacciones, se construyeron representaciones gráficas de curvas dosis respuesta de los fármacos administrados con un mínimo de 6 animales por cada una de las dosis en estudio. Se les inyectó por vía intraperitoneal solución salina, tramadol y L-NAME, 30 minutos antes de la administración de formalina. Para estudiar la participación del sistema nitridérgico, se administró, por la misma vía, el inhibidor L-NAME previo a la administración de tramadol, 45 minutos antes de la inyección de formalina. Los resultados obtenidos en este estudio muestran que la administración intraperitoneal de tramadol produce efectos antinociceptivos dosis dependiente cuando es administrado solo, mientras que al ser administrado en animales pretratados con L-NAME a distintas concentraciones produce efectos variables según la fase de la analgesia evaluada y la concentración del fármaco aplicado.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
1. Dolor: Definición y Tipos o Clasificación	2
1.1. Definición	2
1.2. Tipos o clasificación	2
1.2.1. Según tiempo de evolución	2
1.2.3. Según etiología	4
1.2.4. Según perspectiva neurobiológica	4
2. Neuroanatomía del dolor	5
2.1. Receptores sensitivos	5
2.2. Fibras nerviosas aferentes	7
2.3. Estructuras centrales	8
2.4. Vías ascendentes	9
2.5. Dolor orofacial	10
2.6. Mecanismos de control de la transmisión nociceptiva	11
2.7. Neurotransmisores del dolor	12
3. Óxido nítrico	13
3.1. Estructura de la NOS	14
3.2. Modulación de la síntesis de NO	14
3.3. Mecanismos de acción del NO	15
4. L-NAME	17
5. Tratamiento farmacológico del dolor	17
5.1. Interacción de fármacos	17
5.2. Analgésicos opioides	18
5.2.1. Receptores opioides	18
5.2.2. Clasificación	19
6. Tramadol	20
6.1. Mecanismos de acción	20
6.2. Características farmacocinéticas	21
6.3. Reacciones adversas	22
7. Modelos animales de nocicepción	22

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	25
1. Hipótesis	25
2. Objetivos	25
2.1. Objetivo general.....	25
2.2. Objetivos específicos	25
MATERIAL Y MÉTODOS	26
1. Test de la formalina orofacial.....	26
2. Estudio de la interacción antinociceptiva	29
RESULTADOS	30
1. Grupo Control.....	30
2. Grupo tratado con Tramadol	30
3. Grupo tratado con L-NAME.....	31
4. Grupo tratado con Tramadol previa administración de L-NAME	31
DISCUSIÓN	34
CONCLUSIONES.....	36
SUGERENCIAS	37
BIBLIOGRAFÍA.....	38

INTRODUCCIÓN

La sensación de dolor es considerada una experiencia desagradable, que se complementa con experiencias físicas, psicológicas y sociales del individuo, resultando una percepción individual y subjetiva. En circunstancias fisiológicas tiene una función protectora, desencadenando reacciones e induciendo comportamientos para evitar posibles daños. Sin embargo, existen patologías en que el dolor deja de ser un signo de alerta y se convierte en el síntoma principal de la enfermedad.

El dolor es el síntoma más común reportado por los pacientes a los profesionales del área de la salud, es una fuerza impulsora de la utilización de asistencia médica y pérdida de productividad, constituyendo un obstáculo para los afectados, sus familiares, y la sociedad en general. En el área odontológica, el dolor dental y en general el de localización orofacial, ha sido objeto de preocupación desde tiempos remotos constituyendo un problema al que el dentista se enfrenta diariamente.

Para abordar el dolor es indispensable conocer todos los aspectos implicados en su generación, en otras palabras, el conocimiento de los mecanismos involucrados en la conducción del estímulo doloroso nos permitirá contribuir al bienestar del paciente utilizando un enfoque terapéutico más adecuado.

El manejo del dolor continúa siendo uno de los mayores desafíos para las ciencias de la salud. Se han desarrollado para esto una gran variedad de fármacos, entre ellos los opioides que se caracterizan por ser drogas usadas en el tratamiento del dolor moderado a severo y ejercer su acción analgésica interfiriendo a nivel del sistema nervioso central (1).

Tramadol, un opioide sintético cuyo mecanismo de acción, eficacia analgésica y perfil de efectos adversos son responsables de su exitoso uso en pacientes con diferentes tipos de dolor será evaluado en el presente estudio con el fin de estudiar la analgesia producida al intervenir la modulación nociceptiva, mediante el pretratamiento con L-NAME, un inhibidor del sistema nitridérgico (2).

1. Dolor: Definición y Tipos o Clasificación

1.1. Definición

El término dolor ha sido definido por la Asociación Internacional para el estudio del dolor (IASP) como una experiencia sensorial y emocional desagradable, asociada a un daño tisular existente o potencial, o descrita en términos de ese daño”.

1.2. Tipos o clasificación

El dolor es generalmente clasificado de acuerdo a una serie de parámetros que son descritos a continuación.

1.2.1. Según tiempo de evolución

La clasificación más utilizada del dolor se basa en su duración: agudo y crónico:

- **Dolor agudo.** Es el dolor provocado por la lesión de los tejidos del cuerpo y la activación de la transducción nociceptiva en el sitio del daño tisular local. La injuria local altera la respuesta característica de los nociceptores; sus conexiones centrales y las del sistema nervioso autónomo en la región. En general los estados de dolor agudo duran un tiempo relativamente limitado, y habitualmente remite cuando se resuelve la patología subyacente. Esto ocurre, según lo descrito por John Bonica en 1953, normalmente en el lapso de un mes. Posteriormente, el Comité de Taxonomía de las Algias de la IASP determinó como tiempo de duración límite para el dolor agudo el de tres meses. Es de interés señalar que aún no ha sido totalmente generalizada esta división temporal, pues hay autores que continúan clasificando el dolor agudo como aquel que tiene una duración de hasta seis meses. Este tipo de dolor es a menudo razón para buscar la atención de salud, y se produce después de traumatismos, intervenciones quirúrgicas y algunos procesos patológicos (3).
- **Dolor Crónico.** Por lo general es provocado por una lesión, pero puede ser perpetuado por factores que están patogénica y físicamente muy alejados de la causa original. El dolor crónico se extiende por un largo periodo de tiempo, y representa bajos niveles de patología subyacente que no explica la presencia y/o grado de dolor. Este tipo de dolor induce con frecuencia a

buscar atención de salud, y pocas veces es tratado de forma eficaz. Debido a que el dolor persiste, es probable que factores ambientales y afectivos eventualmente interactúen con el daño tisular, contribuyendo a la persistencia del dolor y comportamiento patológico. De acuerdo a la taxonomía del dolor crónico, este es codificado en cinco ejes (3, 4):

- Eje i. Define regiones anatómicas (ej.: cabeza, tórax, abdomen, etc.)
- Eje ii. Define sistemas (ej.: sistema nervioso, sistema respiratorio, sistema endocrino, etc.)
- Eje iii. Define características temporales del dolor (ej.: episodio único, continuo, recurrente regular, recurrente irregular, paroxístico, etc.)
- Eje iv. Define intensidad asociada al tiempo de inicio del dolor (ej.: leve, moderado, severo, asociado a menos de un mes, entre uno y seis meses y más de seis meses, etc.)
- Eje v. Define etiología (ej.: genética, traumática, infecciosa, inflamatoria, metabólica, neoplásica, mecánica, degenerativa, psicológica, etc.)

1.2.2. Según características somatosensoriales

- **Dolor epicrítico.** Es superficial, de localización precisa y bien delimitado por el paciente; puede ser descrito como: punzante, lacerante, lancinante, quemante, opresivo, fulgurante o en ramalazo. Por naturaleza no es referido (3).
- **Dolor protopático.** Es difuso y mal localizado por el paciente; es también descrito como dolor sordo. Este tipo de dolor es referido en varios cuadros clínicos. Es decir, es localizado o descrito por el paciente en un lugar distante al sitio donde se genera (3).

1.2.3. Según etiología

- **Nociceptivo.** Se produce como consecuencia de una lesión somática o visceral y es la reacción normal frente dicha lesión. El *dolor somático* se origina a nivel de la piel, músculos, ligamentos, articulaciones o huesos. Se caracteriza por ser bien localizado, circunscrito a la zona dañada, y que no suele acompañarse de reacciones vegetativas. El *dolor visceral* se caracteriza por ser difuso y extenderse a otros territorios alejados del órgano lesionado. Es referido y se acompaña frecuentemente de reacciones vegetativas (3).
- **Neuropático.** Dolor iniciado o causado por una lesión primaria o disfunción en el sistema nervioso (3).
- **Psicógeno.** Es el dolor de causa no identificable de origen somático, y que puede ser atribuida a factores psicológicos de manera peyorativa, sugiriendo un modelo cartesiano dualista del dolor que no ayuda a su comprensión (3).

La clasificación anteriormente detallada permite comprender una serie de términos que han sido utilizados durante años en la práctica médica. No obstante, actualmente se ha propuesto la siguiente clasificación (5):

1.2.4. Según perspectiva neurobiológica

- **Dolor nociceptivo.** Representa la sensación asociada a la detección de un estímulo nocivo que potencialmente daña tejidos y es protector.
- **Dolor inflamatorio.** Está asociado a daño tisular e infiltración de células inmunológicas, puede promover la reparación porque causa hipersensibilidad dolorosa hasta que se sana el tejido.
- **Dolor patológico.** Es un estado de enfermedad causado por daño al sistema nervioso (*neuropático*) o por su función anormal (*disfuncional*).

