

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE VETERINARIA**  
**Departamento de Medicina y Cirugía Animal**



**TOLERANCIA AGUDA E HIPERALGESIA INDUCIDA  
POR OPIOIDES DURANTE LA ANESTESIA  
INHALATORIA EN LA RATA**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR  
PRESENTADA POR**

Delia Aguado Domínguez

Bajo la dirección del doctor

Ignacio Álvarez Gómez de Segura

**MADRID, 2013**

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE VETERINARIA**  
**Departamento de Medicina y Cirugía Animal**



# **TOLERANCIA AGUDA E HIPERALGESIA INDUCIDA POR OPIOIDES DURANTE LA ANESTESIA INHALATORIA EN LA RATA**

TESIS DOCTORAL

**Delia Aguado Domínguez**

Bajo la dirección de  
**Ignacio Álvarez Gómez de Segura**

Madrid, 2013



D. Ignacio Álvarez Gómez de Segura, con D.N.I 50804138J, 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 “TOLERANCIA AGUDA E HIPERALGESIA INDUCIDA POR OPIOIDES DURANTE LA ANESTESIA INHALATORIA EN LA RATA”, ha sido realizada bajo su dirección y supervisión por D<sup>a</sup>. Delia Aguado Domínguez.

Revisado el presente trabajo, considera que tiene la debida calidad para su presentación y defensa.

En Madrid, a 15 de octubre de 2012,

Ignacio Álvarez Gómez de Segura



# **AGRADECIMIENTOS**



Me gustaría que estas líneas sirvieran para expresar mi más sincero agradecimiento a todas aquellas personas que con su ayuda han colaborado en la realización del presente trabajo.

A Ignacio Álvarez Gómez de Segura, director de esta investigación, por haber confiado en mí, por la orientación, el seguimiento y la supervisión recibida todos estos años.

A mis padres y toda mi familia que ha estado apoyándome siempre en todos estos años, compartiendo mis alegrías y mis penas.

A Vicen, al cual esta tesis le ha robado tantas horas, que entendió mis prolongadas ausencias y mis malos momentos y a pesar de ello me ha apoyado siempre.

A Mariana llegada desde Brasil, con quien hemos pasado innumerables horas trabajando codo con codo y compartiendo todos nuestros éxitos y fracasos experimentales.

A Javier, que me inició en este camino mientras le ayudaba con sus primeras ratas para terminar haciendo mi propia tesis con el grupo. Con quien he compartido tantas palmeras de chocolate y hemos visto crecer sobre nuestras cabezas las cuatro torres de Madrid.

Al equipo de cirugía experimental: a Carlota Largo, a las auxiliares: Toñi e Isabel y a los celadores: Pablo, Pedro y Juan, que siempre han estado ahí dándome no solo todo el apoyo logístico necesario, sino también su más sincera amistad y cariño.

Al resto de compañeras del Hospital La Paz que me acogieron estos años con mucho cariño haciéndome sentir dentro el edificio como en mi propia casa: Lupe, Shere, Silvia, María, Berta, Merce, Jaime, etc. Y sobre todo a Julia, cuya vida no la dejó llegar a alcanzar sus propios éxitos, me gustaría compartir los míos con ella, esté donde esté.

A mis amigas de la facultad, en especial a Elena y Laura, por estar siempre ahí y también a todas mis amigas de anestesia con quien hemos compartido tantas SEAAV y otros congresos: Danae, María, Cris y Ely. Un agradecimiento muy especial a Susana con quien hemos compartido tantos *taper* a deshoras y tantas terapéuticas galletas de chocolate. Porque ha sido mi gran amiga y aliada en el hospital en todo este tiempo.

A Laura, por su ayuda en todos los trámites de la tesis, y a Rafa por sus buenos consejos.

## VIII

A Yanko, que nos dejó el año pasado, y pese a que mucha gente no lo entenderá ha sido el gran apoyo de mi vida estos estos años de carrera y doctorado.

A todos ellos, ¡¡muchas gracias!!



