

Antagonistas Serotoninérgico y Noradrenérgico, por la Vía Subaracnoidea que Aumentan la Respuesta Álgica en Ratones

Oscar César Pires, TSA¹, Hazem Adel Ashmawi, TSA², Elton Constantino³, Naira Correa Cusma Pelogia⁴, Irimar de Paula Posso, TSA⁵

Resumen: Pires OC, Ashmawi HA, Constantino E, Pelogia NCC, Posso IP – Antagonistas Serotoninérgico y Noradrenérgico, por la Vía Subaracnoidea que aumentan la respuesta Álgica en Ratones.

Justificativa y objetivos: Existen evidencias de que el paso de informaciones nociceptivas por el cuerno posterior de la médula espinal (CPME), y que continúa hacia niveles rostrales del sistema nervioso central, sufre profundas influencias excitatorias e inhibitorias. La presente investigación quiso comparar los efectos de la metisergida, de la fentolamina y de la fentolamina asociada a la metisergida, administrados por vía subaracnoidea, sobre las fases I, intermedia y II del test de la formalina modificado en ratones.

Método: Fueron utilizados en el experimento, 28 ratones Wistar machos, distribuidos aleatoriamente en cuatro grupos (n = 7), para recibir una solución salina (GC), fentolamina (GF), metisergida (GM) o fentolamina asociada a la metisergida ((GFM). El dolor fue inducido por la administración de formalina en la región dorsal de la pata posterior derecha. El test fue dividido en tres fases: fase I, intermedia y fase II. El análisis estadístico de los resultados fue hecho utilizando el programa SPSS (*Statistical Package for Social Sciences*), [Paquete Estadístico para las Ciencias Sociales], adoptando el nivel de significancia de un 5%.

Resultados: En la fase intermedia, el número de elevaciones de la pata fue significativamente mayor en los grupos GF, GM y GFM cuando se comparó con el grupo GC.

Conclusiones: Los resultados nos sugieren la existencia de un efecto noradrenérgico y serotoninérgico en el sistema inhibitorio descendiente del dolor agudo, con la posibilidad del uso de agonistas serotoninérgicos y α 1-adrenérgicos para el control del dolor agudo.

Descriptores: ANATOMIA, Espacio subaracnoideo; ANIMALE, Ratones; DOLOR, Aguda, Avaliación; FÁRMACO, Vasodilatadores: fentolamina, metisergida.

[Rev Bras Anestesiologia 2011;61(1): 109-112] ©Elsevier Editora Ltda.

INTRODUCCIÓN

La nocicepción es un proceso bidireccional con trayectos ascendientes y descendientes en el sistema nervioso. Señales del dolor procesadas en la periferia que pasan a través del cuerno posterior de la médula espinal (CPME), en dirección a los centros cerebrales y en respuesta, proyecciones que parten del cerebro hasta el CPME, haciendo varias conexiones¹. El sistema propuesto como inhibitorio descendiente del dolor consiste en áreas del sistema nervioso central (SNC), inter-

conectadas a fibras que parten de sistemas corticales y diencefálicos en dirección a la materia gris periaqueductal (MGP), y periventricular, ricas en encefalinas y receptores opioides, y a partir de ellas, siguen para áreas del bulbo rostroventral, especialmente el núcleo magno de la rafe (NMR) y los núcleos adyacentes, que, a su vez, envían fibras serotoninérgicas y noradrenérgicas, vía funículo dorsolateral, hacia el cuerno dorsal de la médula y el bulbo, terminando principalmente en las láminas I, II y V, e inhibiendo las neuronas nociceptivas, interneuronas y los tractos ascendientes que se proyectan en el rostro, inclusive el tracto espinotalámico, espinorrecticular y espino-meso encefálico¹⁻³. Por tanto, se espera que el aumento de la neurotransmisión de noradrenalina, serotonina y de opioides pueda ser eficaz en el control del dolor.

La fentolamina es un derivado imidazólico que presenta un efecto antagonista competitivo, con una afinidad similar por los dos subtipos de receptores adrenérgicos α 1 y α 2, actuando en el fenómeno doloroso⁴.

La metisergida, butanolamida del ácido 1-metil-d-lisérgico, es un antagonista no específico de los receptores de la serotonina, utilizado en diversos estudios con animales sobre la modulación serotoninérgica del dolor⁵.

El objetivo de este trabajo fue evaluar los efectos del antagonista adrenérgico fentolamina, del antagonista serotoninérgico metisergida y de la asociación de los dos antagonistas, por vía subaracnoidea en ratones en la modulación del dolor inducido por el test de la formalina modificado.