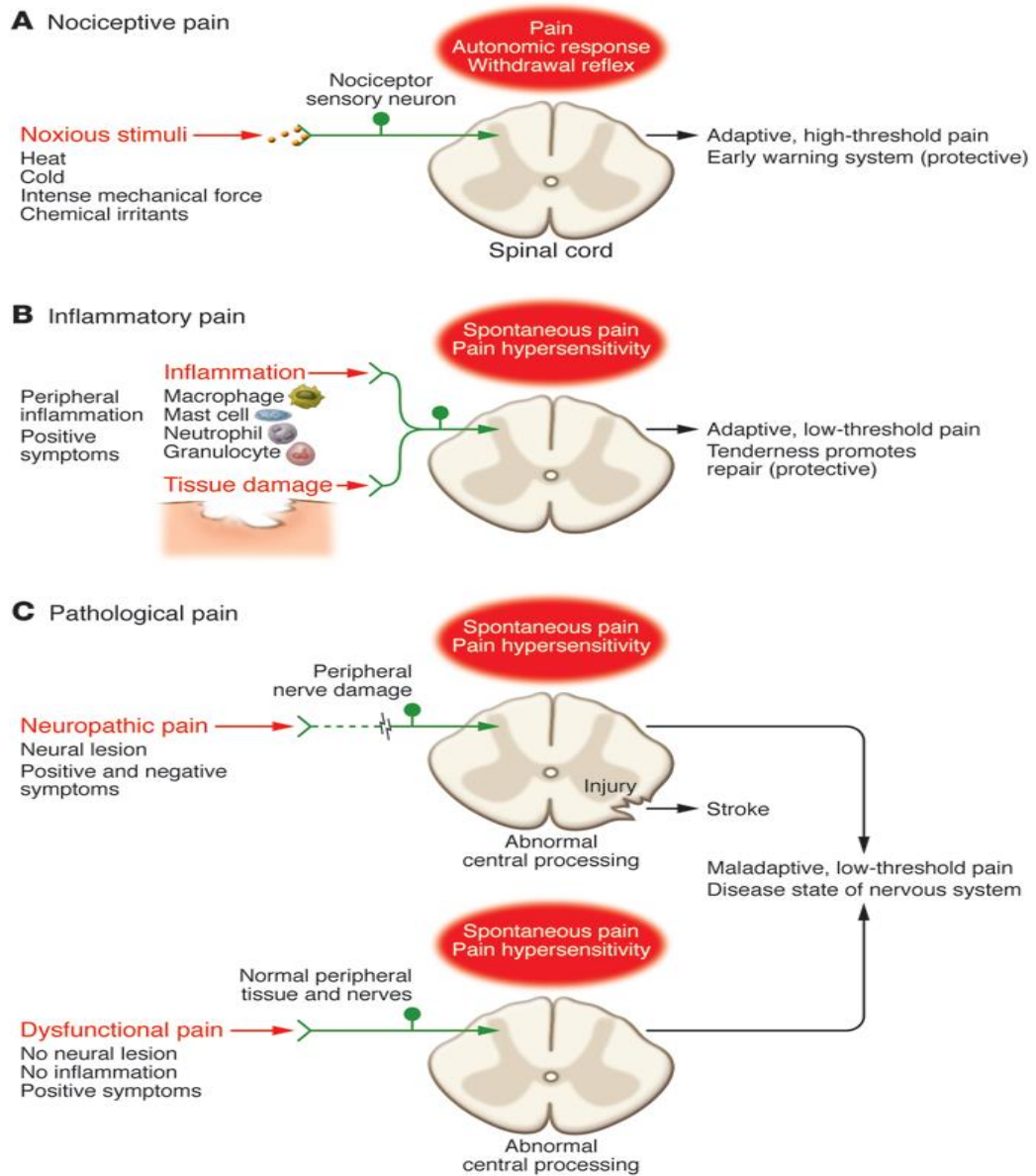


Figura 1. Clasificación neurobiológica del dolor (5)

2. Neuroanatomía del dolor

2.1. Receptores sensitivos

Un receptor sensitivo es la estructura anatómica capaz de responder ante determinados estímulos, convirtiendo la energía de estos estímulos en un potencial eléctrico, señales neurales, que se transmite por una vía periférica hasta los niveles centrales del sistema nervioso. Los receptores se pueden clasificar en función de la respuesta que presentan ante el estímulo (6):

- Receptores de adaptación rápida. Responden a un estímulo continuo y duradero. Sólo envía señales eléctricas cuando comienza o termina el estímulo. Si el estímulo es continuo, el receptor deja de responder (se adapta). Constituye el tipo mayoritario de receptores del tacto.
- Receptores de adaptación lenta. Envían señales eléctricas mientras persiste el estímulo. Son receptores involucrados en la nocicepción y en la sensación de la posición corporal.

La propagación del dolor es iniciada con la activación de receptores fisiológicos llamados nociceptores; ampliamente encontrados en la piel, mucosa, membranas, facias profundas, tejido conectivo de órganos viscerales, ligamentos y cápsulas articulares, periostio, músculos, tendones y vasos sanguíneos (6).

Los nociceptores pueden responder de forma directa a estímulos lesivos; o de forma indirecta a algunas de las sustancias liberadas por el tejido lesionado o a alteraciones metabólicas que se producen en caso de lesión, como la disminución del pH y el aumento de la concentración de algunos iones. De hecho, la mayoría de nociceptores pueden considerarse quimioceptores, sensibles a cambios de concentración de determinadas sustancias.

Según el tipo de estímulo ante el que responden, los nociceptores se pueden dividir en tres grupos (6):

- Nociceptores de tipo mecánico. Se activan a partir de la aplicación de presión intensa sobre la piel, deformación tisular o cambios de osmolaridad. Son receptores con umbral de activación elevados. Están formados por terminaciones nerviosas libres tanto de tipo A δ como C.
- Nociceptores de tipo térmico. Responden ante temperaturas extremas superiores a 45° C o inferiores a 5° C. En su mayoría son terminaciones nerviosas libres de fibras tipo C.
- Nociceptores polimodales. La mayoría de las fibras C son polimodales y son más eficazmente excitadas por estímulos nocivos como el daño tisular, pero pueden responder a estímulos mecánicos térmicos y a mediadores químicos

asociados a la inflamación. Por otra parte, ciertas fibras A δ reaccionan al tacto ligero, temperatura y presión, lo mismo que a estímulos dolorosos capaces de descargar en proporción con la intensidad del estímulo.

2.2. Fibras nerviosas aferentes

Las fibras aferentes que provienen de los receptores periféricos siguen el trayecto de los nervios hasta que penetran en la médula espinal por el cuerno dorsal. El cuerpo celular de estas fibras está situado en el ganglio raquídeo de la raíz dorsal. Las células de los ganglios raquídeos son de tipo pseudounipolar, con un proceso periférico en el que se encuentra el receptor, y un proceso central que forma sinapsis con las neuronas del cuerno dorsal de la sustancia gris medular. Las terminaciones nociceptivas se originan a partir de fibras nerviosas denominadas genéricamente aferentes primarias que se clasifican en los siguientes tipos:

- Fibras A δ , de tipo miélnico con un diámetro de 2-6 μ m y una velocidad de conducción de entre 4 y 30 m/s. En la piel constituyen un 10% de las fibras aferentes sensitivas (4). Transmiten información procedente de nociceptores de tipo mecánico y térmico relativa a sensaciones localizadas con precisión, y no evocan el componente afectivo de la experiencia sensorial. Son las responsables de la percepción del dolor agudo (6).
- Fibras C, amielínicas, con un diámetro de 0,3-1,5 μ m y una velocidad de conducción de entre 0,5 y 2 m/s (4). En la piel constituyen un 70% de las fibras aferentes sensitivas. Transmiten información de los nociceptores polimodales. Son las responsables del dolor de carácter urente y persistente que se establece después del dolor agudo evocando al componente afectivo que acompaña a la experiencia sensorial. (6)

Las fibras A β , de tipo miélnicas, de mayor diámetro (6-20 μ m) y velocidad de conducción (30-100 m/s) que las fibras A δ y tipo C. No propagan potenciales nocivos en situaciones normales, sin embargo, participan en los mecanismos de supresión segmental (4).

2.3. Estructuras centrales

Las fibras A δ y tipo C luego de entrar al sistema nervioso central por el asta posterior de la médula espinal, antes de su ingreso a la sustancia gris, emiten colaterales ascendentes y descendentes que sinaptan entre si y se prolongan varios segmentos medulares superiores e inferiores, constituyendo la parte más medial del haz de Lissauer, una vía de conducción del dolor. Esta interrelación explicaría, en parte, el dolor irradiado o referido (4).

Una vez dentro de la sustancia gris, las fibras A δ y tipo C se ubican ventrolateralmente en relación a ella haciendo sinapsis con una segunda neurona que puede ser de dos tipos:

- Neuronas específicas, que es activada exclusivamente por estímulos nociceptivos de alta intensidad.
- Neuronas de amplio rango dinámico o multirreceptiva, que responde a gran variedad de estímulos (nociceptivos y no nociceptivos).

En el asta dorsal, las neuronas se distribuyen formando láminas aplanadas, mientras que en la zona intermedia o en el asta ventral constituyen agrupaciones nucleares. El conjunto de los núcleos de cada segmento medular recibe el nombre de Láminas de Rexed, cada una con sus propias características citoarquitectónicas. Se pueden definir 10 láminas: el asta dorsal está formada por las láminas I a VI, la zona intermedia por la porción dorsal de la lámina VII, el asta ventral por la porción ventral de la lámina VII y láminas VIII y IX , y la sustancia gris periependimaria por la lámina X (6).

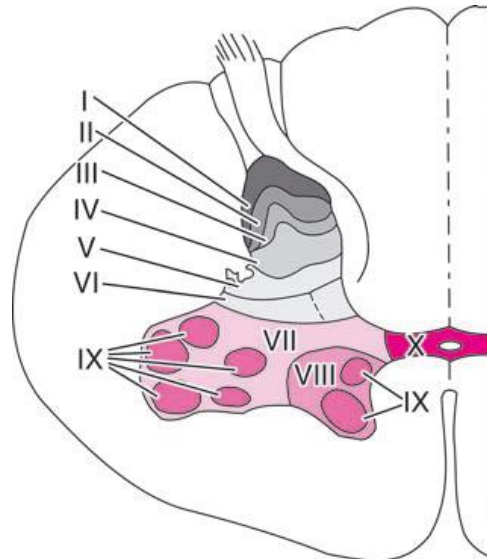


Figura 2. Sustancia gris de la médula espinal, subdividida de acuerdo con Rexed (8)

La mayor parte de las fibras que transmiten información nociceptiva son del tipo A δ y C. Las fibras A δ terminan principalmente en las láminas I y también en la parte más externa de la lámina II; algunas fibras A δ penetran en la sustancia gris dorsal y terminan lateral de la lámina V. Mientras que las fibras C inervan principalmente la lámina I y la capa externa de la sustancia gelatinosa.

