



**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA**

**“ASOCIACIÓN ANTINOCIOCEPTIVA DE IBUPROFENO CON TRAMADOL EN
DOLOR OROFACIAL EXPERIMENTAL”**

Andrea Gálvez Neira

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

**TUTOR PRINCIPAL
Prof. Dr. Hugo F. Miranda**

**TUTOR ASOCIADO
Prof. Dr. Fernando Sierralta**

**Santiago - Chile
2011**

A Francisco Ignacio, gracias por haber sido mi hermano...

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo no es fruto de un simple trabajo individual, sino que es el resultado de una suma de apoyos y esfuerzos a lo largo de meses.

Doy las gracias...

A todas las personas que, aunque no sean conscientes de ello, han hecho posible finalizar mi carrera.

A mi amado esposo por su paciencia y comprensión.

A mis padres por su apoyo incondicional.

A mis amigos verdaderos que la vida me ha regalado.

A mis tutores, Dr. Hugo Miranda y Dr. Fernando Sierralta.

A los buenos amigos del laboratorio de Farmacología Sres. José López y Alejandro Correa.

A la Mati por quererme.

ÍNDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
1. Dolor	3
1.1. Definición	3
1.2. Características del dolor ²	3
1.3. Factores que modulan el dolor ^{2, 10}	4
1.4. Clasificación ²	5
1.4.1. Según duración o evolución.....	5
1.4.2. Según fisiopatología u origen	6
1.4.3. Según discriminación espacial.....	6
2. Estructuras centrales y vías del dolor	7
2.1. Vías espinales del dolor ^{13,14,15}	9
2.2. Modulación del dolor	9
2.3. Neurofisiología del dolor orofacial.....	11
3. Control farmacológico del dolor	12
3.1. Opioides	14
3.1.1. Tramadol	14
3.2. Analgésicos Antiinflamatorios no esteroideos (AINEs).....	17
3.2.1. Ibuprofeno	21
4. Modelos animales de dolor	23
4.1. Prueba de la formalina orofacial	24
4.1.1. Interacción de fármacos:.....	25
HIPÓTESIS	26
OBJETIVO GENERAL	26
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26
MATERIAL Y MÉTODOS	26
1. Test de la formalina	28
2. Estudio de la interacción antinociceptiva	30
RESULTADOS.....	32
1. Grupo control.....	32
2. Grupo tratado con tramadol	32
3. Grupo tratado con Ibuprofeno	34
4. Grupo tratado con la de mezcla tramadol e ibuprofeno.....	35
5. Análisis isoblográfico de la interacción entre tramadol e ibuprofeno..	35
DISCUSIÓN	37
CONCLUSIONES	39
SUGERENCIAS.....	40
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41

RESUMEN

El dolor dental y en general el de localización orofacial, ha sido objeto de preocupación desde la antigüedad, y en la actualidad este tipo de dolores sigue siendo uno de los problemas enfrentados a diario tanto en Medicina como en Odontología. Muchas de las dificultades en el manejo de las condiciones de dolor orofacial agudo y crónico derivan de la falta de conocimiento y comprensión de los mecanismos que subyacen al dolor orofacial, quizá en parte, debido a la relativa escasez de investigaciones dedicadas a esta región comparada con el resto del cuerpo.

El manejo del dolor continúa siendo uno de los mayores desafíos para la medicina. Con este fin se han desarrollado una gran variedad de fármacos, entre los cuales se puede mencionar a los opioides y analgésicos antiinflamatorios no esteroidales (AINEs). La combinación de analgésicos de probada eficacia es una estrategia destinada a lograr uno o más objetivos terapéuticos, tales como: facilitar el debido cumplimiento del paciente; simplificar la prescripción; mejorar la eficacia sin incrementar los efectos adversos o disminuirlos sin perder eficacia.

En el presente trabajo se evaluó la actividad analgésica producida por un AINE (ibuprofeno) y un opioide (tramadol) mediante el test algosimétrico de la formalina orofacial. Se utilizaron ratones a los cuales se les inyectó en el labio superior 20 μ L de una solución de formalina al 2%, que produce un comportamiento bifásico: fase I (algésica) y II (algésica-inflamatoria). La administración de ibuprofeno y tramadol indujo analgesia tanto en la fase I como en la fase II, siendo más potente la actividad del tramadol, en ambas fases. Al coadministrarlo en proporción 1:1 de sus DE_{50} se produjo un efecto sinérgico en ambas etapas del ensayo. Los hallazgos del presente trabajo, podrían ser de utilidad clínica en el tratamiento farmacológico alternativo del dolor tanto agudo (fase I, del ensayo) como crónico (fase II, del ensayo).

INTRODUCCIÓN

El dolor a través de la historia se ha familiarizado con el quehacer odontológico, el cual es considerado como una experiencia subjetiva y desagradable, que complementa las experiencias físicas con la psicológicas y sociales del individuo, resultando una percepción individual^{1, 2}.

La función del dolor en la protección del organismo se pone de manifiesto en que desencadena reacciones e induce comportamiento de evitación aprendida que conlleva a una disminución de la actuación del agente causal y de los posibles daños. Sin embargo, en las enfermedades inflamatorias, las neuropatías y el cáncer, entre otras patologías, el dolor deja de ser un signo de alerta y pasa a ser uno de los síntomas capitales de la enfermedad³.

Desde el punto de vista neurofisiológico, la transmisión de información relacionada con el dolor, desde la periferia a la corteza cerebral, depende de la integración de la señal en tres niveles del sistema nervioso: la médula espinal, el tronco encefálico y el telencéfalo. En el cumplimiento de su tarea de salvaguardar la salud humana, el dolor puede desarrollarse como resultado de daño o alteración a nivel de las neuronas aferentes primarias o surgir espontáneamente sin estímulo causal aparente⁴.

La región orofacial es una de las áreas más densamente inervadas del cuerpo que concentra algunos de los dolores agudos más comunes, como aquellos que acompañan los estados patológicos de los dientes y estructuras relacionadas. Es además, sitio frecuente de dolor crónico (neuralgia post-herpética, migraña) y dolores referidos⁵.

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 los cuales se puede mencionar a los opioides y antiinflamatorios no esteroideos⁶.

Los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs), son fármacos capaces de alterar el curso natural de la respuesta inflamatoria inhibiendo aquellas vías que generan dolor más allá del tiempo necesario. Esto lo realizan mediante la inhibición de las enzimas ciclooxigenasas, responsables de la formación de elementos proinflamatorios a nivel periférico y central.

Los opioides, son fármacos obtenidos a partir de la morfina. Su mecanismo de acción difiere de los AINEs en que se unen a receptores específicos del sistema nervioso central (SNC), inhibiendo así los impulsos nociceptivos provenientes del sitio injuriado.

La combinación de analgésicos de probada eficacia es una estrategia destinada a lograr uno o más objetivos terapéuticos, tales como: facilitar el debido cumplimiento del paciente; simplificar la prescripción; mejorar la eficacia sin incrementar los efectos adversos o disminuirlos sin perder eficacia⁷.

En el presente estudio se evaluó la acción de ibuprofeno y tramadol, así como su interacción usando el análisis isoblográfico en un modelo de dolor orofacial experimental.

1. Dolor

1.1. Definición

El 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”. Esta definición aceptada de forma universal, considera en primer lugar que el dolor no es una experiencia puramente nociceptiva (sensorial), sino que incluye además componentes emocionales y subjetivos inseparables de la sensación dolorosa; por otra parte, esta definición evita decir claramente que el dolor está producido únicamente por daño tisular, pudiendo aparecer sin causa somática que lo justifique⁸.

Nocicepción es el proceso por el cual la intensidad térmica, mecánica, o estímulos químicos son detectados por una subpoblación de fibras nerviosas periféricas, llamadas nociceptores⁹.

1.2. Características del dolor^{2,10}

Según las características del dolor se puede conocer su origen o etiología y por lo tanto su diagnóstico, su pronóstico y tratamiento. Estas características son:

- Localización: el dolor puede ser localizado a un segmento corporal o generalizado.

- Tipo o carácter: punzante, opresivo, lacerante, cólico, etc.
- Duración: el tiempo que transcurre desde su aparición.
- Evolución: cómo se desarrolla en el tiempo.
- Frecuencia: es el número de veces que ha ocurrido el dolor de similares características en un tiempo determinado.
- Intensidad: cuantificar el dolor.
- Irradiación: es el trayecto que recorre el dolor desde su localización original hasta otro lugar.
- Síntomas acompañantes: como náuseas, vómitos, diarrea, fiebre, temblor, etc.
- Signos acompañantes: como sudoración, palidez, escalofríos, trastornos neurológicos, etc.
- Factores agravantes: son los factores que aumentan el dolor; por ejemplo: tras la ingesta, determinados movimientos, etc.
- Factores atenuantes: son los factores que disminuyen el dolor; por ejemplo: el descanso, posiciones corporales, medicación utilizada, etc.

1.3. Factores que modulan el dolor^{2, 10}

Existen múltiples factores psicológicos y físicos que modifican la percepción sensorial del dolor, unas veces amplificándola y otras veces disminuyéndola.

- Personalidad: estado de ánimo, expectativas de la persona, ansiedad, miedo, enfado, frustración.
- Momento o situación de la vida en la que se produce el dolor.
- Relación con otras personas, como familiares, amigos y compañeros de trabajo.
- Sexo y edad.
- Dolores previos y aprendizaje de experiencias previas.
- Nivel intelectual, cultura y educación.
- Ambiente: ciertos lugares (ruidosos, iluminación intensa), tienden a exacerbar algunos dolores (cefaleas).

Actualmente se entiende dolor como la integración de tres componentes:²

- a. El componente sensitivo, que hace referencia al impulso desencadenado desde los receptores periféricos de dolor.
- b. El componente cognitivo, que se relaciona con el aprendizaje cultural, entorno social y experiencias previas respecto al dolor.
- c. El componente emotivo-afectivo, que hace referencia a las emociones frente a un impulso doloroso y la manera en que éstas puedan influir en la interpretación del mismo.

1.4. Clasificación²

El dolor se puede clasificar según diversos criterios:

1.4.1. Según duración o evolución

a) Dolor Agudo:

Es producido por un daño tisular importante y su duración depende del lapso estimado como suficiente para que los tejidos sanen. Según el comité de taxonomía de las algias de la Asociación Internacional del Estudio del Dolor (IASP) propone un tiempo de 3 meses. El dolor agudo constituye un mecanismo fisiológico útil, necesario y protector, puesto que evita que nos exponamos a estímulos dañinos mediante reflejos de protección limitando el daño e iniciando los procesos de reparación. Este es el dolor observado después de un trauma, intervenciones quirúrgicas y en algunas enfermedades.

b) Dolor crónico:

Se observa la persistencia del dolor aún después de que se ha reparado el tejido dañado. El dolor crónico puede ser debido a la persistencia en la estimulación de los nociceptores en áreas donde ha ocurrido daño tisular en ausencia del estímulo desencadenante. En la mayoría de los casos, se le atribuyen causas de tipo neurológica, endocrina e inclusive genética. Carece de propiedades biológicas reparadoras.