Recibido del Instituto Básico de Biociencias – Universidad de Taubaté (UNITAU), Taubaté, SP, Brasil.

1. Responsable del CET/SBA del Hospital Municipal de São José dos Campos, SP; Doctor en Anestesiología; Máster en Farmacología y Profesor de Anestesiología y Farmacología – UNITAU

2. Profesor Adjunto del Departamento de Medicina del Centro de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidade Federal de São Carlos; Profesor Colaborador del Departamento de Cirugía de la Faculdade de Medicina de la Universidade de São Paulo (FMI/USP) y Laboratorio de Investigación Médica – LIM-08 de la FMI/USP

3. Anestesiólogo; Profesor de Anestesiología de la UNITAU

4. Profesora de Fisiología y Farmacología de la UNITAU; Doctorado en Farmacología; Máster en Farmacología.

5. Profesor Asociado de la Asignatura de Anestesiología de la FMI/USP; Profesor Titular de Farmacología de la UNITAU.

Sometido el 4 de julio de 2010.

Aprobado para su publicación el 13 de diciembre de 2010.

Dirección para correspondencia:
Dr. Oscar César Pires
Avenida Itália, 1.551 – Rua 13, nº 821
12030-212 – Taubaté, SP, Brasil
E-mail: ocpires@uol.com.br

MÉTODOS

Fueron utilizados 28 ratones Wistar machos, pesando entre 220 y 300 gramos, que fueron suministrados y mantenidos en el criadero de experimentación de la universidad, donde quedaron tres animales por compartimento, permaneciendo por lo menos durante 15 días antes del inicio del experimento, con vistas a una adecuada adaptación. Fueron tratados con pienso comercial balanceado y agua *ad libitum*, ciclo claro oscuro de 12 horas y una temperatura ambiente de $22^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ (19°C a 25°C).

Para la administración de los fármacos en el espacio subaracnoideo, los animales fueron anestesiados con el halotano, a una concentración de 3,0%, en fracción inspirada de oxígeno de 1,0, administrado por vaporizador calibrado y mantenido por el tiempo necesario para que el animal presentase pérdida de los reflejos posturales e incapacidad de desplazarse dentro del cubículo. En ese momento, el animal fue retirado del cubículo y colocado con la cabeza en una máscara del tipo cono, por donde recibía la misma concentración de halotano y de oxígeno.

Después de la tricotomía, se procedió a una incisión transversal en la línea media del espacio intervertebral por encima de la penúltima vértebra lumbar. Por la incisión, fue realizada una punción con la aguja Tuohy 22G hasta llegar al espacio subaracnoideo identificado por el movimiento reflejo de la cola o de las patas posteriores. Después de la identificación del espacio subaracnoideo, se introdujo un catéter de teflón PE-10 por la aguja para la administración de los fármacos. Antes de la sutura de la piel, el catéter se fijó en la musculatura para que, al final del procedimiento, y después del sacrificio de los animales, fuese confirmada su ubicación en el interior del espacio subaracnoideo.

Los animales se dividieron en cuatro grupos de siete ratones cada uno. Los animales del grupo control (GC) recibieron 10 μL de solución de cloruro de sodio al 0,9% (solución salina) por el catéter; los del grupo fentolamina (GF) recibieron 82 nmol de fentolamina diluidos en 10 μL de solución salina; los del grupo metisergida (GM) recibieron 64 nmol de metisergida en 10 μL de solución salina; y, por último, los del grupo fentolamina asociada a la metisergida (GFM), recibieron 82 nmol de fentolamina asociada a 64 nmol de metisergida en 10 μL de solución salina. El volumen y las dosis fueron definidos a partir de los estudios previos ^{4,6}. Todos los fármacos se obtuvieron en el laboratorio Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO (USA).

La inducción del dolor fue realizada con la inyección de 50 μL de solución de formalina al 2%, en la región dorsal de la pata posterior derecha, 25 minutos después de la inyección de los fármacos en el espacio subaracnoideo.

Las elevaciones de la pata no relacionadas con la marcha fueron registradas en el período de 60 minutos, anotándose el número parcial de elevaciones a cada cinco minutos.

El test fue dividido en tres fases: fase I, fase intermedia y fase II. En la fase I, se anotó el número de elevaciones en los primeros cinco minutos; en la fase intermedia, fue anotado el número de elevaciones de la pata del sexto al vigésimo minuto; y en la fase II, se anotó el número de elevaciones de la pata del vigésimo primero al sexagésimo minuto.