Es de interés destacar el hecho de que la sinapsis entre la neurona en T o primaria y la segunda neurona está siempre modulada por interneuronas de la sustancia gelatinosa, las que pueden ser excitatorias o inhibitorias (6).

2.4. Vías ascendentes

Las segundas neuronas cuyos somas se encuentran en el asta posterior, dan origen a los haces ascendentes preferentemente de ubicación contralateral, que cruzan la sustancia gris en la región comprendida entre el canal central de la médula y la comisura gris anterior. Este cruce no siempre se realiza en la zona correspondiente al soma neuronal sino que puede haber un recorrido ipsilateral de dos o más segmentos medulares antes de cruzar (4).

Las vías ascendentes están constituidas por dos grupos filogenéticamente diferentes: el haz paleoespinal, el más antiguo que comprende a los haces

espinorreticulotalámico, espinomesencefálico, espinoparabraquial-amigdaloideo, espinoparabraquial-hipotalámico y espinotalámico; y el haz neoespinotalámico (4).

Con respecto a los fenómenos de percepción dolorosa los haces frecuentemente estudiados son:

Haz paleoespinotalámico. Se proyecta en forma bilateral a los núcleos inespecíficos del tálamo y luego se proyecta a la zona frontal de la corteza, lo que contribuye a la evaluación cualitativa del dolor.

Haz neoespinotalámico. Sinapta en los núcleos específicos del tálamo (ventral posterior y ventral posterolateral), éstos se proyectan a la corteza somestésica en las áreas S I y S II, zona cuya función consiste en dar la ubicación topográfica del dolor.

Haz espinorreticulotalámico. Está conformado por fibras que sinaptan con la formación reticular en diferentes partes: bulbo, protuberancia, reticular mesencefálica y sustancia gris periacueductal. Luego se proyecta al tálamo en forma bilateral para difundir posteriormente a corteza inespecífica distribuyéndose ampliamente. Este haz aporta el componente emocional y afectivo del dolor (4).

2.5. Dolor orofacial

La transmisión de las señales nociceptivas procedentes del rostro, la cavidad oral y parte de la región dorsal de la cabeza está vehiculada por las fibras del nervio trigémino (V par craneal), con una pequeña contribución de los nervios facial (VII par craneal), glossofaríngeo (IX par craneal) y vago (X par craneal).

Los axones de las células del ganglio semilunar del trigémino forman la raíz sensitiva de este nervio. Las fibras de pequeño diámetro (A δ y C), que provienen de nociceptores y termorreceptores, adoptan, una vez llegan a nivel de la protuberancia, una dirección descendente, formando el tracto espinal del trigémino, al que se unen las fibras aferentes somáticas procedentes del resto de pares craneales que aportan información nociceptiva. El tracto espinal se extiende desde la parte media de la protuberancia hasta el segundo o tercer segmento cervical, donde sus fibras se unen a las del tracto de Lissauer. Las fibras del tracto

espinal acaban en el núcleo espinal del trigémino, situado medialmente respecto al tracto. La mayoría de las aferentes primarias A δ y C que llevan información nociceptiva proveniente de diversos tejidos orofaciales terminan en el *subnúcleo caudal*, que también recibe fibras de las raíces dorsales de los segmentos cervicales superiores, lo que explicaría la irradiación fuera del área sensitiva trigeminal (6,7).

Los axones de las células del ganglio espinal del trigémino se decusan y forman el tracto trigeminotalámico, que sigue una trayectoria ascendente por detrás del lemnisco medial, envía colaterales hacia la Formación Reticular, y termina en los núcleos talámicos ventral posteromedial, e intralaminares. Desde los núcleos talámicos, las señales llegan a la “región facial” del área sensitiva primaria de la corteza cerebral, y a otras estructuras corticales y subcorticales (6).

2.6. Mecanismos de control de la transmisión nociceptiva

Dos mecanismos de control influyen en el tráfico de impulsos nociceptivos a nivel del asta posterior de la médula. El primero de ellos es el mecanismo de control de entrada que fue descrito por primera vez por Melzack y Wall. Se consideró que las colaterales de aferentes primarios de mecanorreceptores gruesos (tacto y presión), que ascienden por las columnas dorsales espinales, activan interneuronas inhibitorias en el nivel de ingreso segmentario, las que a su vez actúan sobre neuronas nociceptivas secundarias. Estas últimas son estimuladas por los aferentes primarios A δ y tipo C, de pequeño diámetro. El concepto de que el balance de actividad en las pequeñas y grandes fibras aferentes primarias, es importante en la transmisión del dolor, ha llevado al uso de la estimulación eléctrica transcutánea de los nervios periféricos, y a la estimulación de las columnas dorsales de la médula espinal mediante electrodos implantados (8).

El segundo mecanismo que puede modular de manera eficaz la experiencia dolorosa e inducir analgesia es el sistema descendente de control del dolor. Este sistema fue reconocido por primera vez después de descubrir que la estimulación eléctrica de la sustancia gris periacueductal mesencefálica causa analgesia profunda. Este efecto se puede explicar por la activación de proyecciones descendentes en el asta posterior de la médula que presentan interrupción

sináptica en el complejo conocido como médula oblongada ventromedial rostral, formado por el núcleo del rafe magno y la formación reticular. El núcleo del rafe magno contiene neuronas serotoninérgicas que se proyectan al asta posterior de la médula, región donde los aferentes nociceptivos primarios establecen contacto con células de las diversas vías ascendentes del dolor. Las células serotoninérgicas y no serotoninérgicas de este complejo influyen en la transmisión nociceptiva en una forma bidireccional a través de un efecto directo en las vías aferentes primarias, así como, a través de un efecto indirecto mediado por interneuronas locales (8).

Lo más probable es que los centros por sobre el nivel mesencefálico también formen parte del sistema descendente de control del dolor. La sustancia gris periacueductal tiene abundantes conexiones recíprocas con el hipotálamo, y recibe aferencias de las áreas corticales prefrontal, cingular e insular. Por medio de los sistemas descendentes que se acaban de mencionar, las sensaciones de dolor se encuentran bajo el control de los centros superiores del cerebro (8).

2.7. Neurotransmisores del dolor

La injuria a los tejidos periféricos a menudo resulta en inflamación que involucra productos liberados desde los vasos sanguíneos o de otros elementos tisulares que incluye a células del sistema inmune. Algunas de estas sustancias (histamina, 5-HT, bradiquininas, citoquinas) promueven la inflamación, pero también actúan sobre las aferentes nociceptivas que se encuentran en la vecindad del sitio injuriado aumentando su excitabilidad, mientras que otras (encefalinas) actúan generando el efecto contrario (7).

A nivel del asta dorsal los neurotransmisores del dolor que contienen las neuronas aferentes primarias están constituidos por Glutamato y una gran variedad de neuropéptidos entre los cuales destacan la sustancia P y el péptido relacionado al gen de calcitonina (CGRP). Todos estos mediadores actúan sinérgicamente ejerciendo efectos pronociceptivos que se explican por la capacidad de inducir despolarización neuronal mediante la apertura de canales selectivos para cationes existentes en receptores ionotrópicos o a través de la activación de fosfolipasa C y adenilato ciclasa vía receptores acoplados a proteínas G estimuladoras (4, 6).

Además de las ya mencionados, existen otros mediadores que pueden tener un rol importante en la transmisión del mensaje doloroso tales como las moléculas de ATP (adenosyntriphosphato), adenosina, prostaglandinas y óxido nítrico (NO).

3. Óxido nítrico

El óxido nítrico (NO) es un gas radical libre producto de la conversión de L-arginina a L- citrulina. Su síntesis es catalizada por la enzima óxido nítrico sintasa (NOS), la cual tiene 3 isoformas: endotelial (NOS III), neuronal (NOS I) y tipo macrófago (NOS II) por el tejido donde fueron inicialmente caracterizadas. Según su mecanismo de acción estas enzimas también se clasifican en NOS constitutiva e inducible. Las formas constitutivas son encontradas en el citosol y membranas y son dependientes de las concentraciones de Ca^{2+} /calmodulina, participando en la regulación de procesos fisiológicos. Las formas inducibles son sintetizadas en células posterior a la inducción por endotoxinas bacterianas o citoquinas, no dependen de las concentraciones de Ca^{2+} /calmodulina y son consideradas como isoformas patológicas. Aunque todas las isoformas catalizan las mismas reacciones, cada tipo tiene una estructura y localización única. Estas características determinan diferencias en la activación de vías así como también en la especificidad de inhibidores (9).