1.4.2. Según fisiopatología u origen

a) Dolor somático o nociceptivo:

Es aquel que aparece cuando un estímulo potencialmente dañino para la integridad física excita los receptores nociceptivos de la piel, músculos o articulaciones. Es habitualmente bien localizado y el paciente no tiene grandes dificultades en describirlo.

b) Dolor neuropático:

Es el resultado de lesiones o alteraciones crónicas en vías nerviosas periféricas o centrales. Se produce por anomalías funcionales (desafrenciación, irritación o defecto de inhibición del sistema nervioso) o estructurales del mecanismo de información/transmisión o codificación del dolor, lo que ocasiona descargas espontáneas y paroxísticas que son interpretadas como dolor.

Puede desarrollarse y persistir en ausencia de estímulo nocivo evidente, e involucrar al sistema nervioso central.

c) Dolor psicógeno:

No resulta de una estimulación nociceptiva ni de una alteración neuronal, sino de causa psíquica (depresión, ansiedad, hipocondría) o de la intensificación psicógena de un dolor orgánico, ya que si bien el daño estuvo o está presente, el problema central es la amplificación y distorsión de esos impulsos periféricos por el estado psicológico.

d) Dolor visceral:

El dolor visceral es producto de la estimulación de receptores de dolor que inervan estructuras viscerales tales como intestinos, órganos internos, etc. Clásicamente es referido por el paciente como un dolor inespecífico de localización difusa, mal definido.

1.4.3. Según discriminación espacial

a) Dolor epicrítico:

Su localización es precisa dentro de un campo receptivo, de fácil discriminación. El paciente lo refiere habitualmente como punzante, lancinante,

fulgurante, etc. Durante el trayecto hacia el SNC, los impulsos viajan por una sola vía preestablecida sin la emisión de impulsos paralelos.

b) Dolor protopático:

Corresponde a un dolor difuso, mal localizado y relatado por los pacientes como un dolor sordo que abarca extensiones anatómicas mayores que el dolor epicrítico. Durante el trayecto al SNC, los impulsos pueden hacerse divergentes por emisión de vías colaterales o recibir aferencias de neuronas de otros dermatomas, dando lugar al dolor referido.

2. Estructuras centrales y vías del dolor

Son muy variadas las estructuras nerviosas que participan en la percepción de la experiencia dolorosa. Existen niveles de integración, donde la información nociceptiva es procesada de forma organizada y sometida a control de los sistemas individuales. Los eventos generados entre el sitio activo del tejido dañado y la percepción de dicho daño se denominan nocicepción y este mecanismo puede ser graficado como una cadena de tres neuronas^{11, 12}:

- Neurona de primer orden, que se origina en la periferia, lugar donde se encuentra el nociceptor. Desde aquí se proyecta a la médula espinal.
- Neurona de segundo orden, que asciende a través del asta posterior de la médula espinal.
- Neurona de tercer orden, que se proyecta a la corteza cerebral.

Los axones aferentes de las neuronas nociceptoras hacen sinapsis preferentemente en esta área de la médula, que se subdivide en 6 capas diferenciadas: las láminas de Rexed, I a VI. Los distintos tipos de nociceptores, con sensibilidades diferentes, hacen sinapsis en láminas distintas (ver Figura 1).

Las láminas I (zona marginal) y II (sustancia gelatinosa) reciben los axones aferentes de los nociceptores periféricos, sobre todo fibras C y Aδ. La mayor parte de las neuronas de la lámina I reciben sólo estímulos nocivos, por lo que se denominan "nociceptores específicos", y se proyectan después sobre los centros superiores del SNC. Sin embargo, las neuronas de amplia gama dinámica (WDR, por wide dynamic range) responden de manera progresiva, primero a estímulos no nocivos de baja intensidad, que se convierten en nocivos cuando la intensidad aumenta. La lámina II contiene casi

exclusivamente interneuronas reguladoras, que modulan la intensidad de los estímulos tanto nocivos como no nocivos, y funcionan como filtros de las señales que pasan de la periferia al cerebro.

Las láminas III y IV (núcleo propio) reciben axones aferentes de receptores no nocivos A β . Estas neuronas reciben por tanto estímulos no nocivos de la periferia y tienen campos receptivos pequeños, organizados de forma topográfica.

La lámina V contiene fundamentalmente neuronas WDR que proyectan hacia el tronco cerebral y ciertas regiones del tálamo. Reciben fibras de tipo C, A δ y A β , en muchos casos procedentes de estructuras viscerales. Puesto que en la lámina V convergen aferencias somáticas y viscerales, ello podría explicar el fenómeno del dolor referido, una situación frecuente en clínica, en la que el dolor asociado a una lesión en una víscera se detecta de manera reproducible de un individuo a otro en una zona de la superficie corporal.

La lámina VI (núcleo dorsal) está implicada en la propiocepción inconsciente.

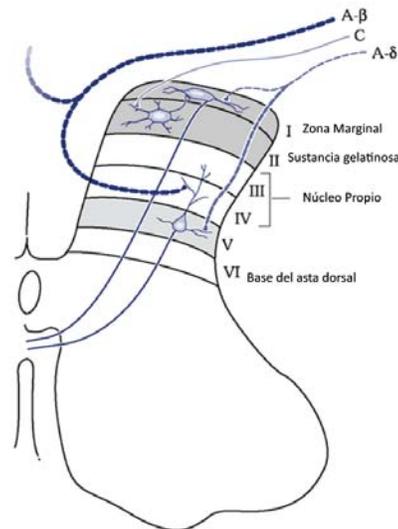


Figura 1. Patrón de terminación laminar de terminales sensoriales primarios en asta dorsal²

A este nivel, las interneuronas (neurona de segundo orden), son encargadas de modular las sinapsis. Una vez realizada la sinapsis con la segunda neurona de la raíz posterior medular, la fibra se cruza en la comisura blanca anterior (en el 90% de los casos el axón de la segunda neurona decusa la línea media), para formar las vías espinales del dolor, que ascienden hacia

las estructuras cerebrales llegando al tálamo, específicamente al núcleo ventro-postero-medial (NVPM). Aquí parte la tercera gran neurona, que puede proyectar a distintas partes: corteza somato sensitiva, sistema límbico, sistema autónomo, etc; dando como resultado las diferentes características de la experiencia dolorosa^{13,14, 15}.

2.1. Vías espinales del dolor^{13,14,15}

Las principales vías implicadas en la transmisión del dolor son:

- La vía que comunica la médula espinal con la corteza cerebral: el haz o tracto espinotalámico (STT) o vía anterolateral, implicada en la percepción y en las reacciones conscientes en respuesta a una sensación dolorosa; contiene axones procedentes de los siguientes tipos de neuronas:
 - 75% neuronas nociceptivas de amplia gama dinámica (WDR) de la lámina V.
 - 25% neuronas nociceptivas específicas de la lámina I.
 - Neuronas no nociceptivas A β y A δ .
- Los haces espinoparabraquial amigdalino (SPA) y espinoparabraquial hipotalámico (SPH), relacionados con las reacciones subcorticales al dolor (sin intervención de la corteza cerebral); ambos haces están constituidos casi exclusivamente por axones provenientes de nociceptores específicos de la lámina I.

2.2. Modulación del dolor

Las neuronas que conforman las vías descendentes se comunican y ejercen su rol modulador sobre neuronas que pueden ser serotoninérgicas, noradrenérgicas y, con menor importancia, dopaminérgicas, a través de la secreción de múltiples neurotransmisores y neuromoduladores presentes en el asta dorsal ya sea en terminales aferentes primarios, en interneuronas y/o neuronas de proyección supramedular¹⁶.

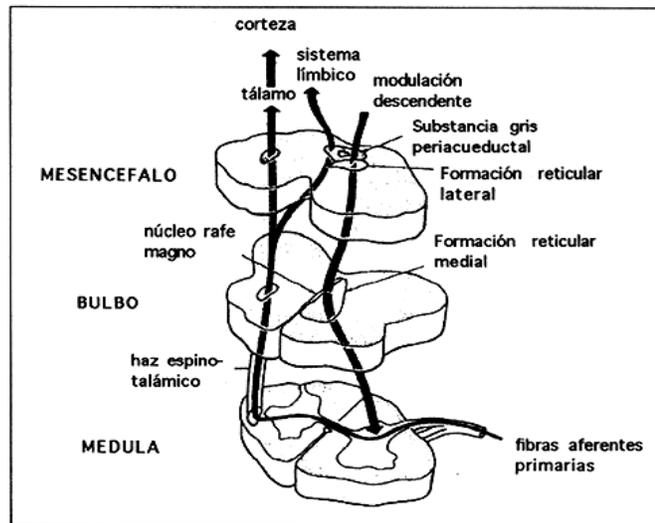


Figura 2. Vías ascendentes, descendentes y modulación del dolor (Adaptado de Bónica)²

Desde los centros superiores, las vías descendentes realizan sinapsis en otros centros de control del dolor que van desde la corteza cerebral hacia la médula espinal participando en forma determinante en la modulación del dolor¹⁶.

Las neuronas de la sustancia gris periventricular (SGPV) y periacueductal (SGPA) del cerebro medio hacen conexiones excitatorias en la médula rostro ventral (MRV) incluyendo al núcleo serotoninérgico del Rafe Magno (NRM) y al núcleo reticularis paragigantus celularis. Las neuronas del MVR hacen sinapsis inhibitorias con la lámina I, II, V del asta dorsal, sitios de terminación de las fibras aferentes primarias nociceptivas. La estimulación de las fibras MVR inhiben a las neuronas adrenérgicas, incluyendo a las del tracto espi-notalámico, que responden a la estimulación nociceptiva. Los circuitos locales de la médula espinal modulan las acciones descendentes. Un esquema de esta modulación se muestra en la Figura 2.

Por otra parte, en la SGPA se localiza una red inhibitoria GABAérgica activa, que cuando se genera un estímulo nociceptivo, se produce una inhibición de este sistema, activándose la vía excitatoria del glutamato en la SGPA, estimulando al NRM liberando serotonina (5-HT), noradrenalina (NA) y encefalinas. Éstos actúan directamente en la médula espinal bloqueando la transmisión de estímulos nocivos; se ha podido identificar en este proceso a

receptores serotoninérgicos (5-HT_{1a}, 5-HT_{1b}, 5-HT₃) adrenérgicos (α_2) y opioides: MOR (μ), DOR (δ), KOR (κ). Recientemente se han identificado dos tipos de células participantes en los mecanismos descendentes en el NRM, éstas son: células de encendido (on) y de apagado (off), las que excitan o inhiben respectivamente a las aferencias nociceptivas¹⁶.

2.3. Neurofisiología del dolor orofacial

Para que el organismo genere una respuesta dolorosa se necesita de la participación de un sinnúmero de redes de vías neuronales, de neurotransmisores y de centros de integración de información y generación de la respuesta^{2,12}.

