

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

Departamento de Medicina y Cirugía Animal



TESIS DOCTORAL

**Hiperalgnesia inducida por opioides: implicación durante la anestesia
inhalatoria en la rata**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Mariana Boechat de Abreu

Director

Ignacio Álvarez Gómez de Segura

Madrid, 2013

Hiperalgesia inducida por opioides



Implicación durante
la anestesia inhalatoria
en la rata

Tesis Doctoral

Mariana Boechat de Abreu

2012



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

DEPARTAMENTO DE MEDICINA Y CIRUGÍA ANIMAL

Hiperalgnesia inducida por opioides: Implicación durante la anestesia inhalatoria en la rata

MARIANA BOECHAT DE ABREU

Director: Dr. Ignacio Álvarez Gómez de Segura

Madrid, 2012

D. Ignacio Álvarez Gómez de Segura, con D.N.I. 50804138-J, Profesor Titular del Departamento de Medicina y Cirugía Animal, en la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid

CERTIFICA:

Que la Tesis Doctoral titulada “**Hiperalgnesia inducida por opioides: implicación durante la anestesia inhalatoria en la rata**”, ha sido realizada bajo su dirección y supervisión por D^a. Mariana Boechat de Abreu.

Revisado el presente trabajo, considera que reúne los requisitos necesarios para su presentación y defensa.

En Madrid, a 24 de febrero de 2012,

Dr. Ignacio Álvarez Gómez de Segura

AGRADECIMIENTOS

A Ignacio Álvarez Gómez de Segura por su apoyo personal, por la dirección científica y las horas de discusión que permitirán ese trabajo.

A mi padre, sin su apoyo incondicional todo eso hubiera sido imposible.

A Javier Benito por fundamental apoyo personal y por todo que he aprendido con el.

A Delia Aguado por tantos días de trabajo juntas y por lo que me ha enseñado.

A todos del centro de investigación del Hospital la Paz. A Tonie, Isabel, Pablo, Pedro y Juan por el apoyo diario y amistad. A Tonie, Julio y Esteban por el enorme cariño.

A Carlota Largo por el cariño, apoyo logístico, y la ayuda siempre que necesaria.

A Laura del departamento de Medicina y cirugía Animal por la ayuda administrativa y a Rafael Cediel y Susana Canfrán.

A todos los amigos de tantos países que he hecho en Madrid. Por el cariño, y apoyo tantas veces necesario al largo de esos 4 años: Alicia Torres, Analía La Torre, Cecilia Neiva, Chris Pinto, Claudia Reinfo, Julia y Juan, Juliana Sá, Julie Wagner, Leda Wiese, Lorena Furieri, Sofia Yañez, Vanessa Ferreira, y todos los demás.

De novo ao meu pai, ao meu pai e mina mãe por terem feito de mim quem eu sou, por todo o amor e dedicação. A minha avó, a Marlene e ao Fred pelo amor e carinho em tempo integral e a toda minha família.

A todos meus amigos, pelo apoio desde bem longe, pelas muitas visitas que tive em Madrid e por estarem sempre presentes na minha vida.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	9
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	13
MANEJO DEL DOLOR	15
EFECTOS ADVERSOS DE LOS OPIOIDES: HIPERALGESIA INDUCIDA POR OPIOIDES Y TOLERANCIA.....	15
<i>Mecanismos relacionados con el desarrollo de hiperalgesia inducida por opioides y tolerancia farmacológica</i>	<i>16</i>
<i>Valoración de la hiperalgesia inducida por opioides y tolerancia clínica a los opioides</i>	<i>17</i>
<i>Tratamiento de la tolerancia a opioides y la hiperalgesia inducida por opioides.....</i>	<i>18</i>
<i>Interacción entre opioides y anestésicos inhalatorios: valoración de la CAM</i>	<i>21</i>
FÁRMACOS ANALGÉSICOS OPIOIDES.....	22
<i>Clasificación de los fármacos opioides.....</i>	<i>22</i>
<i>Recomendaciones sobre el uso de opioides en roedores</i>	<i>29</i>
HIPÓTESIS	31
OBJETIVOS	35
MATERIAL Y MÉTODOS	39
ANIMALES.....	41
INDUCCIÓN ANESTÉSICA E INTUBACIÓN ENDOTRAQUEAL	42
MONITORIZACIÓN	42
DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN ALVEOLAR MÍNIMA.....	43
PRUEBAS DE COMPORTAMIENTO NOCICEPTIVAS.....	45
<i>Prueba de Von Frey.....</i>	<i>45</i>
<i>Prueba de Randall-Selitto</i>	<i>47</i>
DISEÑO EXPERIMENTAL	48
<i>1 - Reducción dosis-dependiente inmediata de la CAM de sevoflurano tras la administración intraperitoneal de opioides butorfanol, metadona, morfina y tramadol, (Experimento I)</i>	<i>48</i>
<i>2 - Hiperalgesia inducida por el remifentanilo y efectos asociados en la CAM (Experimento II) ..</i>	<i>50</i>
<i>3 - Efectos inmediatos y tardíos de los opioides sobre la CAM (Experimento III).....</i>	<i>51</i>

4 - Hiperalgnesia y modificación de la CAM producida por tramadol. Efecto de la administración de ketamina (Experimentos IV y V)	53
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	54
RESULTADOS	57
1 - REDUCCIÓN DOSIS-DEPENDIENTE INMEDIATA DE LA CAM DE SEVOFLURANO TRAS LA ADMINISTRACIÓN INTRAPERITONEAL DE OPIOIDES (EXPERIMENTO I)	59
<i>Reducción de la CAM</i>	59
<i>Duración de la reducción de la CAM</i>	60
<i>Efectos Cardiorrespiratorios</i>	61
2- HIPERALGESIA INDUCIDA POR REMIFENTANILO Y AUMENTO DE LA CAM (EXPERIMENTO II)	64
<i>Umbral mecánicos nociceptivos</i>	64
3- EFECTOS DE LOS OPIOIDES EN LA CAM DE SEVOFLURANO (EXPERIMENTO III)	65
<i>Reducción inmediata de la CAM producida por los opioides</i>	65
<i>Aumento retardado de la CAM producido por los opioides</i>	66
4- HIPERALGESIA Y AUMENTO DE LA CAM PRODUCIDA POR TRAMADOL Y PREVENCIÓN O ATENUACIÓN PRODUCIDA POR EL EMPLEO DE KETAMINA (EXPERIMENTOS IV Y V)	68
DISCUSIÓN	73
REDUCCIÓN INMEDIATA DE LA CAM PRODUCIDA POR OPIOIDES	75
EFECTOS CARDIO-RESPIRATORIOS DE LOS OPIOIDES	79
HIPERALGESIA Y AUMENTO DE LA CAM INDUCIDA POR OPIOIDES	81
EFECTO DE LA KETAMINA SOBRE LA HIPERALGESIA Y AUMENTO DE LA CAM INDUCIDAS POR TRAMADOL	84
EFECTO ANALGÉSICO DEL TRAMADOL	84
LIMITACIONES Y APLICACIONES DE LA CAM	85
CONCLUSIONES	87
RESUMEN	91
SUMMARY	95
BIBLIOGRAFÍA	99

INTRODUCCIÓN

Los opioides son fármacos analgésicos recomendados para el tratamiento del dolor moderado o severo. Por ello son utilizados habitualmente en procedimientos quirúrgicos donde proporcionan el principal componente analgésico que, además de la pérdida de consciencia, requiere la anestesia quirúrgica. En la práctica, los opioides constituyen un grupo de fármacos insustituibles en el manejo del dolor intraoperatorio y son combinados con anestésicos -inhalatorios o inyectables, con efecto preferentemente hipnótico para proporcionar una excelente analgesia, ya que estos últimos fármacos no lo producen de forma intrínseca. Aportan, por tanto, el componente analgésico de la denominada anestesia equilibrada o *balanceada* (Lang et al. 1996).

Existen numerosas evidencias que sugieren que los opioides agonistas de los receptores mu (MOR) no solo promueven efectos antinociceptivos, mediante la activación del sistema inhibitorio (analgesia), sino que simultáneamente pueden activar efectos pronociceptivos estimulando el sistema facilitador del dolor y produciendo la denominada hiperalgesia inducida por opioides (Koch and Holtt 2008). La hiperalgesia ha sido detectada tanto en personas (Guignard et al. 2000; Angst et al. 2003; Compton et al. 2003; Koppert et al. 2003; Luginbuhl et al. 2003) como en roedores (Laulin et al. 1999; Celerier et al. 2000; Celerier et al. 2001; Van Elstraete et al. 2005; Celerier et al. 2006), así como en tratamientos crónicos y agudos. Sin embargo aún no ha sido estudiado en el periodo intraoperatorio, lo que sería muy útil considerando la amplia utilización de los opioides en los protocolos anestésicos.

Resulta relativamente difícil valorar la analgesia producida por fármacos en el animal anestesiado aunque una forma indirecta de valorar el efecto de estos fármacos es la reducción de las necesidades de anestésicos inhalatorios. Ello puede valorarse mediante la cuantificación de cambios en la concentración alveolar mínima (CAM) de un anestésico inhalatorio, que puede ser reducida por la asociación de los anestésicos inhalatorios con fármacos opioides. Dicha reducción no implica una relación directa con el efecto analgésico, pero evalúa la interacción entre ese fármaco y el agente halogenado (Docquier

et al. 2003). Ello implica que la valoración de la CAM no sustituye los métodos de evaluación del dolor en animales despiertos, sin embargo presenta la ventaja única al mimetizar la situación intraoperatoria (Docquier et al. 2003). Finalmente, la comparación de la variación de la CAM con pruebas comportamentales de respuesta a estímulos nociceptivos en animales conscientes puede constituir una herramienta útil para investigar la relación de los efectos de los opioides, y la presencia de hiperalgesia inducida por opioides, en ambos estados de anestesia y consciencia.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

MANEJO DEL DOLOR

El control del dolor constituye un problema de una dimensión social cada vez mayor que ha favorecido un incremento igualmente considerable de los estudios que tratan de determinar sus mecanismos y tratamientos (Kitchen 1987; Hansen 2003). La suma de ambos ha favorecido el desarrollo de la denominada analgesia polimodal que sugiere que el abordaje analgésico resulta más eficaz si se emplean diferentes tratamientos analgésicos que emplean diferentes mecanismos de acción. Un elemento fundamental en todos ellos es el empleo de opioides que son empleados de forma habitual perioperatoriamente desde hace décadas. Recientemente se ha observado que los opioides producen efectos sobre el control del dolor opuestos a los esperados y que pueden tener relevancia clínica.

EFFECTOS ADVERSOS DE LOS OPIOIDES: HIPERALGESIA INDUCIDA POR OPIOIDES Y TOLERANCIA

El efecto más conocido de los opioides es el analgésico pero desde hace tiempo se conocen las limitaciones que presenta su empleo, especialmente si este es prolongado (Laulin et al. 1999; Laulin et al. 2002) (Mao 2002). El efecto facilitador del dolor ha sido observado como respuesta tardía tanto en personas (Guignard et al. 2000; Angst et al. 2003; Compton et al. 2003; Koppert et al. 2003; Luginbuhl et al. 2003) como en roedores (Laulin et al. 1999; Celerier et al. 2000; Celerier et al. 2001; Van Elstraete et al. 2005; Celerier et al. 2006). El balance final de los efectos pro- y antinociceptivos determina un efecto analgésico o hiperalgésico (Mao 2002).

Tanto la tolerancia a los opioides como la hiperalgnesia inducida por estos son fenómenos que limitan el tratamiento analgésico con opioides (Mao 2002; King et al. 2005; Lee et al. 2011). Conceptualmente los dos mecanismos son opuestos por el desarrollo de mecanismos

celulares opuestos: proceso de insensibilización (tolerancia farmacológica) del primer fenómeno frente a un proceso de sensibilización en el segundo caso (hiperalgesia inducida por opioides) (Mao 2002).

La tolerancia clínica a opioides se describe como un efecto sumatorio de los dos procesos: La tolerancia farmacológica (insensibilización y reducción de los receptores funcionales en las neuronas diana (von Zastrow 2003; Mitra 2008)), y la relativa disminución de la eficacia de los opioides por la simultánea activación de sistemas pronociceptivos del organismo (hiperalgesia inducida por opioides) (Laulin et al. 1999). Se considera que ambos procesos pueden presentar algunos mecanismos y formas de prevención en común (King et al. 2005).

Tanto como consecuencia del desarrollo de tolerancia a opioides como de hiperalgesia inducida por opioides o si un dolor pre-existente no está adecuadamente tratado, el resultado es una disminución del umbral del dolor (Mao 2002). Clínicamente, se puede diferenciar el desarrollo de hiperalgesia del desarrollo de tolerancia, o de un fallo de tratamiento tras el aumento de la dosis de opioides, que genera una mejora en los casos de tolerancia y fallo del tratamiento, y un empeoramiento en el caso de hiperalgesia inducida por opioides (Lee et al. 2011).

Mecanismos relacionados con el desarrollo de hiperalgesia inducida por opioides y tolerancia farmacológica

Los mecanismos celulares potencialmente involucrados en el desarrollo de la hiperalgesia inducida por opioides incluyen la activación de mecanismos ascendentes en la medula espinal (activación de receptores N-Metil D-Aspartato; NMDA) y aumento de los niveles de dinorfina espinal) (Vanderah et al. 2001; Mao 2002) y la facilitación descendente mediante

la activación de células pro-nociceptivas en el núcleo medular ventro-rostral y funículo dorso-lateral, con aumento de los niveles de colecistoquinina) (King et al. 2005).

El desarrollo de la tolerancia farmacológica está relacionada con la disponibilidad de receptores opioides y su modulación (Koch and Hollt 2008). La estimulación del receptor opioide por estos fármacos desencadena una cascada de señalización extra e intracelular que regula a la baja la disponibilidad de receptores opioides y su modulación mediante procesos de internalización o endocitosis (Pradhan et al. 2009). Se genera una desviación de la curva dosis-efecto hacia la derecha, lo que significa que una misma dosis del fármaco determina un menor efecto, requiriendo dosis más altas para lograr el mismo grado de efecto analgésico (DuPen et al. 2007). Los opioides endógenos no determinan tolerancia farmacológica pues promueven el nivel necesario de endocitosis y reciclaje del receptor opioide mu que evite su desensibilización (Kim et al. 2008).

Valoración de la hiperalgesia inducida por opioides y tolerancia clínica a los opioides

La valoración del dolor en animales se basa en respuestas comportamentales frente a estímulos mecánicos o térmicos. Las pruebas de Von Frey (Zhao et al. 2009) y Randall Selltto (Randall and Selltto 1957) evalúan umbrales mecánicos, donde el primero determina alodinia y el segundo hiperalgesia. En la prueba de Randall-Selitto se utiliza una pinza aplicada en la zona dorsal de la pata mientras que la prueba de Von Frey utiliza filamentos que determinan distintas presiones de estímulos no nociceptivos en la zona plantar. El animal es colocado en una cubeta con el fondo perforado para la realización de la prueba.

La prueba de Hargreaves (Hargreaves et al. 1988; Kocevski and Tvrdeic 2008) y el método del Tail Flick (Nikenina and Abramov 2009) son pruebas que utilizan un estímulo térmico. La prueba de Hargreaves, o de sensibilidad plantar, mide el tiempo de retirada de la pata de una su-

perficie que se calienta gradualmente de 42°C a 49°C mediante una luz infra-roja posicionada debajo de la pata. (Kocevski and Tvrdeic 2008). La prueba de Tail Flick determina la latencia en segundos hasta la retirada de la cola frente a un estímulo térmico (Nikenina and Abramov 2009). En personas se ha empleado una prueba que aplica frío y presión: en un recipiente con agua y hielo a una temperatura constante de 2°C a 8°C se determina la latencia, con un máximo de 300 segundos, soportada por la mano apoyada sobre el fondo helado (Compton et al. 2000).

El tipo de estímulo utilizado por cada test puede dificultar el diagnóstico entre tolerancia e hiperalgesia (Bannister and Dickenson 2010). Por ejemplo, no pudieron determinarse diferencias entre el umbral de respuesta basal y pos-tratamiento con opioides utilizando la prueba de *tail flick* ya que aplica una subida brusca de temperatura que puede enmascarar el valor basal, pero que si fueron detectadas empleando el test de Hargreaves (Hargreaves et al. 1988). En pacientes tratados con metadona se observó hiperalgesia frente al estímulo nociceptivo inducido por frío y presión, pero no por el eléctrico (Doverly et al. 2001). El test de von Frey (Cabañero et al. 2009) y el test de Randall-Selitto (Celerier et al. 2000), ambos estímulos mecánicos, permiten determinar fenómenos de hiperalgesia producida por remifentanilo en roedores. Además de la utilización de pruebas comportamentales de respuesta a estímulos nociceptivos, clínicamente, la presencia de tolerancia también puede ser evaluada por un aumento de las necesidades de analgésicos (Cortinez et al. 2001; Lee et al. 2005).

Tratamiento de la tolerancia a opioides y la hiperalgesia inducida por opioides

Actualmente se barajan varias estrategias para aumentar la eficacia de los opioides que incluyen desde la administración de medicaciones adyuvantes al empleo de dosis bajas de opioides o la rotación de los mismos (Koppert and Schmelz 2007).

Medicaciones adyuvantes

En la última década se ha podido determinar que la activación de receptores excitatorios, como los NMDA, están implicados en los mecanismos de tolerancia farmacológica e hiperalgesia inducida por opioides ^(Marek et al. 1991; Trujillo and Akil 1991). Los receptores NMDA son expresados tanto en fibras aferentes de neuronas de primer orden como en neuronas de la medula espinal e inducen hiperalgesia y tolerancia pre-sináptica mediante la liberación de neurotransmisores, y post-sináptica mediante la potenciación de la transmisión sensitiva ^(King et al. 2005; Vissers 2006).

La inhibición de estos receptores NMDA puede prevenir el desarrollo de tolerancia ^(Tiseo and Inturrisi 1993) e hiperalgesia inducida por opioides ^(Bell et al. 2005), tanto en personas como en animales ^(Holtman et al. 2008; Kosson et al. 2008). Estos efectos también se han observado cuando se produce una alteración del transporte de glutamato (que regula la disponibilidad de glutamato extracelular ^(Mao et al. 2002)). Otro posible mecanismo involucrado es un proceso de neurotoxicidad, mediado por la apoptosis de receptores NMDA asociado a la administración prolongada de morfina ^(Mao et al. 2002). En conjunto, todas estas evidencias sugieren la implicación del sistema glutaminérgico en los procesos de tolerancia e hiperalgesia inducida por opioides y su prevención mediante la utilización de antagonistas NMDA. En ratas se ha observado que la administración de ketamina a dosis de 10 mg.kg⁻¹ 30 minutos antes de la administración de remifentanilo previno el desarrollo de hiperalgesia ^(Celerier et al. 2000; Laulin et al. 2002) y tolerancia a morfina ^(Laulin et al. 2002). Por otro lado, existe otro grupo de fármacos análogos la ácido γ -amino-butírico, entre los que se incluye la gabapentina y la pregabalina, que podrían prevenir la aparición de hiperalgesia ^(Van Elstraete et al. 2008). Con esta misma finalidad también se han empleado anticuerpos administrando suero anti-dinorfina ^(Vanderah et al. 2000).

Rotación de opioides

La rotación de opioides se ha propuesto en casos de fallo del tratamiento con opioides y consiste en que el tratamiento opioide original es sustituido por otro opioide. Para el éxito en el tratamiento mediante la rotación de opioides parece ser relevante que haya tolerancia cruzada incompleta entre los dos opioides. Ello depende, especialmente, de diferencias en la afinidad de los receptores opioides y no opioides y la eficiencia intrínseca (capacidad de reserva funcional) que permitan la tolerancia cruzada incompleta (DuPen et al. 2007; Vissers et al. 2010).

Se considera que existen factores claves a la hora de decidir qué opioide utilizar para una rotación (Vissers et al. 2010) y que incluyen: a) grado de afinidad por receptores opioides, b) tipo de unión al receptor μ , c) que el segundo opioide tenga afinidad por otros receptores opioides además del μ y/o que presente afinidad (agonista o antagonista) por receptores no opioides involucrados en las vías del dolor, y d) que el segundo opioide presente mayor eficiencia intrínseca y menor capacidad de desarrollo de tolerancia. (Slatkin 2009).

Otros autores consideran que el éxito de la rotación de un opioide por otro es poco previsible. El principal motivo para que el opioide sustituto no sea efectivo sería la respuesta individual del paciente a ese opioide, y que aunque fuera utilizado como primer fármaco, no se observaría una analgesia satisfactoria. Aunque un determinado opioide no presente una respuesta óptima para un paciente concreto, se considera que puede encontrarse un opioide óptimo para cada paciente. Ello no invalida el hecho de que una respuesta inicial satisfactoria pueda reducirse con un tratamiento prolongado, requiriendo el cambio de opioide. La variabilidad de respuesta a opioides ha sido atribuida a factores individuales farmacocinéticos, farmacodinámicos, fisiológicos y genéticos (Slatkin 2009). Por las características de los opioides buprenorfina, metadona y tramadol se consi-

dera que estos podrían ser candidatos en una rotación con el fin de inhibir el fenómeno de tolerancia.

