



REVISTA BRASILEIRA DE ANESTESIOLOGIA

Publicación Oficial de la Sociedade Brasileira de Anestesiologia
www.sba.com.br



ARTÍCULO CIENTÍFICO

Efecto hiperalgésico de la fentolamina por vía subaracnoidea en ratones[☆]



Desiré Carlos Callegari^a, João Antônio Correa^a, Oscar César Pires^{b,*},
Renan Batista Corrêa Braga^c, Ana Flávia Marques Gimbo^d, Adriana Aparecida de Souza^e,
Marta Helena Rovani Pires^f, Elton Constantino^b e Irimar de Paula Posso^b

^a Facultad de Medicina del ABC (FMABC), Santo André, SP, Brasil

^b Universidad de Taubaté (Unitau), Taubaté, SP, Brasil

^c Curso de Medicina, Universidad de Taubaté (Unitau), Taubaté, SP, Brasil

^d Curso de Enfermería, Universidad de Taubaté (Unitau), Taubaté, SP, Brasil

^e Curso de Biología, Universidad de Taubaté (Unitau), Taubaté, SP, Brasil

^f Curso de Medicina, Facultad de Medicina de Petrópolis, Petrópolis, RJ, Brasil

Recibido el 12 de agosto de 2013; aceptado el 12 de septiembre de 2013

Disponible en Internet el 13 de enero de 2015

PALABRAS CLAVE

Ratones;
Fentolamina;
Dolor;
Test de la formalina;
Von Frey

Resumen

Justificación y objetivos: El fenómeno doloroso es una de las más importantes y complejas experiencias. La fentolamina es un antagonista alfaadrenérgico no selectivo. El objetivo fue comparar los efectos de dosis crecientes de fentolamina por vía subaracnoidea en la modulación del fenómeno doloroso en ratones.

Método: Fueron usados 84 ratones Wistar machos, divididos en los grupos formalina e incisión plantar, subdivididos en 6 subgrupos (n = 7). En el subgrupo control (GC) solamente se administró solución salina (10 µL); en los subgrupos activos, 10 µg de fentolamina (GF10), 20 µg (GF20), 30 µg (GF30), 40 µg (GF40) y 50 µg (GF50). En el grupo formalina, el dolor fue inducido con una inyección de 50 µL de formalina al 2% en la región dorsal de la pata posterior derecha. En el grupo incisión plantar, el dolor se indujo por incisión plantar y evaluación por los filamentos de Von Frey. La inducción y el mantenimiento anestésico se llevó a cabo con halotano al 3% para la introducción de catéter en el espacio subaracnoideo y la realización de la incisión plantar. El análisis estadístico de los resultados se hizo mediante el programa JMP® del SAS con un nivel de significación del 5%.

Resultados: La fentolamina en las dosis de 20 y 30 µg produjo un aumento de la respuesta de dolor en la fase intermedia del test de la formalina. En el test de la incisión plantar, generó un efecto hiperalgésico en el primero, tercero, quinto y séptimo días con dosis de 10 µg; en el primero, tercero y quinto días con dosis de 20 µg; y en el quinto día con dosis de 30 µg.

[☆] Trabajo desarrollado en la Facultad de Medicina del ABC, Santo André, SP, Brasil.

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: ocpires@uol.com.br (O.C. Pires).

KEYWORDS

Mice;
Phentolamine;
Pain;
Formalin test;
Von Frey

Conclusión: La fentolamina por vía subaracnoidea generó un efecto hiperalgésico posiblemente por la participación de diferentes subclases de receptores alfaadrenérgicos en las vías moduladoras del dolor.

© 2014 Sociedade Brasileira de Anestesiologia. Publicado por Elsevier Editora Ltda. Todos los derechos reservados.

Hyperalgesic effect of subarachnoid administration of phentolamine in mice
Abstract

Background and objectives: Painful phenomenon is one of the most important and complex experiences. Phentolamine is a non-selective alpha-adrenergic antagonist. The objective of this study was to compare the effect of increasing doses of phentolamine into subarachnoid space in rats in the modulation of painful phenomenon.