La región orofacial es una de las más sensibles, por estar ricamente inervada y con mayor representación y diversificación de receptores. Es menester del odontólogo conocer cuáles son los mecanismos involucrados en la nocicepción de esta zona, ya que la gran mayoría de los pacientes presenta dolor (de diversa etiología) cuando va a consultar. El principal nervio que está a cargo de esta región es el trigémino (V par), el cual emerge en la superficie mediolateral de la protuberancia, como una raíz sensitiva grande y una raíz motora pequeña. Se divide en 3 ramas: la oftálmica, maxilar y mandibular, las que emergen del cráneo por la cisura orbitaria superior, el agujero redondo y el agujero oval respectivamente.

Al percibir un estímulo nocivo se activan los nociceptores de algunas de las fibras A δ y C, las que van a llevar la información dolorosa hacia el SNC, pasando previamente por el ganglio de Gasser, de donde sale otro axón que se proyecta ipsilateralmente hacia el tronco cerebral, para hacer sinapsis con neuronas de segundo orden del complejo nuclear sensorial trigeminal. Este complejo está formado por los núcleos sensitivo principal, mesencefálico y el espinal trigeminal (dividido en núcleo oral, interpolar y caudal). Luego, estas fibras ascienden por el tracto trigeminotalámico anterior hacia el tálamo, para hacer sinapsis con la neurona de tercer orden, cuyo soma se ubica en el núcleo ventral posteromedial del tálamo (relacionado con localización y discriminación del dolor), que van a ascender a través del brazo posterior de la cápsula interna para terminar en el tercio inferior de la circunvolución poscentral, en la corteza cerebral ipsilateral (ver Figura 3). El componente afectivo del dolor estaría

relacionado con neuronas nociceptivas presentes en los núcleos más mediales del tálamo^{17, 18}.

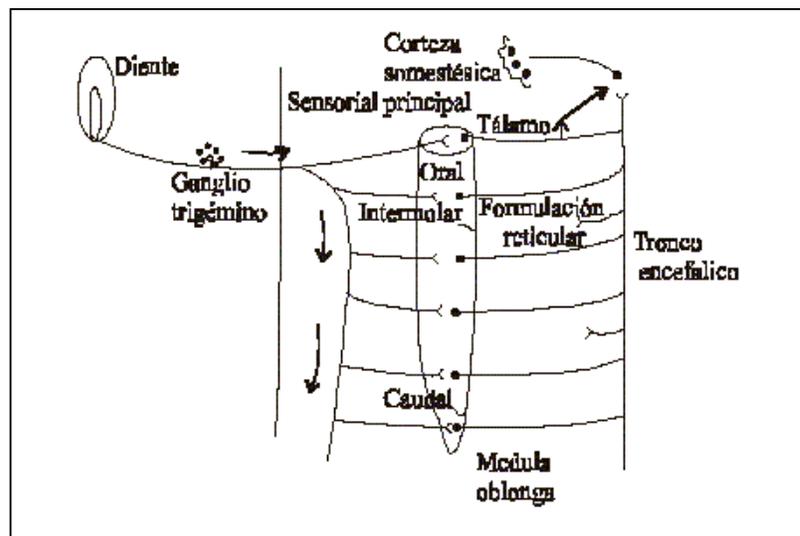


Figura 3. Esquema de la vía somatosensorial trigeminal (modificado de Sessle)¹⁷

Ahora, los mecanismos neuroquímicos involucrados son variados y se encuentra a una gran cantidad de sustancias: neuropéptidos (sustancia P), otros neuroquímicos endógenos, como somatostatina, CGRP, ATP, péptidos opiáceos, factores de crecimiento, etc. Las vías inhibitorias descendentes juegan el mismo papel que en el resto del cuerpo².

3. Control farmacológico del dolor

Existe una amplia gama de fármacos terapéuticos capaces de inducir efectos selectivos en la inhibición de la neurotransmisión dolorosa, éstos difieren tanto en su composición química, como en la vía de administración que se utiliza. Dependiendo de su naturaleza química, pueden actuar sólo en 3 niveles:

- 1) Conducción del estímulo doloroso: en este caso pueden verse afectadas las membranas depolarizables de las neuronas, ya que se inhibe de manera reversible la conducción del potencial de acción que se propaga por éstas. Como ejemplo podemos nombrar a los anestésicos locales².
- 2) Nivel Central: existen fármacos que actúan en receptores endógenos específicos en el sistema nervioso, y participan del control descendente del

dolor. Estos son los opiodes o analgésicos opiáceos, antiguamente conocidos como narcóticos, pueden ser fármacos naturales o sintéticos que derivan del opio (de la adormidera *Papaver somniferum*) y que se caracterizan por deprimir la transmisión nerviosa (por inhibición de la adenililciclase, apertura de canales de K⁺ y cierre de canales de Ca²⁺) y por ende los cuadros dolorosos, ya que éstos se expresan en la mayoría de las áreas donde se procesa el dolor en el SNC¹⁹.

3) Nivel Periférico: la respuesta local es controlada en el sitio específico de la injuria, para disminuir las señales de dolor que se dirigen al SNC; control que es ejercido por 2 tipos de fármacos: los antiinflamatorios esteroidales o corticoides y antiinflamatorios no esteroidales o AINEs (serán vistos más adelante).

En el caso de los corticoides, a partir del esteroide natural cortisol se han obtenido numerosos derivados sintéticos, dando origen a estos fármacos (hidrocortisona, betametasona, prednisona, beclometasona, fluticasona, etc), altamente utilizados en medicina, por ser la inflamación crónica un proceso patológico común a muchas patologías de diversas etiologías.

Los efectos antiinflamatorios e inmunosupresores, son sus principales usos "farmacológicos", debido a la multiplicidad de efectos celulares que poseen¹⁹.

Sin embargo, también se debe mencionar que existen otro tipo de fármacos, como los α -adrenérgicos, anestésicos locales, colinérgicos, nitridérgicos, serotoninérgicos, antidepresivos, anticonvulsivante y cannabinoides, entre otros, que ejercen su función en receptores que son expresados pre y post-sinápticamente en neuronas a nivel espinal y supraespinal (α -adrenérgicos, serotoninérgicos y muscarínicos), ya mencionados^{20, 21}.

A lo largo de los decenios, los fármacos AINEs y los opiodes han sido los fármacos más comúnmente utilizados en el manejo del dolor agudo y crónico²².

3.1. Opioides

Existe registro del uso de la morfina, en forma de opio, en los papiros del antiguo Egipto que datan hace más de 4.000 años. Ya en el siglo pasado, se logra aislar la morfina de entre el conjunto de alcaloides que componen el opio. La morfina es un derivado fenantrénico, estructurado en un núcleo morfínico tetracíclico. Su disposición química ha permitido que la industria farmacéutica lograra manipular algunos grupos terminales de ciertos carbonos para así obtener semisintéticos cuyas características específicas la hace útil en clínica. Se destaca el hidroxilo fenólico en el carbono 3, el hidroxilo alcohólico en el carbono 6, el doble enlace entre los carbonos 7 y 8 y el metilo (CH₃) en el nitrógeno terciario, es en estos puntos donde se introducen las sustituciones. Al suplir el grupo OH del carbono 3 por OCH₃, se obtiene un derivado de la morfina llamado codeína.

En 1962 fue sintetizado por primera vez un analgésico de acción central relacionado estructuralmente con la codeína y la morfina llamado tramadol (ver Figura 4).

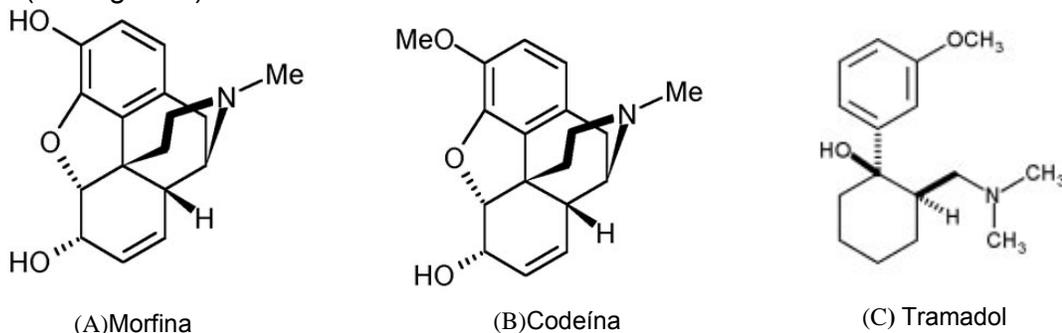


Figura 4. Estructura química de opioides.

3.1.1. Tramadol

El tramadol es un análogo sintético de 4 –fenilpiperidina de codeína. Tiene actividad agonista en los receptores opioides, sin actividad antagonista. Al igual que la codeína, tiene una sustitución de metilo en fenol del resto de la estructura de la morfina, lo que explica su afinidad relativamente débil de receptores opioides. Inicialmente se pensaba que el tramadol carecía de selectividad para receptores opioides MOR(μ), KOR (κ), o DOR (δ), pero

recientemente fue encontrada selectividad en el receptor MOR. La afinidad del tramadol para receptores MOR es 10 veces menor que la codeína, 60 veces menor que el propoxifeno, 1000 veces menor que la metadona, y 6000 veces menor que la morfina. El metabolito O-desmetilado del tramadol (M1) tiene de 2 a 4 veces la potencia analgésica del compuesto original y de 4 a 200 veces mayor afinidad por los receptores MOR- que el compuesto de origen. Tramadol inhibe la recaptación de norepinefrina y serotonina, aumentando así las concentraciones de estos dos neurotransmisores en el sistema nervioso central (SNC). Esta dualidad de acción ha llevado a la FDA a clasificarla como un analgésico opioide no tradicional o atípico. La norepinefrina endógena y serotonina están implicados en la modulación descendente del dolor, donde pueden mediar en el efecto analgésico de tramadol. Tramadol existe como una mezcla racémica. Hay diferencias en los opioides de unión al receptor, la inhibición de la recaptación de monoaminas y el metabolismo entre los dos enantiómeros. El S(+) enantiómero tiene mayor afinidad para MOR-receptores y preferentemente inhibe la captación de serotonina y mejora la liberación de serotonina. El R(-) enantiómero preferentemente inhibe la recaptación de la noradrenalina, y consecuente estimulación de los receptores α 2-adrenérgicos. La droga es comercializada como el racemato del isómero trans, ya que esta formulación es más potente que cualquier enantiómero²³.

El R(+) tramadol y el metabolito (+)-O-desmetil-tramadol son agonistas del receptor MOR. Además R(+) tramadol inhibe la recaptación de serotonina y de noradrenalina, mientras que el S(-) tramadol inhibe la recaptación de noradrenalina pero es 10 veces más potente que su R(+) enantiómero²⁴. Cuando se administra en forma oral, la absorción de tramadol es casi completa (100%) después de un tiempo de latencia que varía entre 12 y 30 minutos dependiendo si se administra en gotas o cápsulas respectivamente.