## **ABREVIATURAS**



---

### Abreviaturas empleadas en el texto

<b>ADME</b>	Asta dorsal de la médula espinal
<b>AINE</b>	Antiinflamatorio no esteroideo
<b>AMPc</b>	Adenosin monofosfato cíclico
<b>CAM</b>	Concentración alveolar mínima
<b>COX</b>	Ciclooxigenasa
<b>GABA</b>	Ácido $\gamma$ -aminobutírico
<b>HIO</b>	Hiperalgia inducida por opioides
<b>IL</b>	Interleuquina
<b>LTP</b>	Potenciación a largo plazo de la fuerza sináptica ( <i>Long term potentiation</i> )
<b>MRV</b>	Medula rostroventral
<b>NK</b>	Neuroquinina
<b>NMDA</b>	N-Metil-D-Aspartato
<b>NO</b>	Óxido nítrico
<b>PCA</b>	Analgesia controlada por el paciente ( <i>Patient controlled analgesia</i> )
<b>PK</b>	Fosfoquinasa
<b>PL</b>	Fosfolipasa
<b>SNC</b>	Sistema nervioso central
<b>TAO</b>	Tolerancia aguda a opioides
<b>TLR</b>	Receptor tipo Toll ( <i>Toll like receptor</i> )
<b>TNF</b>	Factor de necrosis tumoral ( <i>Tumor necrosis factor</i> )

---





# ÍNDICE



AGRADECIMIENTOS.....	V
ABREVIATURAS.....	IX
ÍNDICE.....	XIII
RESUMEN.....	1
SUMMARY.....	5
INTRODUCCIÓN.....	9
1.1 Anestesia y analgesia intraoperatoria.....	11
1.2 Fisiología del dolor.....	12
1.2.1 Conceptos y definiciones.....	12
1.2.2 Transmisión nociceptiva.....	13
1.2.3 Modulación nociceptiva.....	16
1.2.4 Fisiopatología de la sensibilización central y periférica: hiperalgesia.....	18
1.3 Hiperalgesia y tolerancia inducida a opioides.....	21
1.3.1 Conceptos y definiciones.....	21
1.3.2 Mecanismos de acción de la hiperalgesia y la tolerancia inducida por opioides.....	25
1.3.3 Evidencias de la presencia de tolerancia e hiperalgesia inducida por opioides.....	33
1.3.4 Tratamientos preventivos y/o curativos de la tolerancia e hiperalgesia.....	35
1.4 Concentración Alveolar Mínima (CAM).....	40
1.4.1 Definición e historia de la CAM.....	40
1.4.2 Usos y limitaciones de la CAM.....	41
1.4.3 Determinación de la CAM.....	43
1.4.4 Mecanismo de acción: anestésicos inhalatorios e inmovilidad.....	44
1.4.5 Factores que afectan a la CAM.....	46
OBJETIVOS.....	51
MATERIAL Y MÉTODOS.....	55
3.1 Animales.....	57
3.2 Anestesia, instrumentación y monitorización.....	57
3.2.1 Inducción a la anestesia.....	57
3.2.2 Intubación endotraqueal.....	58
3.2.3 Cateterización de arteria carótida.....	59
3.2.4 Monitorización.....	60
3.2.5 Administración de remifentanilo.....	61
3.2.6 Administración de otros fármacos.....	62
3.3 Determinación de la CAM.....	64

3.4	Diseño experimental .....	65
3.4.1	Tolerancia aguda .....	65
3.4.2	Tolerancia vs. hiperalgesia .....	66
3.4.3	Ketamina .....	66
3.4.4	Gabapentina .....	68
3.4.5	Amitriptilina.....	69
3.4.6	Minociclina .....	70
3.4.7	Maropitant .....	71
3.4.8	Naloxona .....	71
3.5	Diseño estadístico .....	73
3.5.1	Evaluación del tamaño muestral.....	73
3.5.2	Aleatorización de los animales.....	73
3.5.3	Comparación de medias (valores de CAM y reducciones de CAM) .....	73
<b>RESULTADOS</b> .....		75
4.1	Tolerancia aguda.....	77
4.2	Tolerancia vs. hiperalgesia .....	79
4.3	Ketamina.....	80
4.4	Gabapentina.....	84
4.5	Amitriptilina .....	87
4.6	Minociclina.....	88
4.7	Maropitant.....	90
4.8	Naloxona.....	91
<b>DISCUSIÓN</b> .....		97
5.1	Tolerancia aguda.....	99
5.2	Ketamina.....	101
5.3	Gabapentina .....	103
5.4	Amitriptilina .....	106
5.5	Minociclina.....	107
5.6	Maropitant.....	108
5.7	Naloxona.....	109
5.8	Limitaciones del estudio .....	112
<b>CONCLUSIONES</b> .....		115
<b>CONCLUSIONS</b> .....		119
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....		123
<b>PUBLICACIONES Y TRABAJOS EN FASE DE REVISIÓN</b> .....		141