Methods: Eighty four male Wistar rats were divided into formalin and plantar incision groups, subdivided into six subgroups (n=7). Control group (CG) received only saline (10 µL); active subgroups received phentolamine 10 µg (GF10), 20 µg (GF20), 30 µg (GF30), 40 µg (GF40), and 50 µg (GF50). In formalin group, pain was induced by injection of 50 µL of 2% formalin in dorsal region of right posterior paw. In plantar incision group, pain was induced by plantar incision and evaluated using Von Frey filaments. Induction and maintenance of anesthesia were performed with 3% halothane for catheter placement into subarachnoid space and plantar incision. Statistical analysis was performed using the JMP® program from SAS with 5% significance level.

Results: Phentolamine at doses of 20 and 30 µg increased the algic response in the intermediate phase of the formalin test. In plantar incision test, it had hyperalgesic effect on first, third, fifth, and seventh days at a dose of 10 µg and on first, third, and fifth days at a dose of 20 µg and on fifth day at a dose of 30 µg.

Conclusion: Subarachnoid administration of phentolamine showed hyperalgesic effect, possibly due to the involvement of different subclasses of alpha-adrenergic receptors in modulating pain pathways.

© 2014 Sociedade Brasileira de Anestesiologia. Published by Elsevier Editora Ltda. All rights reserved.

Introducción

El paso de informaciones nociceptivas por el cuerno posterior de la médula espinal en dirección a niveles rostrales del sistema nervioso central sufre profundas influencias excitatorias e inhibitorias. La elucidación de la farmacología de esos sistemas moduladores ha orientado la apreciación de la habilidad de receptores específicos¹.

Los neurotransmisores, aminoácidos y neuropéptidos son liberados por los terminales de los aferentes primarios en el cuerno posterior de la médula espinal, donde actúan en la modulación de la transmisión nociceptiva. Entre otros se destacan los aminoácidos excitatorios glutamato y aspartato, los neurotransmisores y neuropéptidos, incluyendo las taquicininas sustancia P, neurocinina A, neurocinina B, péptido gen relacionado con la calcitonina, colecistocinina, somatostatina, óxido nítrico, prostaglandinas, galanina, encefalinas y endorfinas².

La fentolamina, antagonista alfaadrenérgico competitivo que pertenece al grupo imidazolina, no selectivo, con eficacia similar sobre los receptores alfa1 y alfa 2, puede también bloquear receptores 5-HT y canales de potasio y causar la liberación de histamina por los mastocitos³.

Esta investigación evaluó los efectos de dosis crecientes de fentolamina, administradas por vía subaracnoidea, sobre el dolor inducido en ratones usando el test de la formalina modificado y del test de la incisión plantar, para verificar si la involucración de las vías adrenérgicas en el sistema inhibitorio descendiente del dolor es dosis dependiente de la fentolamina.

Método

Los procedimientos experimentales respetaron las normas éticas de la *International Association for the Study of Pain* (IASP), que regula los experimentos hechos en animales (*Committee for Research and Ethical Issues of the IASP*, 1983) y el proyecto fue aprobado por el Comité de Ética en el Uso de Animales Ceua/Unitau, con el n.º 019/11. Fueron usados 84 ratones Wistar machos, con peso entre 220 y 300 g, que fueron colocados individualmente en una cámara de vidrio transparente de 15 × 25 × 15 cm, con un orificio en la parte anterior y posterior para permitir la entrada y la salida de oxígeno, gases anestésicos y dióxido de carbono, y anestesiados con halotano, a una concentración de 3% en oxígeno al 100%. Cuando el ratón no podía desplazarse en la cámara,

se le retiraba y se le ponía en decúbito dorsal horizontal con el abdomen sobre un cilindro plástico, con el hocico en una mascarilla, por donde continuaba recibiendo el halotano en la misma concentración.

A continuación se introducía un catéter de polietileno (PE 10), en el espacio subaracnoideo en sentido caudal, por punción con aguja 22 G de Tuohy en la línea media del espacio intervertebral por encima de la penúltima vértebra lumbar, hasta el espacio subaracnoideo, que era identificado por el movimiento reflejo de la cola o de una de las patas traseras. El catéter se fijaba en el tejido subcutáneo y la piel se suturaba con un hilo de nilón 4-0 y al final del experimento, después del sacrificio del animal con tiopental sódico, se seccionaba la columna lumbar para confirmar la presencia del catéter en el espacio subaracnoideo⁴.