Es rápidamente distribuido en el cuerpo, con una vida media de 6 minutos en la primera fase, seguida de una segunda fase de distribución lenta con una vida media de 1.7 horas. En modelos de roedor se ha visto una distribución particular en pulmones, bazo, hígado, riñones y cerebro. La biodisponibilidad del fármaco disminuye a un 70%, hecho que se atribuye al primer paso hepático. El tramadol es metabolizado en el hígado donde ocurren reacciones fase I (N-desmetilación u O-desmetilación) y fase II (conjugación) lo que deriva en diversos metabolitos siendo los más importantes (\pm)-O-desmetil-

tramadol quien es metabolizado por el complejo de los citocromos, especialmente el P450 (CYP) 2D6. El metabolito (+)-O-desmetil-tramadol es el agonista con mayor afinidad por el receptor MOR, mostrando tener una afinidad de 700 veces la del compuesto racémico, por lo que se le atribuye el efecto opioide del fármaco. Se conocen alrededor de 30 productos de la metabolización del tramadol y aunque experimentalmente se ha comprobado que algunos de ellos tendrían mayor potencia, se han descartado debido a que sus características farmacodinámicas (liposolubilidad, polaridad) la hacen inviable a nivel central²⁵. El 90% de la eliminación del tramadol ocurre a través del sistema renal, el resto es encontrado en las heces, vías biliares y en la saliva²⁴.

Entre las principales reacciones adversas (RAM) a considerar en el uso de tramadol están las náuseas y vómitos. Estos efectos se deben a la acción de tramadol sobre el receptor MOR. A diferencia de otros fármacos opiodes, el tramadol no tiene efectos clínicamente relevantes sobre la respiración, está asociado con una baja incidencia a la constipación ya que a pesar de su actuar a nivel del receptor MOR y del incremento de los niveles de noradrenalina, los mayores causantes del estreñimiento, son contrarestandos parcialmente por el aumento de los niveles de serotonina en el sistema nervioso y a nivel intestinal provocando el aumento del tránsito gastrointestinal explicando así la baja incidencia a la constipación²⁶. Además, muestra efectos positivos en el sistema inmune y tiene un bajo potencial de abuso y dependencia²⁷.

El tramadol puede ser recomendado como un analgésico base en el tratamiento del dolor agudo de intensidad moderada a severa, es particularmente útil en pacientes con una pobre función cardiopulmonar, incluido en los ancianos, obesos, fumadores y después de una cirugía de tórax o de abdomen alto; en situaciones en que se incrementa el riesgo de depresión respiratoria, incluido el dolor de parto, cirugías pediátricas, etc. Su uso es habitual posterior a cirugías, exodoncias de terceros molares, etc.

Tramadol también puede ser recomendado en el tratamiento del dolor crónico de origen no maligno, como osteoartritis o dolor neuropático. Además, es frecuente administrarlo asociado a AINEs con el fin de disminuir las dosis y en paralelo sus RAMs. En la actualidad existen preparados de asociaciones de tramadol con inhibidores de la COX como dipirona, paracetamol, ibuprofeno y ketorolaco²⁷. De hecho se han realizado análisis de la interacción analgésica

entre tramadol y ketorolaco en ratas con artritis cuyos resultados indican un sinergismo al ser utilizado en combinación²⁷.

3.2. Analgésicos Antiinflamatorios no esteroidales (AINEs)

Los antiinflamatorios no esteroidales corresponden a un grupo muy diverso de sustancias que en su mayoría son ácidos orgánicos débiles derivados en general de los ácidos carboxílico y enólico. Sin embargo, la sigla de AINEs se debe por tener un mecanismo de acción común capaz de entregarles ciertas características terapéuticas y efectos adversos que les son similares^{28, 29}.

Por lo general son fácilmente absorbidos desde el tracto gastrointestinal superior, sin embargo existen algunos factores capaces de intervenir en este proceso. Entre los más importantes tenemos: motilidad gastrointestinal, pH intragástrico, presencia de alimento, lesiones patológicas y concentración de la droga. La clásica distribución de los AINEs es extracelular, y al ser ácidos débiles, tienden a penetrar el medioambiente ácido de los tejidos dañados e inflamados, lo que podría expandir su volumen de distribución aparente.

Como grupo, los AINEs tienen la característica de unirse en una alta proporción (90%) a proteínas plasmáticas, además si la afinidad por proteínas es particularmente grande para una droga, la farmacocinética de eliminación se ve prolongada. El metabolismo de los AINEs generalmente es hepático y mediado por el sistema de oxidación, siendo también comunes las reacciones de conjugación, existiendo diferencias entre AINEs para las distintas especies. La excreción es principalmente renal vía filtración glomerular y secreción tubular, pero también es posible la eliminación biliar de conjugados. La velocidad de excreción renal es dependiente del pH, y la secreción tubular puede ser inhibida competitivamente por otros ácidos débiles. De todas las drogas usadas en animales, la mayor diferencia entre todas las especies se encuentra en la farmacocinética de eliminación de los AINEs. Esta diferencia hace de la extrapolación interespecies una situación extremadamente peligrosa puesto que la acumulación de AINEs en los tejidos puede resultar francamente tóxica y potencialmente fatal. El ejemplo clásico de este

fenómeno es la vida media plasmática de la aspirina (caballo: 1 hora, perro: 8 horas, gato: 38 horas)³⁰.

Los AINEs han asumido un rol farmacológico importante en el tratamiento de las enfermedades inflamatorias, ya que afectan a la mayoría de las situaciones que tiene en común un proceso inflamatorio producto de la fagocitosis, liberación enzimática lisosomal, estímulos de quimiotaxis, activación de la coagulación, procesos fibrinolíticos, quininas y la cascada de la coagulación, entre otras³¹.

La mayoría de los AINEs además de tener poder antiinflamatorio ostentan otras características como son la acción analgésica y algunos antipirética. Estas cualidades que poseen los AINEs resulta de su capacidad de inhibir a un tipo específico de enzimas llamadas ciclooxigenasas (COXs).

Toda membrana celular está constituida por fosfolípidos los cuales al ser degradados por la enzima fosfolipasa A₂ dan origen al ácido araquidónico (AA), este compuesto es sometido a conversión por dos tipos de enzimas, las lipooxigenasas (LOXs) y las ciclooxigenasas (COXs). En este estudio se analizará el camino que sigue la degradación del AA producto de la acción de las COXs. Las COXs convierten a los AA en prostaglandina H₂ (PGH₂), las cuales posteriormente se transforman por la prostaglandina sintasa en variados productos pertenecientes al grupo de los eicosanoides, llamados prostanoides como las prostaglandinas (PG), tromboxanos y prostaciclina las cuales juegan un rol principal en la homeostasis celular como también en la mediación de la respuesta inflamatoria^{32, 33, 34}. (ver Figura 5).

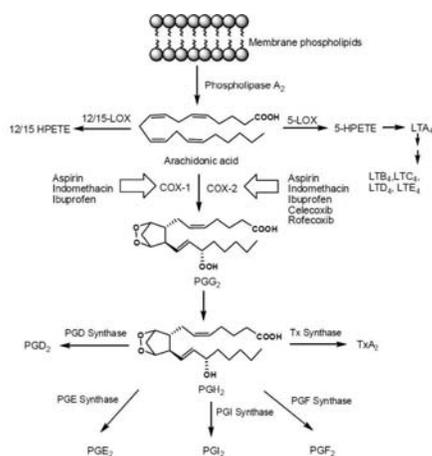


Figura 5. Representación de la ruta de Biosíntesis de Prostaglandinas³²

De acuerdo a los resultados de las últimas investigaciones, se sabe que existen por lo menos 3 tipos de isoformas de enzimas, COX-1, COX-2 y COX-3. La COX-1 es reconocida como una enzima “constitutiva” responsable de la síntesis de prostanoïdes en cantidades fisiológicas, por ende, la preservación de la regulación de los prostanoïdes mantiene la homeostasis en el organismo. Elementalmente se encuentra expresada en casi todas las células³⁵. La COX-2 se encuentra expresada en forma constitutiva en varios tipos de células, pero su concentración aumenta hasta 20 veces en células efectoras de la respuesta inflamatoria ante un estímulo nocivo, como los lipopolisacáridos y citoquinas³⁵. Por ello se le ha llamado también enzima “inducible”³². La COX-3 o como algunos autores la llaman COX-1b es la enzima construida a partir del gen de la COX-1 pero incluye el intrón1 del ARN_m, por lo que su secuencia aumenta entre 30 y 34 aminoácidos. Se encuentra presente en el SNC casi exclusivamente en el encéfalo y su acción es analgésica y antipirética al actuar sobre el hipotálamo también se han encontrado en el corazón^{32,36}. Al incorporar los AINE’s como terapia farmacológica, estamos inhibiendo la síntesis de prostanoïdes a la espera de obtener una modulación del dolor y del efecto antiinflamatorio y antipirético, sin embargo esta indiscriminada abolición es la principal causa de una serie de graves efectos secundarios ya que se produce una alteración de diversas funciones fisiológicas, como la autorregulación de la perfusión del riñón, protección gastrointestinal, implantación del óvulo, mantenimiento del embarazo, regulación de la función plaquetaria, resistencia vascular, etc., es por esto que se ha utilizado como uno de los principales criterios de clasificación de los AINES, su capacidad de inhibir selectiva o no selectivamente a las COXs.

Los AINEs se pueden clasificar, de acuerdo a Warner y Mitchell³², en:

Tipo estructural	Inhibidores No selectivos COXs
Alcalinas	nabumetona.
Derivados del ácido antranílico	ác. mefenámico, ác. Meclofenámico
Derivados del ácido propiónico	ketoprofeno, ibuprofeno, naproxeno
Di-aril-heterocíclicos	SC560
Derivados de ácido enólicos	piroxicam, tenoxicam, fenilbutazona
Derivados del ácido hetero-aril-acético	diclofenaco, ketorolaco, tolmetin
Derivados del ácido indolacético	indometacina, sulindaco
Derivados del para-amino-fenol	Acetaminofeno
Derivados del ácido salicílico	aspirina, diflunisal, sulfasalazina

Tipo estructural	Inhibidores selectivos COX2
Derivados del ácido antranílico	ésteres y amidas del meclofenamato
Di-aril-heterocíclicos	celecoxib, etoricoxib, parecoxib, rofecoxib, valdecoxib
Derivados de ácido enólicos	meloxicam.
Derivados del ácido hetero-aril-acético	Lumiracoxib
Derivados del ácido indolacético	etodolaco, ésteres y amidas de indometacina
Derivados del ácido salicílico	APHS.
Di-ter-butil fenoles	Darbufelona
Sulfanilidas	nimesulida, flosulida

Si bien es cierto el efecto analgésico de los AINEs se explica en gran medida por su mecanismo de acción común de inhibir las COXs, esta inhibición no es suficiente para explicar la eficacia de estos agentes en múltiples modelos de dolor agudo donde no existe inflamación⁶. Junto con lo anterior, un gran número de ensayos sugieren que los AINEs ejercen antinocicepción al interactuar con neuronas periféricas o centrales involucradas en la transmisión

de señales nociceptivas. Es así como existen trabajos que relacionan al sistema colinérgico, mediante el uso de agonistas y antagonistas, con la actividad antinociceptiva de AINEs. Los resultados de dichos estudios proponen que los AINEs aumentarían las concentraciones de acetilcolina tanto a nivel espinal como supraespinal, lo cual sería en parte responsable de su efecto antinociceptivo^{21,37}. El incremento de sustancias antagonistas del receptor NMDA a nivel espinal y diencefálico podrían contribuir al efecto analgésico de los AINEs³⁸.