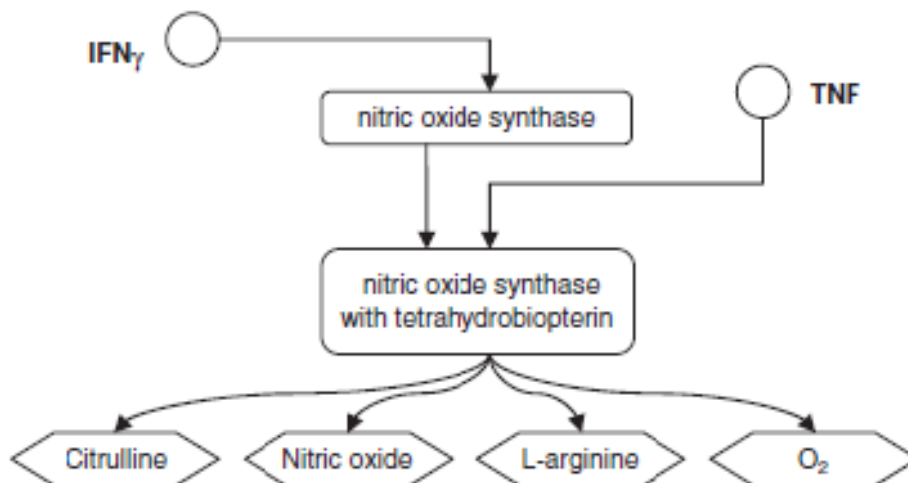


Figura 3. Esquema simplificado de la producción de NO (11)

3.1. Estructura de la NOS

Estudios han demostrado la complejidad de esta enzima en cuya estructura y regulación intervienen una serie de cofactores. Entre los más importantes que participan en la síntesis de NO tenemos: nicotinamida adenina dinucleotido fosfato (NADPH), flavin adenina dinucleotido (FAD), flavin mononucleotido (FMN), tetrahydrobiopterin (BH₄), calcio (Ca²⁺) y calmodulina. Además, interferón gamma (IFN γ) y el factor de necrosis tumoral (TNF) activan la vía de producción. La NOS se presenta como un dímero y es activada de tal modo, cada subunidad contiene dominios para oxigenasas, reductasas y uniones para calmodulina.

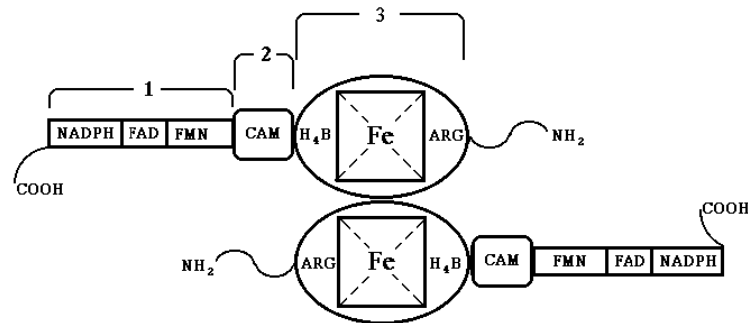


Figura 3. Estructura de la NOS (9)

3.2. Modulación de la síntesis de NO

La síntesis de NO es regulada por activadores e inhibidores durante diferentes estados fisiológicos y fisiopatológicos. Dentro de las vías de inhibición participan una serie de moléculas entre las cuales encontramos a los derivados de L-arginina. Este grupo es representado por L-NMMA, L-ADMA y L-NAME los cuales compiten no selectivamente con L-arginina e igualmente inhiben a todas las NOS.

Periféricamente, las neuronas primarias aferentes y los ganglios del asta dorsal contienen NOS. A nivel central, en el cerebro y el tálamo, varias estructuras sensoriales también contienen esta enzima. Pareciera ser que los reflejos nociceptivos involucran un receptor de glutamato, el NMDA (N-metil-D aspartato), el cual participa en la síntesis de NO. Existe una serie de evidencias que indican que la activación aferente nociceptiva da como resultado una mayor excitabilidad

de las neuronas espinales, fenómeno conocido como **sensibilización central**. Estudios farmacológicos sugieren que la sensibilización central es parcialmente mediada por la activación de receptores NMDA lo que se relaciona con la producción de óxido nítrico neural. Esto se genera por la liberación presináptica de glutamato el cual produce un flujo transmembrana de calcio y la activación de la NOS, con la consecuente producción de NO. Este gas difunde, sale de la célula, atraviesa la membrana, y se introduce en la terminación presináptica estimulando una mayor secreción de glutamato, es decir, se produce un feedback positivo a nivel central (10). Como resultado de lo anterior, estímulos que previo a la sensibilización no alcanzaban el umbral doloroso, luego de esta son suficientes para generar potenciales de acción en las neuronas de segundo orden, contribuyendo al incremento en la sensación de dolor.

3.3. Mecanismos de acción del NO

El óxido nítrico es una molécula con múltiples efectos sobre diferentes tejidos que juega un rol importante en la regulación vascular, la homeostasis, la formación y reabsorción ósea, la neurotransmisión y la función inmune. Además, se ha visto que participa en la patogénesis de ciertas enfermedades orales como periodontitis, desórdenes temporomandibulares, patologías de glándulas salivales y cáncer (11).

Una vez sintetizado, el ON difunde a los tejidos vecinos donde se une a la guanilato ciclasa soluble para activarla y catalizar entonces la transformación de guanosin trifosfato (GTP) en guanosin monofosfato cíclico (GMPc). El ON puede unirse también a las proteínas de la cadena respiratoria mitocondrial de forma reversible o irreversible, dependiendo de su concentración y puede ocasionar muerte celular por asfixia o por apoptosis.

El NO tiene una vida media efímera de 4 a 5 segundos en condiciones fisiológicas, siendo inactivado fácilmente por oxidación dando lugar a la formación de nitritos (NO₂) y nitratos (NO₃) o reacciona con el radical superóxido (O₂) para formar peroxinitrito (ONOO). Debido a la reactividad y corta vida del NO, su medición directa en células y tejidos difícilmente puede ser realizada y se hace por medios indirectos, a través de los productos que genera.

El NO participa en el proceso de nocicepción y se propone que alteraciones en su producción intervienen en la modulación del dolor. La modulación de la vía L-arginina- ON-GMPc podría ser útil en el tratamiento de diferentes estados de dolor. La producción cuantitativa diferenciada del óxido nítrico es dependiente de la enzima y de la célula donde se genera, así como también es diferente la respuesta de las neuronas excitatorias o inhibitorias ante el óxido nítrico (12).

En relación a la percepción del dolor, el NO está implicado en varias vías tanto periféricas como centrales. Los reflejos nociceptivos involucran la interacción del NO con los receptores NMDA y establece que la síntesis de ON aumenta la facilitación espinal de los input aferentes transmitiéndolos a la corteza y manifestando posteriormente respuestas conductuales. Sin embargo, el rol del NO cambia de acuerdo al estímulo doloroso. Por ejemplo, la inhibición del NO tiene efectos antinociceptivos frente al dolor que resulta de la estimulación química de nervios periféricos, en modelos de hiperalgesia térmica y de dolor visceral. Mientras que, el bloqueo de la síntesis de NO exagera el dolor en modelos de hiperalgesia mecánica. Por otra parte, su implicancia en el efecto antinociceptivo de diferentes drogas es también controversial. Por ejemplo, inhibidores del sistema NO / guanilato ciclasa potencian la acción antinociceptiva de la Morfina mientras que atenúan los efectos analgésicos de β -endorfinas (10).

Además, el NO desempeña un papel importante como mediador fisiológico durante la inflamación. Ciertos mediadores lipídicos solubles, citoquinas y factores del crecimiento incrementan la síntesis de este radical, en respuesta a daño tisular e infección. Tanto en procesos inflamatorios agudos como crónicos una expresión excesiva de NO puede resultar tóxica y causar lesiones en diversos tejidos. Los agentes inhibidores pueden actuar como un mecanismo de control, limitando la amplitud y duración de la expresión de la NOS, y por tanto regular la síntesis de NO (13).

4. L-NAME

N- nitro- L-arginina metilester (L-NAME) es un derivado estructural de L-arginina considerado un inhibidor específico de la enzima NOS que ha sido usado para provocar antinocicepción en varios modelos experimentales. No obstante, se ha reportado que L-NAME produce efectos contradictorios frente a un mismo test algesiométrico generando analgesia e hiperalgesia (14).

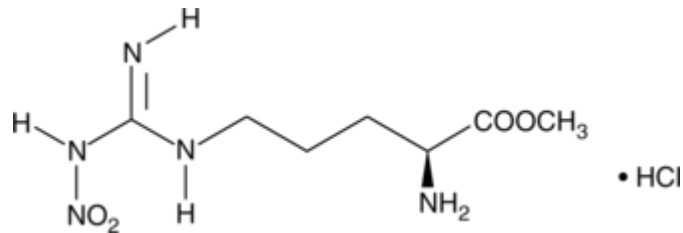


Figura 4. Estructura química de L-NAME

5. Tratamiento farmacológico del dolor

Los diferentes tipos de dolor son de naturaleza multifactorial debido a la anatomía y fisiología de la transmisión nociceptiva. Además varios neuroquímicos están implicados en la transducción, conducción, modulación y prolongación de la percepción del dolor (15). Producto de esto es que existe una amplia variedad de fármacos analgésicos que actúan a través de diversos mecanismos con la finalidad de aliviar el dolor, dentro de estas drogas los opioides son frecuentemente utilizados.

5.1. Interacción de fármacos

La asociación de 2 o más fármacos, puede originar interacciones entre ellos, que de acuerdo a su nivel de efecto pueden ser:

- Aditiva: esta correspondería a que el efecto obtenido por asociación de fármacos, es la simple suma algebraica de los efectos individuales.
- Sinérgica, supraaditiva, o superaditiva: en este caso el efecto obtenido por la combinación de los agentes es significativamente mayor que la suma de los efectos individuales de las drogas.

- Subaditiva o antagónica: situación en que el efecto resultante de la combinación de fármacos, es significativamente menor que la suma de los efectos individuales.

La interacción de tipo sinérgica es de especial importancia, por cuanto permite disminuir las dosis necesarias de cada droga, para lograr el efecto buscado y con ello se logra también disminuir las RAM de cada fármaco involucrado (15).

5.2. Analgésicos opioides

Los opioides han sido usados por miles de años para el tratamiento del dolor. Registros de papiros del antiguo Egipto reportan el uso de opio para el alivio del dolor.

Los opioides ejercen su influencia sobre la transmisión nociceptiva tanto a nivel de la sustancia gris periacueductal como a nivel de la terminación de aferentes primarios (8).