Los animales fueron distribuidos aleatoriamente en 2 grupos: formalina e incisión plantar. Los del grupo formalina fueron divididos en 6 subgrupos con siete ratones cada uno. Los del grupo control (GC) recibieron por vía subaracnoidea inmediatamente después de la colocación del catéter 10 μ l de solución salina; y los de los grupos activos GF10, GF20, GF30, GF40 y GF50 recibieron por la misma vía 10 μ l de solución con fentolamina en las dosis respectivas de 10 μ g, 20 μ g, 30 μ g, 40 μ g y 50 μ g, que correspondieron respectivamente a 31,5 nmol, 63 nmol, 94 nmol, 126 nmol y 157 nmol de fentolamina en solución salina estéril.

La inducción del dolor por la formalina (test de la formalina modificado), se hizo a través de la administración de 50 μ l de solución de formalina al 2%, en la región dorsal de la pata posterior derecha, 25 min después de la administración de la solución salina o de la fentolamina⁵.

Fueron consideradas todas las elevaciones de la pata no relacionadas con el caminar, independientemente del tiempo en que permanecía levantada. El recuento se hizo continuamente durante 60 min. Se anotó el número parcial de elevaciones cada 5 min. El test fue dividido en 3 fases: I, intermedia y II. La fase I comprendió el número de elevaciones de la pata durante los primeros 5 min, la fase intermedia del minuto 6 al minuto 20, y la fase II del minuto 21 al 60.

Los animales del grupo incisión plantar fueron divididos en 6 subgrupos con 7 ratones cada uno. Los del grupo control (GC) recibieron por vía subaracnoidea inmediatamente después de la colocación del catéter, 10 μ l de solución salina; y los de los grupos activos GIP10, GIP20, GIP30, GIP40 y GIP50 recibieron por la misma vía 10 μ l de solución con fentolamina en las dosis respectivas de 10 μ g, 20 μ g, 30 μ g, 40 μ g y 50 μ g, lo que correspondió respectivamente a 31,5 nmol, 63 nmol, 94 nmol, 126 nmol y 157 nmol de fentolamina en solución salina estéril.

Con el animal anestesiado, se hizo una incisión quirúrgica longitudinal, de 1 cm de extensión, en la pata posterior derecha con un bisturí del número 11. Fueron incisionadas la piel y la fascia de la región plantar de la pata, con inicio a 0,5 cm desde el borde del calcáneo y extensión en dirección a los dedos de la pata. El músculo plantar se elevó y se hizo una incisión longitudinal, permaneciendo esta intacta. Después de la hemostasia con una ligera presión sobre el sitio quirúrgico, todos los planos fueron aproximados y suturados con 2 puntos separados con un hilo en una aguja de mononilón 4-0. La evaluación de la hiperalgesia se hizo por la aplicación de filamentos de von Frey, en la segunda hora y en el primero, tercero, quinto, séptimo, decimocuarto y vigésimo

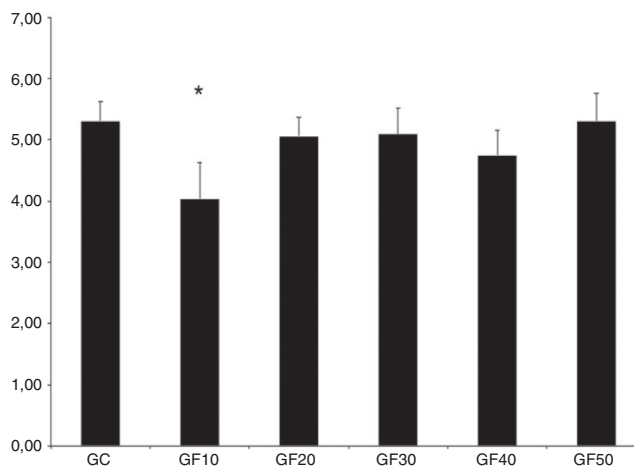


Figura 1 Promedios del número de elevaciones de la pata de los animales durante la fase intermedia del test de la formalina, en los grupos estudiados. * Diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$).

primer día después de la administración de la solución salina o de la fentolamina⁶.

El volumen de la solución inyectada en el espacio subaracnoideo de 10 μ l, se definió a partir de los estudios previos^{4,7,8}.

Para el análisis estadístico de los resultados obtenidos, usamos el software JMP® del *Statistical Analysis System Institute* y se aplicó el análisis de variancia seguido del test de Dunnett, con la adopción del nivel de significación menor del 5% ($p < 0,05$).