El AINE a analizar en este estudio es un derivado del ácido propiónico y es un inhibidor no selectivo de la COX: ibuprofeno.

3.2.1. Ibuprofeno

Es uno de los analgésicos, antiinflamatorios, antipiréticos más utilizados en la actualidad. Siendo de los fármacos sin prescripción, menos tóxico al compararlo con aspirina³⁹.

Fue desarrollado como una droga antirreumática en 1960⁴⁰. Es un fármaco cuyos efectos analgésicos, antipiréticos y antiinflamatorios hace que se encuentre disponible en varios países. Es un AINE racémico, es decir, está compuesto por sus 2 enantiómeros, S-(+)-ibuprofeno y R-(-)-ibuprofeno, en forma equitativa en la mezcla. Es una estructura quiral del ácido 2-arilpropiónico. La quiralidad se da cuando las moléculas adoptan configuraciones asimétricas de modo que no pueden superponerse y coincidir con su imagen especular⁴¹. Cada enantiómero de un fármaco quiral, le confiere a éste características farmacodinámicas y farmacocinéticas distintas (ver Figura 6).

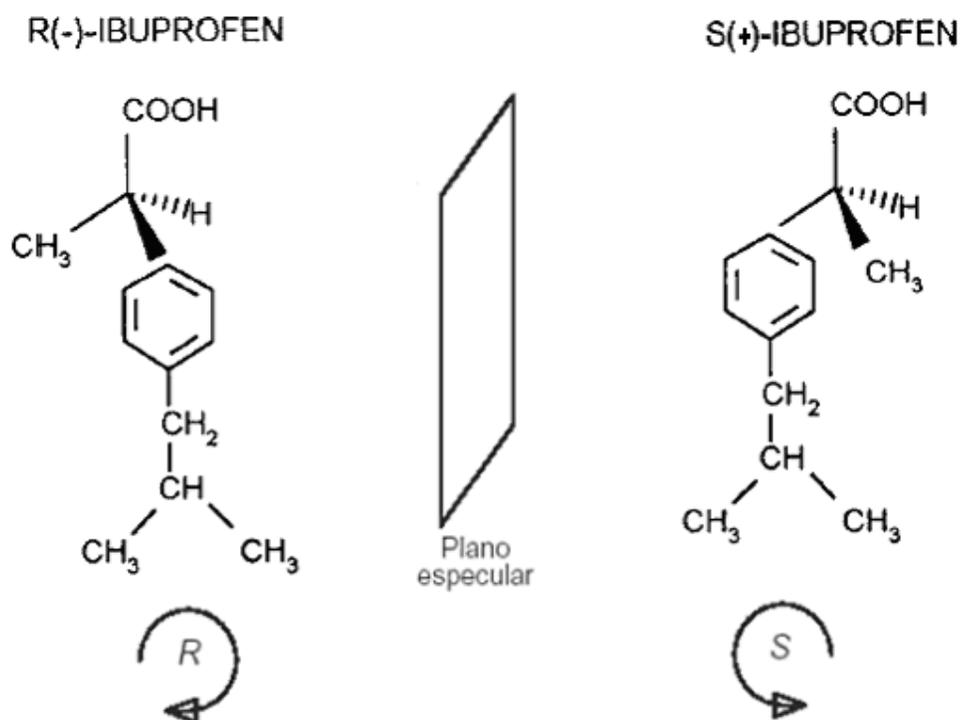


Figura 6. Estereoquímica del ibuprofeno

Es un potente inhibidor de la síntesis de prostaglandinas con su enantiómero S-(+)-ibuprofeno quien posee la mayor actividad farmacológica (eutómero). El R(-)-ibuprofeno (distómero) es considerado por algunos autores como inútil y potencialmente nocivo, sin embargo, también actúa como una pro-druga porque sufre una bioinversión al S-(+)-enantiómero. Este último ha sido reportado como 160 veces más potente que el enantiómero R(-)-ibuprofeno inhibiendo la síntesis de prostaglandinas *in vitro*⁴⁰. El ibuprofeno racémico tiene la mitad de la potencia que el S-(+)-ibuprofeno en la inhibición de la agregación plaquetaria y en la formación de tromboxano. Al igual que otros AINEs, el ibuprofeno presenta enantioselectividad en acción y en disposición.

El ibuprofeno tiene una unión a las proteínas plasmáticas (PP) mayor al 98% en concentraciones terapéuticas. Estudios sugieren que existe una estereoselectividad de la unión a las PP y que hay por lo menos 3 sitios de unión con diferentes enantioselectividades. Estudios subsecuentes demuestran que el R(-) y el S-(+)-ibuprofeno tendrían en común 1 sitio de unión a las PP y que el S-(+)-ibuprofeno tendría a lo menos otro sitio de unión mayor⁴⁰.

Ambos enantiómeros del ibuprofeno son sometidos a un metabolismo hepático dividido en una fase I oxidativa catalizado por el complejo del

citocromo P450 (CYP) en especial el CYP2C8 y CYP2C9 siendo este último el más importante para formar metabolitos hidrogenados y carboxilados. Luego pueden ser conjugados con ácido glucorónico para producir los metabolitos de la fase II. Existe una substancial bioinversión unidireccional, es decir, transformación del enantiómero (R) en el enantiómero (S) en humanos. El R(-) es primero convertido a un tioéster coenzima A, el cual posteriormente se sufre de racemización y de hidrólisis para producir una mezcla de R(-) y de S(+). Mientras que el S(+) original no es sustrato para la enzima acetil-CoA-sintetasa por lo que no puede sufrir de bioinversión⁴². Todo esto se evidencia al registrar las cantidades del eutómero en la orina o heces ya que es por aquí por donde se excreta^{40,43}. Aunque existe además una posibilidad de excretarse dentro de la leche materna.

Las reacciones adversas más importantes asociadas al uso de ibuprofeno, son aquellas derivadas de la inhibición de la síntesis de PGs en el sistema gastrointestinal, pudiendo provocar úlceras, sangramiento u perforaciones en el estómago e intestino. También puede causar falla renal y asma³⁵.

4. Modelos animales de dolor

A través de los modelos animales de dolor las investigaciones han avanzado mucho en los últimos años en su intento de conocer a fondo los mecanismos de la nocicepción. 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, sólo podremos estudiar sus reacciones de comportamiento ante los estímulos nocivos de naturaleza diversa¹.

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. Y por tanto, debemos tener una visión crítica de los mismos, ya que en el animal valoramos fundamentalmente el comportamiento ante un estímulo nocivo, mientras que no podemos valorar la dimensión afectiva inherente al dolor en el ser humano y probablemente en los animales¹.

Existen pocos estudios de comportamiento en animales de laboratorio dedicados al estudio de la nocicepción en la región trigeminal. Además, con excepción de los modelos de dolor neuropáticos del trigémino, la mayoría de ellos 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. Si bien, estos procedimientos proporcionan información útil sobre algunos mecanismos de la nocicepción, que obviamente no dan indicios del dolor clínico. Dentro de la categoría de modelos de dolor nociceptivos, la prueba de la formalina es relevante⁴⁴.

4.1. 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 I), 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 II). Tras la aplicación de la formalina aparece respuestas conductuales dirigidas hacia la extremidad injuriada como: lamido 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^{1, 44}.

El test de la formalina ha sido adaptado para el estudio del dolor orofacial, observándose tras la aplicación del irritante, 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 es inyectada en el labio superior, lateral a la nariz; o bien en el centro de la almohadilla vibril. Esto produce una respuesta nociceptiva más intensa y repetible dentro del territorio orofacial⁴⁴. La concentración de la formalina a utilizar es importante para el resultado de la prueba. En un estudio de Luccarini et al.⁵, 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 8 %, induciendo una respuesta nociceptiva creciente, mientras aunque el uso de concentraciones mayores no se traduce en una mayor respuesta nociceptiva. 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 nociceptiva⁴⁴.

4.1.1. Interacción de fármacos:

Al realizar combinaciones de dos o más agonista que producen un efecto común a través de mecanismos que no están relacionadas con un único receptor afín, se producen situaciones en las que la presencia de uno no afecta a la unión del receptor del otro. Este tipo de agonista de acción conjunta fue denominado en 1939 por Bliss como “similar e independiente”⁴⁵.

La coadministración de dos fármacos, generalmente con diferente mecanismo de acción, pero con similar efecto, puede generar las siguientes alternativas de interacción:

1. Aditivos: el efecto obtenido corresponde a la simple suma de los efectos que produce cada uno de los fármacos por separado.
2. Subaditivo o antagónico: el efecto que se obtiene corresponde a un efecto menor que la suma de la actividad de cada fármaco por separado.
3. Supraditivo o sinérgico: el efecto obtenido es significativamente mayor que la suma de los efectos de cada fármaco por separado⁴⁵.

La farmacología al realizar combinaciones de preparados, generalmente busca una interacción de tipo sinérgica ya que este tipo de asociación permitiría disminuir las dosis de cada fármaco reduciendo así sus RAMs, obviamente sin disminuir el efecto deseado⁴⁵.

HIPÓTESIS

La administración intraperitoneal (i.p.) de ibuprofeno o de tramadol y de su combinación, produce actividad antinociceptiva, en el ensayo algesiométrico de la formalina orofacial.

OBJETIVO GENERAL

Estudiar la actividad antinociceptiva de ibuprofeno, tramadol y de su mezcla en el ensayo algesiométrico de la formalina orofacial en ratones.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1.- Evaluar la antinocicepción inducida por la administración i.p. de ibuprofeno en el test orofacial.
- 2.- Estudiar la analgesia producida por la administración i.p. de tramadol en el ensayo de formalina orofacial.
- 3.- Estudiar el tipo de interacción analgésica que se obtiene al administrar en conjunto ibuprofeno con tramadol en el ensayo algesiométrico antes citado.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se usaron 202 ratones (*Mus musculus*) machos de la cepa CF/1 de 28 a 30 g de peso (Foto 1), 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.



Foto 1. Ratón (*Mus musculus*) macho de la cepa CF/1 ubicado en sistema de observación.

Los ratones usados solamente fueron 186, descartándose 16, por su falta de respuesta y se describen en la siguiente tabla:

Tabla 1.

FARMACOS Y DOSIS (mg/kg)	FASE I (n)	FASE II (n)
CONTROL	12	12
TRAMADOL (0.1, 1. 3, 10,30)	30	24
IBUPROFENO (3,10,30,100, 200)	30	30
TRAMADOL/IBUPROFENO (2.78, 5.56, 11.12, 22.25)	24	---
TRAMADOL/IBUPROFENO (2,4,8,16)	---	24
ANIMALES SIN RESPUESTA	10	6
TOTAL	106	96

Los fármacos se administraron i.p. en un volumen constante de 10 mL/kg, 30 minutos antes del ensayo algesiométrico de la formalina orofacial, ya que existe evidencia que demuestra que es el tiempo en que se alcanza el efecto analgésico máximo^{1,7,44}.

Los animales usados como grupo control fueron tratados con una solución salina, i.p., incluyéndose al menos, 2 ejemplares en cada grupo experimental.