La estructura química de la morfina fue la base para el desarrollo de otras moléculas opioides. Al cambiar las cadenas laterales de la molécula se puede modificar la interacción del opioide con los receptores y su potencia (16).

5.2.1. Receptores opioides

Hay receptores opioides dentro del SNC así como también a través de los tejidos periféricos. Estos receptores son normalmente estimulados por péptidos endógenos (endorfinas, encefalinas y dinorfinas) producidos en respuesta a estímulos nocivos. Letras griegas nombran a los receptores opioides basados en sus agonistas prototipo y hasta el momento se han clonado 4 subtipos principales de receptores opioides (17):

Mu (μ) o MOR (agonista del receptor μ , ejemplo: morfina) Estos receptores son encontrados principalmente en el tálamo cerebral y medial. Son responsables de la analgesia supraespinal, depresión respiratoria, euforia, sedación, disminución de la motilidad gastrointestinal y dependencia física. Los subtipos incluyen Mu1 y Mu2, con Mu1 relacionados con la analgesia, euforia, y serenidad, mientras que Mu2 se relaciona con depresión respiratoria, prurito, liberación de prolactina,

dependencia, anorexia, y sedación. Éstos también se llaman OP3 o MOR (receptores opioides morfina).

Kappa (κ) o KOR (agonista del receptor κ , ejemplo: ketociclazocina) Estos receptores son encontrados en el sistema límbico y otras áreas del diencefalo, tronco cerebral, y médula espinal. Son responsables de analgesia espinal, sedación, disnea, dependencia, disforia y depresión respiratoria. También son conocidos como OP2 o KOR (receptores opioides kappa)

Delta (δ) o DOR (agonista del receptor δ , ejemplo: delta-alanina-delta-kleucina-encefalina) Están localizados en gran parte del cerebro. Sus funciones no han sido bien estudiadas, sin embargo, se les atribuyen efectos sicomiméticos y de disforia. Son denominados OP1 o DOR (receptores opioides delta).

NOR (agonista del receptor NOR, ejemplo: orphanin FQ). Ha sido descrito con relación a la ansiedad, memoria, analgesia y apetito (18).

5.2.2. Clasificación

Los analgésicos opioides pueden clasificarse según el tipo de actividad que producen sobre el receptor opioide en (4):

Agonistas puros. Aquellos opioides que tienen una acción preponderante sobre el receptor μ presentando la máxima actividad intrínseca.

Agonistas parciales. Presentan una acción marcada sobre el receptor KOR y menor acción sobre el receptor MOR que los agonistas puros, por lo tanto, su acción intrínseca es menor.

Antagonistas puros. Aquellos opioides que tienen afinidad sobre todos los receptores opioides, pero que carecen de actividad intrínseca.

El grupo de analgésicos opioides incluye fármacos naturales como la morfina y la codeína, derivados semisintéticos como la buprenorfina y la oxicodona, y sustancias sintéticas como el tramadol, tapentadol y fentanilo (16).

Una de las drogas más útiles e interesantes en este grupo es el tramadol. Su mecanismo de acción, eficacia analgésica y perfil de efectos adversos son

responsables de su exitoso uso en pacientes con diferentes tipos de dolor agudo y crónico, incluyendo el neuropático.

6. Tramadol

Tramadol es un opioide sintético del grupo aminociclohexanol que actúa en la neurotransmisión de noradrenalina y serotonina, fue desarrollado en Alemania por Grünenthal en 1962. Puede ser administrado por vía oral, subcutánea (*s.c.*), intravenosa (*i.v.*), intramuscular (*i.m.*), rectal y espinal (2).

6.1. Mecanismos de acción

Produce efectos anélgicos y antinociceptivos multimodales vía dos mecanismos: a través de su actividad agonista opioide y activando el sistema espinal inhibitorio del dolor. El primer mecanismo es a través de la unión a receptores opioides presentando una carencia de selectividad por los diferentes receptores opioides, aunque una leve especificidad por MOR., lo que se ha comprobado por tener una afinidad moderada por el receptor opioide μ y una afinidad más débil por los receptores δ y κ . La activación de estos receptores disminuye la liberación presináptica de neurotransmisores e hiperpolariza a la neurona postsináptica inhibiendo la transmisión del dolor (2,4).

El otro modo de acción analgésica de tramadol es su influencia sobre el **sistema inhibitorio descendente**. Este consiste principalmente en 2 vías. La primera se origina en la sustancia gris periacueductal (PAG) en el cerebro medio, con sinapsis en el núcleo del rafe magnus (RM), del cual las fibras se proyectan a la médula espinal. El neurotransmisor liberado en esta vía es serotonina (5-HT). La segunda vía principal se origina del locus coeruleus en el puente, el cual tiene proyecciones hacia la médula espinal. El neurotransmisor liberado en esta vía es noradrenalina, que inhibe la respuesta dolorosa en la médula espinal a través de un mecanismo α adrenérgico. PAG, RM en médula oblongada y astas dorsales en la médula espinal poseen significativas cantidades de péptidos opioides endógenos y receptores opioides. La activación del sistema inhibitorio descendente del dolor está conectada con la estimulación de interneuronas, las cuales inhiben la transmisión del estímulo doloroso en sinapsis en el asta dorsal

de la médula espinal por acción de opioides endógenos. El mecanismo de acción analgésica del tramadol involucra la activación de ambas vías descendentes: serotoninérgica y noradrenérgica (2,4).

6.2. Características farmacocinéticas

La biodisponibilidad de tramadol después de una dosis oral única es de un 68% y aumenta a aproximadamente 90-100% durante administraciones orales múltiples, lo que se debe al efecto de la saturación del primer paso hepático. La biodisponibilidad total media de tramadol fue de 100% después de la administración *im* y 78% después de la administración rectal.

El volumen de distribución (Vd) después de administración oral e *iv* indica una alta afinidad de Tramadol por los tejidos. Aproximadamente un 20% de tramadol se une a proteínas séricas y atraviesa la placenta, la concentración sérica en venas umbilicales es 80% de la concentración en venas de la madre.

Tramadol es metabolizado por el sistema enzimático del citocromo P-450 en el hígado y es excretado por los riñones. Siendo sometido a biotransformación en el hígado, inicialmente por reacciones de fase I (principalmente O y N-desmetilación) y luego por reacciones de fase II (principalmente por conjugación de compuesto O y N- desmetilados). Once metabolitos son producidos por reacciones de primera fase y doce por reacciones de segunda fase; el principal metabolito es M1. Este posee actividad analgésica y tiene una mayor afinidad a receptores opioides μ que el compuesto original. A parte de M5 (que posee una actividad analgésica más débil comparado con M1) y M1, otros metabolitos son farmacológicamente inactivos (2).

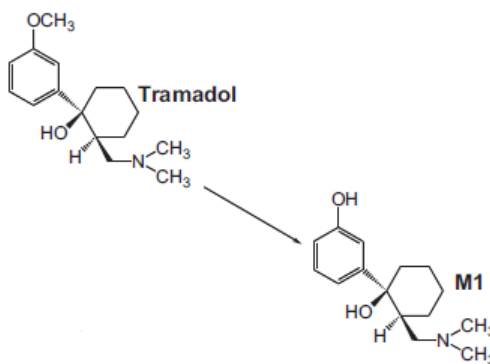


Figura 5. Tramadol y M1, su principal metabolito (19)

La vida media de eliminación es de 5-6 horas para tramadol y 8 horas para M1. Durante la administración oral de tramadol, aproximadamente 90% de la droga metabolizada es excretada por los riñones y un 10% por las heces.

6.3. Reacciones adversas

El mecanismo que produce analgesia es también responsable de efectos colaterales como náuseas, vómitos, mareos, fatiga, sudoración, sequedad de boca, somnolencia e hipotensión ortostática (2). La depresión respiratoria ha sido observada en un pequeño porcentaje de pacientes después de la administración *iv* de tramadol. La tolerancia y dependencia física durante el tratamiento con tramadol de hasta 6 meses no es significativa, pero la posibilidad de dependencia física durante tratamientos a largo plazo no puede ser completamente excluida.

7. Modelos animales de nocicepción

La investigación básica y clínica ha avanzado mucho en los últimos años en su intento de conocer a fondo los mecanismos íntimos de la nocicepción. Esto ha sido posible gracias a los modelos animales de dolor.

El dolor en el ser humano, es una sensación compleja. La ausencia de comunicación verbal en los animales es claramente, un obstáculo para la evaluación del dolor. A raíz de esto, no podemos conocer las sensaciones de un animal, y por tanto, solo podremos estudiar sus reacciones ante los estímulos nocivos de diversa naturaleza (20).

Zimmermann, reinterpretó la definición de dolor de la IASP para que pueda ser aplicada en animales. Así, el dolor en animales sería: “Una experiencia sensorial aversiva causada por una lesión real o potencial que produce reacciones motoras y vegetativas progresivas, desencadena un comportamiento aprendido de evitación y puede modificar comportamientos específicos de la especie, incluyendo los sociales”. A partir de esta definición se puede entender los modelos animales de dolor, como procedimientos mediante los cuales se valora la reacción

de un animal ante un estímulo nocivo de naturaleza variada, o situación patológica inducida, que puede ser utilizado en circunstancias fisiológicas o patológicas. (20)

La mayoría de las investigaciones dedicadas al estudio de la nocicepción en animales se basan en mediciones de umbral o latencia relativamente breves (milisegundos a segundos) ante estímulos nocivos químicos, térmicos, mecánicos o eléctricos de dientes, piel de la cara o mucosa oral. Estos procedimientos proporcionan información útil sobre algunos mecanismos de la nocicepción, entre los que se valida a la prueba de la formalina para el estudio de los modelos de dolor en animales (21).