Interacción entre opioides y anestésicos inhalatorios: valoración de la CAM

La concentración alveolar mínima (CAM) de los anestésicos halogenados, que también puede considerarse la dosis efectiva 50, se define como aquella que previene la respuesta a un estímulo nociceptivo supramáximo en un 50% de los sujetos ^(Eger et al. 1965). La CAM constituye una referencia de la potencia anestésica del fármaco halogenado. La capacidad de opioides como la morfina, fentanilo o remifentanilo en reducir las dosis de anestésicos inhalatorios hasta un 90% en personas ^(Lang et al. 1996), está determinada mediante la reducción de la CAM ^(Eger et al. 1965). Morfina, buprenorfina, fentanilo y remifentanilo reducen la CAM de isoflurano en ratas ^(Criado et al. 2000; Criado and Gomez e Segura 2003), pero no se han determinado los efectos de la metadona y el butorfanol en la CAM de anestésicos inhalatorios en ratas, posiblemente por su menor empleo en roedores.

Resulta relevante indicar que dicha reducción de la CAM no implica una relación directa con el efecto analgésico ^(Docquier et al. 2003) y, de hecho, algunos antiinflamatorios no esteroides no modifican la CAM ^(Gomez de Segura et al. 1998) mientras que otros fármacos sin efectos analgésicos sí lo hacen, como las benzodiacepinas. La reducción de la respuesta al estímulo no representa necesariamente el efecto analgésico del fármaco, sino que evalúa la interacción entre dicho fármaco y el agente halogenado ^(Docquier et al. 2003). Por ello, la CAM no sustituye los métodos de evaluación del dolor en animales conscientes pero sí aporta información relevante como promover una cuantificación fiable del efecto observado, evitar resultados con falsos positivos por analgesia inducida por estrés por manipulación ^(Konarska et al. 1989). Además, mimetiza la situación intraoperatoria y constituye un modelo más aceptable desde el punto de vista ético ^(Docquier et al. 2003).

Hasta ahora no se ha investigado si los fenómenos de hiperalgesia inducida por opioides pueden tener consecuencias durante el periodo intraoperatorio. Se han observado fenómenos de tolerancia aguda a opioides, fundamentalmente a remifentanilo, de aparición tan solo 90 minutos posteriores a su administración. Un estudio reciente de nuestro grupo ^(Gomez de Segura et al. 2009) ha podido determinar que la tolerancia aguda a remifentanilo en la rata produce una disminución del grado de la reducción de la CAM típicamente producida por este opioide, es decir, pasado un tiempo desde el inicio de la infusión, la reducción las necesidades de anestésico inhalatorio son menores. Aunque se considera que la tolerancia a opioides y la hiperalgesia inducida por opioides son fenómenos relacionados ^(Mao 2002), no ha podido determinarse aún si el fenómeno de hiperalgesia inducida por opioides puede estar asociado a modificaciones en la CAM de anestésicos inhalatorios.

FÁRMACOS ANALGÉSICOS OPIOIDES

Clasificación de los fármacos opioides

Tradicionalmente han sido clasificados 4 tipos de receptores opioides inicialmente denominados delta, kappa, mu, y sigma ^(Dietis et al. 2011). Los receptores MOR (*mu opioid receptor*) son los que producen una analgesia más profunda, aunque también pueden provocar euforia, depresión respiratoria, dependencia física, bradicardia, tolerancia e hiperalgesia ^(DuPen et al. 2007). Los receptores KOR (*kappa opioid receptor*) desencadenan una respuesta analgésica menor, y pueden causar miosis, efecto sedante y disforia. Los receptores DOR (*delta opioid receptor*) modulan la actividad del receptor MOR y los receptores NOR (*nociceptin / orphanin opioid receptor*) y producen poca o nula analgesia, siendo estos últimos responsables de muchos de los efectos adversos asociados con

los opioides (disforia, alucinaciones, estimulación vasomotora y respiratoria). Actualmente, mediante el empleo de estudios moleculares y la utilización de ratones *knock-out* se conocen varios subtipos de estos receptores ^(Dietis et al. 2011). Hay como mínimo 7 subtipos de receptores MOR ^(Pasternak 2001). La tolerancia ^(DuPen et al. 2007) e hiperalgesia inducida por opioides ^{Koch and Hollt 2008)} son efectos colaterales asociadas a algunos de los subtipos MOR ^(DuPen et al. 2007).

Además de la diferencia de selectividad de los receptores, el fenómeno de tolerancia asimétrica (ausencia de tolerancia cruzada completa) puede deberse a diferencias en la eficacia de los distintos agonistas (actividad intrínseca) ^(Slatkin 2009). La *actividad intrínseca relativa* se define como la capacidad de los ligandos para producir un efecto determinado en un receptor. Para ello es necesario ocupar un número mínimo de receptores de su población total, denominada ocupación fraccional de receptores. El número de receptores que deben ser ocupados para que se produzca el efecto es inversamente proporcional a la actividad intrínseca. ^(Mercadante 1999; Vissers et al. 2010). Un opioide agonista de eficiencia baja ocupa más receptores y produce un mayor efecto de tolerancia debido a que, para el mismo efecto analgésico, es necesario un número mayor de receptores ocupados comparado con un opioide de alta eficiencia. De este modo, la reserva de receptores (número de receptores libres disponibles) es muy baja y hay mayor potencial para desarrollo de tolerancia ^(Mercadante 1999). Debido a estas diferencias de afinidad y actividad de los distintos agonistas en los distintos receptores, la rotación de opioides es uno de los recursos utilizados cuando se desarrolla tolerancia / hiperalgesia ^(Slatkin 2009).

Los opioides naturales y sintéticos, así como los péptidos opioides endógenos, se unen específicamente y con gran afinidad a los receptores opioides. Pueden actuar como agonistas (que se unen y estimulan el receptor), antagonistas (que se unen y bloquean o inhiben su actividad), agonistas parciales (se unen y estimulan parcialmente la actividad de ciertos subtipos de receptores), y agonistas/antagonistas (estimulan unos

receptores opioides mientras bloquean otros) (Lipman 1990). A continuación se revisan algunos de los opioides más empleados en la clínica y que han sido estudiados en el presente trabajo. Estos presentan selectividad por los receptores opioides con efecto variable pero algunos de ellos pueden presentar efectos sobre otros tipos de receptores. Ello puede implicar diferencias en la potencia analgésica, duración del efecto o efectos adversos.

Morfina

La morfina es un agonista opioide puro, y constituye el patrón de referencia de los opioides de elevada eficacia analgésica (nivel III). Este tipo de opioides son los recomendados por la Organización Mundial de la Salud para el tratamiento del dolor moderado a severo (Fallon and Laird 2011). También utilizada en el periodo intraoperatorio, la morfina reduce el requerimiento de anestésicos inhalatorios, lo que determina una reducción de la CAM en diversas especies. (Murphy and Hug 1982; Steffey et al. 1994; Criado et al. 2000) Pero la morfina, como cualquier opioide, no está libre de efectos adversos. Normalmente, sobre todo en tratamientos prolongados, los pacientes suelen presentar una analgesia adecuada inicial, apareciendo posteriormente efectos adversos que implican un control inadecuado del dolor o efectos adversos intolerables. Los efectos adversos más frecuentes pueden incluir náuseas, vómitos, cansancio, constipación, prurito, depresión respiratoria, así como dependencia y tolerancia analgésica.

La presencia de estos efectos adversos constituye una indicación para el empleo de un fármaco alternativo, lo que incluye la rotación con opioides (Freye et al. 2007). En ratas y ratones la sustitución de la morfina por metadona (Davis and Inturrisi 1999) o tramadol (Romero et al. 2010) fue efectiva en el control del dolor, habiéndose determinado también en personas con dolor crónico cuando la morfina fue sustituida por fentanilo (Morita et al. 2005) o buprenorfina (Freye et al. 2007). La morfina ha sido asociada al desarrollo de hiperalgesia inducida por opioides en ratas (Dunbar et al. 2007; Wilson et al. 2011), ratones (Liang et al. 2008) y personas (Chu et al. 2006).

Remifentanilo

Remifentanilo es también un agonista opioide puro, de alta potencia y corta duración, caracterizado por un fin de efecto muy rápido, independiente de la dosis o del tiempo de infusión. Por ello es una práctica común iniciar el tratamiento con otro opioide antes de finalizar la infusión de remifentanilo para evitar la aparición brusca de dolor postoperatorio (Angst and Clark 2006). Como otros opioides potentes reduce de forma relevante el requerimiento de anestésicos inhalatorios (Yoo et al. 2011). La reducción dosis dependiente de la CAM ha sido descrita en ratas (Criado and Gomez e Segura 2003; Gomez de Segura et al. 2009), perros (Monteiro et al. 2010) y gatos (Brosnan et al. 2009).

Tras la introducción del remifentanilo para uso intraoperatorio, se han descrito efectos de tolerancia aguda, así como de hiperalgesia postoperatoria, caracterizada por un incremento del dolor y de las necesidades postoperatorias de morfina (Guignard et al. 2000). Otro aspecto relevante es que la tolerancia aguda aparece antes cuando se emplean opioides de corta duración de acción (Kissin et al. 1991; Kissin et al. 1991; Kissin et al. 1996). La hiperalgesia relacionada con el uso del remifentanilo ha sido en ratones (Cabañero et al. 2009; Campillo et al. 2011) y personas (Troster et al. 2006; Singler et al. 2007), y puede ser prolongada; un único tratamiento con remifentanilo produjo un efecto hiperalgésico de hasta 10 días en ratones (Cabañero et al. 2009).

Tramadol

El tramadol es un opioide sintético de acción central que actúa en los receptores MOR y también presenta efecto antiinflamatorio y sobre las vías noradrenérgicas y serotoninérgicas, altera la transmisión del estímulo de dolor al inhibir la recaptación de monoaminas en la medula espinal. Por ello, presenta también actividad analgésica por afinidad y actividad antagonista sobre receptores pro-inflamatorios y pro-nociceptivos (Grond and Sablotzki 2004).

El tramadol es metabolizado en el hígado ^(Raffa et al. 1993) y es uno de sus metabolitos (M1) el que presenta una alta afinidad por el receptor MOR siendo este responsable de la acción MOR-opioide del tramadol. Aun así su afinidad es más baja que la de los opioides agonistas puros ^(Raffa 2008).

El tramadol ha sido utilizado en el manejo perioperatorio de ratas ^(Stokes et al. 2009) y reduce la CAM de sevoflurano en perros ^(Seddighi et al. 2009), gatos ^(Ko et al. 2008) y del isoflurano en conejos ^(Egger et al. 2009) y ratas ^(de Wolff et al. 1999). También ha sido utilizado para el manejo intraoperatorio del dolor en personas, reduciendo el consumo postoperatorio de morfina y previniendo las necesidades del analgesia de rescate ^(Wang et al. 2009; Rahimi et al. 2010).

También se ha estudiado el efecto anti-hiperalgésico del tramadol, siendo eficaz en un modelo de hiperalgesia térmica mediante lesión crónica de nervios ^(Tsai et al. 2000), la inducida por la inyección de formalina ^(Bianchi and Panerai 1998) en un modelo quirúrgico de estimulación mecánica postoperatoria ^(Kammerman et al. 2007) en ratas. Por el contrario, no redujo la hiperalgesia térmica ni mecánica en un modelo de dolor incisional en ratas ^(McKeon et al. 2011).

La información sobre el desarrollo de tolerancia relacionada con el uso crónico del tramadol es controvertida. Pacientes tratados durante un mes con tramadol presentaron, en algunos casos, desarrollo de dependencia pero no de tolerancia ^(Kitahara et al. 2009; Lanier et al. 2010). En estudios con ratones algunos autores observaron el desarrollo de tolerancia ^(Abdel-Zaher et al. 2011) pero otros no ^(Miranda and Pinardi 1998). Aparentemente no se ha observado tolerancia cruzada en ratones pre-tratados con morfina ^(Romero et al. 2010). El tramadol es un opioide de uso cada vez más extendido, tanto en personas ^(Lanier et al. 2010) como en animales ^(McKeon et al. 2011) ya que presenta la ventaja de no ser un fármaco controlado. Aun así, todavía no existen estudios que determinen la presencia de hiperalgesia inducida por el uso del tramadol.

Butorfanol

El butorfanol es un opiáceo clasificado como agonista/antagonista muy extendido en el ámbito veterinario para el alivio del dolor leve a moderado. Es un agonista del receptor KOR y un antagonista débil del receptor MOR (Ilkiw et al. 2002). Los analgésicos agonistas/antagonistas son un grupo de fármacos heterogéneos con efecto analgésico moderado, comparado con los agonistas opioides puros y con un rango de dosis efectiva limitado, denominado efecto 'techo' (Hoskin and Hanks 1991).

El efecto de la reducción de la CAM de sevoflurano del butorfanol no ha sido determinado en ratas, y han sido descritas diferencias según la especie considerada en la respuesta analgésica del butorfanol (Murphy and Hug 1982; Doherty et al. 1997; Ko et al. 2000; Doherty et al. 2002).

Buprenorfina

La afinidad real de la buprenorfina por los receptores opioides es controvertida. La buprenorfina es un agonista parcial de receptor MOR (Pick et al. 1997; Koppert et al. 2005) y mientras algunos autores la consideran un antagonista KOR (Koppert et al. 2005; Freye et al. 2007), otros plantean que es un agonista KOR (Pick et al. 1997) o agonista parcial /antagonista KOR (Ide et al. 2004).

Se ha considerado la rotación con buprenorfina por su efecto anti-hiperalgésico. El mecanismo no está claro: existen diferencias en la selectividad de la subunidad del receptor MOR y su lugar de unión con la proteína G, presentando diferencias cuando se compara con los típicos agonistas MOR (con distinto tipo de unión al receptor MOR) (Koppert et al. 2005; Freye et al. 2007). Estudios realizados con un potente agonista MOR asociado a un antagonista DOR igualmente potente, produjeron un elevado efecto analgésico en respuesta al estímulo de pinzamiento de la cola en ratas, provocando una menor tolerancia que la administración de morfina, administrada de forma crónica en altas dosis (Schiller et al. 1999). Aparentemente, a diferencia de los agonistas MOR puros, la buprenorfina

induce efectos anti-hiperalgésicos de duración más prolongada que sus efectos analgésicos (Koppert et al. 2005). El tiempo de inicio del efecto anti-hiperalgésico y analgésico de la buprenorfina también es diferente y la reducción del efecto hiperalgésico se observa 30 minutos antes de la reducción del efecto analgésico (Koppert et al. 2005).

Estudios recientes sugieren la implicación de las vías descendentes de facilitación del dolor en el efecto anti-hiperalgésico de la buprenorfina. La administración sistémica de opioides aumenta la expresión de dinorfina en la medula espinal. Se ha demostrado que este opioide endógeno tiene una acción agonista KOR, y promueve la aparición de hiperalgesia y tolerancia (Vanderah et al. 2000). La buprenorfina podría actuar contrarrestando estos efectos, considerando que presenta acción antagonista sobre el receptor KOR (Koppert et al. 2005), por eso tiene indicaciones en la rotación de opioides, y se ha demostrado eficaz en pacientes con dolor crónico tolerantes a la morfina (Freye et al. 2007) y como agente anti-hiperalgésico (Koppert et al. 2005). Por otro lado, se ha observado hiperalgesia inducida por buprenorfina en ratas (Wala and Holtman 2011).

Metadona

La metadona es un agonista de receptores MOR y DOR, antagonista NMDA e inhibidora de la recaptación de serotonina y norepinefrina, presentando una eficiencia intrínseca más alta que la morfina (Slatkin 2009). Al considerar dichas características del fármaco, la metadona parece constituir un buen candidato para la rotación de opioides (Vaught and Takemori 1979). Por su efecto antagonista NMDA constituye la primera elección para la rotación de opioides en pacientes con tratamiento crónico con opioides y que presentan efectos adversos, tolerancia o sospecha de hiperalgesia inducida por opioides (Bruera and Pereira 1998; Mercadante 1999; Soares 2005). De todos modos también ha sido descrita la aparición de hiperalgesia inducida por metadona en ratas (Holtman and Wala 2007) y personas (Doverty et al. 2001), lo que cuestiona su empleo en la rotación de opioides.

Se ha observado que la administración de d-metadona en ratas treinta minutos tras la administración de morfina ha sido capaz de prevenir el desarrollo de tolerancia en ratas, posiblemente por su efecto antagonista NMDA (Davis and Inturrisi 1999). Y ha producido un efecto anti-hiperalgésico, previniendo la tolerancia relacionada con el empleo de morfina (Inturrisi 1997). También ha sido utilizada con éxito en la rotación con fentanilo y morfina. (Mercadante and Arcuri 2005; Axelrod and Reville 2007). No existen referencias relativas al efecto de la metadona en ratas anestesiadas con sevoflurano.

Recomendaciones sobre el uso de opioides en roedores

La valoración de la eficacia analgésica de los opioides en roedores no solo tiene importancia por su implicación en pacientes humanos y veterinarios de otras especies, sino también por su empleo terapéutico en las propias especies roedores en el ámbito de la investigación. En experimentación animal, la terapia analgésica debe ser un procedimiento de rutina, considerando que la anestesia y la analgesia son factores base para el refinamiento de cualquiera técnica quirúrgica (Criado et al. 2000).

Los fármacos analgésicos utilizados en roedores suelen ser principalmente de dos grupos, opioides y antiinflamatorios no esteroideos (AINES), dependiendo del grado de intensidad dolorosa. Los anestésicos locales también pueden ser utilizados durante un procedimiento quirúrgico para reducir la estimulación dolorosa en el área afectada (bloqueo nervioso local). También, de acuerdo con la intensidad del dolor, los analgésicos pueden ser asociados (analgesia multimodal) para que actúen sinérgicamente en diferentes mecanismos y vías de transmisión y percepción del dolor (Kohn et al. 2007).

Un aspecto importante para realizar un tratamiento analgésico satisfactorio de los animales de laboratorio es la evaluación eficaz del dolor. Dicha valoración es subjetiva y

resulta difícil ya que los animales no pueden expresar el dolor verbalmente; el comportamiento varía entre especies y entre individuos y los investigadores pueden presentar una interpretación variable de acuerdo con su experiencia previa. ^(Conzemius et al. 1997) .

Para el dolor leve se recomienda el uso de antiinflamatorios no esteroides y opioides de eficacia baja como el butorfanol. Para el dolor moderado a severo, se recomienda el uso de antiinflamatorios no esteroideos asociados a la buprenorfina, cuya potencia analgésica es mayor. En los casos severos puede emplearse la morfina u otros de potencia similar. En cualquiera de los casos el tratamiento puede asociarse a un bloqueo con anestésicos locales en situaciones tales como el periodo intraoperatorio ^(Kohn et al. 2007) .

La valoración de la eficacia intraoperatoria de los analgésicos resulta aún más difícil y la determinación de la CAM sigue siendo el método estándar, aunque limitado, dado que este método no mide específicamente analgesia.

HIPÓTESIS

Atendiendo a las evidencias descritas en el apartado anterior, se plantearon las siguientes hipótesis de trabajo:

1. Los opioides disminuyen las necesidades de anestésicos inhalatorios aunque existen diferencias en función de la especie y fármaco considerado. Según ello, la administración de butorfanol, metadona, morfina y tramadol reduce la CAM de sevoflurano en ratas.
2. Además del efecto antinociceptivo inmediato esperado de los opioides, estos fármacos pueden desencadenar otro posterior pronociceptivo, normalmente conocido como hiperalgesia. De este modo, la hiperalgesia inducida por el remifentanilo en la rata podría estar asociada a un aumento de los requerimientos de sevoflurano, determinados por un incremento de la CAM de sevoflurano en la rata.
3. De forma similar, mientras que el empleo de otros opioides con diferencias en sus efectos sobre los receptores opioides, como la buprenorfina, metadona, morfina, remifentanilo y tramadol esta asociado a un efecto inmediato de reducción de la CAM de sevoflurano, se observaría otro de aumento tardío.
4. La hiperalgesia inducida por opioides que podría estar inducida por el opioide tramadol y que podría provocar un aumento tardío de la CAM, podría ser prevenida o atenuada por el empleo de ketamina.

OBJETIVOS

Para demostrar las hipótesis anteriormente descritas se han planteado los siguientes objetivos:

1. Determinar la reducción inmediata y dosis-dependiente de la CAM de sevoflurano tras la administración intraperitoneal de butorfanol, metadona, morfina y tramadol.
2. Determinar la presencia y duración de hiperalgesia inducida por remifentanilo y si está asociada a un aumento de la CAM de sevoflurano.
3. Evaluar el efecto inmediato y tardío de la administración buprenorfina, metadona, morfina, remifentanilo y tramadol en la CAM de sevoflurano en ratas.
4. Determinar si la hiperalgesia y aumento de la CAM producida por tramadol puede ser prevenido o atenuado por el empleo de ketamina.