Los grupos de estudio fueron:

1. Grupo control.
2. Grupo tratado con tramadol en fase I y II del ensayo.
3. Grupo tratado con Ibuprofeno en fase I y II del ensayo.
4. Grupo tratado con mezcla tramadol e ibuprofeno en fase I y II del ensayo.

Se comparó los DE_{50} de cada uno de los grupos, tanto en la fase I como en la fase II del ensayo orofacial de la formalina.

1. Test de la formalina

La evaluación de la actividad antinociceptiva se efectuó utilizando una modificación del test algesiométrico orofacial de la formalina, que midió 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 2%, en el labio superior derecho del animal (Foto 2). Ello induce un sostenido frotamiento de la zona inyectada y un vigoroso restregamiento de la cara en el área perinasal (Foto 3). Los ratones se colocaron en un cilindro diseñado para la observación, y se registro por medio de un cronómetro digital el tiempo total que se frotó el 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 frotaron el labio comprometido que corresponde a la fase inflamatoria y que mide el dolor crónico (fase II). No se contabilizó el tiempo entre la fase I y II debido a que el ratón se encuentra en un período de quietud⁵.



Foto 2. Inyección subcutánea de 20 μ L de formalina al 2% en el labio superior derecho del ratón.

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 obtenida por el trazado del log de la dosis versus %MPE.

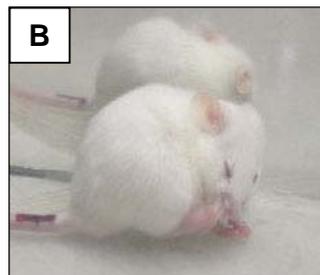


Foto 3. Frotamiento zona perinasal post-inyección de formalina. (A) Con pata delantera. (B) Con la pata trasera.

2. Estudio de la interacción antinociceptiva

Para la evaluación de la actividad antinociceptiva, se construyeron curvas dosis-respuesta del AINE administrado por vía i.p. con un mínimo de 6 animales por cada una de al menos 4 dosis logarítmicas crecientes (Foto 4). Los animales controles fueron inyectados con solución salina al 0.9 %. Luego, se obtuvo y analizó la curva dosis respuesta de la coadministración de ibuprofeno con tramadol, de mezclas de 1/2, 1/4, 1/8 y 1/16, de sus correspondientes valores de DE_{50} del ibuprofeno y tramadol, en proporción fija 1:1.

Para la evaluación de las interacciones se utilizó el método isobolográfico del laboratorio, en la forma descrita por Tallarida⁴⁵, que corresponde a representaciones gráficas de dosis isoeffectivas para un efecto determinado de cada uno de los fármacos utilizados individualmente y combinados. Este tipo de análisis permite conocer si existe interacción, de qué tipo y cuál es su magnitud.



Foto 4. Inyección intraperitoneal de fármacos.

Para la combinación de las drogas se determinó la DE_{50} mediante el análisis de regresión lineal de su curva dosis-respuesta. Esta dosis se comparó estadísticamente con la dosis que representa teóricamente la adición simple de efectos, que se obtiene según la siguiente fórmula:

$$DE_{50} \text{ aditividad teórica} = DE_{50} \text{ droga 1} / (P1 + R \times P2)$$

Donde:

- R: relación de potencia entre las drogas administradas solas.
- P1: proporción de ibuprofeno.
- P2: proporción de tramadol en la mezcla.

El punto experimental resultante fue graficado en un sistema de coordenadas cartesianas, que contiene una línea que conecta la DE₅₀ de tramadol en la abscisa, con la DE₅₀ de ibuprofeno en la ordenada (línea de aditividad simple o teórica). La región del gráfico donde se ubica el punto experimental determina el tipo de interacción. En el caso de que la interacción sea sinérgica (supraaditiva), el punto experimental se ubica bajo la línea de aditividad.

En el caso contrario, si resultase una interacción antagónica, el punto se ubicará sobre la línea de aditividad, y por último, si el punto se ubica en un sector cercano a la línea de aditividad, la interacción será de simple aditividad. Al mismo tiempo, el programa calcula el índice de interacción entre las drogas, de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\text{Índice de interacción} = DE_{50} \text{ experimental} / DE_{50} \text{ teórico}$$

Si el valor resultante es menor que 1 corresponde a una interacción sinérgica; al resultar igual a 1 la interacción es aditiva, y si es mayor que 1, es antagónica.

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 DE₅₀, 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 (Pharm Tools Pro, version 1.27, McCary Group Inc. PA, USA). La significación estadística se determinó por análisis de varianza y pruebas t de Student, considerándola a un nivel del 5% ($p < 0,05$).

RESULTADOS

1. Grupo control

La administración de formalina al 2 % produce un comportamiento bifásico como se observa en la figura 7.

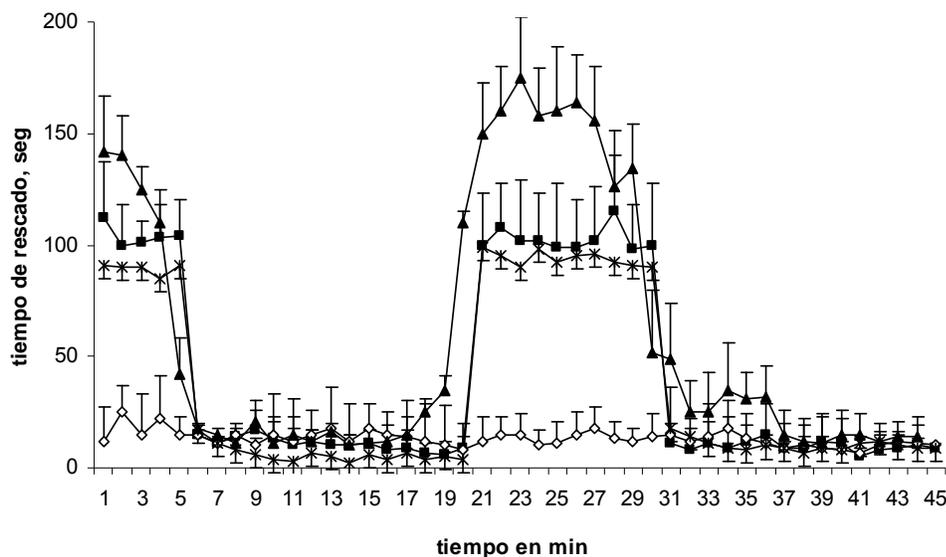


Figura 7. Curso temporal del ensayo de la formalina orofacial en ratones.

* Formalina 1 %; ■ Formalina 2 % ; ▲ Formalina 5 % y ◇ Salino.

Cada punto representa el promedio \pm EEM de al menos 6 animales.

La administración de 10 mg/Kg de solución salina al 0,9% vía i.p. 30 minutos antes de la administración de formalina produjo un tiempo de frotamiento de la zona labial y perinasal derecha de $95,3 \pm 3,45$ segundos para la fase I (n=12) y de $101,76 \pm 3,62$ seg. para la fase II (n=12).

2. Grupo tratado con tramadol

La administración i.p. de tramadol (0.1, 1, 3, 10 o 30 mg/kg), da como resultado una actividad antinociceptiva dosis-dependiente tanto en la fase algésica aguda (fase I), como en la fase inflamatoria (fase II), como se observa en los gráficos 1 y 2 respectivamente. La DE_{50} resultó ser de $0,49 \pm 0,10$ mg/kg

para el intervalo 0 – 5 minutos (n=6-8), mientras que para el intervalo 20-30 minutos fue de $2,05 \pm 0,27$ (n=6-8).

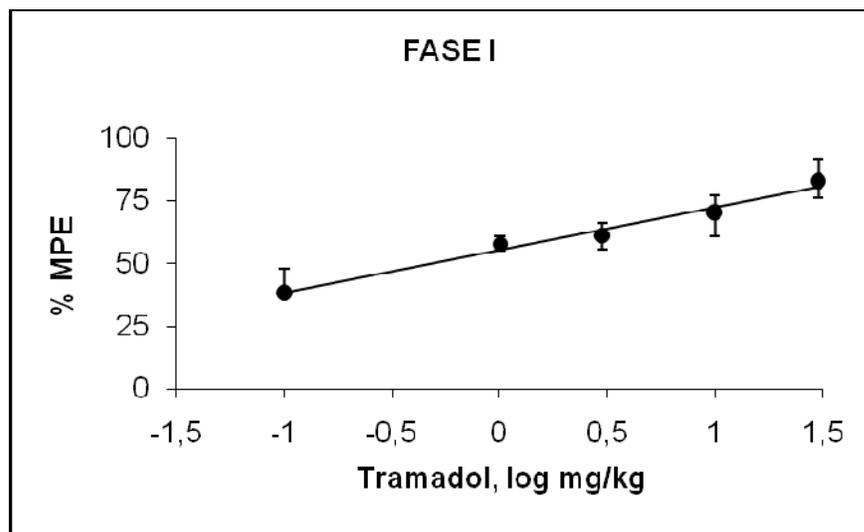


Gráfico 1. Curva dosis respuesta de tramadol, representada logarítmicamente para el período 0-5 minutos (fase I).

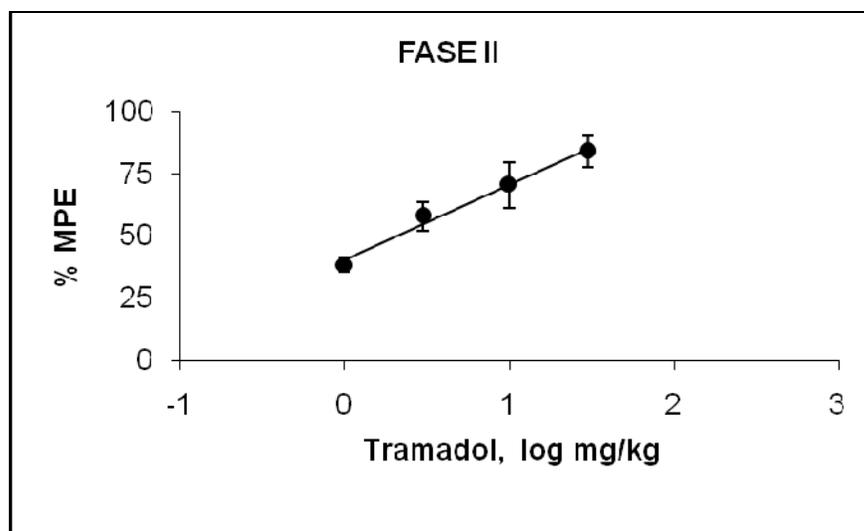


Gráfico 2. Curva dosis respuesta de tramadol, representada logarítmicamente para el período 20-30 minutos (fase II).

3. Grupo tratado con Ibuprofeno

La administración de ibuprofeno (3,10,30,100 o 200 mg/kg) vía i.p. indujo una respuesta antinociceptiva dosis-dependiente tanto en la fase I como en la fase II, observándose los resultados que se muestran en los gráficos 3 y 4 respectivamente. La DE_{50} fue de $43,88 \pm 6,22$ mg/kg para el intervalo 0-5 minutos ($n=6-8$), mientras que para el intervalo 20-30 minutos fue de $30,13 \pm 1,60$ mg/kg, ($n=6-8$).