## RESUMEN



Los opioides son actualmente los fármacos analgésicos más empleados para el tratamiento del dolor severo a moderado, pero presentan el inconveniente de desarrollar efectos de tolerancia e hiperalgesia inducida por opioides (HIO). Este efecto se observa como un aumento del dolor y las necesidades de analgésicos postoperatorios en aquellos pacientes que recibieron opioides como el remifentanilo en el periodo intraoperatorio. Además, se ha descrito en voluntarios que el efecto analgésico de una infusión de remifentanilo disminuye a la mitad en solo 90 minutos evidenciando la existencia también de un efecto de tolerancia aguda a opioides (TAO).

Nuestra hipótesis fue que la TAO podría ser observada intraoperatoriamente mediante una disminución en la reducción de la concentración alveolar mínima (CAM) de los anestésicos inhalatorios producida por el opioide remifentanilo. Por tanto, los objetivos del estudio fueron determinar la presencia de TAO asociada a una infusión continua de remifentanilo durante la anestesia inhalatoria limitando la reducción de la CAM de sevoflurano producida por el opioide y, de ser así, si podría compensarse mediante un aumento de la dosis de remifentanilo. Además, se quiso determinar si fármacos como la ketamina, gabapentina, amitriptilina, minociclina, maropitant y naloxona pueden prevenir o bloquear el desarrollo de TAO al remifentanilo y si, además, estos fármacos pueden reducir la CAM de forma aislada o asociados a remifentanilo, potenciando su efecto. Para finalizar, el último objetivo fue determinar si las dosis ultra-bajas de naloxona administradas conjuntamente con el remifentanilo podrían inhibir el desarrollo de tolerancia retardada (días) y de HIO asociada a la administración del remifentanilo.

Para ello se emplearon 307 ratas Wistar macho adultas que fueron anestesiadas con sevoflurano vaporizado en oxígeno, intubadas traquealmente y monitorizadas. En todos los casos se determinó la CAM basal y, al menos, dos veces más después del remifentanilo o el tratamiento correspondiente. La reducción de la CAM entre estas dos últimas medidas se interpretó como un efecto de TAO. La CAM fue determinada mediante la respuesta al pinzamiento de la cola y valorando la concentración de sevoflurano espirado a través de muestras de gas intratraqueales. Para la determinación de la hiperalgesia se evaluaron los umbrales mecánicos nociceptivos (test de von Frey) antes de la anestesia. Para evaluar la aparición de tolerancia retardada se comparó la reducción de la CAM producida por remifentanilo y la determinada posteriormente en días no consecutivos.

La efectividad del efecto reductor de la CAM de una infusión de remifentanilo bajo anestesia inhalatoria disminuye a corto plazo (90 minutos o menos), pero aumentando las dosis de remifentanilo es posible volver a alcanzar la reducción inicial de la CAM. Se ha observado un efecto subaditivo del remifentanilo con la ketamina, probablemente aditivo con la gabapentina, amitriptilina, minociclina y maropitant mientras que con la naloxona a dosis ultra-bajas no produjo ningún efecto adicional en la reducción de la CAM de sevoflurano. Además, todos estos fármacos, excepto la naloxona, redujeron la CAM administrados aisladamente. Cuando se asociaron a remifentanilo, solo la gabapentina fue capaz de bloquear el efecto de TAO asociado a la administración del opioide bajo anestesia inhalatoria. La naloxona a dosis ultra-bajas previno el desarrollo de hiperalgesia inducida por remifentanilo así como el aumento de la CAM asociado a ella.