MATERIAL Y MÉTODOS

El estudio fue aprobado por el Comité de Ética del Hospital Universitario La Paz. Todos los experimentos han sido realizados durante el período de luz, a partir de las 8:00 de la mañana.

ANIMALES

Para determinar la reducción dosis-dependiente inmediata de la CAM de sevoflurano tras la administración intraperitoneal de butorfanol, metadona, morfina y tramadol, fueron utilizadas 63 ratas Sprague-Dawley adultas macho de 319 ± 14 g de peso (colonia del Hospital La Paz, originalmente procedentes de Charles River, Barcelona, España).

En los demás experimentos se emplearon ratas Wistar adultas macho (Charles River, Barcelona, España). Para determinar la presencia y duración de hiperalgesia inducida por remifentanilo y si estaba asociada a un aumento de la CAM de sevoflurano se emplearon 16 animales de 402 (28) g. Para evaluar el efecto inmediato y tardío de la administración buprenorfina, metadona, morfina, remifentanilo y tramadol en la CAM de sevoflurano se emplearon 42 ratas 348 (39) g. Para determinar si la hiperalgesia y aumento de la CAM producida por tramadol pueden ser prevenidos o atenuados por el empleo de ketamina fueron realizados dos experimentos. En el primer experimento fueron utilizados 18 animales y en el segundo 21 animales, de 363 (36) g.

Todos los animales fueron alojados en grupos de 6 por jaula (Macrolon Tipo IV) y se mantuvo un ciclo luz-oscuridad 12:12 h (luz entre las 8:00 y 20:00) a temperatura de $22 \pm 2^\circ\text{C}$ y 40-70% de humedad relativa. Se alimentaron con pienso estándar (A03 dieta de mantenimiento para roedores, Alimentación Animal Ciencia e Ingeniería, SAFE, Panlab, Barcelona, España) y agua *ad libitum*.

INDUCCIÓN ANESTÉSICA E INTUBACIÓN ENDOTRAQUEAL

Las ratas fueron colocadas en una cámara de inducción anestésica de metacrilato (25 × 15 × 15 cm) en la que el sevoflurano (8% en volumen, Sevorane, Laboratorios Abbott, Madrid, España) fue administrado en oxígeno (3 L / min) (vaporizador de sevoflurano, Sevorane Drager Vapor 2000, Lübeck, Alemania). La intubación endotraqueal fue realizada con un catéter de polietileno de calibre 14G (Terumo Surflo catéter IV, Terumo Europe NV, Leuven, Bélgica). El animal fue colocado en decúbito esternal tras lo que se colocó una guía de alambre flexible de puntas romas en la tráquea y con la ayuda de un otoscopio. La guía permitió introducir el tubo endotraqueal en la tráquea. Para comprobar la correcta posición del catéter se verificó el movimiento respiratorio a través del catéter valorando el CO₂ exhalado con un capnógrafo. Se empleó una pequeña pieza en T con espacio muerto mínimo. Aproximadamente 2-3 minutos más tarde, la concentración de sevoflurano inspirado se redujo a 3,5% y el flujo de oxígeno se redujo a 0,75 - 1,0 L/min.

MONITORIZACIÓN

En el experimento para la determinación de la reducción inmediata y dosis-dependiente de la CAM de sevoflurano tras la administración intraperitoneal de butorfanol, metadona morfina y tramadol, se cateterizó la arteria carótida izquierda (Vencath-18, Venisystems, Abbott, Sligo, Irlanda). El catéter ha sido utilizado para la medición de la presión arterial invasiva, a través de un transductor de presión calibrado (Transpac IV, Abbott Laboratories, Abbott Park, IL, EE.UU.) y para el muestreo de sangre arterial. La presión arterial sistólica, diastólica y media, frecuencia cardíaca y respiratoria, y pulsioximetría) fueron medidos de forma continua (RGB Medical Devices, Ma-

drid, España), y también la fracción expirada de CO₂ (Capnomac Ultima, 5330 Agent Monitor, Datex-Ohmeda, Hertfordshire, Reino Unido). Los efectos de los fármacos y dosis sobre la presión arterial y frecuencia cardíaca y respiratoria se registraron 1 minuto antes del pinzamiento de la cola requerido para la determinación de la CAM.

En los demás experimentos, las frecuencias cardíaca y respiratoria, la saturación de oxígeno arterial (a través del pulsioxímetro) y la fracción expirada de CO₂ y de sevoflurano fueron medidas de forma continua (Datex-Ohmeda SA5 monitor. General Electric, Helsinki, Finlandia), esos parámetros también han sido registrados un minuto antes de cada uno de los estímulos de pinzamiento de la cola para determinación de la CAM.

La temperatura rectal fue monitorizada y mantenida entre los 37°C y 38°C por medio de una manta de calor de agua circulante (Heat therapy Pump, modelo TP-220, Gaymar, Orchard Park, NY, EE.UU.) y un lámpara (60 W).

DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN ALVEOLAR MÍNIMA

Se emplearon muestras de gas intratraqueal para medir la concentración de gases anestésicos y determinar la CAM. El método utilizado para la determinación de la reducción inmediata de la CAM de sevoflurano tras la administración intraperitoneal de butorfanol, metadona morfina y tramadol ha sido descrito en detalle previamente. (Eger et al. 1965;

Quasha et al. 1980; Gomez de Segura et al. 1998) En resumen, se insertó un catéter fino, con un diámetro exterior de 0,9 mm, a través de la sonda endotraqueal, con la punta situada en el nivel de la carina. El extremo proximal del catéter fue conectado a una jeringa de vidrio de 10 mL (Hamilton Jeringa, de la serie 1000 hermética, modelo 26211-U, Sigma-Aldrich, St. Quentin Fallavier, Francia). Las muestras fueron obtenidas mediante la retirada de 10 ml de gas durante 5 minutos con uso de una bomba de infusión (Mod. 55-2226, Harvard

Apparatus, Millis, MA, EE.UU.). El catéter fino fue retirado entre la extracción de las muestras. Antes de la primera determinación de la CAM, la fracción expirada del anestésico fue ajustada a 2,4%vol, un valor cercano a la CAM establecida anteriormente en ratas Wistar. ^(Gomez de Segura et al. 1998) Después de cada cambio en la concentración de sevoflurano, se estableció un intervalo de al menos 10 minutos para el equilibrado de la nueva concentración y antes de la obtención de muestras de gases y la aplicación del estímulo nocivo. Las muestras de gas fueron analizadas utilizando un analizador de infrarrojos de flujo lateral (Capnomac Ultima, 5330 Agent Monitor, Datex-Ohmeda, Hertfordshire, Reino Unido). En los demás experimentos, las muestras se obtuvieron por la conexión del extremo proximal del catéter al monitor con un tubo más largo para la medición del CO₂ y sevoflurano expirados.

El estímulo nociceptivo supra-máximo fue aplicado inmediatamente después de haber obtenido la muestra de gas traqueal. El estímulo fue realizado con una pinza hemostática larga (Pinzas hemostáticas Rochester Dean de 20 cm, Martin, Tutlingen, Alemania) aplicada, en el primer punto de anclaje de la pinza, en la cola durante 60 s. El punto inicial de estimulación fue a una distancia de 6 cm de la extremidad distal de la cola y los estímulos posteriores fueron administrados 1 cm proximal al punto de la prueba anterior, cuando la respuesta fue negativa ó 1 cm distal a ese punto si la respuesta fue positiva. ^(Valverde et al. 2003) (Figura 1) Una respuesta fue considerada positiva cuando fue observado un movimiento brusco de la cabeza, las extremidades y / o cuerpo, o un claro movimiento de la columna vertebral. Una respuesta fue considerada negativa tras la ausencia de movimiento o reacciones concretas: muecas, tragar, masticar, o retirada de la cola. Cuando se determinó una respuesta negativa, la fracción expirada de sevoflurano fue reducida en 0,2%vol, hasta que la respuesta negativa fue positiva. Cuando se produjo una respuesta positiva, la concentración de sevoflurano se incrementó en un 0,2%vol, hasta que la respuesta fue negativa. La CAM fue considerada la concentración

media entre la concentración más alta que permitió el movimiento en respuesta al estímulo y la concentración más baja impidió tal movimiento. La determinación de la CAM se realizó a una altitud de 650 m (Madrid), y los valores de la CAM han sido corregidos a 760 mm



FIGURA 1. Pinzamiento de cola en la rata, durante la determinación de la CAM

Hg (Mama et al. 1999).

PRUEBAS DE COMPORTAMIENTO NOCICEPTIVAS

Para minimizar la influencia del estrés durante el procedimiento experimental, los animales fueron aclimatados durante tres días antes de la obtención de los valores de referencia. Se han empleadas dos pruebas de comportamiento provocado por estímulos nociceptivos mecánicos: Von Frey y Randall-Selitto.

Prueba de Von Frey

La alodinia fue evaluada tras la determinación de los umbrales de retirada de la pata trasera mediante la estimulación mecánica con filamentos de von Frey (Cunha et al. 2004). Los animales fueron colocados en una jaula de metacrilato (330 cm²) con un fondo de malla

de alambre con perforaciones de 1 cm² a través de las cuales se aplicaron los estímulos con los filamentos de von Frey de calibración electrónica (Electronic von Frey Anesthesiometer, modelo 2393 CITI Inc., CA) (Figura 2). Antes de iniciar el ensayo, los animales fueron colocados en la jaula durante un periodo de 15 - 30 minutos para su aclimatación. Cuando las ratas estuvieron tranquilas y quietas, sin movimientos exploratorios, defecación, y sin estar tumbados sobre sobre la pata ^(Cunha et al. 2004) se iniciaron las pruebas.



FIGURA 2. Rata en la jaula con fondo perforado para realización de la prueba de Von Frey.

Se emplearon 8 filamentos de von Frey y la fuerza de flexión estuvo entre 0,1 g y 60,0 g. Los filamentos (del más delgado al más grueso) fueron aplicados sobre la zona plantar de la pata posterior derecha durante un máximo de 7 s ^(Zhao et al. 2004) o hasta que la rata presentara reflejo de retirada. ^(Cunha et al. 2004; Zhao et al. 2009; Gunduz et al. 2011) La locomoción

no fue considerada una respuesta de retirada y, en ese caso, se repitió el estímulo.^(Tiwari et al. 2011) El estímulo fue aplicado entre tres y cinco veces con cada filamento, con un intervalo de 5 s entre estímulos. La menor fuerza que produjo una respuesta de retirada fue considerada el umbral de retirada. Tres respuestas positivas con un mismo filamento determinaron el umbral en cada medición y el umbral de cada animal se basó en tres medidas diferentes (intervalo de 5 minutos entre las dos mediciones consecutivas). La media de las tres medidas fue considerada el umbral mecánico de alodinia para ese determinado tiempo de medición ^(Zhao et al. 2009; Liou et al. 2011).

Prueba de Randall-Selitto

La hiperalgesia mecánica se cuantificó mediante la prueba de Randall-Selitto (Digital Randall-Selitto, modelo 2600, CITI Inc., CA) (Randall y Selitto 1957), que consiste en la aplicación de una presión puntual en la pata del animal con una pinza que dispone de dos puntas en sus extremos y produciendo una fuerza lineal mecánica creciente en gramos. Antes de comenzar la prueba, el animal fue acostumbrado al manejo en la mano del investigador durante al menos 5 minutos, o hasta que se tranquilizara. El estímulo fue aplicado a la superficie plantar de la pata trasera izquierda, aumentando la presión hasta que la rata retirara la extremidad. La fuerza aplicada en el momento de la retirada fue considerado el umbral ^(Gunduz et al. 2011). El umbral fue determinado entre 2 y 5 veces, hasta que se obtuvieron dos valores consecutivos que no difirieran en más del 15%. La media de estos dos valores fue considerado el umbral nociceptivo. Se permitió como mínimo un intervalo de 5 minutos entre dos medidas consecutivas ^(Tiwari et al. 2011). Se determinó una presión máxima de 300 g para evitar daño tisular ^(Umukoro and Olugbemide 2011). La hiperalgesia mecánica fue considerada una reducción del umbral de retirada frente al valor basal o control.

Se plantearon cinco experimentos (I-V) para alcanzar los objetivos perseguidos que se enumeran a continuación.

1 - Reducción dosis-dependiente inmediata de la CAM de sevoflurano tras la administración intraperitoneal de opioides butorfanol, metadona, morfina y tramadol, (Experimento I)

Los cuatro fármacos opioides seleccionados en este estudio fueron utilizados con dos dosis, baja y alta, cada uno: butorfanol (Torbugesic, Fort Dodge, Madrid, España), metadona (Metasedin, Esteve, Barcelona, España), morfina (Morfina, Braun Barcelona, España) y tramadol (Adolonta, Grünenthal Pharma, Madrid, España). Las dosis baja y alta han sido seleccionadas basadas en el rango de dosis clínica de la rata ^(Criado et al. 2000; Kohn et al. 2007; Smith et al. 2008; Cannon et al. 2010). Además, se realizó un estudio piloto con el fin de determinar las dosis definitivas. En el estudio se incluyeron nueve grupos experimentales, el grupo control (tratado con solución salina fisiológica) y 8 grupos de tratamiento considerando los cuatro fármacos y dos dosis de cada uno de ellos: butorfanol 5 y 10 mg.kg⁻¹, metadona 5 y 10 mg.kg⁻¹, morfina 5 y 10 mg.kg⁻¹ y el tramadol 25 y 50 mg.kg⁻¹. Los fármacos fueron administrados diluidos con una solución salina al 0,9% NaCl para completar un volumen total de 1 mL, administrado por vía intraperitoneal.

Los animales fueron asignados aleatoriamente a uno de los nueve grupos (n = 7 por grupo). Después de la inducción anestésica e instrumentación, se determinó la CAM basal de sevoflurano de modo que cada animal fue utilizado como su propio control. En cada rata se administró, aleatoriamente, o bien uno de los fármacos estudiados o la solución salina por vía intraperitoneal tras lo cual se re-determinó la CAM. Tras de la ad-

ministración de opiáceos, la fracción expirada sevoflurano fue reducida de acuerdo con el efecto esperado de reducción de la CAM en la rata ^(de Wolff et al. 1999; Criado et al. 2000) o alternativamente del perro ^(Ko et al. 2000; Yamashita et al. 2008; Seddighi et al. 2009; Campagnol et al. 2011) o gato ^(Ferreira et al. 2011) si existía información en la rata. El valor de la CAM fue determinado hasta que el valor basal se hubiera recuperado. En general, fueron necesarios cerca de sesenta minutos para determinar la CAM y se estableció un intervalo de 30 minutos entre dos determinaciones consecutivas de la CAM.

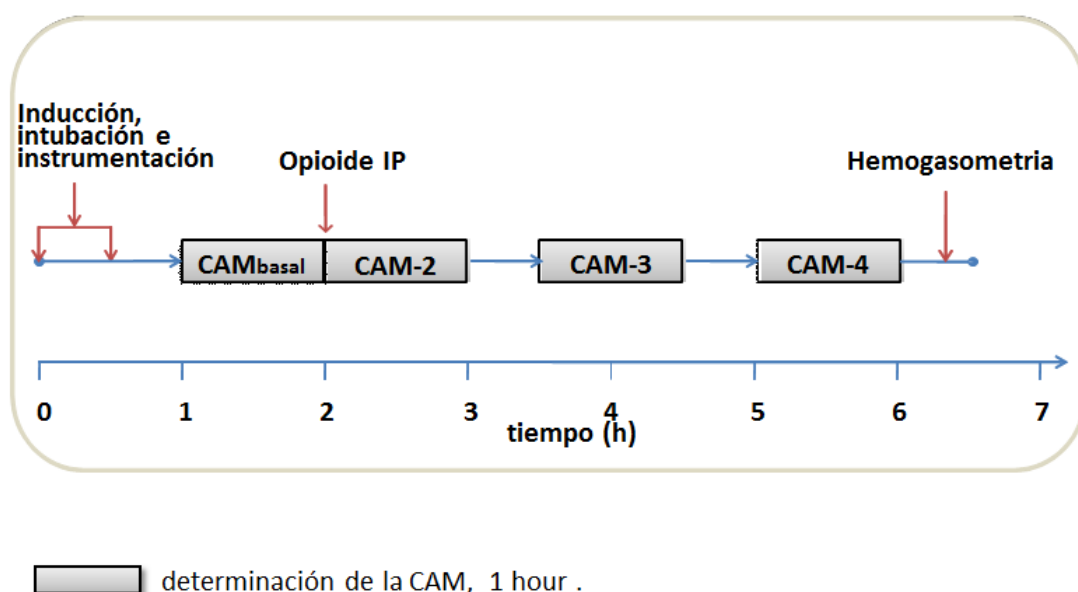


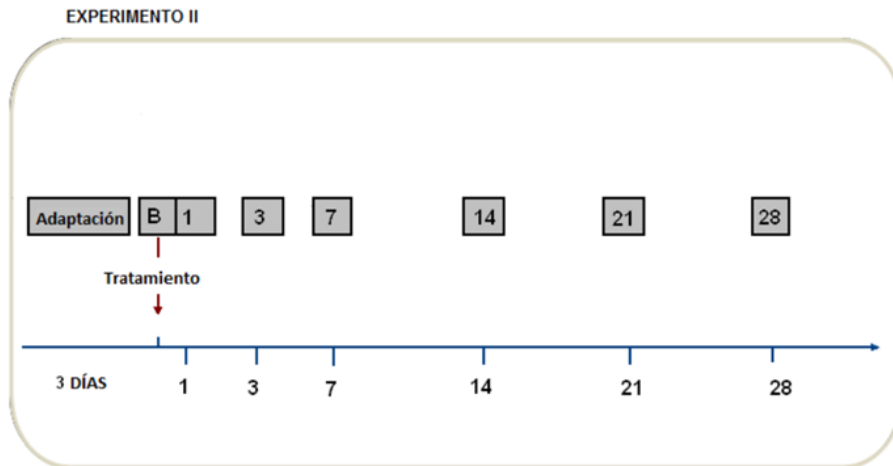
FIGURA 3. Diseño Experimental del experimento I.

El tiempo de reducción de la CAM fue considerado el tiempo total, en minutos, desde la administración del opiáceo, o solución salina, (tiempo cero) hasta la recuperación de los valores basales de la CAM. El tiempo de máxima reducción de la CAM fue considerado el tiempo, en minutos, durante el cual se determinó la máxima reducción de CAM. Al final del experimento, la concentración de sevoflurano fue aumentada para la obtención de un plano profundo de anestesia y las ratas fueron sacrificadas tras la administración de una sobredosis de cloruro de potasio por vía intravenosa.

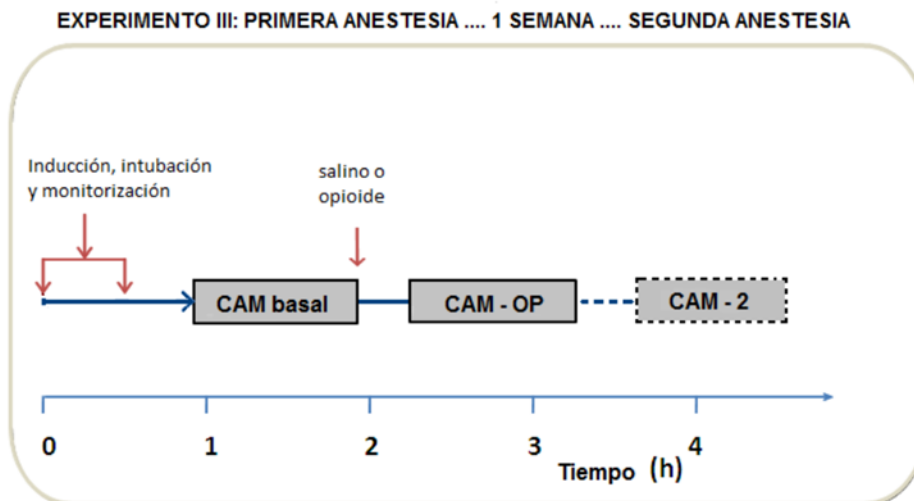
2 - Hiperalgnesia inducida por el remifentanilo y efectos asociados en la CAM (Experimento II)

Se incluyeron dos grupos de tratamiento con remifentanilo (Ultiva, Glaxo-Wellcome Laboratorios, Madrid, España) o solución salina (grupo control). La dosis de remifentanilo fue de $120 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ y, en ambos grupos, la velocidad de infusión fue de $4,8 \text{ ml}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ por vía intravenosa durante dos horas.

Los animales fueron asignados aleatoriamente a los dos grupos ($n = 8$ por grupo). Tras tres días de aclimatación a las pruebas de Von Frey y de Randall-Selitto, en el cuarto día, se obtuvieron los valores basales. Entonces, los animales fueron anestesiados e instrumentados y se determinó la CAM basal de sevoflurano. Una vez determinada se administró el tratamiento a cada rata. Posteriormente los animales se recuperaron de la anestesia. Los mismos procedimientos fueron realizados en los días 1, 3, 7, 14, 21 y 28 posteriores al tratamiento para evaluar el comportamiento de los umbrales mecánicos nociceptivos y de la CAM. En el vigésimo octavo día del estudio, las ratas fueron sacrificadas bajo anestesia con una sobredosis de cloruro de potasio.