8. Prueba de la formalina orofacial

La prueba de la formalina en ratas y ratones muestra dos fases: una fase temprana debida a la activación directa de los nociceptores que sigue a la injuria corrosiva que produce el irritante (fase 1), y luego una fase tardía debida a la organización de un foco inflamatorio en el sitio de la injuria y la sensibilización central y periférica que conlleva (fase 2). Tras la aplicación de la formalina aparece respuestas conductuales dirigidas hacia la extremidad injuriada como: lamidos, mordisqueo, sacudidas, elevación y resguardo, habiéndose descrito originalmente un método para puntuar la respuesta nociceptiva, en base a la observación conjunta de estas respuestas. La intensidad de las respuestas conductuales dependerá de la concentración de la formalina que es administrada.

El test de la formalina ha sido adaptado para el estudio del dolor orofacial, observándose tras la aplicación del irritante un aumento en el “acicalamiento” facial, expresado como frotamiento y rascado de la cara. Esta respuesta nociceptiva presenta un típico curso de tiempo bifásico, con una primera fase de corta duración (3-5 min), seguido, después de un periodo de reposo de 10-15 minutos, por una segunda fase tónica prolongada (20-40 min). En este caso la inyección intradérmica de formalina se inyecta en el labio superior, lateral a la nariz; o bien en el centro de la almohadilla vibrisal. Produciendo una respuesta nociceptiva más intensa y repetible dentro del territorio orofacial (22).

La concentración de la formalina a utilizar es importante para el resultado de la prueba. En un estudio de *Luccarini y col.* se observó una relación lineal positiva entre concentración y amplitud de la actividad de frotamiento, tanto en la primera como segunda fase del test, con concentraciones de hasta 5 %, induciendo una respuesta nociceptiva creciente, mientras que el uso de concentraciones mayores no se traduce en una mayor expresividad. Concentraciones altas de formalina puede producir desensibilización de las fibras periféricas, o incluso producir una conducta de inmovilidad del animal durante largos períodos, llevando a una interpretación errónea de la conducta nociceptiva (21, 22).

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

1. Hipótesis

La administración intraperitoneal (i.p.) de tramadol produce actividad antinociceptiva, en el ensayo algesiométrico de la formalina orofacial que es modulada por el sistema nitridérgico.

2. Objetivos

2.1. Objetivo general

- Estudiar la actividad antinociceptiva de tramadol en el ensayo algesiométrico de la formalina orofacial en ratones, en presencia y en ausencia de L-NAME.

2.2. Objetivos específicos

- Evaluar la antinocicepción inducida por la administración i.p. de tramadol en el test orofacial.
- Estudiar la analgesia producida por la administración i.p. de L-NAME en la prueba de la formalina orofacial.
- Estudiar e interpretar el tipo de interacción analgésica que se obtiene al administrar tramadol en animales pretratados con L-NAME.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se usaron 113 ratones (*Mus musculus*) machos de la cepa CF/1 de 28 a 30 g de peso, habituados al ambiente del laboratorio al menos dos horas antes del experimento, de acuerdo al protocolo CBA N° 238 FMUCH aprobado por la Comisión de Ética de la Facultad de Medicina (cada animal recibió solamente una dosis de las drogas, las observaciones fueron efectuadas en forma ciega, aleatoria y controladas con solución salina). Se deja constancia que, basándose en las normas éticas internacionales que rigen este tipo de experimentación, el número de animales utilizados fue el mínimo estrictamente necesario para un correcto análisis estadístico. Los animales se sacrificaron después del experimento mediante dislocación cervical por personal experimentado.

Los fármacos se administraron i.p. en un volumen constante de 10 mL/kg cuando fueron inyectados como droga única, 30 minutos antes del ensayo algesiométrico, ya que existe evidencia experimental previa en el laboratorio (23,24) que demuestra que es el tiempo en que se alcanza el efecto analgésico máximo. Sin embargo, en animales del grupo pretratado con L-NAME la administración del fármaco se realizó 45 minutos antes del ensayo. Los animales usados como grupo control fueron tratados con una solución salina i.p., incluyéndose al menos, 2 ejemplares en cada grupo experimental.

1. Test de la formalina orofacial

La evaluación de la actividad antinociceptiva se efectuó utilizando el test algesiométrico orofacial de la formalina, que mide el dolor originado en la estimulación del nervio trigémino, uno de los nervios de mayor inervación del territorio máxilofacial. Para ello se realizó una inyección subcutánea de 20 μ L de una solución de formalina al 1 %, en el labio superior derecho del animal (Figura 7). Ello induce un sostenido frotamiento de la zona inyectada y un vigoroso restregamiento de la cara en el área perinasal (Figura 8). Los ratones se colocaron en un cilindro diseñado para la observación, y se registró por medio de un cronómetro digital el tiempo total de frotamiento del área perinasal, durante los 5 minutos inmediatos a la inyección, que corresponde a la fase algésica aguda (fase I). Luego se registró por 10 minutos, a partir de los 20 minutos de la inyección y

hasta los 30 minutos, el tiempo durante el cual los animales se frotan el labio comprometido que corresponde a la fase inflamatoria (fase II). No se contabilizó el tiempo entre la fase I y II debido a que el ratón se encuentra en un período de quietud.



Figura 5: Ratones de la cepa CF/1, *Mus musculus*.



Figura 6: Inyección intraperitoneal de fármacos

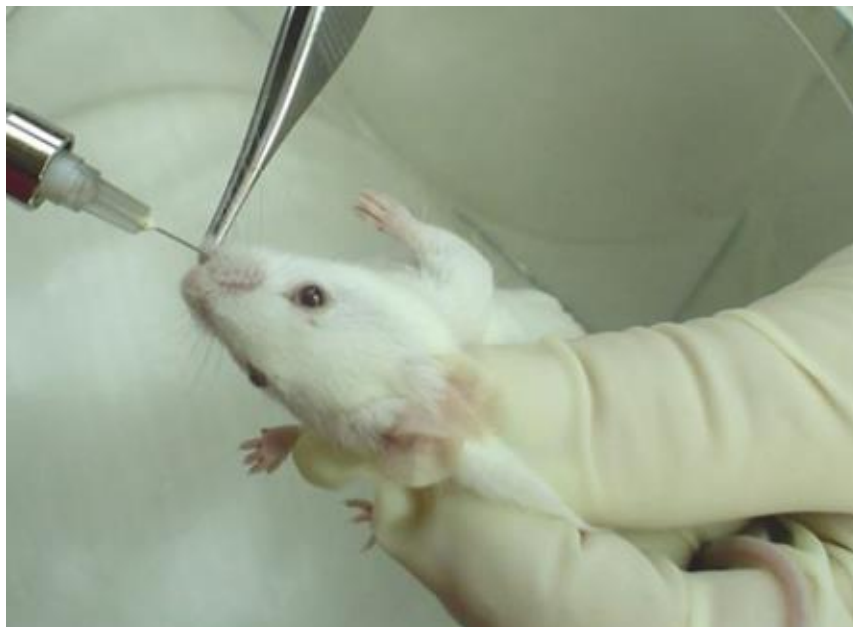


Figura 7: Inyección de 20 μ L de formalina al 1%.

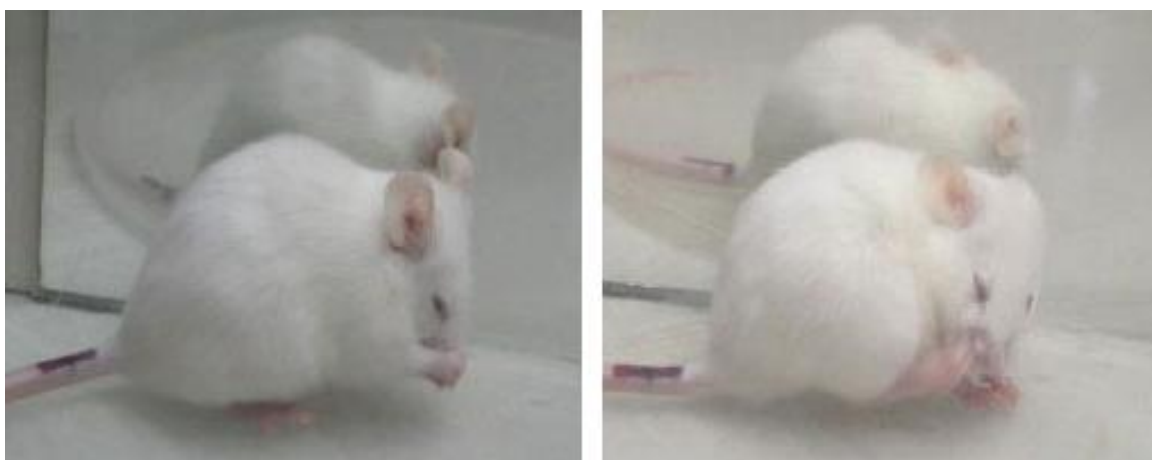


Figura 8: Frotamiento de zona inyectada.

El tiempo total de frotamiento (grooming) en cada período (en segundos), se convirtió a porcentaje del máximo efecto posible (MPE) por medio de la siguiente fórmula:

$$\%MPE = 100 - (\text{tiempo grooming post-droga} / \text{tiempo grooming control salino}) \times 100$$

La dosis que produce el 50% del MPE (DE_{50}) fue calculada por análisis de regresión lineal de la curva log dosis respuesta obtenida para tramadol.

2. Estudio de la interacción antinociceptiva

Para la evaluación de la actividad antinociceptiva, se construyeron curvas dosis-respuesta de tramadol, en presencia y en ausencia de L-NAME administrados por vía i.p. con un mínimo de 6 y un máximo de 8 animales por cada uno, de 4 dosis logarítmicas crecientes para el primero y 2 dosis para el segundo fármaco. Los animales controles fueron inyectados con solución salina al 0.9 %. Luego, se obtuvo y analizó las curvas dosis respuesta de la administración de tramadol, de L-NAME y de tramadol previa administración de L-NAME, de sus correspondientes valores de DE_{50} para tramadol, L-NAME y de la administración de tramadol en animales pretratados con L-NAME.