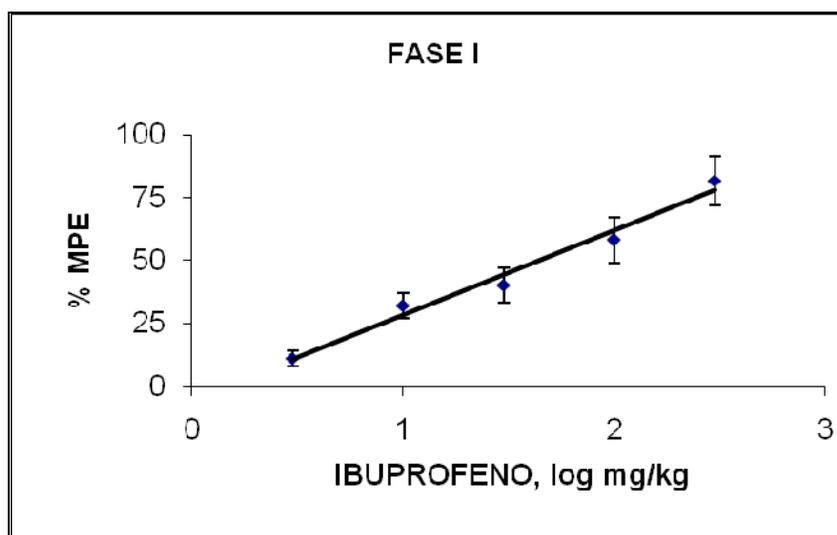


Gráfico 3. Curva dosis respuesta de ibuprofeno, representada logarítmicamente para el período 0-5 minutos (fase I).

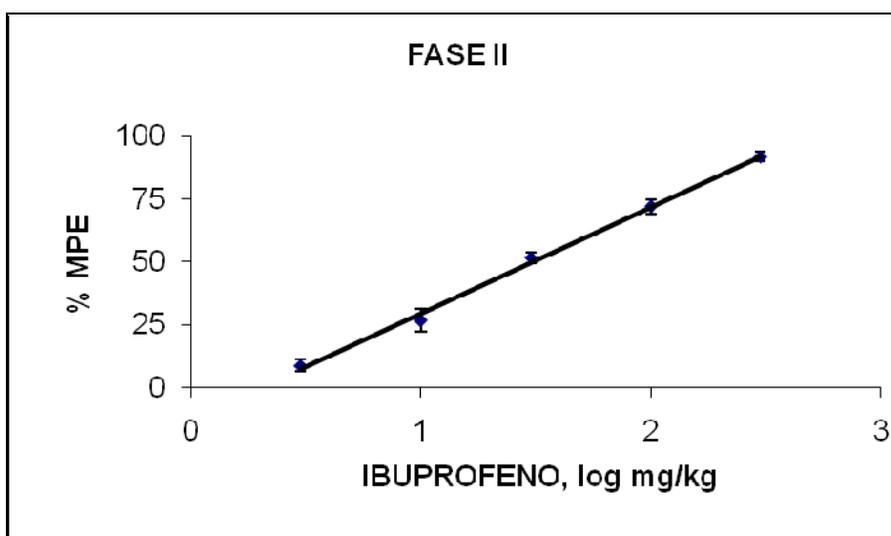


Gráfico 4. Curva dosis respuesta de ibuprofeno, representada logarítmicamente para el período 20-30 minutos (fase II).

4. Grupo tratado con la de mezcla tramadol e ibuprofeno

La DE_{50} teórica para esta mezcla, en proporción 1:1 de sus respectivas DE_{50} fue de $22,18 \pm 0,02$ mg/kg para la fase I, y de $16,09 \pm 0,01$ mg/kg para la fase II, ver Tabla 2. La DE_{50} experimental para la mezcla (1:1) es $7,27 \pm 0,55$ mg/kg para la fase I, y de $3,67 \pm 1,13$ mg/kg para la fase II, como se muestran en la Tabla 2.

5. Análisis isobolográfico de la interacción entre tramadol e ibuprofeno

La actividad antinociceptiva de la administración conjunta i.p. de combinaciones de relación fija (1:1) de fracciones de la DE_{50} de tramadol e Ibuprofeno, se evaluó mediante el análisis isobolográfico cuyos resultados se observan en los gráfico 5 y 6 y los valores de sus correspondientes DE_{50} en la Tabla 2. Del análisis isobolográfico de la combinación tramadol con Ibuprofeno, se obtuvo como resultado una interacción antinociceptiva de tipo supraaditiva o sinérgica, tanto para la fase I como la fase II, esto se concluye a partir de la ubicación del punto experimental, bajo la línea de aditividad, y con índices de interacción menores a 1 en ambas fases (fase I = 0,328; fase II = 0,228) (Gráficos 5 y 6). La potencia de combinación tramadol/ibuprofeno fue de 1:89,57 para la fase I, y de 1:14,66 en la fase II.

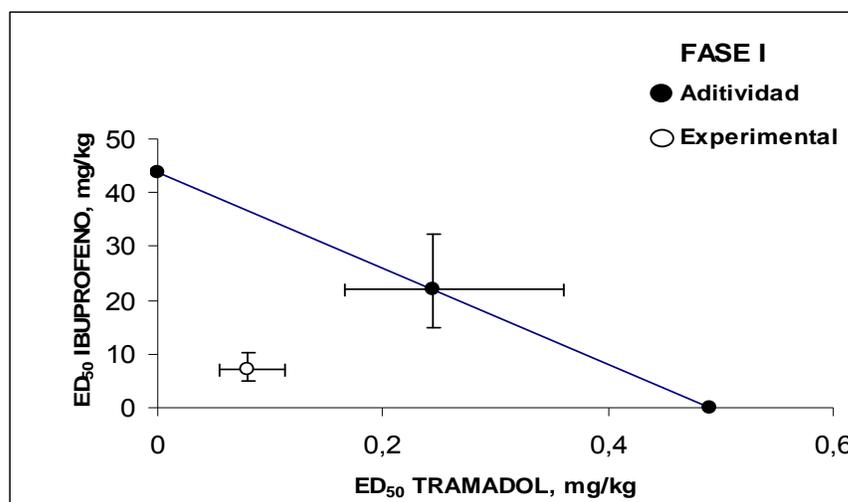


Gráfico 5. Isobograma de la interacción entre tramadol e ibuprofeno, en el intervalo 0 – 5 minutos. El (●) representa el punto de aditividad teórica de la mezcla y el (○) el de aditividad experimental, cada uno con sus correspondientes LC al 95 %.

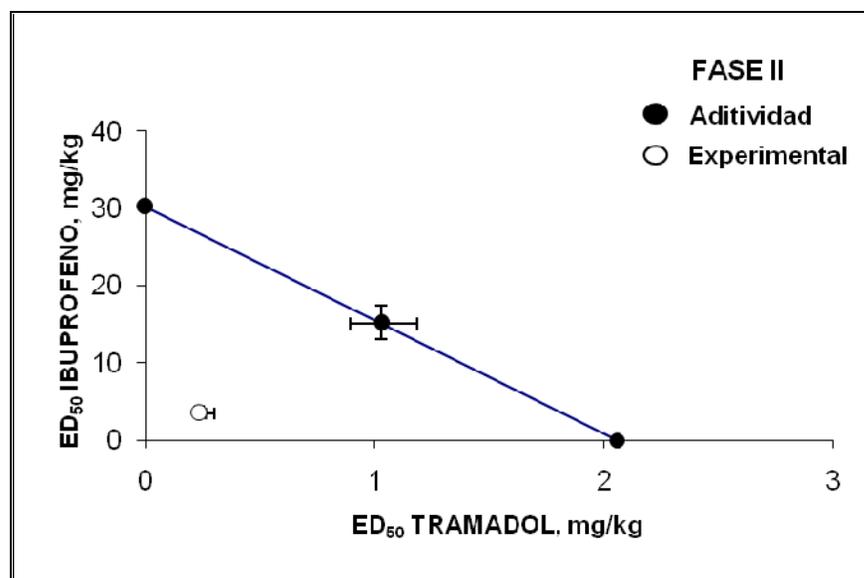


Gráfico 6. Isoblograma de la interacción entre tramadol e ibuprofeno en el intervalo 20 – 30 minutos. El (●) representa el punto de aditividad teórica de la mezcla y el (○) el de aditividad experimental, cada uno con sus correspondientes LC al 95 %.

Tabla 2. Valores de las DE₅₀ ± EEM (mg/kg i.p.) de tramadol, ibuprofeno y de su combinación en el ensayo de la formalina orofacial en ratones.

Fármacos	Fase I	Fase II
Tramadol	0,49 ± 0,10	2,05 ± 2,70
Ibuprofeno	43,88 ± 6,22	30,13 ± 1,60
Tramadol/Ibuprofeno	7,27 ± 0,55	3,67 ± 0,09

DISCUSIÓN

Las investigaciones siguen buscando nuevas terapias que permitan un mejor manejo del dolor, logrando un mayor grado de analgesia y una disminución de efectos adversos. El test de la formalina es uno de los modelos de dolor experimental más adecuados para representar las condiciones de dolor orofacial⁵.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo, mediante el ensayo algesiométrico de la formalina orofacial al 2% demuestran que la administración de tramadol o de ibuprofeno, por vía intraperitoneal, produce una actividad antinociceptiva dosis dependiente tanto en la fase I como en la fase II⁴⁶.

De acuerdo a los valores DE₅₀ de la actividad antinociceptiva, el tramadol resultó ser 4,19 veces más potente en la fase II que en la I. En el caso del ibuprofeno se obtuvo 1,45 veces más potente en la fase I que en la fase II. La mezcla de ibuprofeno con tramadol fue 2 veces más potente en la fase I que en la fase II.

La interacción de tipo sinérgica, resultante de la coadministración de tramadol e ibuprofeno, concuerda en parte con la teoría general de interacción de drogas, que establece que la combinación de drogas es más efectiva cuando los agentes individuales actúan, a través de mecanismos analgésicos diferentes, por lo tanto, la posibilidad de obtener sinergia es mayor^{47,48}.

Esta condición se cumple en esta combinación, ya que mientras el ibuprofeno es capaz de inhibir las ciclooxigenasas, el tramadol posee un mecanismo de acción dual; activa receptores opioide MOR e inhibe la recaptación de monoaminas endógenas, tales como noradrenalina y serotonina^{7,24,25}. Los mecanismos implicados en la sinergia precedente, podrían radicar en diferentes funciones celulares, como por ejemplo la actividad de canales iónicos, las diferentes activaciones de receptores, las interacciones químicas de cada fármaco con los lípidos de membrana. Por otra parte, se ha sugerido que el sinergismo depende de variables como el tipo e intensidad del estímulo; la relación relativa de las concentraciones de las drogas, la localización y amplificación que ejerce cada fármaco en los mecanismos de transducción; de propiedades cinéticas y fisicoquímica de cada de los fármacos asociados,

etc.^{47,48}. Es posible que más de uno de los mecanismos que han sido sugeridos precedentemente se cumplan en la asociación tramadol con ibuprofeno.