█ Evaluación con las pruebas de Von Frey, Randall Selitto y CAM : basal y 1, 3, 7, 14, 21 y 28 días después del tratamiento



█ Determinación de la CAM , 1 h

FIGURA 4. Diseño Experimental del experimento II y III.

3 - Efectos inmediatos y tardíos de los opioides sobre la CAM (Experimento III)

Se estudió el efecto de los opioides buprenorfina (Buprex, Laboratorios Dr. Esteve, Barcelona, España), metadona (Metasedin, Esteve, Barcelona, España), morfina (Morfina, Braun, Barcelona, España), remifentanilo (Ultiva, Glaxo-Wellcome laboratorios, Ma-

drid, España), y tramadol (Adolonta, Grünenthal Pharma, Madrid, España). También fue incluido un grupo control con solución salina. El remifentanilo fue administrado como una infusión continua intravenosa y los demás opioides fueron diluidos en solución salina al 0,9% para un volumen total de 1 ml y fueron administrados por vía IP. La dosis de cada uno de los opioides fue determinada basados en el rango de dosis terapéutica de la rata y el estudio previo de los efectos de reducción de la CAM. En total, se realizaron seis grupos experimentales considerando los cinco fármacos y el grupo control. Las dosis utilizadas fueron: buprenorfina 150 mg.kg^{-1} , metadona 8 mg.kg^{-1} , morfina 10 mg.kg^{-1} , remifentanilo $120 \text{ mg.kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, y tramadol 50 mg.kg^{-1} .

Los animales fueron asignados aleatoriamente a uno de los seis grupos de tratamiento ($n = 7$ por grupo). Una vez que los animales fueron anestesiados y realizada la instrumentación se mantuvo un periodo de 30 minutos para iniciar la determinación de la CAM basal. Dado que la fracción expirada de sevoflurano inicial estaba cerca de la CAM de la rata (2,4 %vol), en general, solo fueron necesarios unos pocos cambios en la concentración de sevoflurano para la determinación del valor de la CAM aunque el tiempo necesario para determinar la CAM fue variable entre los animales. Una vez determinada la CAM basal, a cada rata se le administró aleatoriamente uno de los tratamientos planteados y tras 30 minutos, la CAM fue re-determinada. En el grupo control y en los grupos de opioides administrados por vía intraperitoneal, la CAM fue re-determinada una vez mientras que en el grupo de remifentanilo lo fue dos veces. En todos los grupos que recibieron tratamiento con opioides se evaluó el efecto inmediato de reducción de la CAM. En el grupo de remifentanilo la reducción de la CAM fue determinada en dos ocasiones (MAC-RMF 1 y 2) para verificar el efecto de tolerancia, normalmente observado 1,5 a 2 horas desde el inicio de la infusión (Gomez de Segura et al. 2009). Una semana más tarde, la CAM fue re-determinada en todos los grupos con el mismo protocolo. Al final del estudio, las ratas fueron sacrificadas como en el experimento I.

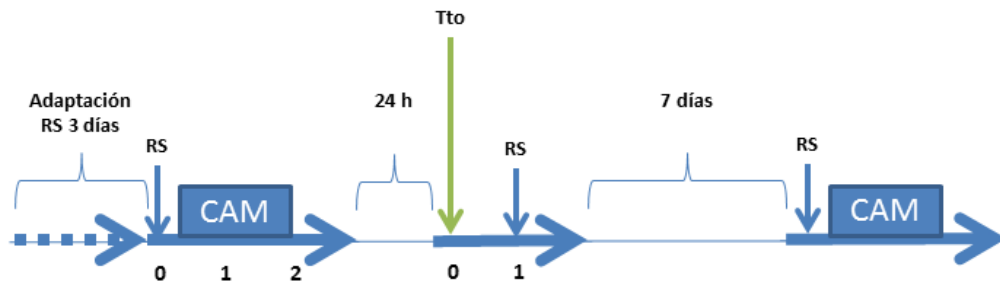
4 - Hiperalgnesia y modificación de la CAM producida por tramadol. Efecto de la administración de ketamina (Experimentos IV y V)

Se realizaron 3 grupos experimentales de tratamiento: tramadol (Adolonta, Grünenthal Pharma, Madrid, España), tramadol + ketamina (Ketolar 500, Parke-Davis, Pfizer, Madrid, España), o solución salina (grupo control). La dosis utilizada de tramadol fue de 50 mg.kg^{-1} y la de ketamina de 10 mg.kg^{-1} . En el grupo de tramadol + ketamina, la ketamina fue administrada 30 minutos antes que el tramadol.

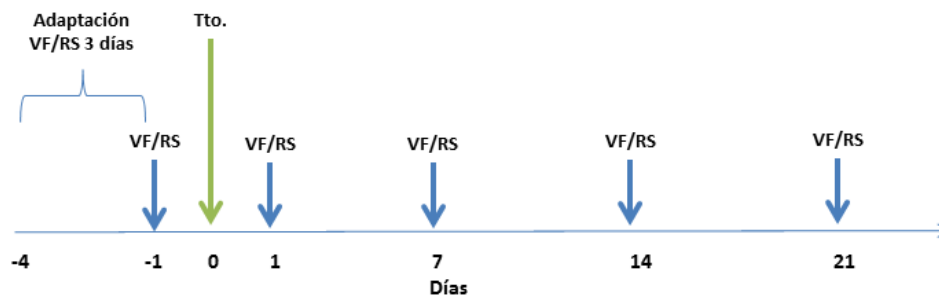
En el experimento IV, los animales fueron asignados aleatoriamente para recibir uno de los tratamientos ($n = 6$ por grupo). Después de tres días de aclimatación a las pruebas de Von Frey y Randall-Selitto, en el cuarto día se obtuvieron los valores basales. Al día siguiente, a cada rata se le administró uno de los tratamientos por vía intraperitoneal. Las pruebas de Von Frey y Randall-Selitto fueron realizadas en los días 1, 7, 14 y 21 posteriores al tratamiento para evaluar los umbrales mecánicos nociceptivos. Al finalizar el experimento, las ratas fueron anestesiadas y sacrificadas como en el experimento I.

En el experimento V, después de los tres días de aclimatación a la prueba de Randall-Selitto, se obtuvieron los valores de referencia. Entonces, los animales fueron anestesiados para la determinación de la CAM basal y posteriormente se recuperaron de la anestesia. Al día siguiente, las ratas recibieron, aleatoriamente, uno de los tratamientos ($n = 7$ por grupo). La prueba de Randall Selitto fue realizada 30 minutos después para evaluar el efecto analgésico. Siete días después del tratamiento, se repitió la prueba de Randall-Selitto y las ratas fueron anestesiadas para una segunda determinación de la CAM. Finalmente las ratas fueron sacrificadas como en los experimentos anteriores.

Aumento de la CAM de sevoflurano asociado a un aumento de la hiperalgesia por tramadol y su bloqueo con ketamina



Evolución del efecto hiperalgésico producido por tramadol y su bloqueo con ketamina



Tratamientos:

1. Salino 1mL IP
2. Tramadol 50 mg/kg IP
3. Ketamina 10 mg/kg + Tramadol 50 mg/kg (a los 30 min) IP

FIGURA 4. Diseño Experimental de los experimentos IV y V.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El número de animales por grupo en cada experimento fue considerado adecuado basada en datos previos de estudios similares realizados en nuestro laboratorio y en el cálculo del valor de n (Gomez de Segura et al. 1998). La prueba de Kolmogorov-Smirnov determinó la distribución normal de los datos para el empleo de test paramétricos. Se realizó un

análisis de la varianza (ANOVA) de medidas repetidas (dosis del fármaco x tiempo), comparando el porcentaje de reducción de la CAM (base = 100%) en el experimento para la determinación de la reducción inmediata de la CAM. Se estudiaron los opioides butorfanol, metadona, morfina y tramadol. También se comparó la variación entre los distintos días pos-tratamiento para las pruebas realizadas en los experimentos que determinarían la hiperalgesia inducida por el remifentanilo y tramadol y su duración en días. Para determinar diferencias en la CAM y parámetros cardio-respiratorios entre grupos se empleó el test Bonferroni. En el experimento diseñado para la determinación del aumento de la CAM de buprenorfina, metadona, morfina, remifentanilo y tramadol a la semana y el aumento de la CAM e hiperalgesia inducida por tramadol a igual tiempo, se empleó un ANOVA de una o 2 vías, respectivamente, para determinar diferencias en la CAM producidas por los tratamientos, determinando diferencias entre grupos con el test Bonferroni. Se consideró un intervalo de confianza del 95% y un valor de $p < 0,05$ para indicar la significación estadística. Los resultados se presentan como media (desviación estándar). Se empleó el paquete estadístico SPSS para Windows 19.

RESULTADOS

A continuación se describen secuencialmente los resultados correspondientes a los cuatro objetivos definidos en este trabajo.

1 - REDUCCIÓN DOSIS-DEPENDIENTE INMEDIATA DE LA CAM DE SEVOFLURANO TRAS LA ADMINISTRACIÓN INTRAPERITONEAL DE OPIOIDES (EXPERIMENTO I)

Reducción de la CAM

La media de la CAM basal determinada en todas las ratas ($n = 63$) ha sido de 2,3 (0,3)%vol, sin diferencias entre los grupos o dosis ($p > 0,05$). La metadona, el tramadol, el butorfanol, y la morfina redujeron la CAM ($p < 0,05$), aunque la magnitud de la reducción varió de acuerdo con el fármaco y la dosis empleados. Un efecto dosis-dependiente de la CAM fue observado para todos los fármacos estudiados, con excepción del butorfanol.

La disminución en los valores de la CAM producidos por las dosis bajas de los 4 opioides estudiados, y también por la dosis alta de butorfanol, fueron similares y no fueron determinadas diferencias significativas entre los grupos (reducción media de la CAM de los 5 grupos = 33(3)% y fue significativamente menor que las obtenidos con dosis elevadas de metadona y tramadol (reducción de la MAC de 100(0)% y 83(17)%, respectivamente). La morfina a dosis alta redujo en un 77(25) % la CAM (tabla 1, Figura 6).

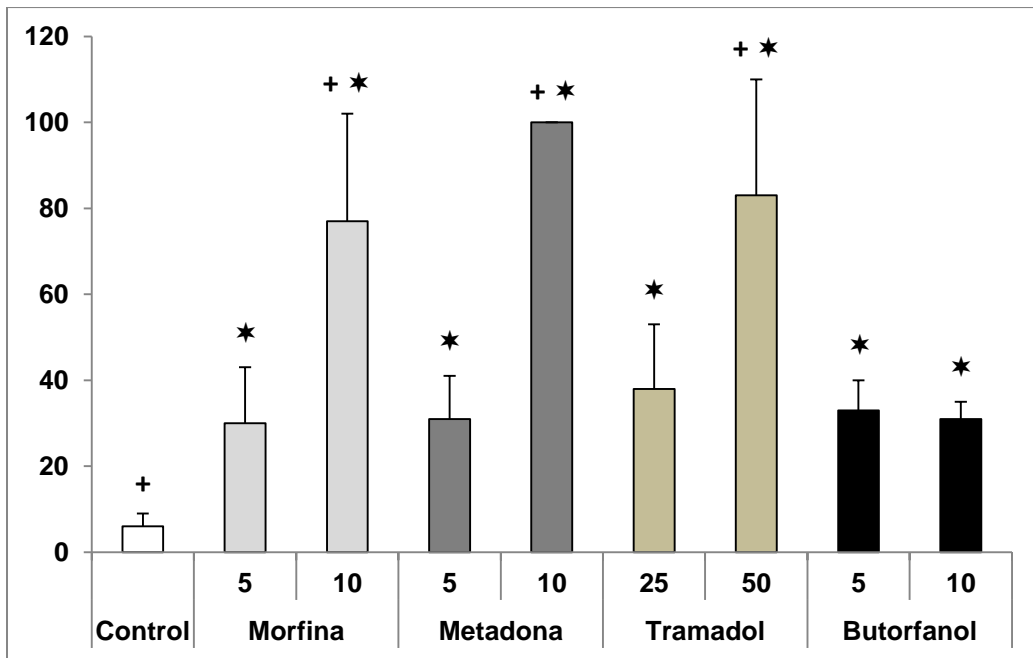


FIGURA 5. Máxima reducción de la CAM de sevoflurano producida por morfina, metadona, tramadol o butorfanol administrados a dos dosis, por vía intraperitoneal, en la rata.

* Estadísticamente diferente del grupo tratado con salino ($p < 0,05$)

+ Estadísticamente diferente de la dosis baja del mismo fármaco ($p < 0,05$).

Duración de la reducción de la CAM

La duración de la reducción de la CAM producida por metadona, butorfanol y morfina con ambas dosis, y tramadol a dosis bajas, no fueron significativamente diferentes, mientras que el tramadol a dosis altas produjo una reducción de la CAM de más larga duración ($p < 0,05$). Sin embargo, el tiempo de máxima reducción de la CAM fue similar para todos los fármacos y dosis (Tabla 1). En general, cada ensayo tuvo una duración de entre 4 y 6 h.

Efectos Cardiorrespiratorios

La presión arterial media se mantuvo dentro del rango fisiológico (100-150 mm Hg) en todos los grupos antes y después de la administración del fármaco. Y los valores obtenidos después de la administración de opioides no presentaron diferencias significativas frente a los basales de cada uno de los grupos ($p > 0,05$). Se observó una reducción de la frecuencia cardíaca en las ratas que recibieron metadona y tramadol con ambas dosis ($p < 0,05$). Los valores de PaCO_2 , determinados al final del estudio fueron más bajos (< 70 mm Hg) que los que han sido descritos como capaces de influir en el valor de la CAM. ^(Quasha et al. 1980) Una rata que recibió la dosis alta de butorfanol y otra rata que recibió la dosis alta de metadona desarrollaron apnea transitoria inmediatamente después de la administración del fármaco. Estas ratas han sido ventiladas manualmente, durante aproximadamente 5 minutos, hasta que han vuelto a respirar espontáneamente. Sin embargo, con la excepción de este período de apnea, la frecuencia respiratoria de todas las ratas no ha sido distinta de la del grupo control ($p > 0,05$) (tabla 2).

TABLA 1: Concentración alveolar mínima (CAM) del sevoflurano basal y producida por dos dosis de los opioides butorfanol, metadona, morfina y tramadol administrados por vía intraperitoneal en la rata, la duración de la máxima reducción de la CAM y el tiempo total de reducción de la CAM en el experimento I. Los datos están descritos como media (DE).

Tratamiento	Dosis (mg.kg ⁻¹)	CAM Basal (%vol)	CAM Opiode (%vol)	Tiempo de reducción máxima de la CAM (min)	Tiempo total de reduc- ción de la CAM (min)
Salino	-	2,3 (0,3)	2,1 (0,3) ⁺	-	-
Morfina	5	2,4 (0,1)	1,7 (0,4)*	64 (26)	180 (62)
	10	2,4 (0,2)	0,6 (0,6)* ⁺	71 (22)	190 (34)
Metadona	5	2,2 (0,2)	1,6 (0,2)*	83 (26)	168 (34)
	10	2,2 (0,3)	0,0 (0,0)* ⁺	41 (8)	194 (21)
Tramadol	25	2,4 (0,4)	1,5 (0,4)*	67 (20)	199 (21)
	50	2,2 (0,1)	0,4 (0,4)* ⁺	63 (26)	236 (48) [†]
Butorfanol	5	2,3 (0,3)	1,5 (0,2)*	49 (15)	171 (28)
	10	2,2 (0,4)	1,5 (0,2)*	57 (21)	167 (29)

*Estadísticamente distinto del salino ($p < 0.05$).

⁺Estadísticamente distinto de la dosis baja, mismo fármaco (morfina, metadona, tramadol and butorfanol; $p < 0.05$).

[†]Estadísticamente distinto de todos los otros grupos ($p < 0.05$)

TABLA 2: Parámetros cardiovasculares, ventilatorios y de saturación de oxígeno antes y después (30 min) de la administración del opioide durante la anestesia con sevoflurano en el experimento I.

Opioide	(mg.kg ⁻¹)	Frecuencia respiratoria		Frecuencia cardiaca		Presión arterial media		Fracción expirada de CO ₂		SatO ₂	
		(batimientos por min)	(batimientos por min)	(batimientos por min)	(batimientos por min)	(mmHg)	(mmHg)	(mmHg)	(mmHg)	(%)	(%)
		Basal	30 min	Basal	30 min	Basal	30 min	Basal	30 min	Basal	30 min
Control		67 (3)	67 (3)	331 (27)	331 (27)	122 (15)	122 (15)	39 (2)	39 (2)	99 (0)	99 (0)
Butorfanol	5	62 (7)	67 (3)	350 (5)	331 (34)	124 (10)	120 (9)	39 (3)	38 (6)	99 (1)	99 (0)
	10	60 (4)	60 (4)	346 (27)	346 (27)	109 (34)	109 (34)	41 (8)	41 (8)	99 (1)	99 (1)
Metadona	5	63 (5)	64 (3)	328 (18)	267 (32)	120 (7)	135 (14)	38 (1)	44 (7)	99 (0)	99 (1)
	10	59 (9)	62 (6)	333 (16)	276 (21)	118 (10)	121 (11)	38 (2)	40 (7)	99 (1)	99 (1)
Morfina	5	61 (5)	63 (9)	337 (26)	326 (16)	122 (11)	125 (11)	38 (1)	38 (1)	98 (1)	98 (1)
	10	58 (3)	63 (4)	338 (11)	318 (36)	124 (6)	126 (10)	38 (1)	37 (3)	99 (1)	100 (0)
Tramadol	25	60 (7)	61 (5)	350 (32)	303 (22)	128 (9)	126 (17)	39 (2)	39 (2)	99 (1)	99 (0)
	50	66 (3)	65 (3)	348 (33)	276 (63)	135 (7)	130 (20)	37 (1)	38 (4)	99 (1)	99 (0)

2- HIPERALGESIA INDUCIDA POR REMIFENTANILO Y AUMENTO DE LA CAM (EXPERIMENTO II).

Umbrales mecánicos nociceptivos

El remifentanilo ha producido una disminución significativa de los umbrales nociceptivos mecánicos determinados con la prueba del Von Frey ($p = 0,00$; ANOVA de medidas repetidas; Figura 7). La reducción máxima ha sido observada en el día 7 con una reducción de 48 (5)% y las diferencias entre los grupos han sido observadas desde el día 1 al 21 post-tratamiento ($p = 0,017$), pero no en el día 28 ($p = 0,449$). Una reducción similar ha sido observada con la prueba de Randall-Selitto ($p = 0,000$; ANOVA de medidas repetidas; Figura 7). La reducción máxima ha sido observada al tercer día con una reducción del orden del 50(20)% y con diferencias en-

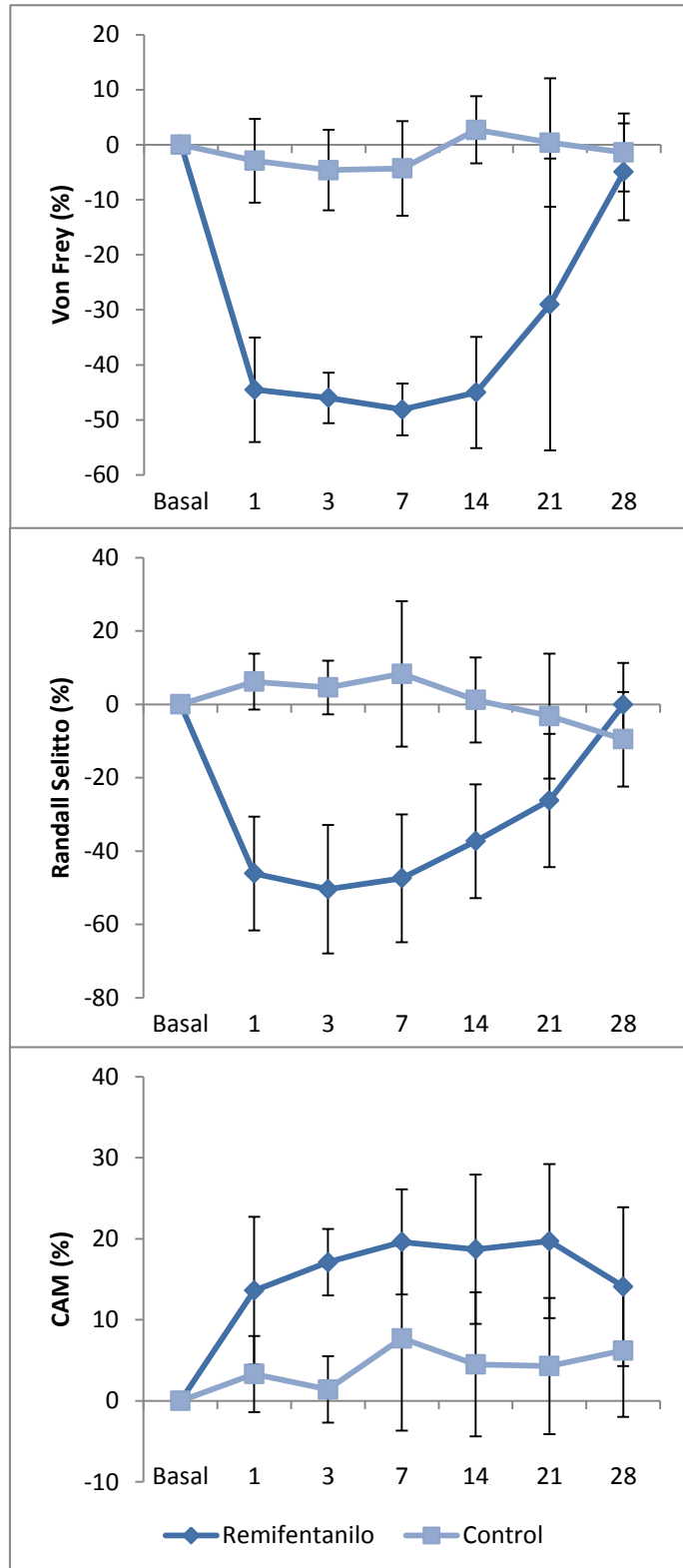


FIGURA 6. Variación de los umbrales nociceptivos determinados con las pruebas: Von Frey (arriba), Randall-Selitto (centro) y CAM (abajo), antes (basal) y después de la administración de remifentanilo o salino (control) en experimento II.

tre los grupos observadas desde día 1 al 21 ($p = 0,015$), pero no al día 28 ($p = 0,149$).