El análisis estadístico de los resultados se hizo utilizando la versión 13.0 del programa SPSS (*Statistical Package for Social Sciences*), adoptando el nivel de significancia de un 5% (0,05). Para identificar las diferencias en cada grupo, se aplicó el Test de los Puestos Señalizados de Wilcoxon. Para identificar las diferencias entre los cuatro grupos, fue aplicado el Test de Kruskal-Wallis y cuando se verificó la diferencia entre los grupos, se usó el Test de Mann-Whitney, para identificar cuáles grupos se diferenciaban entre sí.

RESULTADOS

En todos los grupos se pudo observar el comportamiento bifásico, con una fase intermedia significativamente diferente a las fases I y II (Figura 1). En la fase I, no fueron observadas diferencias significativas en el número de elevaciones de la pata entre los cuatro grupos (Figura 2).

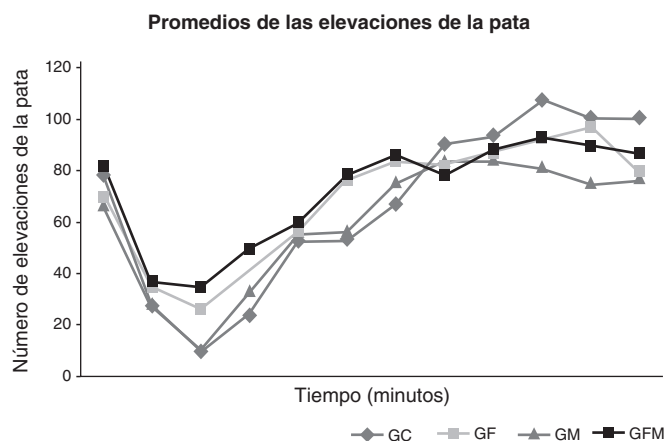


Figura 1. Promedios del Número de Elevaciones de la Pata, durante todas las Etapas del Test de Formalina Modificado y en todos los Grupos.

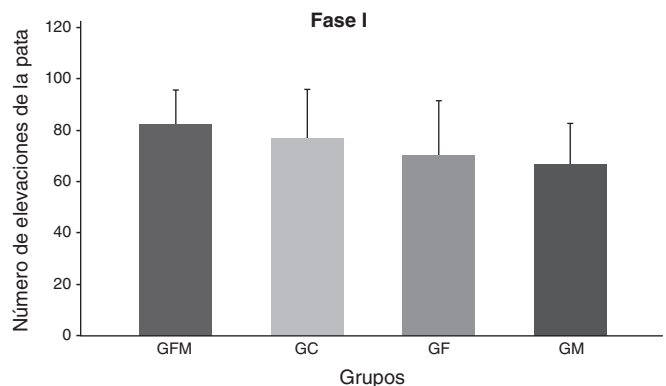


Figura 2. Promedios y Desviación Estándar del Número de Elevaciones de la Pata, en los Grupos durante las Etapas del Test de Formalina Modificado.

Sin diferencia estadística significativa entre los grupos.

En la fase intermedia, el número de elevaciones de la pata fue significativamente mayor en los grupos GF, GM y GFM cuando se les comparó con el grupo GC, sin embargo, no hubo diferencia cuando se comparó entre sí con los grupos GF, GM y GFM (Figura 3), aunque el número de elevaciones de la pata haya sido mayor en el grupo GFM, en que los antagonistas serotoninérgico y noradrenérgico fueron asociados, que en los grupos GF y GM, en que fueron usados aisladamente. El grupo GM presentó un número menor de elevaciones de la pata que los grupos GF y GFM, pero esa diferencia tampoco fue estadísticamente significativa.

En la fase II, no se observaron diferencias significativas cuando hubo comparación de los grupos GF, GM y GFM con el grupo GC, sin embargo, cuando se le comparó con los grupos GF y GFM, el grupo GM obtuvo una reducción del número de elevaciones de la pata estadísticamente significativo (Figura 4).