Resultados

Intensidad del dolor evaluado por el test de la fentolamina modificado

La fentolamina, administrada por vía subaracnoidea, en las dosis de 20 μ g y 30 μ g, produjo un aumento en la respuesta álgica en la fase intermedia del test de la formalina modificado, porque el promedio del número de elevaciones de la pata de los animales durante la fase intermedia del test de la formalina varió entre 16,28 en el grupo GF10 y 27,95 en el grupo GF30. Los mayores valores fueron encontrados en los grupos GF20 y GF30, que presentaron diferencias estadísticamente significativas cuando fueron comparados con el GC (figs. 1 y 2).

El promedio del número de elevaciones de la pata de los animales durante la fase I y la fase II del test de la formalina no presentó diferencias estadísticamente significativas entre los grupos estudiados.

Intensidad del dolor evaluado por los filamentos de von Frey en el test de la incisión quirúrgica plantar

La fentolamina, administrada por vía subaracnoidea, en la dosis de 10 μ g, generó un efecto hiperalgésico en el primero, tercero, quinto y séptimo días en el dolor inducido por la incisión plantar. En la dosis de 20 μ g generó un efecto hiperalgésico en el primero, tercero y quinto días en el dolor

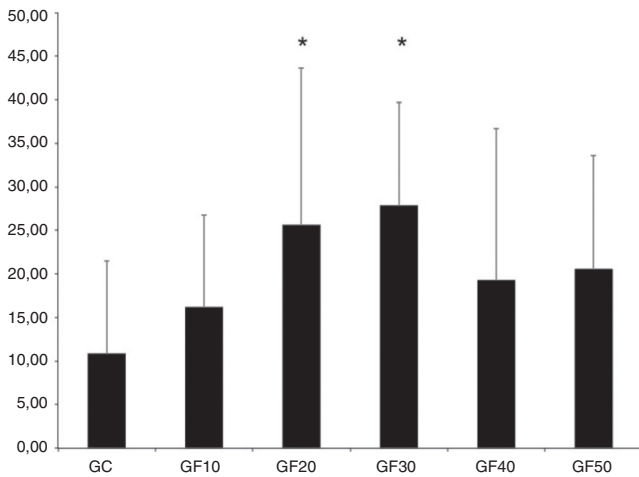


Figura 2 Promedios del número de elevaciones de la pata de los animales durante todas las fases del test de la formalina, en los grupos estudiados. * Diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$).

inducido por la incisión plantar y en la dosis de 30 μg generó un efecto hiperalérgico en el quinto día en el dolor inducido por la incisión plantar.

En la segunda hora y en el primero, tercero y quinto días después de la aplicación de la fentolamina subaracnoidea hubo una menor sensibilidad a los filamentos de von Frey en los grupos GF10 y GF20, que presentaron diferencias estadísticamente significativas cuando fueron comparados con el GC (figs. 3–6).

Al séptimo día de la evaluación se observó una mayor sensibilidad a los filamentos de von Frey en el grupo GF10, que presentó una diferencia estadísticamente significativa cuando fue comparado con el GC (fig. 7).

La evaluación hecha el decimocuarto y el vigésimo primer día no mostró diferencias estadísticamente significativas entre los grupos sobre la sensibilidad a los filamentos de von Frey.

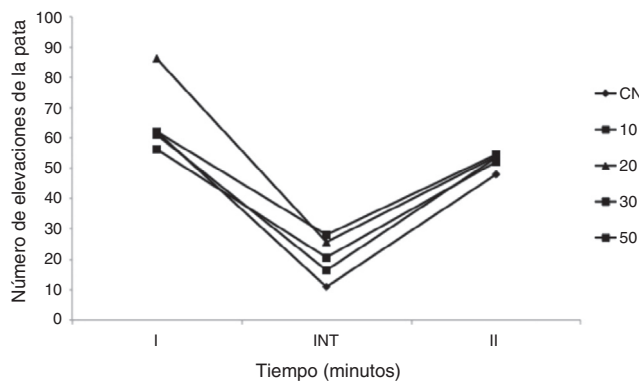


Figura 3 Respuesta a los filamentos de von Frey en la segunda hora después de la administración de la fentolamina subaracnoidea. Diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$).