CAM

La CAM basal de sevoflurano ha presentado un incremento porcentual significativo en ratas tratadas con remifentanilo ($p = 0,000$; ANOVA de medidas repetidas) (Figura 7). El incremento máximo fue del 19(7)%, observado siete días después del tratamiento, con diferencias significativas entre grupos desde el día 1 al 21 días post-tratamiento ($p = 0,013$), pero no en el día 28 ($p = 0,110$).

3- EFECTOS DE LOS OPIOIDES EN LA CAM DE SEVOFLURANO (EXPERIMENTO III).

Reducción inmediata de la CAM producida por los opioides

La buprenorfina, metadona, morfina, remifentanilo y tramadol, pero no la solución salina, han determinado reducción de la CAM de sevoflurano ($p < 0,005$, todos los grupos). La magnitud de la reducción ha variado de acuerdo con el fármaco y dosis administrada. La buprenorfina, metadona y morfina han presentado una reducción similar, de un 29 (7) %, 32 (9) %, y 34 (5)%, respectivamente. El tramadol ha reducido la CAM de sevoflurano en un 58 (29) %, y el remifentanilo en un 22 (12) %, siendo su reducción significativamente diferente de los tres grupos de opioides descritos anteriormente ($p < 0,05$, Tabla 3).

En una segunda determinación de la CAM en las ratas que han recibido el remifentanilo se ha determinado un efecto de tolerancia (CAM basal = 2,3 (0,2)%vol, el CAM RMF1= 1.9 (0.4) %vol, CAM RMF2 = 2.1 (0.4) %vol (RMF1 vs RMF2, $p = 0,003$), que corresponde a una reducción de la CAM del 22 (12)% y 10 (12)%, respectivamente.

(RMF 1 e 2 vs. CAM basal $p= 0,005$).

Aumento retardado de la CAM producido por los opioides

La media de la CAM basal determinada en todas las ratas fue de 2,3 (0,3)%vol (n = 42), sin diferencias entre los grupos ($p > 0.40$ para todos los grupos). Fue observada un aumento de la CAM una semana después en todos los grupos en los cuales se han administrado opioides ($p \leq 0,03$) (Figura 8), pero no en el grupo control (MAC 2.3 (0.2)%vol p vs. CAM basal = 0,53). El aumento de la CAM no fue diferente entre los grupos tratados con opioides ($p > 0,05$) con un valor promedio de 2,8 (0,3)%vol (n = 35), significativamente superior a la CAM basal (aumento medio = 16 (10)%, $p \leq 0,00$. Figura 8). Este aumento no ha sido observado en el grupo de control: 2 (7)%.

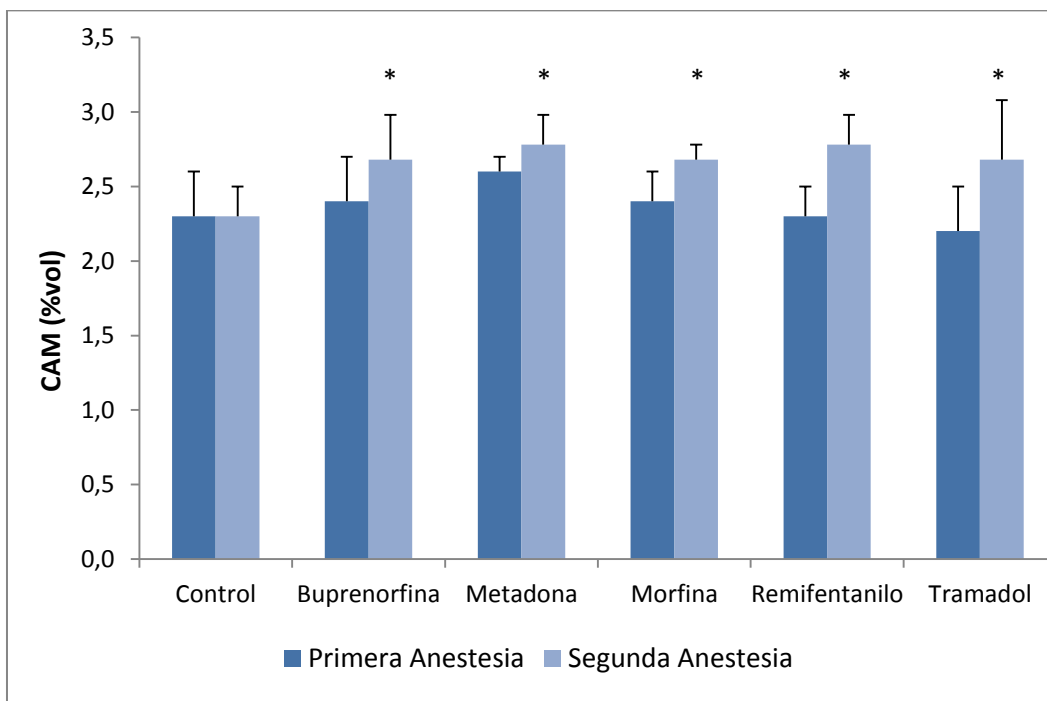


FIGURA 7. Aumento de la CAM basal de sevoflurano una semana después de la administración de una dosis de los opioides estudiados.

* indica diferencias estadísticamente significativas respecto al grupo control en el mismo tiempo.

Tabla 3: CAM de sevoflurano basal y CAM y grado de reducción después de la administración de distintos opioides en ratas en el experimento 3.

Opioide	Dosis	CAM (%vol)	CAM opioide (%vol)	Reducción CAM (%)
Control	-	2.3 (0.2)	2.3 (0.2)	- 0.2 (5.5)
Buprenorfina	0.15 mg·kg ⁻¹	2.4 (0.3)	1.7 (0.2)*	29 (7)*
Metadona	8 mg·kg ⁻¹	2.6 (0.1)	1.8 (0.2)*	32 (9)*
Morfina	10 mg·kg ⁻¹	2.4 (0.2)	1.6 (0.2)*	34 (5)*
Remifentanilo	120 µg·kg ⁻¹ ·h ⁻¹	2.3 (0.3)	1.9 (0.3)*+	22 (12)*+
Tramadol	50 mg·kg ⁻¹	2.2 (0.3)	1.0 (0.6)*+	58 (29)*+

* Distinto del grupo control. (p < 0.05)

+ Distinto de los grupos buprenorfina, metadona y morfina. (p < 0.05)

Reducción de la CAM tras un tratamiento previo, una semana antes, con opioides

La reducción de la CAM producida por los opioides estudiados (buprenorfina, metadona, morfina, remifentanilo y tramadol) no fue modificada por una anestesia previa (1

semana antes) con sevoflurano y opioides (p > 0.50 para todos los grupos) (Figura 8).

La reducción observada en la CAM, después de segundo tratamiento con buprenorfina, metadona, morfina, remifentanilo

y tramadol fue de 32 (8)% 33 (6)%, 34 (7)%,

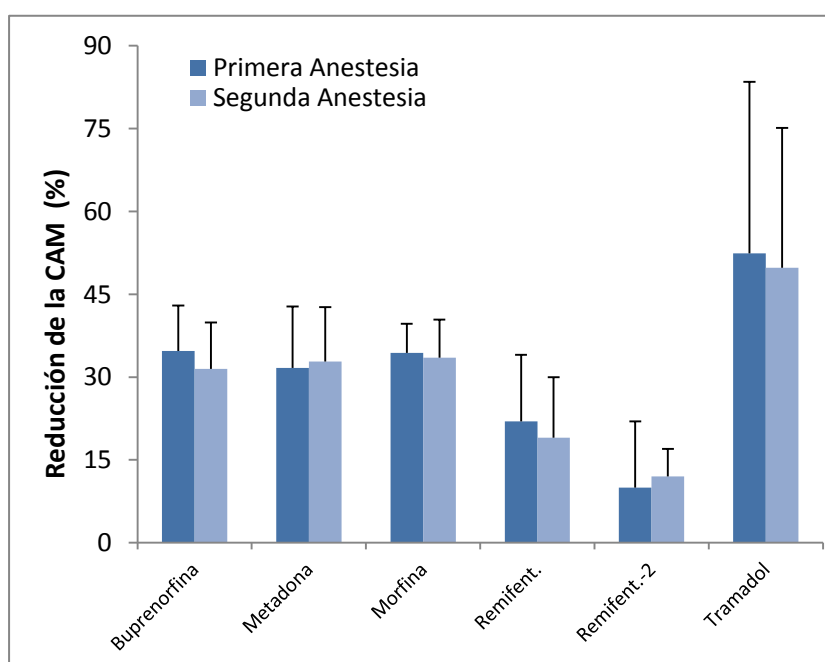


FIGURA 8. Reducción de la CAM producida por opioides en ratas no tratadas inicialmente (barra gris) y una semana después por segunda vez.

19 (11) y el 50% (25)%, respectivamente. De forma similar, la magnitud del efecto de tolerancia determinado por remifentanilo, con un intervalo de una semana, fue similar en los dos tratamientos con remifentanilo ($p=0,721$) (Figura 9).

4- HIPERALGESIA Y AUMENTO DE LA CAM PRODUCIDA POR TRAMADOL Y PREVENCIÓN O ATENUACIÓN PRODUCIDA POR EL EMPLEO DE KETAMINA (EXPERIMENTOS IV Y V)

Efecto analgésico de tramadol solo y asociado a ketamina (Experimento V)

Ambos los tratamientos han determinado un aumento del umbral en la prueba de Randall-Selitto 30 minutos después de la administración del tramadol con valor superior a 400 g, que ha sido definido como estimulación máxima para evitar daños en los tejidos.

Hiperalgnesia mecánica inducida por tramadol: duración de hasta 21 días y asociación al aumento de la CAM (Experimento IV y V)

El tramadol ha producido una disminución significativa en los umbrales mecánicos nociceptivos, tanto al evaluar el porcentaje de reducción producido por el tramadol, frente al grupo control ($p=0,00$), como frente a sus valores basales ($p=0,00$). Con la prueba del Von Frey, se observó una reducción máxima del 45 (10)% en el día 7 aunque las diferencias entre los grupos se observaron al día posterior al tratamiento y hasta el día 21 ($p = 0.00$, ANOVA de medidas repetidas) (Figura 10). Con la prueba de Randall-Selitto, la reducción máxima fue observada en el día 14, 32 (18)%, con efectos significativos desde el día a al 21 ($p = 0,00$ ANOVA de medidas repetidas) (Figura 10).

En el experimento V, siete días después del tratamiento inicial con tramadol, una segunda dosis de este fármaco produjo una disminución significativa de los umbrales nociceptivos con la prueba del Randall-Selitto, con una reducción de estos del 49 (24)% y 59% (15)% en comparación con los valores basales ($p = 0,02$) y el grupo control ($p = 0,00$), respectivamente. (Figura 11). También se ha determinado un aumento significativo de la CAM basal de sevoflurano, de un 14 (11)% frente al valor basal ($p = 0,02$) y 13 (5)% frente al grupo control ($p = 0,04$) (Figura 11).

Ketamina: Bloqueo de la hiperalgesia mecánica y aumento de la CAM producidos por tramadol (experimentos IV y V)

La acción del tramadol de disminución de los umbrales nociceptivos mecánicos ha sido prevenida por la administración previa de ketamina. Los porcentajes de reducción de los umbrales mecánicos con las pruebas de Von Frey y Randall-Selitto no fueron distintos del grupo control ($p = 1,00$, ambas pruebas, ANOVA de medidas repetidas. Figura 10) y fueron significativamente diferentes del grupo de animales que fue tratado solo con tramadol ($p = 0,00$; ambas pruebas, ANOVA de medidas repetidas (Figura 10).

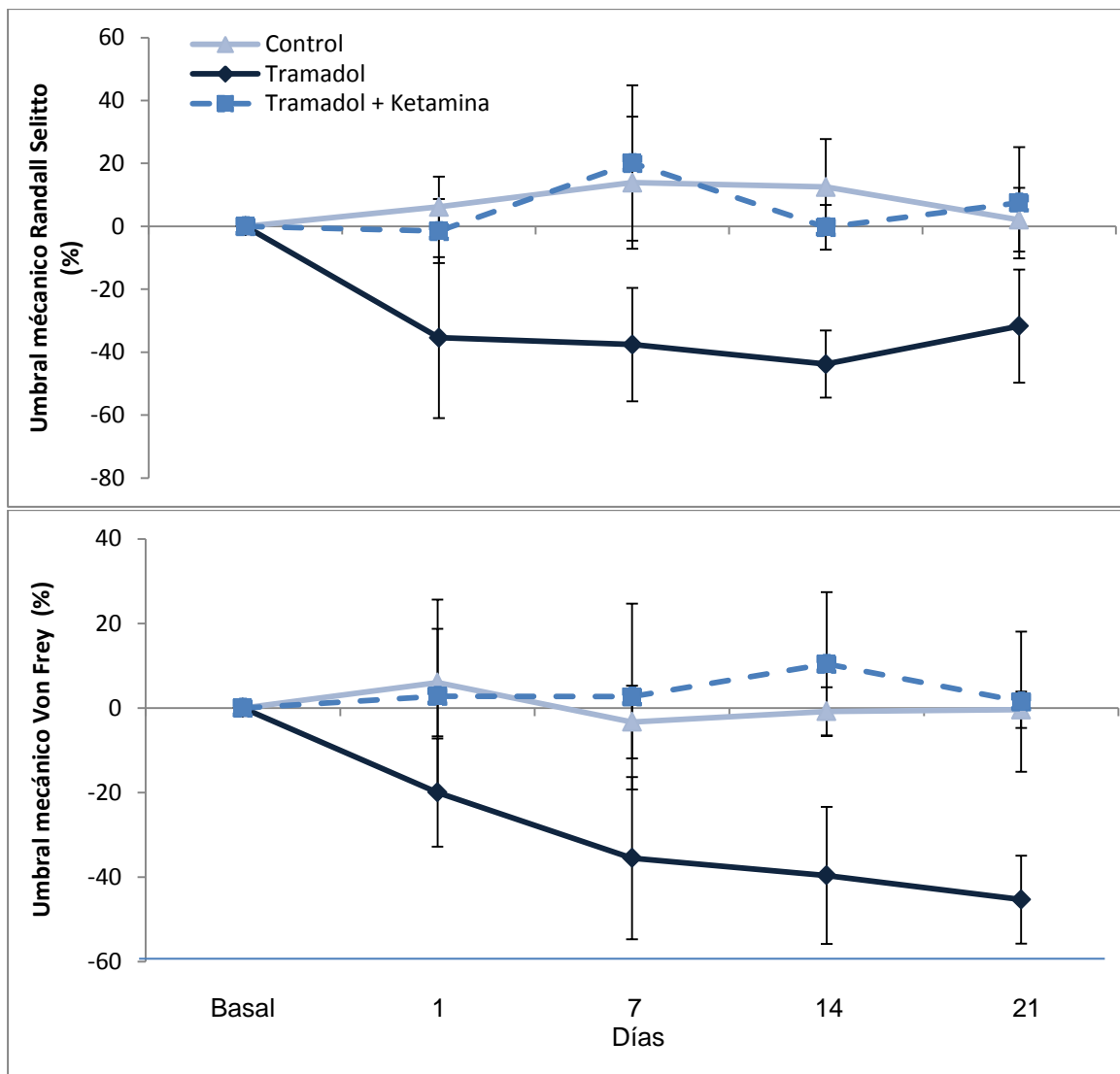


FIGURA 9. Variación de los umbrales nociceptivos mecánicos (en %) con las pruebas de Randall-Selitto (arriba) Von Frey (abajo) y basal en los días 1, 7, 14 y 21 post-tratamiento.

La administración de ketamina previa al tramadol también ha prevenido la disminución del umbral con la prueba de Randall-Selitto. La reducción ha sido del 0,2 (13)% ($p = 0,8$) en comparación con los valores basales y del 2 (9)% en comparación con el grupo control ($p = 1,00$). (Figura 11). Tampoco ha sido observado un aumento significativo de la CAM basal de sevoflurano una semana después del tratamiento con ketamina y tra-

madol. El aumento porcentual de la CAM fue del 4 (9)% en comparación con el valor basal ($p = 0,26$) y del 3 (5)% de aumento en comparación con el grupo control ($p = 1,00$) (Figura 11).

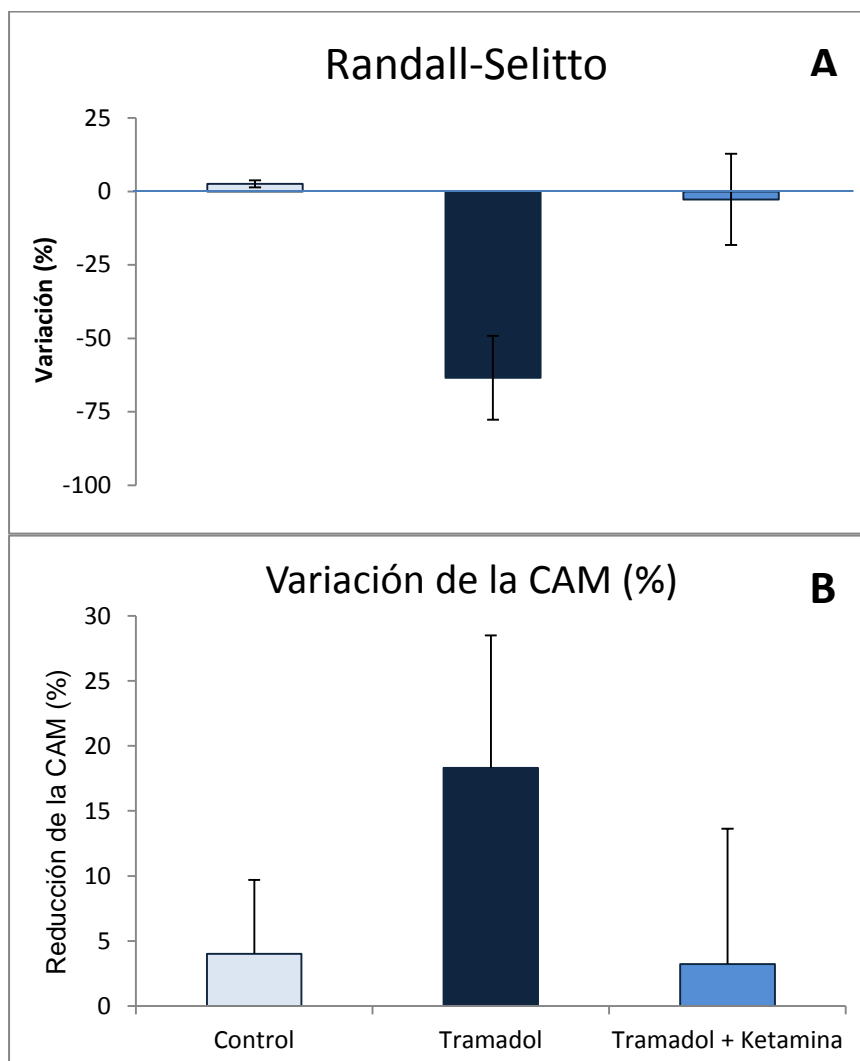


FIGURA 10: Variación de los umbrales nociceptivos mecánicos (%) determinados con las pruebas de Von Frey (A) y Randall-Selitto (B) basales y a los 1, 7, 14 y 21 días post-tratamiento una semana después del tratamiento inicial con tramadol o tramadol + ketamina.

DISCUSIÓN

Globalmente los resultados obtenidos permiten determinar que los opioides reducen las necesidades de sevoflurano de forma inmediata, pero desarrollan un efecto tardío o retardado opuesto, asociado a hiperalgesia, y que podría durar semanas. Este efecto ha sido determinado por todos los opioides estudiados, buprenorfina, metadona, morfina, remifentanilo y tramadol y sugiere que el efecto observado de hiperalgesia e incremento tardío de la CAM es común a este tipo de fármacos.