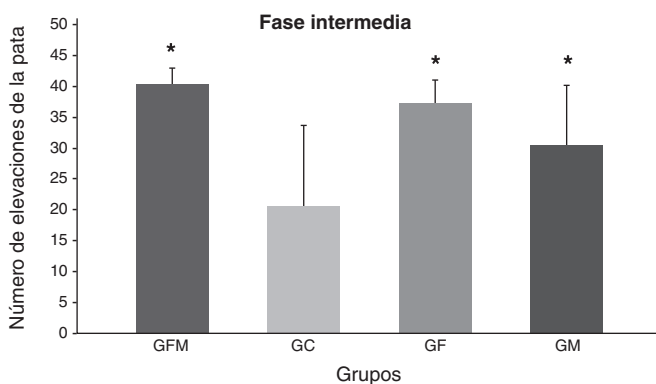


Figura 3. Promedios y Desviación Estándar del Número de Elevaciones de la Pata, en los Grupos durante la Etapa Intermedia del Test de Formalina Modificado.

*Diferencia estadística significativa entre los grupos GC x GFM ($p = 0.025$); GC x GF ($p = 0.025$); y GC x GM ($p = 0.047$).

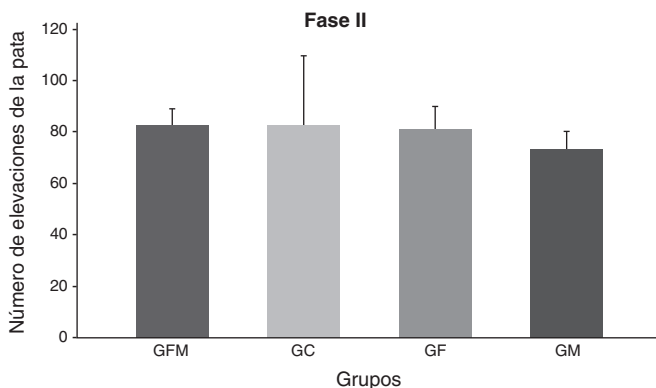


Figura 4. Promedios y Desviación Estándar del Número de Elevaciones de la Pata, en los Grupos durante la Etapa II del Test de Formalina Modificado.

* Diferencia estadística significativa entre los grupos GM x GFM ($p = 0.013$) y GM x GF ($p = 0.035$).

DISCUSIÓN

El test de la formalina es un antiguo modelo experimental de dolor en animales que consiste en inyectar una solución diluida de formalina en un concentrado entre 0,5 y 5,0%, en la región dorsal de la pata trasera de los ratones, generando una respuesta nociceptiva bifásica, consistente en una primera fase, en los primeros cinco minutos después de la inyección y en una segunda fase, que se inicia después del vigésimo minuto y se extiende por 40 a 60 minutos. La primera fase se interpreta como proveniente de la activación directa de los nociceptores periféricos, mientras que la segunda se interpreta como siendo el resultado de la respuesta inflamatoria aguda y de la sensibilización central. El período entre las dos fases de la respuesta nociceptiva se identifica como fase de inactividad, siendo atribuido a ese período un mecanismo antinociceptivo central⁷⁻⁹. Un estudio de revisión sobre el test de la formalina concluyó que ese test presenta ventajas relevantes en comparación con otros test utilizados, y se le considera como el modelo estándar para el estudio de la nocicepción animal¹⁰. En comparación con otros agentes inductores de dolor, la formalina produce una respuesta espontánea más consistente, ofreciendo el beneficio de la respuesta bifásica con gran potencial para el estudio del dolor agudo¹¹.

El número de elevaciones de la pata fue utilizado para la calificación del comportamiento doloroso inducido por la formalina por presentar una correlación importante con el test de la formalina clásico y con las alteraciones cardiovasculares en respuesta al dolor causada por la inyección de la formalina en la pata. Nos ofrece una correlación confiable del comportamiento doloroso en animales conscientes y no sometidos a la restricción física¹¹⁻¹⁷. No son muchos los datos presentes en la literatura sobre el papel de los receptores serotoninérgicos o noradrenérgicos del SNC en la mediación de la respuesta al dolor causada por la formalina.

Se utilizan varias dosis de fentolamina y de metisergida por vía subaracnoidea en ratones, siendo utilizadas en este estudio dosis ya descritas y habitualmente utilizadas por otros autores^{4,18,19}.

El pentobarbital, el diazepam y el alcohol, inhibieron la reducción de la nocicepción existente en la fase intermedia del test de formalina, lo que presupone la involucración de receptores GABA_A⁹. Por otra parte, un estudio electrofisiológico en ratones anestesiados con tiopental sódico y sometidos a la sección medular mostró un comportamiento bifásico evidente, sugiriéndonos que el control del dolor provocado por la formalina no depende del mecanismo gabaérgico²⁰.