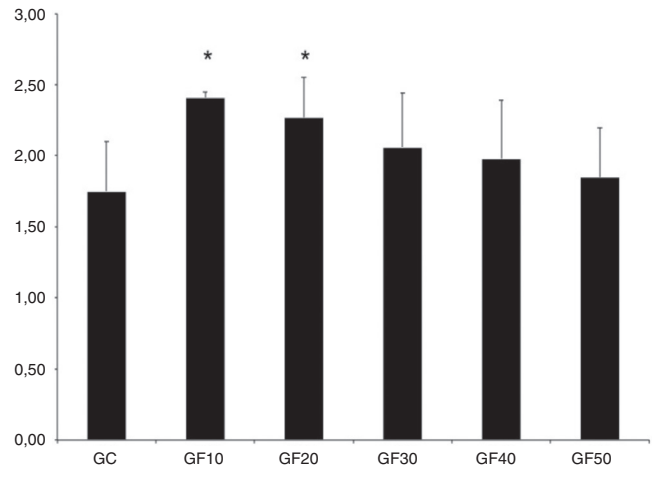


Figura 4 Respuesta a los filamentos de von Frey en el primer día después de la administración de la fentolamina subaracnoidea. * Diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$).

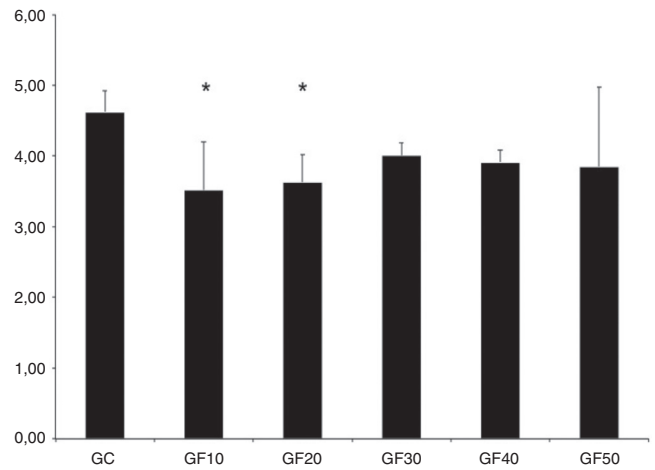


Figura 5 Respuesta a los filamentos de von Frey en el tercer día después de la administración de la fentolamina subaracnoidea. * Diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$).

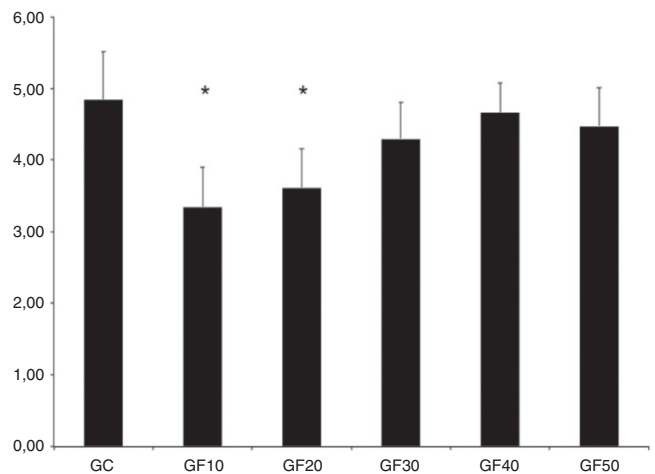


Figura 6 Respuesta a los filamentos de von Frey en el quinto día después de la administración de la fentolamina subaracnoidea. * Diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$).

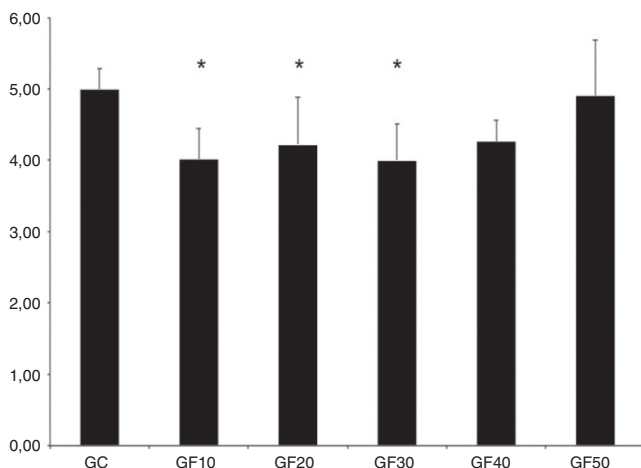


Figura 7 Respuesta a los filamentos de von Frey en el séptimo día después de la administración de la fentolamina subaracnoidea. * Diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$).