REDUCCIÓN INMEDIATA DE LA CAM PRODUCIDA POR OPIOIDES

Tal y como se planteaba en la hipótesis la administración de los opioides butorfanol, metadona, tramadol han producido un efecto ahorrador de anestésico inhalatorio, medido mediante una disminución de la CAM. El efecto de estos opioides no había sido comprobado previamente en la rata (butorfanol, metadona, tramadol) y ha confirmado el efecto observado previamente por nuestro laboratorio u otros autores en el caso de morfina y remifentanilo. La reducción de la CAM de los primeros opioides (butorfanol, metadona, tramadol) era un efecto esperado, aunque se desconocía su intensidad dependiendo de la dosis empleada en la rata.

Existen numerosas evidencias que confirman los efectos sobre la CAM y producidos por la **morfina**. Una dosis de morfina de 10 mg.kg^{-1} redujo la CAM de sevoflurano en un 77% cuando en ratas Sprague Dawley y que fue superior al 50% de reducción de la CAM de isoflurano (dosis de 10 mg.kg^{-1}) ^(Criado et al. 2000) o el 55% de reducción de la CAM de halotano (dosis 8 mg.kg^{-1}) ^(Lake et al. 1985) determinados en ratas Wistar . Una dosis más elevada de morfina (20 mg.kg^{-1}) redujo la CAM de halotano en un 84% ^(Lake et al. 1985) en ratas Wistar. La reducción del 30% de la CAM de sevoflurano producida por una dosis de morfina de 5 mg.kg^{-1} en ratas Sprague-Dawley es comparable con la producida en isoflurano con una dosis similar de morfina ^(Criado et al. 2000) en ratas Wistar. Las diferencias

entre los resultados del estudio pueden ser debido a las cepas de ratas estudiadas (Hoffmann et al. 1998) así como diferencias en la metodología empleada. En el presente estudio, también han sido observadas diferencias en el grado de reducción de la CAM cuando fueran utilizadas ratas Sprague Dawley (Experimento I) respecto a ratas Wistar (Experimento III), con igual fármaco y dosis. La morfina a 10 mg.kg^{-1} presentó un 34% de reducción en ratas Wistar frente al 77% de reducción en ratas Sprague Dawley. La metodología utilizada fue la misma, así que posiblemente fue la diferencia de cepas lo que ha contribuido para diferencias en el grado de reducción. De forma idónea hubiera debido emplearse la misma cepa en todos los experimentos y realmente la modificación se debió a problemas de suministro que obligaron al empleo de ratas adquiridas directamente del proveedor. Por otro lado, el empleo de ambas cepas ha permitido comparar diferencias entre las mismas.

Las reducciones en la CAM de sevoflurano producidos por estos opioides en la rata no se pueden extrapolar directamente a otras especies. Así como han sido evidenciadas diferencias en el grado de reducción entre cepas de ratas, también se han observado diferencias clínicamente relevantes en la reducción de la CAM con opioides entre especies. Por ejemplo, la morfina (2 mg.kg^{-1}) redujo la CAM de isoflurano aproximadamente un 50% en monos y perros, pero sólo un 13% en cerdos (Steffey et al. 1994).

La **metadona** a dosis de 10 mg.kg^{-1} ha proporcionado una reducción del 100% en la CAM en ratas Sprague-Dawley, un grado de reducción rara vez observada con los opioides. Las razones de esta diferencia son desconocidas y pueden incluir efectos adicionales no opioides de este fármaco, como el antagonismo NMDA (Inturrisi 2005). Cuando se ha empleado una dosis menor (8 mg.kg^{-1}) en ratas Wistar, se observó un grado de reducción igualmente menor, del orden de un 32%, similar al producido por una dosis de 5 mg.kg^{-1} en el presente estudio en ratas Sprague Dawley, lo que puede haber sido influenciado por la dosis y por la diferencia entre las cepas de ratas. El efecto reductor de

la CAM, tras la administración intravenosa de la metadona en los gatos ha demostrado una disminución también mucho menor, del orden de un 25% con sevoflurano ($0,3 \text{ mg.kg}^{-1}$) (Ferreira et al. 2011). En perros, se ha observado hasta un 48% (dosis-dependiente) de la CAM de isoflurano ($0,5- 1,0 \text{ mg.kg}^{-1}$) (Credie et al. 2011). Al extrapolar los resultados a la practica clínica, debe considerarse que en la CAM se utiliza el pinzamiento de la cola como estímulo nociceptivo y no el estímulo quirúrgico, siendo normalmente necesario incrementar la dosis un 50% ($1,5 \times \text{CAM}$) para mantener una anestesia adecuada para obtener un plano quirúrgico (Lang et al. 1996). Por lo tanto, a pesar de obtener una reducción del 100% de la CAM con metadona, deben ser administradas dosis adicionales de anestésicos inhalatorios para proporcionar el nivel adecuado de anestesia quirúrgica.

El efecto del **tramadol** en la reducción de CAM en ratas también parece ser dosis dependiente. Una dosis de tramadol de 10 mg.kg^{-1} por vía intravenosa ha disminuido la CAM de isoflurano en un 13% (de Wolff et al. 1999) en ratas Wistar. En el presente estudio, el tramadol a dosis de 25 y 50 mg.kg^{-1} , administrada por vía intraperitoneal en ratas Sprague Dawley, ha reducido la CAM de sevoflurano en un 38% y 83%, respectivamente. También en el caso del tramadol, una reducción menos acentuada ha sido observada en ratas Wistar, apenas un 58% con la dosis de 50 mg.kg^{-1} . En perros, el tramadol ha reducido la CAM de sevoflurano en un 26% y 36% con dosis de $1,3 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{h}^{-1}$, y $2,6 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{h}^{-1}$, respectivamente (Seddighi et al. 2009). La reducción de la CAM con tramadol en los perros ha sido mucho más baja de lo que se ha determinado en el presente estudio pero ello no implica necesariamente que haya una diferencia entre especies o si las dosis utilizadas en las ratas han sido mucho más altas.

Así, el efecto dosis-dependiente de la reducción de la CAM ha sido observado con la morfina, metadona y tramadol. Una reducción dosis-dependiente de la CAM de los anestésicos volátiles había sido observado previamente en ratas con una reducción del orden de 50% a 90% con las dosis altas de los agonistas puros de receptores MOR-

opioides, como la como la morfina, (Criado et al. 2000) fentanilo (Criado and Gomez e Segura 2003), remifentanilo (Criado and Gomez e Segura 2003; Gomez de Segura et al. 2009), sufentanilo (Hecker et al. 1983) y alfentanilo (Lake et al. 1985), así como la buprenorfina, agonista parcial (Criado et al. 2000). Las diferencias en las dosis empleadas pueden estar relacionadas con diferencias en la potencia de los fármacos. Una infusión continua de opioides de acción corta, como remifentanilo y fentanilo, han reducido la CAM de isoflurano en hasta un 60% (240 y 60 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$, respectivamente) (Criado and Gomez e Segura 2003), y el sufentanilo redujo la CAM de isoflurano en un 90% (60 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$) (Hecker et al. 1983).

El **butorfanol** ha producido una disminución relativamente pequeña de la CAM, con una reducción máxima del orden de 30%. Dosis mayores de 5 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ no proporcionarían ninguna reducción adicional de la CAM de sevoflurano en ratas. Se ha descrito un efecto analgésico techo con opioides con efectos agonista-antagonista de los receptores; se ha demostrado que el butorfanol es capaz de antagonizar los receptores opioides MOR (Hoskin and Hanks 1991). Muchas de las acciones del butorfanol en el ratón (prueba de *tail-flick*) son coherentes con los de los agonistas MOR parciales, que se caracterizan por las acciones antagonistas a dosis bajas de butorfanol cuando se combinan con la morfina (Garner et al. 1997). Se han observado diferencias en la respuesta al butorfanol entre las distintas especies (Murphy and Hug 1982; Doherty et al. 1997; Ko et al. 2000; Doherty et al. 2002), pero también dentro de la misma especie (Quandt et al. 1994; Ko et al. 2000). En las aves psitácidas, el butorfanol ha reducido la dosis efectiva (ED50) de isoflurano en un 25% (Curro et al. 1994). En los gatos, ha sido determinado un 15-19% de reducción de la CAM de isoflurano con dosis entre 0,08 a 0,8 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ (Ilkiw et al. 2002; Zwijnenberg et al. 2010). Los efectos del butorfanol en la CAM son variables dentro de la misma especie y, en los perros, dosis de 0,1, 0,2 y 0,4 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ por vía intramuscular han reducido la CAM en un 11% (Murphy and Hug 1982), 15% (Zwijnenberg et al. 2010) y 20% (Ko et al. 2000), respectivamente. Sin embargo, en otro estudio, no ha sido observada una reducción de la CAM en perros con dosis de butorfanol entre 0,2 y 0,8 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ por

vía intravenosa (Quandt et al. 1994; Grimm et al. 2000). En los potros ha sido determinado un 10% de reducción de la CAM de halotano con 0,022 y 0,044 mg.kg⁻¹ de butorfanol (Matthews and Lindsay 1990), pero sólo un 3% de reducción de MAC 0,05 mg.kg⁻¹ de butorfanol en otro estudio (Doherty et al. 1997). El estímulo nociceptivo utilizado puede explicar las diferencias en la eficacia antinociceptiva del butorfanol. En pruebas realizadas en ratones utilizando este fármaco, el efecto analgésico máximo ha sido observado con la prueba de distensión abdominal (Zimmerman et al. 1987) y la de retirada de la cola con agua caliente (Butelman et al. 1995; Morgan and Picker 1996), mientras que no ha sido observado un efecto analgésico máxima con la prueba de *tail-flick*.

La misma reducción de la CAM producida por los opioides ha sido determinada en ratas tanto tras una primera dosis como tras una segunda dosis una semana después. En ambos casos la eficacia inmediata de los opioides se mantuvo, sin embargo, dado que la CAM basal se había incrementado, si se extrapolan los resultados a la practica clínica, ello implica que las dosis de los opioides, o del anestésico inhalatorio, deberían incrementarse para proporcionar un efecto similar.

De forma similar, el efecto de tolerancia observado en ratas tratadas por primera vez con remifentanilo fue similar a la producida en las mismas ratas una semana más tarde, lo que sugiere mecanismos independientes involucrados en la tolerancia y la hiperalgesia inducida por opioides.

EFFECTOS CARDIO-RESPIRATORIOS DE LOS OPIOIDES

La depresión respiratoria y la apnea son efectos secundarios comunes de la administración de opiáceos y se han observado en ratas tras la administración de dosis altas de buprenorfina, morfina, fentanilo o remifentanilo (Criado et al. 2000; Criado and Gomez e Segura 2003). Las

dosis de metadona y butorfanol de 10 mg.kg^{-1} han inducido un breve período de apnea transitoria en una rata de cada grupo. Este es un factor limitante en el uso de estos fármacos a estas dosis. La metadona (15 mg.kg^{-1}) produce una depresión respiratoria en ratas que resulta en hipoxemia y la acidosis respiratoria ^(Chevillard et al. 2010).

La presión arterial invasiva ha sido evaluada en el experimento reducción dosis-dependiente inmediata de la CAM de sevoflurano pero no así en los demás experimentos debido a una limitación metodológica, ya que los animales debían recuperarse para una reevaluación después del tratamiento y porque la lesión quirúrgica (aunque pequeña) podría actuar como factor adicional en el desarrollo de la hiperalgesia ^(Cabañero et al. 2009).

En el primer experimento no ha sido observada hipotensión clínicamente significativa tras la administración de los medicamentos, aunque la hipotensión sea un efecto adverso comúnmente descrito con uso de opiáceos, ^(Ellenberger et al. 2003), sobre todo cuando se alcanzan rápidamente altas concentraciones plasmáticas, como tras la administración intravenosa de dosis altas de buprenorfina o remifentanilo ^(Criado et al. 2000; Criado and Gomez e Segura 2003). Una disminución transitoria de la presión arterial del orden del 40-45% se ha producido tras la administración intravenosa de morfina ($1-10 \text{ mg.kg}^{-1}$) y de un 20-25 % tras la aplicación intravenosa de buprenorfina ($10-100 \text{ } \mu\text{g.kg}^{-1}$) ^(Criado et al. 2000). La hipotensión también ha sido observada después de la inyección intravenosa de $4,4 \text{ mg.kg}^{-1}$ de tramadol en conejos anestesiados con isoflurano ^(Egger et al. 2009), pero no en perros anestesiados con sevoflurano ($1,3 \times \text{MAC}$), ^(Itami et al. 2011), lo cual es coherente con los resultados del presente estudio, donde no se ha observado hipotensión significativa. Una posible explicación es que los opioides se administraron por vía intraperitoneal, mientras que los estudios anteriores citados emplearon la vía intravenosa. Aunque los fármacos por vía intraperitoneal se absorben rápidamente, la administración por vía intravenosa resulta en una mayor concentración plasmática inicial de los opioides y produce un efecto inmediato ^(Parasrampur et al. 2007).

HIPERALGESIA Y AUMENTO DE LA CAM INDUCIDA POR OPIOIDES

El efecto anteriormente descrito de disminución de la CAM de sevoflurano era previsible dadas las numerosas evidencias existentes. Lo que resulta novedoso es que se ha podido demostrar también un aumento tardío de la CAM. El tratamiento con remifentanilo ha producido dicho aumento transcurridas 24 horas y se ha mantenido durante varias semanas. Tal aumento podría ser una consecuencia de la hiperalgesia inducida por opioides, ya que la disminución de los umbrales nociceptivos mecánicos y el aumento de la CAM han sido observados simultáneamente cuando se ha administrado el remifentanilo. En cualquier caso la magnitud del aumento de la CAM ha sido relativamente moderada (16%).

El uso del remifentanilo ha sido previamente asociado a fenómenos de hiperalgesia inducida por opioides en pacientes anestesiados. Una dosis total de remifentanilo de 1,5 mg.kg⁻¹ (Singler et al. 2007) y 60 mg.kg⁻¹ (Troster et al. 2006) en voluntarios sanos ha producido hiperalgesia, evaluada por la estimulación eléctrica, con una duración de 90 minutos. En niños, una dosis total de 115 mg.kg⁻¹ administrada durante 7 horas ha producido un aumento en las puntuaciones de escalas de dolor postoperatorio y en el consumo de morfina. Sin embargo, dosis totales más bajas entre 23 mg.kg⁻¹ y 27 mg.kg⁻¹ (Cortinez et al. 2001; Lee et al. 2005) no han modificado las puntuaciones de dolor ni el consumo de morfina en el período postoperatorio. Estos resultados aparentemente contradictorios pueden estar relacionados con la dosis total administrada, la velocidad y duración de la infusión y el método de evaluación (Bannister and Dickenson 2010).

En roedores el remifentanilo ha inducido hiperalgesia inducida por opioides. Una infusión de 30 minutos en ratones (dosis total de remifentanilo de 80 a 100 µg.kg⁻¹), ha determinado una reducción máxima de los umbrales mecánicos con la prueba de von Frey del 40% dos días después del tratamiento, y los valores se mantuvieron por debajo de

los basales durante 10 días. Como en el caso de personas, en roedores el empleo de dosis más bajas (20 y $40 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$) no ha logrado producir hiperalgesia ^(Cabañero et al. 2009), lo que sugiere que sería necesaria una dosis mínima de opioides para su desarrollo. Un efecto similar ha sido observado con la prueba de Randall-Selitto, aunque la dosis mínima de remifentanilo necesaria para reducir el umbrales de retirada fue de, al menos, $160 \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ^(Celerier et al. 2000). Esta dosis produce hiperalgesia con una duración de 2 días y el aumento de la dosis entre 240 y $400 \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ determina no sólo un mayor grado de reducción de los umbrales de retirada, sino también un tiempo de reducción más prolongado de 3-5 días ^(Celerier et al. 2000). La dosis de $240 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ($120 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$) empleada en el experimento II produjo una reducción máxima de los umbrales mecánicos del orden del 50% entre los días tres y siete posteriores al tratamiento, recuperando los valores basales a las cuatro semanas. Una respuesta similar ha sido observada con las dos pruebas de comportamiento frente al estímulo nociceptivo, pruebas de von Frey y Randall-Selitto, lo que indica la coherencia del efecto observado.

Resulta relevante el hecho de que la buprenorfina, la metadona, la morfina, el remifentanilo y el tramadol también han producido un aumento similar en la CAM una semana después de su administración. La buprenorfina, la metadona, y la morfina ya habían sido asociadas al desarrollo de la hiperalgesia en personas y en animales. Los pacientes tratados con buprenorfina y con metadona han mostrado una reducción de la latencia de retirada en el test de presión y frío ^(Compton et al. 2001). En otro estudio, pacientes tratados con metadona han presentado hiperalgesia con la prueba de presión y frío y relacionada al aumento de necesidad de morfina, pero no cuando se aplicó una estimulación eléctrica ^(Doverly et al. 2001). En roedores, la hiperalgesia inducida por morfina ha sido demostrada tanto en tratamientos agudos ^(Van Elstraete et al. 2005) como crónicos ^(Dunbar et al. 2007; Liang et al. 2008). La metadona y la buprenorfina también han producido hiperalgesia a dosis sub-analgésicas ^(Holtman and Wala 2007; Wala and Holtman 2011), mientras que con dosis analgésicas,

esta no ha sido observada con metadona ^(Holtman and Wala 2007) ni con buprenorfina a dosis única, pero si cuando este último opioide se administra en dosis repetidas. ^(Wala and Holtman 2011).

En general, las evidencias sugieren el desarrollo de respuesta hiperalgésica frente a los opioides, tanto en las personas como en ratas. Nuestros resultados sugieren una relación entre la hiperalgesia inducida por el remifentanilo y un aumento de la CAM de sevoflurano. Aunque no ha sido establecida una relación directa entre ambos fenómenos, los resultados sugieren que el aumento de los requerimientos anestésicos inhalatorios podría ser una consecuencia de la hiperalgesia inducida por opioides. Sin embargo, es necesario confirmar dicha relación para verificar esta hipótesis. Un aumento similar de la CAM producido por todos los opioides estudiados, incluyendo el tramadol, también apoyaría un mecanismo similar entre los dos fenómenos, dadas las evidencias existentes de desarrollo de hiperalgesia tras la administración de estos analgésicos.

No existía información previa sobre la capacidad del tramadol para inducir hiperalgesia y, de hecho, ha sido utilizado paradójicamente y con éxito aparente como agente anti-hiperalgésico ^(Bianchi and Panerai 1998; Tsai et al. 2000), que pudiera estar relacionado con sus efectos no opioides. Al igual que con el remifentanilo, el tramadol ha inducido hiperalgesia 24 horas después de su administración con una duración de tres semanas. La hiperalgesia y aumento de la CAM también han sido identificados simultáneamente y en los mismos animales después del tratamiento con tramadol, reforzando la relación entre el desarrollo de los dos.

EFFECTO DE LA KETAMINA SOBRE LA HIPERALGESIA Y AUMENTO DE LA CAM INDUCIDAS POR TRAMADOL

Otro aspecto relevante observado en este estudio es que la hiperalgesia y el aumento de la CAM han sido prevenidos por la administración previa de ketamina. La actividad anti-hiperalgésica de la ketamina ya había sido descrita previamente en pacientes (Subramaniam et al. 2004; Vissers 2006) y animales (Marek et al. 1991; Mao et al. 1994). El efecto de la ketamina sobre receptores MOR ha sido demostrado en ratones knock-out para estos receptores (Sarton et al. 2001), y probablemente podría ser, al menos en parte, responsable del efecto anti-hiperalgésico de la ketamina. El hecho de que en el presente estudio el aumento de la CAM haya sido bloqueado es un indicio más de que pueda existir un mecanismo común entre la disminución en los umbrales mecánicos nociceptivos (hiperalgesia) y el aumento de la CAM.

EFFECTO ANALGÉSICO DEL TRAMADOL

El uso del tramadol como analgésico ha sido ampliamente introducido tanto para el tratamiento del dolor agudo (Ribezi et al. 2011; Sawaddiruk 2011) como crónico (Mongin 2007). La asociación de la ketamina a opioides no sólo ha determinado un efecto anti-hiperalgésico (Webb et al. 2007; Ayoglu et al. 2010), sino también un efecto analgésico sinérgico durante el periodo intraoperatorio (Guignard et al. 2000). El efecto analgésico del tramadol ha sido evidenciado en este estudio pero debido a la limitación del estímulo mecánico que evita la lesión tisular no ha podido determinarse el efecto máximo analgésico que esta combinación de tramadol y ketamina podría proporcionar.