Para la evaluación de las interacciones se utilizó el método isoblográfico del laboratorio, en la forma descrita por *Zelcer* (25), que corresponde a representaciones gráficas de las curvas dosis-respuesta de un fármaco antes y después del pretratamiento con otro fármaco. Este tipo de análisis permite conocer si existe interacción, de que tipo y cuál es su magnitud.

Los resultados se expresaron como promedio \pm error estándar del promedio (EEM), o bien como promedio con su correspondientes 95 % de límite o intervalo de confianza (95 % LC). El análisis estadístico de los datos obtenidos de las curvas log dosis respuestas, se analizaron mediante regresión lineal por cuadrados mínimos para determinar las DE_{50} , ya sea, de los fármacos administrados en forma aislada como de sus combinaciones. Todos los parámetros estadísticos se calcularon con un programa computacional del laboratorio, y la significación estadística se determinó por análisis de varianza y pruebas t de Student, considerando la significación a un nivel del 5% ($p < 0,05$).

RESULTADOS

1. Grupo Control

La administración de solución salina al 0,9% vía i.p., 30 minutos antes de la administración de la solución de formalina, produjo un tiempo de frotamiento de la zona labial y perinasal derecha de $100,00 \pm 2,87$ seg. para la fase I (n=14), y de $103,36 \pm 2,77$ seg. para la fase II (n=14).

2. Grupo tratado con Tramadol

La administración i.p. de tramadol resultó en una actividad antinociceptiva dosis dependiente tanto en la fase algésica aguda (fase I), como en la fase inflamatoria (fase II), lo que se observa en el gráfico 1. La DE50 resultó ser de $0,672 \pm 0,345$ mg/kg para la fase I (n=28), mientras en la fase II resultó ser $1,902 \pm 0,599$ mg/kg (n=28).

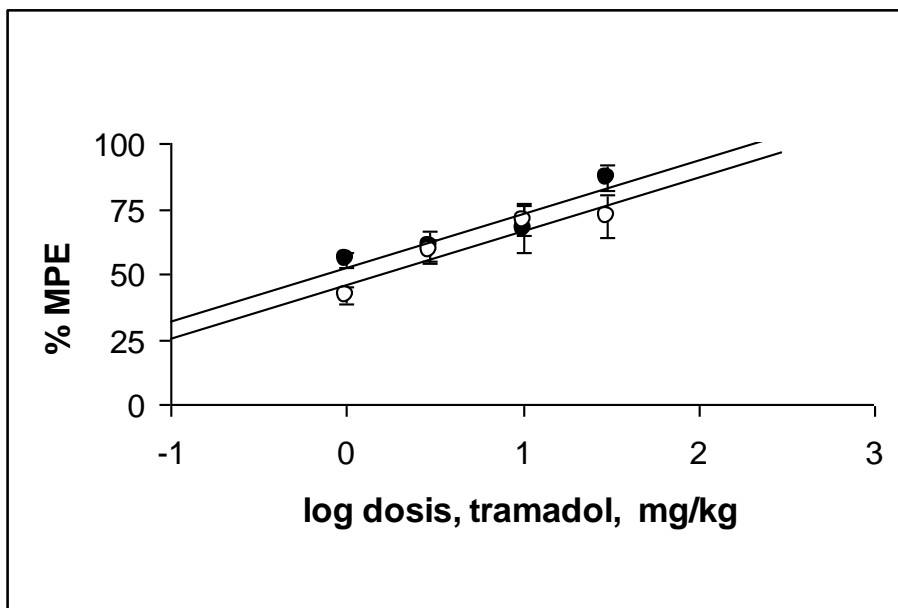


Gráfico 1: Curva dosis respuesta para la administración i.p. de tramadol

3. Grupo tratado con L-NAME

La administración i.p. de L-NAME resultó en una actividad nociceptiva dosis dependiente para ambas fases. Produciendo un tiempo de frotamiento de la zona labial y perinasal derecha de $58,86 \pm 6,08$ seg. para la fase I (n=7), y de $61,00 \pm 6,18$ seg. para la fase II (n=7) al inyectar L-NAME 1 mg/Kg. Por otra parte, produjo un tiempo de frotamiento de la zona labial y perinasal derecha de $39,14 \pm 5,20$ seg. para la fase I (n=7), y de $21,80 \pm 6,76$ seg. para la fase II (n=7) al inyectar L-NAME 10 mg/Kg.

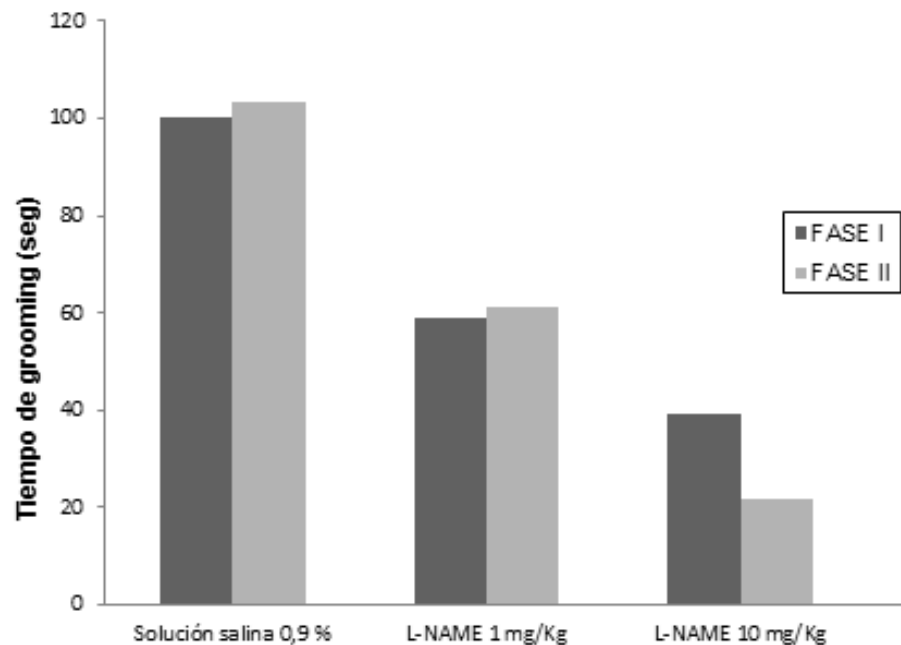


Gráfico 2: Gráfico dosis respuesta para la administración i.p. de L-NAME comparado con el grupo control.

4. Grupo tratado con Tramadol previa administración de L-NAME

La DE_{50} calculada para el grupo experimental tratado con tramadol + L-NAME 1 mg/Kg resultó ser 1.964 ± 0.10 para la Fase I (n=29) y de 0.743 ± 0.23 para la Fase II (n=29). La DE_{50} calculada para el grupo experimental tratado con tramadol + L-NAME 10 mg/Kg resultó ser 0.002 ± 0.0004 para la Fase I (n=28) y de 0.006 ± 0.001 para la Fase II (n=28).

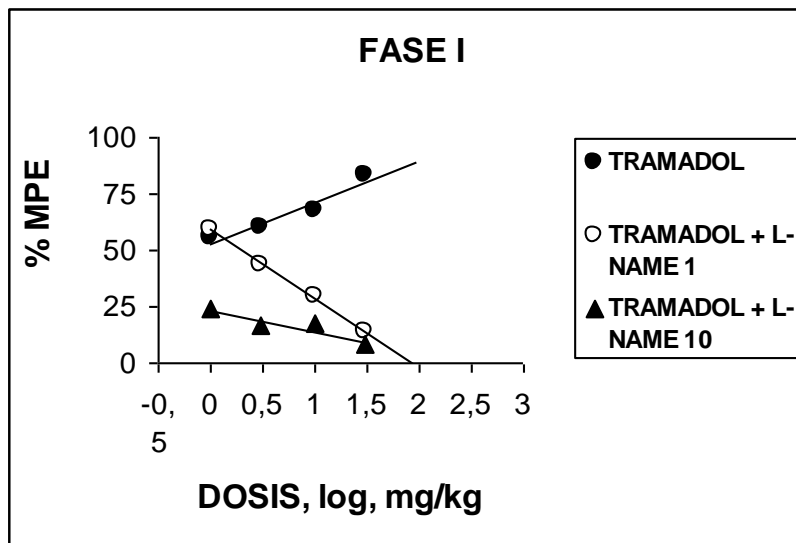


Gráfico 3: Curvas dosis respuesta para la administración de tramadol previo tratamiento con L-NAME 1 y L-NAME 10 comparadas con la curva dosis respuesta de Tramadol administrado como droga única en fase I.

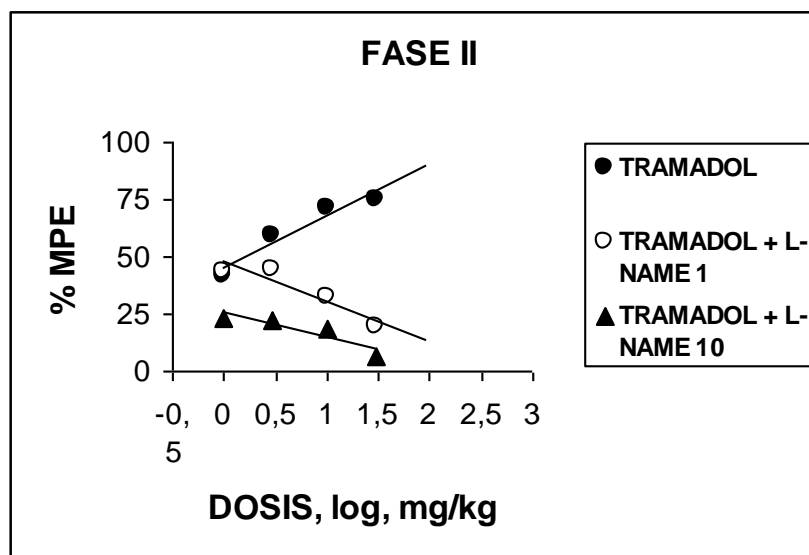


Gráfico 4: Curvas dosis respuesta para la administración de tramadol previo tratamiento con L-NAME 1 y L-NAME 10 comparadas con la curva dosis respuesta de Tramadol solo en fase II.