Discusión

El sistema inhibitorio descendente del dolor se compone principalmente de 4 partes del sistema nervioso central interconectadas: a) sistemas corticales y diencefálico; b) sustancias grises periacueductal y periventricular ricas en encefalinas y en receptores opioides; c) partes del bulbo rostroventral, especialmente el núcleo magno del rafe, y núcleos adyacentes que reciben los impulsos excitatorios de la sustancias grises periacueductal y que, a su vez, envían fibras serotoninérgicas y noradrenérgicas, a través del funículo dorsolateral, que se proyectan hacia el cuerno dorsal de la médula y bulbo. Las fibras del sistema inhibitorio descendente terminan principalmente en las láminas I, II y V, donde inhiben las neuronas nociceptivas, incluyendo las interneuronas y tractos ascendentes que se proyectan rostralmente, entre ellos los tractos espinotalámico, espinorretracticular y espinomesencefálico. Otro importante grupo de fibras que ha sido incluido en la formación del sistema endógeno de control del dolor son las neuronas noradrenérgicas originarias en el *locus coeruleus* y el sistema colinérgico central^{2,9-11}.

Para estudiar los efectos de la fentolamina sobre las vías del dolor se administran diversas dosis por vía subaracnoidea en ratones. En este estudio fueron usadas dosis crecientes, a partir de dosis ya descritas y habitualmente usadas por otros autores, que demostraron resultados contradictorios y mostraron la necesidad de estudios con dosis variadas, lo que motivó este estudio con dosis crecientes^{4,8,12}.

El test de formalina modificado, por producir respuestas próximas a las que ocurren en seres humanos, es muy usado como modelo de nocicepción en animales. El número de elevaciones de la pata como dispositivo para la cuantificación del comportamiento doloroso inducido por la formalina presenta una correlación importante con el test de la formalina clásico y con las alteraciones cardiovasculares en respuesta al dolor causado por la formalina en la pata, llevándonos a una correlación estrecha con el comportamiento doloroso en animales conscientes¹³⁻¹⁶.

Durante las fases I y II del test de la formalina modificado no observamos diferencias entre los grupos estudiados, lo

que muestra que no hay interferencia del sistema noradrenérgico. Sin embargo, durante la fase intermedia, propuesta como relacionada con la inhibición central del dolor, vimos un significativo aumento del número de elevaciones de la pata en comparación con el grupo control, cuando se usaron las dosis de 20 y 30 μg por vía subaracnoidea, sin observar diferencias estadísticamente significativas en comparación con los demás grupos.

Estudios que demuestran la aparición de un efecto analgésico en presencia de un estímulo de los receptores alfa-2 medulares, muestran que 10 μg fueron insuficientes para ejercer un efecto agonista sobre esos receptores y que las dosis superiores a 30 μg tal vez ejerzan un efecto agonista también sobre los receptores alfa-1, efecto este que antagoniza los efectos del estímulo de los receptores alfa-2¹⁷.

El modelo de dolor a partir de la incisión plantar en ratones, propuesto por Brennan et al.⁶ es muy útil para comprender los mecanismos fisiopatológicos del dolor. En la práctica clínica, se asemeja mucho al dolor que los pacientes sienten en el periodo postoperatorio, involuntario y de menor intensidad en reposo.

La fentolamina administrada por vía subaracnoidea en ratones, en las dosis de 10 y 20 μg , presentó características analgésicas en la segunda hora después de la administración. Esto puede ser explicado por un predominio del efecto modulador central sobre bajas dosis del fármaco. Ellas son incapaces de antagonizar el efecto de la liberación noradrenérgica descendente, visto que con el aumento de la dosis ese antagonismo se mantuvo sin que se observase ninguna reducción de la sensibilidad (analgésia). Sin embargo, la dosis de 10 μg administrada por vía subaracnoidea tuvo un efecto hiperalgésico en el primero, tercero, quinto y séptimo día, como también la dosis de 20 μg en el primero, tercero y quinto día. La dosis de 30 μg solo presentó un efecto hiperalgésico en el quinto día después de la administración, lo que evidencia que en ese periodo, sin la acción moduladora, el bloqueo de los receptores adrenérgicos con mayor selectividad, posiblemente sobre los receptores alfa-2, generó una mayor sensibilidad e hiperalgesia.