LIMITACIONES Y APLICACIONES DE LA CAM

El método de la CAM proporciona datos fiables y cuantificables relacionados con la potencia anestésica. Sin embargo, el valor de la CAM varía hasta en un 20% dentro de una especie determinada aunque, generalmente, ^(Quasha et al. 1980) menos del 10% en un mismo animal. La reducción de la CAM producida por los analgésicos no necesariamente refleja la potencia analgésica real del fármaco ^(Brosnan et al. 2009), ya que el efecto observado sobre la CAM no es simplemente el resultado de los efectos antinociceptivos de los fármacos probados, pero el efecto de las interacciones de la combinación entre el analgésico y el anestésico inhalatorio. Aun así, el método CAM es considerado como una referencia de utilidad clínica, ya que mimetiza el período intraoperatorio. La reducción de MAC producida por fármacos, incluyendo analgésicos como los opiáceos, permite una estimación de los requerimientos de anestésicos inhalatorios para los procedimientos quirúrgicos y por lo tanto un aumento en el margen de seguridad derivados de la reducción de las dosis anestésicas cuando un analgésico es incluido en el protocolo ^(Docquier et al. 2003).

Un estudio reciente sugiere que la eficacia de los opioides puede reducirse con el tiempo y ha sido descrito un efecto de tolerancia aguda durante la anestesia inhalatoria, determinado como una disminución de la eficacia de los opioides en reducir la CAM con el tiempo ^(Gomez de Segura et al. 2009). Ello indica que podría ser también una herramienta útil para el estudio de los fenómenos de hiperalgesia durante el periodo intraoperatorio. Si extrapolamos los resultados, se puede sugerir que los pacientes en tratamiento analgésico con opioides previo a una anestesia inhalatoria para la realización de intervenciones quirúrgicas, podrían presentar un aumento de la demanda de anestésicos inhalatorios con el fin de mantener el plano anestésico deseado. Sin embargo, la relevancia de estos efectos observados en ratas no debe ser extrapolada directamente a pacientes y requerirá de estudios en personas.

CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos en este estudio y su análisis se consideran las siguientes conclusiones:

1. Los opioides butorfanol, metadona, morfina y tramadol disminuyen la CAM de sevoflurano inmediatamente después de su administración. Dicho efecto ha sido dosis-dependiente, a excepción del butorfanol.
2. El remifentanilo produjo un efecto de hiperalgesia observable a las 24 horas, y de varias semanas de duración. El mismo estuvo asociado a un incremento de la CAM de sevoflurano.
3. La buprenorfina, metadona, morfina, remifentanilo y tramadol produjeron un efecto similar de reducción inmediata de la CAM de sevoflurano seguida de un incremento posterior, a la semana, de la misma.
4. La hiperalgesia e incremento de la CAM basal producida por el tramadol fue atenuada mediante el empleo de ketamina.

RESUMEN

Los opioides son los fármacos de elección en el manejo del dolor intraoperatorio y combinados con anestésicos proporcionan el componente analgésico de la anestesia equilibrada^(Lang et al. 1996). En cualquier caso, existen numerosas evidencias que indican que los opioides no solo promueven efectos antinociceptivos (analgesia), sino que simultáneamente pueden activar efectos pronociceptivos provocando un fenómeno denominado hiperalgnesia inducida por opioides. El objetivo de este estudio ha sido determinar si la administración de opioides previos a una anestesia inhalatoria puede estar asociada a hiperalgnesia y modificar la potencia de dichos anestésicos.

Para demostrar lo anterior se han planteado varios estudios en ratas anestesiadas con sevoflurano donde se pretendió 1) determinar la reducción dosis-dependiente inmediata de la CAM tras la administración intraperitoneal de butorfanol, metadona, morfina, y tramadol; 2) el efecto inmediato y tardío de la administración de buprenorfina, metadona, morfina, remifentanilo y tramadol en la CAM; la presencia y duración de hiperalgnesia inducida por 3) remifentanilo o 4) tramadol y si está asociada a un aumento de la CAM y, finalmente, 5) si esos efectos tardíos inducidos por el tramadol pueden ser prevenidos o atenuados por el empleo de ketamina.

Todos los opioides estudiados redujeron de forma inmediata la CAM seguido de un incremento posterior que se prolongó al menos 21 días tras la administración de remifentanilo y tramadol y estuvo asociado a hiperalgnesia. El empleo de ketamina previno tanto la aparición de hiperalgnesia como de aumento tardío de la CAM y producido por tramadol.

SUMMARY

Opioids are the drugs of choice in perioperative pain management and combined with anaesthetics provide the analgesic component of a balanced anaesthetic regimen. Increasing evidence suggest that opioids not only promote antinociceptive effects (analgesia), but can simultaneously activate pronociceptive effects leading to opioid-induced hyperalgesia. The aim of this study was to determine whether previous opioid administration leading to hyperalgesia may be associated with increased inhalant anaesthetic requirements.

Several studies have been performed in rats anesthetized with sevoflurane aiming to determine 1) the dose-dependent and immediate MAC reduction produced by butorphanol, methadone, morphine, and tramadol, 2) the delayed increases on MAC produced by buprenorphine, methadone, morphine, remifentanil and tramadol, associated with lasting hyperalgesia 3) the remifentanil and 4) tramadol induced hyperalgesia and associated increases in the MAC and 5) whether these effects may be prevented by ketamine.

All studied opioids reduced the MAC immediately but were followed by a latter increase in basal sevoflurane requirements lasting at least 21 days. This effect was associated with hyperalgesia when remifentanil and tramadol were used. Finally, the hyperalgesia and MAC increase produced by tramadol were prevented by ketamine.

BIBLIOGRAFÍA

- Abdel-Zaher AO, Abdel-Rahman MS and Elwasei FM. Protective effect of *Nigella sativa* oil against tramadol-induced tolerance and dependence in mice: Role of nitric oxide and oxidative stress. *Neurotoxicology* 2011; 32(6): 725-733.
- Angst MS and Clark JD. Opioid-induced hyperalgesia: a qualitative systematic review. *Anesthesiology* 2006; 104(3): 570-587.
- Angst MS, Koppert W, Pahl I, Clark DJ and Schmelz M. Short-term infusion of the mu-opioid agonist remifentanyl in humans causes hyperalgesia during withdrawal. *Pain* 2003; 106(1-2): 49-57.
- Axelrod DJ and Reville B. Using methadone to treat opioid-induced hyperalgesia and refractory pain. *J Opioid Manag* 2007; 3(2): 113-114.
- Ayoglu H, Altunkaya H, Bayar A, Turan IO, Ozer Y and Ege A. The effect of intraarticular combinations of tramadol and ropivacaine with ketamine on postoperative pain after arthroscopic meniscectomy. *Arch Orthop Trauma Surg* 2010; 130(3): 307-312.
- Bannister K and Dickenson AH. Opioid hyperalgesia. *Curr Opin Support Palliat Care* 2010; 4(1): 1-5.
- Bell RF, Dahl JB, Moore RA and Kalso E. Peri-operative ketamine for acute post-operative pain: a quantitative and qualitative systematic review (Cochrane review). *Acta Anaesthesiol Scand* 2005; 49(10): 1405-1428.
- Bianchi M and Panerai AE. Anti-hyperalgesic effects of tramadol in the rat. *Brain Res* 1998; 797(1): 163-166.
- Brosnan RJ, Pypendop BH, Siao KT and Stanley SD. Effects of remifentanyl on measures of anesthetic immobility and analgesia in cats. *Am J Vet Res* 2009; 70(9): 1065-1071.
- Bruera E and Pereira J. Recent developments in palliative cancer care. *Acta Oncol* 1998; 37(7-8): 749-757.
- Butelman ER, Winger G, Zernig G and Woods JH. Butorphanol: characterization of agonist and antagonist effects in rhesus monkeys. *J Pharmacol Exp Ther* 1995; 272(2): 845-853.
- Cabañero D, Campillo A, Celerier E, Romero A and Puig MM. Pronociceptive effects of remifentanyl in a mouse model of postsurgical pain: effect of a second surgery. *Anesthesiology* 2009; 111(6): 1334-1345.
- Campagnol D, Teixeira-Neto FJ, Peccinini RG, Oliveira FA, Alvaides RK and Medeiros LQ. Comparison of the effects of epidural or intravenous methadone on the minimum alveolar concentration of isoflurane in dogs. *Vet J* 2011.
- Campillo A, Cabanero D, Romero A, Garcia-Nogales P and Puig MM. Delayed postoperative latent pain sensitization revealed by the systemic administration of opioid antagonists in mice. *Eur J Pharmacol* 2011; 657(1-3): 89-96.
- Cannon CZ, Kissling GE, Hoenerhoff MJ, King-Herbert AP and Blankenship-Paris T. Evaluation of dosages and routes of administration of tramadol analgesia in rats using hot-plate and tail-flick tests. *Lab Anim (NY)* 2010; 39(11): 342-351.
- Celerier E, Gonzalez JR, Maldonado R, Cabanero D and Puig MM. Opioid-induced hyperalgesia in a murine model of postoperative pain: role of nitric oxide generated from the inducible nitric oxide

- synthase. *Anesthesiology* 2006; 104(3): 546-555.
- Celerier E, Laulin JP, Corcuff JB, Le Moal M and Simonnet G. Progressive enhancement of delayed hyperalgesia induced by repeated heroin administration: a sensitization process. *J Neurosci* 2001; 21(11): 4074-4080.
- Celerier E, Rivat C, Jun Y, Laulin JP, Larcher A, Reynier P and Simonnet G. Long-lasting hyperalgesia induced by fentanyl in rats: preventive effect of ketamine. *Anesthesiology* 2000; 92(2): 465-472.
- Compton P, Athanasos P and Elashoff D. Withdrawal hyperalgesia after acute opioid physical dependence in nonaddicted humans: a preliminary study. *J Pain* 2003; 4(9): 511-519.
- Compton P, Charuvastra VC, Kintaudi K and Ling W. Pain responses in methadone-maintained opioid abusers. *J Pain Symptom Manage* 2000; 20(4): 237-245.
- Compton P, Charuvastra VC and Ling W. Pain intolerance in opioid-maintained former opiate addicts: effect of long-acting maintenance agent. *Drug Alcohol Depend* 2001; 63(2): 139-146.
- Conzemius MG, Hill CM, Sammarco JL and Perkowski SZ. Correlation between subjective and objective measures used to determine severity of postoperative pain in dogs. *J Am Vet Med Assoc* 1997; 210(11): 1619-1622.
- Cortinez LI, Brandes V, Munoz HR, Guerrero ME and Mur M. No clinical evidence of acute opioid tolerance after remifentanyl-based anaesthesia. *Br J Anaesth* 2001; 87(6): 866-869.
- Credie RG, Teixeira Neto FJ, Ferreira TH, Aguiar AJ, Restitutti FC and Corrente JE. Effects of methadone on the minimum alveolar concentration of isoflurane in dogs. *Vet Anaesth Analg* 2011; 37(3): 240-249.
- Criado AB, Gomez de Segura IA, Tendillo FJ and Marsico F. Reduction of isoflurane MAC with buprenorphine and morphine in rats. *Lab Anim* 2000; 34(3): 252-259.
- Criado AB and Gomez e Segura IA. Reduction of isoflurane MAC by fentanyl or remifentanyl in rats. *Vet Anaesth Analg* 2003; 30(4): 250-256.
- Cunha TM, Verri WA, Jr., Vivancos GG, Moreira IF, Reis S, Parada CA, Cunha FQ and Ferreira SH. An electronic pressure-meter nociception paw test for mice. *Braz J Med Biol Res* 2004; 37(3): 401-407.
- Curro TG, Brunson DB and Paul-Murphy J. Determination of the ED50 of isoflurane and evaluation of the isoflurane-sparing effect of butorphanol in cockatoos (*Cacatua* spp.). *Vet Surg* 1994; 23(5): 429-433.
- Chevillard L, Megarbane B, Baud FJ, Risede P, Decleves X, Mager D, Milan N and Ricordel I. Mechanisms of respiratory insufficiency induced by methadone overdose in rats. *Addict Biol* 2010; 15(1): 62-80.
- Chu LF, Clark DJ and Angst MS. Opioid tolerance and hyperalgesia in chronic pain patients after one month of oral morphine therapy: a preliminary prospective study. *J Pain* 2006; 7(1): 43-48.
- Davis AM and Inturrisi CE. d-Methadone blocks morphine tolerance and N-

- methyl-D-aspartate-induced hyperalgesia. *J Pharmacol Exp Ther* 1999; 289(2): 1048-1053.
- de Wolff MH, Leather HA and Wouters PF. Effects of tramadol on minimum alveolar concentration (MAC) of isoflurane in rats. *Br J Anaesth* 1999; 83(5): 780-783.
- Dietis N, Rowbotham DJ and Lambert DG. Opioid receptor subtypes: fact or artifact? *Br J Anaesth* 2011; 107(1): 8-18.
- Docquier MA, Lavand'homme P, Ledermann C, Collet V and De Kock M. Can determining the minimum alveolar anesthetic concentration of volatile anesthetic be used as an objective tool to assess antinociception in animals? *Anesth Analg* 2003; 97(4): 1033-1039.
- Doherty TJ, Geiser DR and Rohrbach BW. Effect of acepromazine and butorphanol on halothane minimum alveolar concentration in ponies. *Equine Vet J* 1997; 29(5): 374-376.
- Doherty TJ, Rohrbach BW and Geiser DR. Effect of acepromazine and butorphanol on isoflurane minimum alveolar concentration in goats. *J Vet Pharmacol Ther* 2002; 25(1): 65-67.
- Doverly M, Somogyi AA, White JM, Bochner F, Beare CH, Menelaou A and Ling W. Methadone maintenance patients are cross-tolerant to the antinociceptive effects of morphine. *Pain* 2001; 93(2): 155-163.
- Dunbar SA, Karamian I and Zhang J. Ketorolac prevents recurrent withdrawal induced hyperalgesia but does not inhibit tolerance to spinal morphine in the rat. *Eur J Pain* 2007; 11(1): 1-6.
- DuPen A, Shen D and Ersek M. Mechanisms of opioid-induced tolerance and hyperalgesia. *Pain Manag Nurs* 2007; 8(3): 113-121.
- Eger EI, 2nd, Saidman LJ and Brandstater B. Minimum alveolar anesthetic concentration: a standard of anesthetic potency. *Anesthesiology* 1965; 26(6): 756-763.
- Egger CM, Souza MJ, Greenacre CB, Cox SK and Rohrbach BW. Effect of intravenous administration of tramadol hydrochloride on the minimum alveolar concentration of isoflurane in rabbits. *Am J Vet Res* 2009; 70(8): 945-949.
- Ellenberger EA, Lucas HL, Russo JM, Mueller JL, Barrington PL, Tseng LF and Quock RM. An opioid basis for early-phase isoflurane-induced hypotension in rats. *Life Sci* 2003; 73(20): 2591-2602.
- Fallon MT and Laird BJ. A systematic review of combination step III opioid therapy in cancer pain: an EPCRC opioid guideline project. *Palliat Med* 2011; 25(5): 597-603.
- Ferreira TH, Steffey EP, Mama KR, Rezende ML and Aguiar AJ. Determination of the sevoflurane sparing effect of methadone in cats. *Vet Anaesth Analg* 2011; 38(4): 310-319.
- Freye E, Anderson-Hillemacher A, Ritzdorf I and Levy JV. Opioid rotation from high-dose morphine to transdermal buprenorphine (Transtec) in chronic pain patients. *Pain Pract* 2007; 7(2): 123-129.
- Garner HR, Burke TF, Lawhorn CD, Stoner JM and Wessinger WD. Butorphanol-mediated antinociception in mice: partial agonist effects and mu receptor involvement. *J Pharmacol Exp Ther* 1997; 282(3): 1253-1261.

- Gomez de Segura IA, Criado AB, Santos M and Tendillo FJ. Aspirin synergistically potentiates isoflurane minimum alveolar concentration reduction produced by morphine in the rat. *Anesthesiology* 1998; 89(6): 1489-1494.
- Gomez de Segura IA, de la Vibora JB and Aguado D. Opioid tolerance blunts the reduction in the sevoflurane minimum alveolar concentration produced by remifentanil in the rat. *Anesthesiology* 2009; 110(5): 1133-1138.
- Grimm KA, Tranquilli WJ, Thurmon JC and Benson GJ. Duration of nonresponse to noxious stimulation after intramuscular administration of butorphanol, medetomidine, or a butorphanol-medetomidine combination during isoflurane administration in dogs. *Am J Vet Res* 2000; 61(1): 42-47.
- Grond S and Sablotzki A. Clinical pharmacology of tramadol. *Clin Pharmacokinet* 2004; 43(13): 879-923.
- Guignard B, Bossard AE, Coste C, Sessler DI, Lebrault C, Alfonsi P, Fletcher D and Chauvin M. Acute opioid tolerance: intraoperative remifentanil increases postoperative pain and morphine requirement. *Anesthesiology* 2000; 93(2): 409-417.
- Gunduz O, Oltulu C, Buldum D, Guven R and Ulugol A. Anti-allodynic and anti-hyperalgesic effects of ceftriaxone in streptozocin-induced diabetic rats. *Neurosci Lett* 2011; 491(1): 23-25.
- Hansen BD. Assessment of pain in dogs: veterinary clinical studies. *ILAR J* 2003; 44(3): 197-205.
- Hargreaves K, Dubner R, Brown F, Flores C and Joris J. A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. *Pain* 1988; 32(1): 77-88.
- Hecker BR, Lake CL, DiFazio CA, Moscicki JC and Engle JS. The decrease of the minimum alveolar anesthetic concentration produced by sufentanil in rats. *Anesth Analg* 1983; 62(11): 987-990.
- Hoffmann O, Plesan A and Wiesenfeld-Hallin Z. Genetic differences in morphine sensitivity, tolerance and withdrawal in rats. *Brain Res* 1998; 806(2): 232-237.
- Holtman JR, Jr., Crooks PA, Johnson-Hardy J and Wala EP. Interaction between morphine and norketamine enantiomers in rodent models of nociception. *Pharmacol Biochem Behav* 2008; 90(4): 769-777.
- Holtman JR, Jr. and Wala EP. Characterization of the antinociceptive and pronociceptive effects of methadone in rats. *Anesthesiology* 2007; 106(3): 563-571.
- Hoskin PJ and Hanks GW. Opioid agonist-antagonist drugs in acute and chronic pain states. *Drugs* 1991; 41(3): 326-344.
- Ide S, Minami M, Satoh M, Uhl GR, Sora I and Ikeda K. Buprenorphine antinociception is abolished, but naloxone-sensitive reward is retained, in mu-opioid receptor knockout mice. *Neuropsychopharmacology* 2004; 29(9): 1656-1663.
- Ilkiw JE, Pascoe PJ and Tripp LD. Effects of morphine, butorphanol, buprenorphine, and U50488H on the minimum alveolar concentration of isoflurane in cats. *Am J Vet Res* 2002; 63(8): 1198-1202.
- Inturrisi CE. Preclinical evidence for a role

- of glutamatergic systems in opioid tolerance and dependence. *Semin Neurosci* 1997; 9: 110-119.
- Inturrisi CE. Pharmacology of methadone and its isomers. *Minerva Anestesiol* 2005; 71(7-8): 435-437.
- Itami T, Tamaru N, Kawase K, Ishizuka T, Tamura J, Miyoshi K, Umar MA, Inoue H and Yamashita K. Cardiovascular Effects of Tramadol in Dogs Anesthetized with Sevoflurane. *J Vet Med Sci* 2011.
- Kammerman P, Koller A and Loram L. Postoperative administration of the analgesic tramadol, but not the selective cyclooxygenase-2 inhibitor parecoxib, abolishes postoperative hyperalgesia in a new model of postoperative pain in rats. *Pharmacology* 2007; 80(4): 244-248.
- Kim DK, Kwak J, Kim SJ and Kim J. Long-lasting enhancement in the intrinsic excitability of deep dorsal horn neurons. *Pain* 2008; 139(1): 181-189.
- King T, Ossipov MH, Vanderah TW, Porreca F and Lai J. Is paradoxical pain induced by sustained opioid exposure an underlying mechanism of opioid antinociceptive tolerance? *Neurosignals* 2005; 14(4): 194-205.
- Kissin I, Brown PT and Bradley EL, Jr. Magnitude of acute tolerance to opioids is not related to their potency. *Anesthesiology* 1991; 75(5): 813-816.
- Kissin I, Brown PT, Robinson CA and Bradley EL, Jr. Acute tolerance in morphine analgesia: continuous infusion and single injection in rats. *Anesthesiology* 1991; 74(1): 166-171.
- Kissin I, Lee SS, Arthur GR and Bradley EL, Jr. Time course characteristics of acute tolerance development to continuously infused alfentanil in rats. *Anesth Analg* 1996; 83(3): 600-605.
- Kitahara M, Kojima K, Hanada M, Kuriyama Y and Ohmura A. [Effectiveness of oral tramadol hydrochloride for chronic non-malignant pain]. *Masui* 2009; 58(8): 971-975.
- Kitchen HA, A.L.; Bittle, J.L.; Mcpherson, C.W.; Morton, D.B.; Pakes, S.P.; Rollin, B.; Rowan, A.N.; Sechzer, J.A.; Vanderlip, J.E.; Will, J.A.; Clark, A.S.; Gloyd, J.S. Panel report on the Colloquium on Recognition and Alleviation of Animal Pain and Distress. *J Am Vet Med Assoc* 1987; 191(10): 1186-1191.
- Ko JC, Abbo LA, Weil AB, Johnson BM, Inoue T and Payton ME. Effect of orally administered tramadol alone or with an intravenously administered opioid on minimum alveolar concentration of sevoflurane in cats. *J Am Vet Med Assoc* 2008; 232(12): 1834-1840.
- Ko JC, Lange DN, Mandsager RE, Payton ME, Bowen C, Kamata A and Kuo WC. Effects of butorphanol and carprofen on the minimal alveolar concentration of isoflurane in dogs. *J Am Vet Med Assoc* 2000; 217(7): 1025-1028.
- Kocevski D and Tvrdeic A. The effect of repeated daily measurements on paw withdrawal latencies in Hargreaves test. *Coll Antropol* 2008; 32 Suppl 1: 93-97.
- Koch T and Holtt V. Role of receptor internalization in opioid tolerance and dependence. *Pharmacol Ther* 2008; 117(2): 199-206.
- Kohn DF, Martin TE, Foley PL, Morris TH, Swindle MM, Vogler GA and Wixson SK. Public statement: guidelines for the assessment and management of pain in