En conclusión, la aparición de TAO por remifentanilo disminuye a corto plazo, aproximadamente a la mitad, la reducción de la CAM de sevoflurano, de forma relevante clínicamente pudiendo ser compensado con un aumento de la dosis del opioide o la administración preventiva de gabapentina. La hiperalgesia asociada a la administración del opioides puede bloquearse mediante la coadministración de dosis ultra-bajas de naloxona.

## **| SUMMARY**



Opioids are the most widely used analgesic drugs for the treatment of moderate to severe pain, but their efficacy may be limited by the development of tolerance and opioid induced hyperalgesia (OIH). These effects are characterized by increased postoperative pain and opioid consumption in patients receiving opioids such as remifentanil in the intraoperative period. In addition, acute opioid tolerance (AOT) to remifentanil was also observed in healthy volunteers leading to a decrease in the analgesic effect produced by this opioid in only 90 minutes following its administration.

Our hypothesis was that AOT could be observed in the intraoperative period as a decrease in the minimum alveolar concentration (MAC) reduction of the inhalant anaesthetics produced by remifentanil. Therefore, the aim of this study was to determine if AOT associated to a remifentanil infusion may develop during inhalant anaesthesia and limit the opioid-induced reduction in the MAC for inhalant anaesthetics. This effect might be blocked by increasing the remifentanil dose. Besides, we wanted to determine if the drugs ketamine, gabapentin, amitriptyline, minocycline, maropitant and naloxone may prevent or block remifentanil AOT but also their ability to reduce the MAC alone or associated with remifentanil, potentiating the MAC sparing effect of the opioid. Finally, an additional aim was to determine whether an ultra-low dose of naloxone combined with remifentanil may blunt or block the delayed tolerance (days) and OIH produced by remifentanil.

Male adult Wistar rats (n=307) were employed. Animals were anaesthetised with sevoflurane in oxygen, endotracheally intubated and monitored. In every animal, baseline sevoflurane MAC was determined and at two time intervals after the remifentanil infusion or the corresponding drug treatment. Once the initial MAC reduction produced by the opioid was ascertained, a subsequent lower degree of MAC reduction was considered an AOT effect. The sevoflurane MAC was determined from alveolar gas samples at the time of tail clamp. Hyperalgesia was evaluated with mechanical nociceptive thresholds using von Frey filaments in conscious animals. Delayed tolerance was determined by comparing baseline MAC reduction by remifentanil with MAC reduction in non-consecutive days.

Remifentanyl MAC reduction was rapidly blunted in the short term, since a significant reduction was observed some 90 minutes or less after beginning the remifentanyl infusion. However, by increasing the remifentanyl dose the initial MAC reduction was maintained.

Remifentanyl produced a subadditive effect when combined with ketamine, possibly an additive effect with gabapentin, amitriptyline, minocycline and maropitant whereas an ultra-low dose of naloxone did not produce any additional effect on MAC reduction. Furthermore, all these drugs, except naloxone, reduced MAC administered as a single drug. When they were combined with remifentanyl, only gabapentin was able to block the AOT effect associated with the remifentanyl infusion. An ultra-low dose of naloxone blocked remifentanyl-induced hyperalgesia and the MAC increase associated with it.

In conclusion, AOT to remifentanyl blunted the MAC reduction to one half in the short term, which of clinical relevance. This effect was avoided by increasing the remifentanyl dose or with the previous administration of gabapentin. The OIH was blocked by the administration of an ultra-low dose of naloxone.



# INTRODUCCIÓN



---

## 1.1 Anestesia y analgesia intraoperatoria

---

La anestesia general produce la pérdida de consciencia inducida por fármacos caracterizada por una depresión del sistema nervioso central (SNC) controlada y reversible y por analgesia (Heavner 1983). Esta se puede mantener mediante agentes inyectables (p. ej. propofol) o mediante anestesia inhalatoria (p. ej. isoflurano o sevoflurano). Esta última opción es la más utilizada en la mayoría de los casos en medicina humana (Payne *et al.* 2003; Palmer *et al.* 2010) y consta de un gas anestésico volátil que es administrado vaporizado junto a oxígeno a través de la vía aérea del paciente. El sevoflurano es uno de los gases anestésicos más empleado en este momento ya que tiene como principal ventaja que prácticamente no presenta apenas metabolización hepática y que permite realizar modificaciones en la profundidad anestésica de forma rápida y precisa (Patel *et al.* 1996). Sin embargo, al igual que otros anestésicos inhalatorios, tiene también efectos adversos muy importantes como es la depresión cardiovascular dosis dependiente (Malan *et al.* 1995).