Los hallazgos anteriores se pueden explicar en base al perfil farmacológico de cada uno de los fármacos. Tramadol es un analgésico opioide débil acompañado de una capacidad inhibitoria de recaptación de monoaminas: serotonina y noradrenalina^{7,24,25}. Por otro lado el ibuprofeno es un inhibidor no selectivo de COX-1 y COX-2, con mayor eficacia sobre COX-1^{32,49}. Por lo cual se infiere que tramadol es una droga analgésica por 3 mecanismos (opioide, inhibidor noradrenalina, inhibidor serotonina) e ibuprofeno, tendría solamente 1 mecanismo (inhibidor de COXs).

En resumen, la combinación de tramadol con ibuprofeno demuestra sinergia en dolor agudo e inflamatorio, lo que podría tener implicancia clínica en el tratamiento farmacológico del dolor.

CONCLUSIONES

- La administración tanto de tramadol como de ibuprofeno, en forma separada vía intraperitoneal, producen un efecto antinociceptivo de naturaleza dosis dependiente, en el test algésimétrico de la formalina, en la fase algésica aguda (fase I) como en la fase algésica inflamatoria (fase II).
- Tramadol posee mayor potencia analgésica que ibuprofeno en la fase I como en la fase II.
- La coadministración de tramadol y de ibuprofeno por vía intraperitoneal, demostró la existencia de una interacción de tipo sinérgica o supraaditiva.
- La sinergia obtenida podría deberse a la activación producida por los fármacos de sitios distintos en tipo de receptores diferentes, por actuar a distintos niveles o por distintos mecanismos para producir su efecto.
- Los hallazgos podrían tener relevancia clínica, ya que la combinación, disminuye significativamente las dosis, obteniendo un incremento en el efecto analgésico con la consiguiente reducción de los efectos adversos.

SUGERENCIAS

- Evaluar la antinocicepción de tramadol e ibuprofeno, y la naturaleza de su interacción al ser coadministrado, utilizando otro tipo de ensayos algesiométricos.
- Evaluar la capacidad antinociceptiva e interacción entre tramadol e ibuprofeno mediante otras vías de administración.
- Evaluar el daño a nivel gastrointestinal de la combinación de ibuprofeno y tramadol, comparado con los efectos producidos por la administración sólo de ibuprofeno.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) Le Bars D, Gozariu M, Cadden SW. (2001). Animal Models of Nociception. *Pharmacol Rev.* 53: 597-652.
- (2) Bonica JJ. (1990). Anatomic and physiology basic of nociception and pain. The management of pain. (2^aed.). Pennsylvania, Lea & Febiger.pp.28-94.
- (3) Ortega A, Roca A, Micó JA. (2002). Animal Models of pain. A critical view. *Rev Soc Esp. Dolor.* 9:447-453.
- (4) Aguggia M. (2003). Neurophysiology of pain. *Neurol Sci.*24:57-60.
- (5) Luccarini P, Childeric A, Gaydier AM, 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.
- (6) Miranda HF, Sierralta F, Prieto JC. (2009). Synergism between NSAIDs in the orofacial formalin test in mice. *Neurosci Biobehav Rev.*92:314-318.
- (7) Raffa RB. (2001). Pharmacology of oral combination analgesics: rational therapy for pain. *J Clin Pharm Ther.*26:257-264.
- (8) Turk DE, Okifuji A. (2001). Pain Terms and Taxonomies of Pain. *Bonica's Management of Pain.* (3^a ed.) Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins.
- (9) Basbaum AI, Bautista DM, Scherrer G, Julius D. (2009). Cellular and Molecular Mechanisms of Pain. *Cell.*139:267-284.
- (10) Bonica JJ. (1977). Neurophysiologic and pathologic aspects of acute and chronic pain. *Arch. Surg.*112:750-61.
- (11) Guirimand F.(2003).Recent data on the physiology of pain. *Nephrologie.*7:401-407.
- (12) Almeida TF, Roizenblatt S, Tufik S. (2004).Afferent pain pathways: a neuroanatomical review. *Brain Res.*66: 355-477.
- (13) Martin TJ, Eisenach JC. (2001).Pharmacology of opioid and nonopioid analgesics in chronic pain states. *J Pharmacol Exper Ther.* 299: 811-817.
- (14) Ganong WF.(1998). Fisiología médica (16^a ed.). Manual moderno. Mac Graw-Hill.pp. 155-162.
- (15) Purves D, Augustine GJ, Fitzpatrick D, Hall WC, LaMantia AS, McNamara JO, White LE. (2004).Neuroscience (3^a ed.). Sinauer Associates.pp. 209-228.
- (16) Milan M. (2002).Descending control of pain. *Progr. Neurobiol.*66:355- 374.

-
- (17) Sessle BJ. (2005). Peripheral and central mechanisms of orofacial pain and their clinical correlates. *Minerva Anesthesiol.*71:117-136.
- (18) Takemura M, et al. (2006). Mechanisms of orofacial pain control in the central nervous system. *Arch Histol Cytol.*69: 79-100.
- (19) Flórez J, Armijo A, Mediavilla A. (2003). *Farmacología humana.* (4^a Ed.). Barcelona. Masson. pp.355-385.
- (20) Furst S. (1999). Transmitters involved in antinociception in the spinal cord. *Brain Res Bull.* 48: 129-141.
- (21) Miranda HF, Sierralta F, Pinardi G. (2002). Neostigmine interactions with non steroidal anti-inflammatory drugs. *Br J Pharmacol.*135: 1591-1597.
- (22) Padi SV, Naveen KJ, Amarjit S, Shirinivas K. (2004). Isobolographic analysis of interaction between cyclooxygenase inhibitors and tramadol in acetic acid-induced writhing in mice. *Progress in Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiatr.*28:641-649.
- (23) Kelly SL, Tan NH. (1997). Tramadol: A new centrally acting analgesic. *Am J Health-Syst Pharm.*54:643-52.
- (24) Halfpenny DM, Callado LF, Hopwood SE, Bamigbade TA, Langford RM, Stamford JA. (1999). Effects of tramadol stereoisomers on norepinephrine efflux and uptake in the rat locus coeruleus measured by real time voltametry. *Br J Anaesth.*83: 909-91.
- (25) Grond S, Sablotzki A. (2004). Clinical pharmacology of tramadol. *Clin Pharmacokinet.*43: 879-923.
- (26) Planas E, Poveda R, Sánchez S, Romero MA, Puig MM. (2003). Non-steroidal anti-inflammatory drugs antagonise the constipating effects of tramadol. *Eur. J. Pharmacol.*482:223– 226.
- (27) López-Muñoz FJ, Díaz-Reval M.I., Terrón J.A, Campos M.D. (2004). Analysis of the analgesic interactions between ketorolac and tramadol during arthritic nociception in rat. *Eur.J. Pharmacol.*484:157-165.
- (28) Insel PA. (1996). Analgesic-Antipyretic and Antiinflammatory agents and drugs employed in the treatment of gout. *The Pharmacological Basis of Therapeutics.*New York. McGraw Hill.pp.617-658.
- (29) Cashman J. (1996). The Mechanisms of Action of NSAIDs in Analgesia. *Drugs.* 5:13-23.

-
- (30) Jenkins W. (1987). Pharmacologic aspects of analgesic drugs in animals: An overview. *JAVMA*.191: 1231-40.
- (31) Bradford RW, Ehrlich HP. (1990). Ibuprofen in acute-care therapy. *Ann.Surg.*211:78-83.
- (32) Mitchell JA. (2004). Cyclooxygenases: new forms, new inhibitors and lessons from the clinic. *FASEB*.18:790-804.
- (33) Cheng YJ, Duan WG, Yun Y, Liu DQ, Ming Y, Zhen ZJ, Yong LZ. (2007). Screening Method for Nonsteroidal Antiinflammatory Drugs Based on the Cyclooxygenase 2 Pathway Activated by Serum-Free Stimulation in A549 Cells. *The Pharmaceutical Society of Japan*.127:527-532.
- (34) Furse K, Pratt D, Schneider C, Brash A, Porter N, Lybrand T. (2006). Molecular dynamics simulations of Arachidonic Acid-derived pentadienyl radical intermediate complexes with COX-1 and COX-2: insights into Oxygenation region-and stereoselectivity. *Biochemistry*.45:3206-3218.
- (35) Leone S, Ottani A, Bertolini A. (2007). Dual acting anti-Inflammatory drugs current. *Topics in Medicinal Chemistry*.7:265-275.
- (36) Chandrasekharan NV, Dai H, Turepu Roos KL, Evanson NK, Tomsik J, Elton TS, Simmons DL. (2002). COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/ antipyretic drugs: cloning, structure and expression. *Proc Natl Acad Sci USA*.99:13926-13931.
- (37) Pinardi G, Sierralta F, Miranda HF. (2003). Atropine reverses the antinociception of non steroidal anti-inflammatory drugs in the tail-flick test of mice. *Pharmacol Biochem Behav*.74: 603-8.
- (38) Edwards SR, Mather LE, Lin Y, Power I, Cousins MJ. (2000). Glutamate and Kynuren in the rat central nervous system following treatments with tail ischaemia or diclofenac. *J Pharm Pharmacol*.52: 59-66.
- (39) Rainsford KD. (2009). Ibuprofen: pharmacology, efficacy and safety. *Inflammopharmacology*.17:275-342.
- (40) Neal M. D. (1998). Clinical Pharmacokinetics of Ibuprofen. The first 30 years. *Clinical pharmacokinet* .34:101-154.
- (41) McConathy J, Owens MJ. (2003). Stereochemistry in Drug Action. *Prim Care Companion J Clin Psychiatry*.5:70-73.
- (42) Fornasini G, Eandi N, Brogin G, Gallina M. (1997). Preliminary Pharmacokinetic study of ibuprofen enantiomers after administration of a new

oral formulation (ibuprofen arginine) to Healthy male volunteers. *Chirality*. 9:297-302.

(43) Haiping H, Guangji W, Jianguo S. (2005). Enantioselective pharmacokinetics of ibuprofen and involved mechanisms. *Drug Metabolism Reviews*. 1:215-234.

(44) Raboisson P, Dallel R. (2004). The orofacial formalin test. *Neurosci Biobehav Rev*. 28:219-226.

(45) Tallarida RJ. (2001). Drug synergism: its detection and applications. *J Pharmacol Exp Ther*. 298:865-72.

(46) Miranda HF, Sierralta F, Prieto JC. (2009). Synergism between NSAIDs in the orofacial formalin test in mice. *Neurosci Biobehav Rev*. 92:314-318.

(47) Chou TC. (2006). Theoretical Basis, Experimental Design, and Computerized Simulation of Synergism and Antagonism in Drug Combination Studies. *Pharmacol Rev*. 58:621-81.

(48) Barrera NP, Morales B, Torres S, Villalón M. (2005). Principles: mechanisms and modeling of synergism in cellular responses. *Trends Pharmacol Sci*. 26:526-32.

(49) Vane J. (2000). Aspirin and other anti-inflammatory drugs. *Thorax*. 55:3-9.