	DE ₅₀ ± EEM (mg/Kg i.p.)	
	FASE I	FASE II
TRAMADOL	0.67 ± 0.34	1.90 ± 0.60
+ L-NAME 1 mg/Kg	1.96 ± 0.10 *	0.74 ± 0.23 *
+ L-NAME 10 mg/Kg	0.002 ± 0.0004 ∞	0.006 ± 0.001∞

*, ∞ p < 0.05 vs. TRAMADOL

Tabla N° 1. Valores dosis efectiva 50 (DE₅₀) con sus respectivos errores estándar promedio (EEM). Efecto de diferentes dosis de L-NAME sobre la analgesia de tramadol (test de la formalina orofacial). Grupos de ratones recibieron dosis de tramadol solo y en combinación con las dosis de L-NAME indicadas.

DISCUSIÓN

La administración intraperitoneal de tramadol induce efectos analgésicos en forma dosis-dependiente, ya sea cuando se administra aisladamente como en animales pretratados con L-NAME. En este caso las dos concentraciones producen efectos variables según la fase de la analgesia evaluada y la concentración del fármaco aplicado.

Los resultados obtenidos en este trabajo pueden explicarse por el efecto bimodal que presenta L-NAME al bloquear las enzimas que producen el óxido nítrico, el cual se ha visto que ejerce efectos antagónicos ya que en ciertas condiciones es proanalgésico y en otras es pronociceptivo (14, 26).

La presencia de sinergia antinociceptiva generada sobre tramadol bajo ciertas condiciones, producida por el pretratamiento con L-NAME, sugiere que el sistema GMPc-NO podría estar comprometido o bien que L-NAME, pese a ser inhibidor no específico de las NOS frente a determinadas concentraciones, puede tener un efecto suficiente como para caracterizar su participación en los procesos fisiopatológicos.

Si bien una serie de estudios sugieren que el óxido nítrico participa en el proceso de nocicepción (10-14), la complejidad de los mecanismos que regulan la expresión de las diferentes óxido nítrico sintasas, la producción cuantitativa de NO producida por la enzima, y la célula donde se genera, así como también la diferente respuesta de las neuronas inhibitorias o excitatorias frente al NO, ha determinado que no se tenga bien definido cuál es el papel exacto de este gas en el dolor. La importancia del NO en la modulación de este proceso puede variar según las condiciones experimentales, lo que explica que las investigaciones publicadas hasta ahora hayan arrojado resultados contradictorios (14).

Los modelos experimentales de dolor e inflamación son herramientas valiosas e indispensables para entender, entre otras cosas, la complejidad de la participación de diferentes mediadores en la respuesta inflamatoria *in vivo*.

Estos resultados no concluyentes destacan la necesidad de mayor investigación en esta área; de allí la importancia de disponer de modelos animales de dolor válidos que permitan estudiar los mecanismos desencadenantes, los neurotransmisores y los mediadores involucrados en el proceso inflamatorio, así como la secuencia de eventos que lo acompañan.

CONCLUSIONES

- La administración de tramadol intraperitoneal produce un efecto antinociceptivo de naturaleza dosis dependiente, en el test algésimétrico de la formalina orofacial, para ambas fases.
- Para ambas fases del test algésimétrico de la formalina la administración intraperitoneal de L-NAME produce un efecto antinociceptivo de naturaleza dosis dependiente.
- El efecto del pretratamiento con L-NAME 1 mg/Kg antagoniza la actividad antinociceptiva de tramadol solamente en la fase I, en cambio, induce sinergia en la fase II.
- El pretratamiento de los animales con L-NAME 10 mg/Kg produce sinergia tanto en la fase algésica (Fase I) como en la fase algésica-inflamatoria (fase II).
- Los hallazgos podrían tener relevancia clínica, considerando que la sinergia inducida por el pretratamiento nos permitiría disminuir significativamente las dosis, con la consiguiente reducción de los efectos adversos.

SUGERENCIAS

- Evaluar la antinocicepción inducida por tramadol y L-NAME y la naturaleza de su interacción, mediante otras vías de administración.
- Evaluar la antinocicepción y el tipo de interacción mediante otros modelos algesiométricos.
- Evaluar la antinocicepción de tramadol y L-NAME, y la naturaleza de su interacción al ser coadministrados, mediante otras vías de administración y otros ensayos algesiométricos
- Realizar estudios de tramadol y L-NAME en modelos de dolor crónico.
- Realizar pruebas clínicas de la mezcla de tramadol y L-NAME, en otros modelos de dolor agudo.
- Evaluar la actividad de la mezcla y reacciones adversas en ensayos clínicos de dolor crónico.
- Analizar cambios de los umbrales de dolor con la administración de tramadol y L-NAME.
- Se sugiere generar análisis isoblográficos con fármacos que presentan distintos mecanismos de acción.

BIBLIOGRAFÍA

1. Miranda HF, Prieto JC, Noriega V, Zegpi C, Gonzalez C. (2011). Sinergism between dexketoprofen and meloxicam in an orofacial formalin test was not modified by opioid antagonists. *Pharmacol Rep*; 63: 433-440.
2. Leppert W. (2009). Tramadol as an analgesic for mild to moderate cancer pain. *Pharmacol Rep*; 61:978-992.
3. Turk DE, Okifuji A. (2001). "Pain terms and taxonomies of pain". In: Bonica's management of pain. Loeser JD, Butler SH, Chapman CR, Turk DE (eds). 3rd ed. Lippincott Williams & Wilkins, pp. 17-25.
4. Paeile C. (2005). "Algunas consideraciones de las vías aferentes y eferentes del estímulo nervioso". En: *El dolor: de lo molecular a lo clínico*. 3ª Edición. Editorial Mediterráneo, pp. 43-52.
5. Woolf CJ. (2010). What is this thing called pain?. *J Clin Invest*; 120(11):3742-3744.
6. Reig J. (2002). "Neuroanatomía del dolor: bases anatómicas de la percepción dolorosa". En: *Unidades de dolor. Realidad hoy, reto para el futuro*. Monografies Mèdiques de l'Acadèmia de Ciències Mèdiques de Catalunya i de Balears. Busquets CJ, Ribera MV, pp. 217-250.
7. Sessle BJ. (2005). Peripheral and central mechanisms of orofacial pain and their clinical correlatos. *Minerva Anesthesiol*; 71:117-136.
8. Nieuwenhuys R, Voogd J, Van Huijzen C. (2009). *El sistema nervioso central humano*. 4ª Edición, Editorial médica panamericana, pp. 701-705.
9. Arzumanian V, Stankevičius E, Laukevičienė A, Kėvelaitis E. (2003). Mechanisms of nitric oxide synthesis and action in cells. *Medicina*; 39: 535-541.
10. Espulgues JV. (2002). NO as a signalling molecule in the nervous system. *British J Pharmacol*; 135: 1079-1095.

11. Uğar-Çankal D, Ozmeric N. (2006). A multifaceted molecule, nitric oxide in oral and periodontal diseases. *Clinica Chimica Acta*; 366: 90-100.
12. Martínez-Quiroz Z, López-Muñoz FJ, Guevara-López UM. (2005) Participación local de la vía L-arginina-óxido nítrico-GMPc en el efecto antinociceptivo inducido por parecoxib. *Cir Ciruj*; 73: 119-125.
13. Vega AR. (2005). Bases moleculares de la inflamación: Regulación de la expresión de la óxido nítrico sintasa inducible, la ciclooxigenasa-2, y de la activación del factor nuclear de células T activadas en células fagocíticas. Tesis Sevilla, pp.37-39.
14. Duarte ID, Ferreira SH. (2000). L-NAME causes antinociception by stimulation of the arginine-NO-cGMP pathway. *Mediators of Inflammation*; 9: 25–30.
15. Raffa R, Pergolizzi J, Tallarida R. (2010). Analgesic combinations. *J Pain*; 11(8): 701-709.
16. Vallejo M, Ruiz F. (2009). “Aspectos básicos de la farmacología clínica de los analgésicos opioides”. En: *Opioides en la práctica médica*. Asociación colombiana para el estudio del dolor. Bogotá, Colombia, pp. 1-18.
17. Trescot A, Datta S, Lee M, Hansen H. (2008). Opioid pharmacology. *Pain Physician*; 11:S133-S153.
18. Waldhoer M, Bartless SE, Whistler JL. (2004). Opioid receptors. *Annu Rev Biochem*; 73: 953-990.
19. Raffa RB, Stone DJ. (2008). Unexceptional seizure potential of tramadol or its enantiomers or metabolites in mice. *JPET*; 325:500–506.
20. Le Bars D, Gozariu M, Cadden SW. (2001). Animal models of nociception. *Pharmacol Rev*; 53:597-652.
21. Raboisson P, Dallel R. (2004). The orofacial formalin test. *Neurosci Biobehav Rev*; 28:219-226.

22. Luccarini P, Childeric A, Gaydier A-M, Voisin D, Dallel R. (2006). The orofacial formalin test in the mouse: A behavioral model for studying physiology and modulation of trigeminal nociception. *J Pain*; 12: 908-914.
23. Miranda H. F., Sierralta F., Pinardi G. (2001). An isobolographic analysis of the adrenergic modulation of diclofenac antinociception. *Anesth Analg*; 93: 430–435.
24. Miranda HF, Puig M, Prieto JC, Pinardi G. (2006). Sinergism between paracetamol and nonsteroidal anti-inflammatory drugs in experimental acute pain. *Pain*; 121:22-28.
25. Zelcer S, Kolesnikov Y, Kovalyshyn I, Pasternak D, Paternak G. (2005). Selective potentiation of opioid analgesia by nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Brain Res*; 1040:151-156.
26. Miclescu A, Gordh T. (2009). Nitric oxide and pain. *Acta Anaesthesiol Scand*; 53: 1107-1120.