- rodents and rabbits. *J Am Assoc Lab Anim Sci* 2007; 46(2): 97-108.
- Konarska M, Stewart RE and McCarty R. Habituation of sympathetic-adrenal medullary responses following exposure to chronic intermittent stress. *Physiol Behav* 1989; 45(2): 255-261.
- Koppert W, Ihmsen H, Korber N, Wehrfritz A, Sittl R, Schmelz M and Schuttler J. Different profiles of buprenorphine-induced analgesia and antihyperalgesia in a human pain model. *Pain* 2005; 118(1-2): 15-22.
- Koppert W and Schmelz M. The impact of opioid-induced hyperalgesia for postoperative pain. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol* 2007; 21(1): 65-83.
- Koppert W, Sittl R, Scheuber K, Alsheimer M, Schmelz M and Schuttler J. Differential modulation of remifentanil-induced analgesia and postinfusion hyperalgesia by S-ketamine and clonidine in humans. *Anesthesiology* 2003; 99(1): 152-159.
- Kosson D, Klinowiecka A, Kosson P, Bonney I, Carr DB, Mayzner-Zawadzka E and Lipkowski AW. Intrathecal antinociceptive interaction between the NMDA antagonist ketamine and the opioids, morphine and buprenorphine. *Eur J Pain* 2008; 12(5): 611-616.
- Lake CL, DiFazio CA, Moscicki JC and Engle JS. Reduction in halothane MAC: comparison of morphine and alfentanil. *Anesth Analg* 1985; 64(8): 807-810.
- Lang E, Kapila A, Shlugman D, Hoke JF, Sebel PS and Glass PS. Reduction of isoflurane minimal alveolar concentration by remifentanil. *Anesthesiology* 1996; 85(4): 721-728.
- Lanier RK, Lofwall MR, Mintzer MZ, Bigelow GE and Strain EC. Physical dependence potential of daily tramadol dosing in humans. *Psychopharmacology (Berl)* 2010; 211(4): 457-466.
- Laulin JP, Celerier E, Larcher A, Le Moal M and Simonnet G. Opiate tolerance to daily heroin administration: an apparent phenomenon associated with enhanced pain sensitivity. *Neuroscience* 1999; 89(3): 631-636.
- Laulin JP, Maurette P, Corcuff JB, Rivat C, Chauvin M and Simonnet G. The role of ketamine in preventing fentanyl-induced hyperalgesia and subsequent acute morphine tolerance. *Anesth Analg* 2002; 94(5): 1263-1269, table of contents.
- Lee LH, Irwin MG and Lui SK. Intraoperative remifentanil infusion does not increase postoperative opioid consumption compared with 70% nitrous oxide. *Anesthesiology* 2005; 102(2): 398-402.
- Lee M, Silverman SM, Hansen H, Patel VB and Manchikanti L. A comprehensive review of opioid-induced hyperalgesia. *Pain physician* 2011; 14(2): 145-161.
- Liang D, Shi X, Qiao Y, Angst MS, Yeomans DC and Clark JD. Chronic morphine administration enhances nociceptive sensitivity and local cytokine production after incision. *Mol Pain* 2008; 4: 7.
- Liou JT, Liu FC, Mao CC, Lai YS and Day YJ. Inflammation confers dual effects on nociceptive processing in chronic neuropathic pain model. *Anesthesiology* 2011; 114(3): 660-672.
- Lipman AG. Clinically relevant differences among the opioid analgesics. *Am J Hosp*

- Pharm 1990; 47(8 Suppl): S7-13.
- Luginbuhl M, Gerber A, Schnider TW, Petersen-Felix S, Arendt-Nielsen L and Curatolo M. Modulation of remifentanil-induced analgesia, hyperalgesia, and tolerance by small-dose ketamine in humans. *Anesth Analg* 2003; 96(3): 726-732, table of contents.
- Mama KR, Wagner AE, Parker DA, Hellyer PW and Gaynor JS. Determination of the minimum alveolar concentration of isoflurane in llamas. *Vet Surg* 1999; 28(2): 121-125.
- Mao J. Opioid-induced abnormal pain sensitivity: implications in clinical opioid therapy. *Pain* 2002; 100(3): 213-217.
- Mao J, Price DD and Mayer DJ. Thermal hyperalgesia in association with the development of morphine tolerance in rats: roles of excitatory amino acid receptors and protein kinase C. *J Neurosci* 1994; 14(4): 2301-2312.
- Mao J, Sung B, Ji RR and Lim G. Chronic morphine induces downregulation of spinal glutamate transporters: implications in morphine tolerance and abnormal pain sensitivity. *J Neurosci* 2002; 22(18): 8312-8323.
- Mao J, Sung B, Ji RR and Lim G. Neuronal apoptosis associated with morphine tolerance: evidence for an opioid-induced neurotoxic mechanism. *J Neurosci* 2002; 22(17): 7650-7661.
- Marek P, Ben-Eliyahu S, Gold M and Liebeskind JC. Excitatory amino acid antagonists (kynurenic acid and MK-801) attenuate the development of morphine tolerance in the rat. *Brain Res* 1991; 547(1): 77-81.
- Matthews NS and Lindsay SL. Effect of low-dose butorphanol on halothane minimum alveolar concentration in ponies. *Equine Vet J* 1990; 22(5): 325-327.
- McKeon GP, Pacharinsak C, Long CT, Howard AM, Jampachaisri K, Yeomans DC and Felt SA. Analgesic effects of tramadol, tramadol-gabapentin, and buprenorphine in an incisional model of pain in rats (*Rattus norvegicus*). *J Am Assoc Lab Anim Sci* 2011; 50(2): 192-197.
- Mercadante S. Opioid rotation for cancer pain: rationale and clinical aspects. *Cancer* 1999; 86(9): 1856-1866.
- Mercadante S and Arcuri E. Hyperalgesia and opioid switching. *Am J Hosp Palliat Care* 2005; 22(4): 291-294.
- Miranda HF and Pinardi G. Antinociception, tolerance, and physical dependence comparison between morphine and tramadol. *Pharmacol Biochem Behav* 1998; 61(4): 357-360.
- Mitra S. Opioid-induced hyperalgesia: pathophysiology and clinical implications. *J Opioid Manag* 2008; 4(3): 123-130.
- Mongin G. Tramadol extended-release formulations in the management of pain due to osteoarthritis. *Expert Rev Neurother* 2007; 7(12): 1775-1784.
- Monteiro ER, Teixeira-Neto FJ, Campagnol D, Alvaides RK, Garofalo NA and Matsubara LM. Effects of remifentanil on the minimum alveolar concentration of isoflurane in dogs. *Am J Vet Res* 2010; 71(2): 150-156.
- Morgan D and Picker MJ. Contribution of individual differences to discriminative stimulus, antinociceptive and rate-

- decreasing effects of opioids: importance of the drug's relative intrinsic efficacy at the mu receptor. *Behav Pharmacol* 1996; 7(3): 261-284.
- Morita T, Takigawa C, Onishi H, Tajima T, Tani K, Matsubara T, Miyoshi I, Ikenaga M, Akechi T and Uchitomi Y. Opioid rotation from morphine to fentanyl in delirious cancer patients: an open-label trial. *J Pain Symptom Manage* 2005; 30(1): 96-103.
- Murphy MR and Hug CC, Jr. The anesthetic potency of fentanyl in terms of its reduction of enflurane MAC. *Anesthesiology* 1982; 57(6): 485-488.
- Murphy MR and Hug CC, Jr. The enflurane sparing effect of morphine, butorphanol, and nalbuphine. *Anesthesiology* 1982; 57(6): 489-492.
- Nikenina EV and Abramov YB. Study of the cognitive component of nociception by the tail flick method. *Bull Exp Biol Med* 2009; 147(3): 378-380.
- Parasrampur R, Vuppugalla R, Elliott K and Mehvar R. Route-dependent stereoselective pharmacokinetics of tramadol and its active O-demethylated metabolite in rats. *Chirality* 2007; 19(3): 190-196.
- Pasternak GW. Insights into mu opioid pharmacology the role of mu opioid receptor subtypes. *Life Sci* 2001; 68(19-20): 2213-2219.
- Pick CG, Peter Y, Schreiber S and Weizman R. Pharmacological characterization of buprenorphine, a mixed agonist-antagonist with kappa 3 analgesia. *Brain Res* 1997; 744(1): 41-46.
- Pradhan AA, Becker JA, Scherrer G, Tryoen-Toth P, Filliol D, Matifas A, Massotte D, Gaveriaux-Ruff C and Kieffer BL. In vivo delta opioid receptor internalization controls behavioral effects of agonists. *PLoS One* 2009; 4(5): e5425.
- Quandt JE, Raffae MR and Robinson EP. Butorphanol does not reduce the minimum alveolar concentration of halothane in dogs. *Vet Surg* 1994; 23(2): 156-159.
- Quasha AL, Eger EI, 2nd and Tinker JH. Determination and applications of MAC. *Anesthesiology* 1980; 53(4): 315-334.
- Raffa RB. Basic pharmacology relevant to drug abuse assessment: tramadol as example. *J Clin Pharm Ther* 2008; 33(2): 101-108.
- Raffa RB, Friderichs E, Reimann W, Shank RP, Codd EE, Vaught JL, Jacoby HI and Selve N. Complementary and synergistic antinociceptive interaction between the enantiomers of tramadol. *J Pharmacol Exp Ther* 1993; 267(1): 331-340.
- Rahimi SY, Alleyne CH, Vernier E, Witcher MR and Vender JR. Postoperative pain management with tramadol after craniotomy: evaluation and cost analysis. *J Neurosurg* 2010; 112(2): 268-272.
- Randall LO and Selitto JJ. A method for measurement of analgesic activity on inflamed tissue. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 1957; 111(4): 409-419.
- Ribezzi M, Di Venosa N, Nicoletti E, Lauter E and Giuliani R. The association of tramadol and morphine in the treatment of acute postoperative pain. *Minerva Anestesiol* 2011; 77(2): 239; author reply 240-231.

- Romero A, Miranda HF and Puig MM. Antinociceptive effects of morphine, fentanyl, tramadol and their combination, in morphine-tolerant mice. *Pharmacol Biochem Behav* 2010; 97(2): 363-369.
- Sarton E, Teppema LJ, Olievier C, Nieuwenhuijs D, Matthes HW, Kieffer BL and Dahan A. The involvement of the mu-opioid receptor in ketamine-induced respiratory depression and antinociception. *Anesth Analg* 2001; 93(6): 1495-1500, table of contents.
- Sawaddiruk P. Tramadol hydrochloride/acetaminophen combination for the relief of acute pain. *Drugs Today (Barc)* 2011; 47(10): 763-772.
- Schiller PW, Weltrowska G, Berezowska I, Nguyen TM, Wilkes BC, Lemieux C and Chung NN. The TIPP opioid peptide family: development of delta antagonists, delta agonists, and mixed mu agonist/delta antagonists. *Biopolymers* 1999; 51(6): 411-425.
- Seddighi MR, Egger CM, Rohrbach BW, Cox SK and Doherty TJ. Effects of tramadol on the minimum alveolar concentration of sevoflurane in dogs. *Vet Anaesth Analg* 2009; 36(4): 334-340.
- Singler B, Troster A, Manering N, Schuttler J and Koppert W. Modulation of remifentanil-induced postinfusion hyperalgesia by propofol. *Anesth Analg* 2007; 104(6): 1397-1403, table of contents.
- Slatkin NE. Opioid switching and rotation in primary care: implementation and clinical utility. *Curr Med Res Opin* 2009; 25(9): 2133-2150.
- Smith MA, Cole KT, Gergans SR, Iordanou JC, Lyle MA and Schmidt KT. Effects of environmental enrichment on sensitivity to mu, kappa, and mixed-action opioids in female rats. *Physiol Behav* 2008; 94(4): 563-568.
- Soares LG. Methadone for cancer pain: what have we learned from clinical studies? *Am J Hosp Palliat Care* 2005; 22(3): 223-227.
- Steffey EP, Baggot JD, Eisele JH, Willits N, Woliner MJ, Jarvis KA, Elliott AR and Tagawa M. Morphine-isoflurane interaction in dogs, swine and rhesus monkeys. *J Vet Pharmacol Ther* 1994; 17(3): 202-210.
- Stokes EL, Flecknell PA and Richardson CA. Reported analgesic and anaesthetic administration to rodents undergoing experimental surgical procedures. *Lab Anim* 2009; 43(2): 149-154.
- Subramaniam K, Subramaniam B and Steinbrook RA. Ketamine as adjuvant analgesic to opioids: a quantitative and qualitative systematic review. *Anesth Analg* 2004; 99(2): 482-495, table of contents.
- Tiseo PJ and Inturrisi CE. Attenuation and reversal of morphine tolerance by the competitive N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, LY274614. *J Pharmacol Exp Ther* 1993; 264(3): 1090-1096.
- Tiwari V, Kuhad A and Chopra K. *Emblica officinalis* Corrects Functional, Biochemical and Molecular Deficits in Experimental Diabetic Neuropathy by Targeting the Oxido-nitrosative Stress Mediated Inflammatory Cascade. *Phytother Res* 2011.
- Troster A, Sittl R, Singler B, Schmelz M, Schuttler J and Koppert W. Modulation of remifentanil-induced analgesia and

- postinfusion hyperalgesia by parecoxib in humans. *Anesthesiology* 2006; 105(5): 1016-1023.
- Trujillo KA and Akil H. Inhibition of morphine tolerance and dependence by the NMDA receptor antagonist MK-801. *Science* 1991; 251(4989): 85-87.
- Tsai YC, Sung YH, Chang PJ, Kang FC and Chu KS. Tramadol relieves thermal hyperalgesia in rats with chronic constriction injury of the sciatic nerve. *Fundam Clin Pharmacol* 2000; 14(4): 335-340.
- Umukoro S and Olugbemide AS. Antinociceptive effects of methyl jasmonate in experimental animals. *J Nat Med* 2011; 65(3-4): 466-470.
- Valverde A, Morey TE, Hernandez J and Davies W. Validation of several types of noxious stimuli for use in determining the minimum alveolar concentration for inhalation anesthetics in dogs and rabbits. *Am J Vet Res* 2003; 64(8): 957-962.
- Van Elstraete AC, Sitbon P, Mazoit JX and Benhamou D. Gabapentin prevents delayed and long-lasting hyperalgesia induced by fentanyl in rats. *Anesthesiology* 2008; 108(3): 484-494.
- Van Elstraete AC, Sitbon P, Trabold F, Mazoit JX and Benhamou D. A single dose of intrathecal morphine in rats induces long-lasting hyperalgesia: the protective effect of prior administration of ketamine. *Anesth Analg* 2005; 101(6): 1750-1756.
- Vanderah TW, Gardell LR, Burgess SE, Ibrahim M, Dogrul A, Zhong CM, Zhang ET, Malan TP, Jr., Ossipov MH, Lai J and Porreca F. Dynorphin promotes abnormal pain and spinal opioid antinociceptive tolerance. *J Neurosci* 2000; 20(18): 7074-7079.
- Vanderah TW, Ossipov MH, Lai J, Malan TP, Jr. and Porreca F. Mechanisms of opioid-induced pain and antinociceptive tolerance: descending facilitation and spinal dynorphin. *Pain* 2001; 92(1-2): 5-9.
- Vaught JL and Takemori AE. Differential effects of leucine and methionine enkephalin on morphine-induced analgesia, acute tolerance and dependence. *J Pharmacol Exp Ther* 1979; 208(1): 86-90.
- Vissers KC. The clinical challenge of chronic neuropathic pain. *Disabil Rehabil* 2006; 28(6): 343-349.
- Vissers KC, Besse K, Hans G, Devulder J and Morlion B. Opioid rotation in the management of chronic pain: where is the evidence? *Pain Pract* 2010; 10(2): 85-93.
- von Zastrow M. Mechanisms regulating membrane trafficking of G protein-coupled receptors in the endocytic pathway. *Life Sci* 2003; 74(2-3): 217-224.
- Wala EP and Holtman JR, Jr. Buprenorphine-induced hyperalgesia in the rat. *Eur J Pharmacol* 2011; 651(1-3): 89-95.
- Wang F, Shen X, Xu S and Liu Y. Preoperative tramadol combined with postoperative small-dose tramadol infusion after total abdominal hysterectomy: a double-blind, randomized, controlled trial. *Pharmacol Rep* 2009; 61(6): 1198-1205.
- Webb AR, Skinner BS, Leong S, Kolawole H, Crofts T, Taverner M and Burn SJ.

- The addition of a small-dose ketamine infusion to tramadol for postoperative analgesia: a double-blinded, placebo-controlled, randomized trial after abdominal surgery. *Anesth Analg* 2007; 104(4): 912-917.
- Wilson NM, Jung H, Ripsch MS, Miller RJ and White FA. CXCR4 signaling mediates morphine-induced tactile hyperalgesia. *Brain Behav Immun* 2011; 25(3): 565-573.
- Yamashita K, Okano Y, Yamashita M, Umar MA, Kushiro T and Muir WW. Effects of carprofen and meloxicam with or without butorphanol on the minimum alveolar concentration of sevoflurane in dogs. *J Vet Med Sci* 2008; 70(1): 29-35.
- Yoo KY, Jeong CW, Kim SJ, Jeong ST, Kim WM, Lee HK, Oh KJ, Lee JU, Shin MH and Chung SS. Remifentanyl decreases sevoflurane requirements to block autonomic hyperreflexia during transurethral litholapaxy in patients with high complete spinal cord injury. *Anesth Analg* 2011; 112(1): 191-197.
- Zhao C, Tall JM, Meyer RA and Raja SN. Antiallodynic effects of systemic and intrathecal morphine in the spared nerve injury model of neuropathic pain in rats. *Anesthesiology* 2004; 100(4): 905-911.
- Zhao WJ, Nie HZ, Gao ZY, Zhao Q and Yin M. WITHDRAWN: Spinal d-amino acid oxidase contributes to the pathogenesis of hyperalgesia in the rat formalin test. *Neuroscience* 2009.
- Zimmerman L, Duncan K, Pozehl B and Schmitz R. Pain descriptors used by patients with cancer. *Oncol Nurs Forum* 1987; 14(4): 67-71.
- Zwijnenberg RJ, C LdR, Pollet RA and Muir WW. Effects of perzinfotel, butorphanol tartrate, and a butorphanol-perzinfotel combination on the minimum alveolar concentration of isoflurane in cats. *Am J Vet Res* 2010; 71(11): 1270-1276.

Comunicación de aceptación de publicación.

Editor: Colin Dunn
2010 Impact Factor: 1.282
Rank: 42/145 in Veterinary Sciences
Frequency: Quarterly



De: onbehalfof+LAeditorial+rsm.ac.uk@manuscriptcentral.com [mailto:onbehalfof+LAeditorial+rsm.ac.uk@manuscriptcentral.com] En nombre de LAeditorial@rsm.ac.uk

Enviado el: lunes, 26 de marzo de 2012 0:07

Para: iagsegura@vet.ucm.es

Asunto: Laboratory Animals - Decision on Manuscript ID LA-10-066.R5

25-Mar-2012

Dear Prof. Gomez de Segura:

It is a pleasure to accept your manuscript LA-10-066.R5, entitled "Reduction of the sevoflurane MAC induced by methadone, tramadol, butorphanol, and morphine in rats", for publication in Laboratory Animals. Thank you for your fine contribution. On behalf of the Editors of Laboratory Animals, we look forward to your continued contributions to the Journal.

This paper will be sent to the Production Team for processing. You should receive proofs of your article within eight weeks. Once corrections have been made and the proofs approved by the Production Team, the article will be sent for Online First publication. This is a new service which allows articles to be published online before being printed in an issue of the journal. Online First can be found on the Laboratory Animals website at www.la.rsmjournals.com/onlinefirst.dtl.

Best wishes

Laboratory Animals Administrator
Royal Society of Medicine Press
1 Wimpole Street, London W1G 0AE, UK
www.rsmjournals.com/la.htm