En el estudio actual, encontramos un aumento en el número de las elevaciones de la pata durante la fase intermedia en los grupos GF, GM y GFM, lo que revela la involucración de las vías serotoninérgicas y noradrenérgicas en el sistema inhibitorio descendiente del dolor. A tono con los resultados obtenidos en este estudio, la involucración de la serotonina (5-HT) en la modulación descendiente del dolor, también quedó demostrado por la inhibición de su síntesis por p-chlorophenylalanina, la lesión electrolítica del núcleo magno de la rafe y el uso de 5,6-dihydroxytryptamina, una neurotoxina

serotoninérgica ²¹. Otro estudio mostró una reducción de la respuesta nociceptiva a la formalina en todas las fases con el uso del agonista serotoninérgico α -metil-5-HT ²².

Esperábamos encontrar un efecto aditivo o potenciador sobre el número de elevaciones de la pata, con la utilización de la asociación de los antagonistas serotoninérgico y noradrenérgico. Se registró un mayor número de elevaciones en el grupo GFM, pero sin significancia estadística en comparación con los grupos GF y GM, con ese último presentando un número menor de elevaciones de la pata, también sin significancia estadística. Esos datos sugieren que la dosis de fentolamina utilizada fue suficientemente elevada para inhibir casi por completo el sistema descendiente adrenérgico y que la dosis de metisergida no fue tan elevada a punto de inhibir integralmente la vía descendiente serotoninérgica, pero la asociación de los dos fármacos parece haber sido suficiente para la inhibición de la actividad inhibitoria descendiente serotoninérgica y noradrenérgica. El uso de dosis logarítmicamente menores podría evidenciar con más propiedad ese efecto de los antagonistas serotoninérgico y noradrenérgico, fentolamina y metisergida, como también su asociación en la inhibición de la actividad inhibitoria descendiente serotoninérgica y noradrenérgica, pues con los datos de esta investigación podemos detectar que, a pesar de haber sido usadas dosis ya evaluadas por otros autores ^{4,18,19}, ellas pueden haber sido elevadas para la elucidación de aspectos controvertidos de la actividad inhibitoria descendiente serotoninérgica y noradrenérgica.

Pero un estudio realizado en varios modelos de dolor encontró un efecto antinociceptivo de la metisergida en la segunda fase del test de la formalina, y sugiere que se debe a la liberación reducida de glutamato y de la sustancia P de las neuronas primarias aferentes en la médula espinal, causada por el bloqueo de los receptores 5-HT2 anteriormente a la inflamación periférica ²³. Por otra parte, el papel inhibitorio de las vías noradrenérgicas quedó demostrado en el modelo de retirada de la cola, donde la fentolamina y la ioimbina favorecieron el aumento de la corriente eléctrica de estimulación del núcleo retículo lateral, para la activación del sistema descendente inhibitorio ²⁴.

Otro estudio encontró una reducción de la respuesta nociceptiva del test de la formalina con ioimbina, un antagonista adrenérgico relativamente selectivo para los receptores α_2 y serotoninérgicos 5-HT1A, lo que nos permite deducir una involucreción directa de los receptores α_1 en la modulación de la nocicepción de la fase II del test de la formalina, ya que esta ocurrió con la fentolamina, un antagonista inespecífico de los receptores α_1 y α_2 ²⁵.

En este estudio, durante la fase II, relativa al test de formalina modificado, se registró una diferencia significativa de la respuesta nociceptiva cuando se compararon los grupos fentolamina y fentolamina asociada a la metisergida con el grupo metisergida, lo que puede ser explicado por el efecto antagonista de la fentolamina en los receptores α_2 , generando un efecto α_1 .

Los resultados obtenidos demostraron un aumento de la respuesta álgica con el uso de los antagonistas noradrenérgico

y serotoninérgico por vía subaracnoidea en ratones, sugiriéndonos la existencia de un efecto noradrenérgico y serotoninérgico en el sistema inhibitorio descendiente del dolor agudo y permitiéndonos demostrar la importancia de investigar en este y en otros modelos de dolor, a los agonistas que puedan presentar un efecto analgésico, posibilitando así, su uso en el control del dolor agudo. Sin embargo, algunos estudios realizados por otro investigador de la institución que están en marcha actualmente, y que adoptan otros modelos experimentales del dolor, deberán confirmar esos descubrimientos.