Otros estudios mostraron el surgimiento de un efecto analgésico en presencia de estímulo de los receptores alfa-2 ubicados en la médula espinal, por inhibición de la descarga neuronal^{17,18}. Eso podría explicar los resultados de este experimento, visto que dosis mayores del antagonista adrenérgico fentolamina podrían estimular también los receptores alfa-1, producir un efecto antagonista a los efectos del estímulo de los receptores alfa-2 y potenciar el efecto adrenérgico sobre los receptores alfa-1.

La hipótesis de que dosis mayores del antagonista fentolamina podrían estimular los receptores alfa-1 adrenérgicos y producir un efecto antagonista a los efectos del estímulo de los receptores alfa-2 adrenérgicos y por ende, potenciar el efecto adrenérgico sobre los receptores alfa-1 adrenérgicos, debe ser elucidada en nuevos estudios que comparen bloqueantes con una mayor selectividad por los receptores alfa-1 adrenérgicos con altas dosis de fentolamina.

Conclusión

Diferentes dosis de fentolamina por vía subaracnoidea generan diversos efectos sobre la sensibilidad al dolor,

posiblemente por la participación de distintas subclases de receptores alfaadrenérgicos en las vías moduladoras del dolor.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

1. Budai D. Neurotransmitters and receptors in the dorsal horn of the spinal cord. *Acta Biol Szegediensis*. 2000;44:21–38.
2. Terman GW, Bonica JJ. Spinal mechanisms and their modulation. En: Bonica's management of pain. 3th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2001. p. 73–152.
3. Mc Pherson GA. Current trends in the study of potassium channel openers. *Gen Pharmacol*. 1993;24:275–81.
4. Pires OC, Ashmawi H, Constantino E, et al. Antagonistas serotoninérgico e noradrenérgico por via subaracnóidea aumentam a resposta algica em ratos. *Rev Bras Anesthesiol*. 2011;61:202–10.
5. D'Armour FE, Smith D. A method for determining loss of pain sensation. *J Pharmacol Exp Ther*. 1941;72:74–9.
6. Brennan TJ, Vandermeulen EP, Gebhart GF. Characterization of a rat model of incisional pain. *Pain*. 1996;64:493–501.
7. Calejesan 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.
8. Liu RJ, Zhang RX, Qiao JT, et al. Interrelations of opioides with monoaminas in descending inhibition of nociceptive transmission at the spinal level: an immunocytochemical study. *Brain Res*. 1999;830:183–90.
9. Vanegas H, Schaible HG. Descending control of persistent pain: inhibitory or facilitatory? *Brain Res Rev*. 2004;46:295–309.
10. Mason P. Deconstructing endogenous pain modulation. *J Neurophysiol*. 2005;94:1659–63.
11. D'Mello R, Dickenson AH. Spinal cord mechanisms of pain. *Br J Anaesth*. 2008;101:8–16.
12. Obata H, Saito S, Sasaki M. Antiallodynic effect of intrathecaly administered 5-HT₂ agonists in rats with nerve ligation. *Pain*. 2000;90:173–9.
13. Wheeler-Aceto H, Porreca F, Cowan A. The rat paw formalin test: comparison of noxious agents. *Pain*. 1990;40:229–38.
14. Doak GJ, Sawynok J. Formalin-induced nociceptive behavior and edema: involvement of multiple peripheral 5-hydroxytryptamine receptor subtypes. *Neuroscience*. 1997;3:939–49.
15. Parada CA, Tambelli CH, Cunha FQ, et al. The major role of peripheral release of histamine and 5-hydroxytryptamine in formalina-induced nociception. *Neuroscience*. 2001;102:937–44.
16. Ashmawi HA, Chambergo FS, Palmeira CCA, et al. The effects of pirlamine and cimetidine and nociceptive flinching behavior in rats. *Anesth Analg*. 2003;97:541–6.
17. Afonso J, Reis F. Dexmedetomidina: papel atual em anestesia e cuidados intensivos. *Rev Bras Anesthesiol*. 2012;62:118–33.
18. Nociti JR, Serzedo PSM, Zuccolotto EB, et al. Dexmedetomidina associada a propofol em sedação durante anestesia local para cirurgia plástica. *Rev Bras Anesthesiol*. 2003;53:198–208.