REFERENCIAS

- D'Mello R, Dickenson AH – Spinal cord mechanisms of pain. *Br J Anaesth*, 2008;101:8-16.
- Vanegas H, Schaible HG – Descendent control of persistent pain: inhibitory or facilitatory? *Brain Res Rev*, 2004;295-309.
- Mason P – Deconstructing endogenous pain modulation. *J Neurophysiol*, 2005;94:1659-1663.
- Liu RJ, Zhang RX, Qiao JT et al. – Interrelations of opioids with monoamines in descending inhibition of nociceptive transmission at the spinal level: an immunocytochemical study. *Brain Res*, 1999;830:183-190.
- Mochizuki D – Serotonin and noradrenaline reuptake inhibitors in animal models of pain. *Hum Psychopharmacol*, 2004;19:S15-S19.
- Calajiesan AA, Chang HC, Zhuo M – Spinal serotonergic receptors mediate of a nociceptive reflex by subcutaneous formalin injection into hindpaw in rats. *Brain Res*, 1998;798:46-54.
- Dubuisson D, Dennis SG – The formalin test: A quantitative study of analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats. *Pain*, 1977;4:161-174.
- Abbott FV, Franklin KBJ, Westbrook RF et al. – The formalin test: scoring properties of the first and second phases of the pain response in rats. *Pain*, 1995;60:91-102.
- Franklin KBJ, Abbott FV – Pentobarbital, diazepam and ethanol abolish the interphase diminution of pain in the formalin test: evidence for pain modulation by GABAA receptors. *Pharmacol Biochem Behav*, 1993;46:661-66.
- Tjolsen A, Beerge O, Hunskaar S et al. – The formalin test: an evaluation of the method. *Pain*, 1992;51:5-17.
- Wheller-Aceto H, Porreca F, Cowan A – The rat paw formalin test: comparison of noxious agents. *Pain*, 1990;40:229-238.
- Shibata M, Ohkubo T, Takahashi H et al. – Modified formalin test: characteristic bifasic pain response. *Pain*, 1989;38:347-352.
- Taylor BK, Peterson MA, Basbaum AI – Persistent cardiovascular and behavioral nociceptive responses to subcutaneous formalin require peripheral nerve input. *J Neurosci*, 1995;15:7575-7584.
- Doak GJ, Sawynok J – Formalin-induced nociceptive behavior and edema: involvement of multiple peripheral 5-hydroxytryptamine receptor subtypes. *Neuroscience*, 1997;80:939-949.
- Parada CA, Tambeli CH, Cunha FQ et al. – The major role of peripheral release of histamine and 5-hydroxytryptamine in formalin-induced nociception. *Neuroscience*, 2001;102:937-944.
- Ashmawi HA, Chambergo FS, Palmeira CCA et al. – The effects of pyrilamine and cimetidine on mRNA c-Fos expression and nociceptive flinching behavior in rats. *Anesth Analg*, 2003;97:541-546.
- Sousa A, Franco PAB, Ashmawi HA et al. – Efeito analgésico local do tramadol em modelo de dor provocada por formalina em ratos. *Rev Bras Anestesiologia*, 2008; 371-379.
- Danzebrink RM, Gebhart GF – Evidence that spinal 5-HT1, 5-HT2 and 5-HT3 receptor subtypes modulate responses to noxious colorectal distension in the rat. *Brain Res*, 1991;538:64-75.
- Obata H, Saito S, Sasaki M et al. – Antiallostatic effect of intrathecal administered 5-HT2 agonists in rats with nerve ligation. *Pain*, 2000;90:173-79.

20. Henry JL, Yashpal K, Pitcher GM et al. – Physiological evidence that the “interphase” in the formalin test is due to active inhibition. *Pain*, 1999;82:57-63.
21. Basbaum AI – Descending control of pain transmission: possible serotonergic- enkephalinergic interactions. *Adv Exp Med Biol*, 1981;133:177-189.
22. Sasaki M, Obata H, Saito S et al. – Antinociception with intratecal α -methyl-5-hydroxytryptamine, a 5-hydroxytryptamine_{2A/2C} receptor agonist, in two rat models of sustained pain. *Anesth Analg*, 2003;96:1072-1078.
23. Ki-Myung C, Seong-Soo C, Ki-Jung H et al. – Antinociceptive effects of methysergide in various pain models. *Pharmacology*, 2003;101:69-93.
24. Gebhart GF, Ossipov MH – Characterization of inhibition of the spinal nociceptive Tail-Flick Reflex in the rat from the medullary lateral reticular nucleus. *Neuroscience*, 1986;6:701-713.
25. Shanon HE, Lutz EA – Yoimbine produces antinociception in the formalin test in rats: involvement to serotonin_{1A} receptors. *Psychopharmacology*, 2000;149:93-97.