La analgesia es también un factor muy importante durante la anestesia para la realización de una cirugía u otro procedimiento doloroso. Los fármacos analgésicos son aquellos que inhiben o previenen la sensación dolorosa en pacientes conscientes. Además bajo anestesia previenen todos los cambios fisiológicos negativos que el dolor produce en el organismo y disminuyen las necesidades de anestésicos inhalatorios, disminuyendo así sus efectos adversos.

En el periodo intraoperatorio los opioides junto a los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) son los fármacos analgésicos más empleados (Payne *et al.* 2003). Estos últimos estarían restringidos a procedimiento quirúrgicos poco dolorosos mientras que para cirugías más dolorosas se utilizan preferentemente los opioides (Palmer *et al.* 2010). Estos fármacos son agonistas de los receptores opioides actuando sobre el SNC y periférico. En las últimas décadas, se ha introducido en la práctica clínica de medicina humana el remifentanilo (Glass 1995) que junto al fentanilo, ambos administrados en infusión continua debido a su corta duración, son los fármacos opioides más empleados en el periodo intraoperatorio (Palmer *et al.* 2010). El remifentanilo tiene la ventaja de poseer un metabolismo muy rápido por esterasas plasmáticas (Glass 1995) que proporciona una rápida recuperación después de su uso, y los inconvenientes derivados de su acción opioide (depresión cardiorrespiratoria, afectación hemodinámica, rigidez muscular,

vómitos y náuseas). Comparando con otros opioides de acción corta (fentanilo, alfentanilo o sufentanilo), el remifentanilo presenta una menor respuesta a estímulos nociceptivos y depresión respiratoria, que requiriese su antagonización por naloxona, aunque por otro lado produce una mayor afectación cardiovascular (bradicardia, hipotensión) asociada a su uso (Komatsu *et al.* 2007). A pesar de ser un excelente fármaco analgésico se han descrito recientemente fenómenos de tolerancia e hiperalgesia manifestados como el aumento del dolor y de las necesidades de analgésicos postoperatorios asociados a su uso (Guignard *et al.* 2000; Komatsu *et al.* 2007).

Actualmente la tendencia más empleada es no limitar toda la analgesia al uso de un único fármaco, si no a utilizar distintos fármacos con diferente mecanismo de acción que sean complementarios y proporcionen una mayor analgesia con una menor dosis de cada uno, disminuyendo por tanto los efectos adversos de cada uno. Esta estrategia se denomina analgesia polimodal e incluye el uso de fármacos como los opioides, los AINEs y otros más novedosos como las dosis bajas de ketamina y los fármacos antiepilépticos o antidepresivos que han demostrado eficacia como fármacos analgésicos (Stahl *et al.* 2009).

---

## 1.2 Fisiología del dolor

---

### 1.2.1 Conceptos y definiciones

El dolor se define como una experiencia sensorial y emocional desagradable asociado con daño tisular real o potencial, o descrito en términos de tal daño (Boyd *et al.* 1994). Según esta definición de la IASP (International Association for the Study of Pain) el dolor y sus derivados requieren un sujeto consciente que sea capaz de expresar dolor.

Los mecanismos moleculares, celulares y sistémicos que conducen al proceso de la información relacionada con el dolor, su amplificación o su depresión son llamados nociceptivos, pronociceptivos y antinociceptivos, respectivamente (Boyd *et al.* 1994). La nocicepción implicaría los fenómenos fisiológicos de transducción, transmisión y modulación del estímulo nociceptivo (Lamont *et al.* 2000). El dolor será por tanto una de las posibles manifestaciones de la nocicep-

ción, aunque hay ciertas ocasiones donde no se pueden observar, p. ej. en pacientes o animales bajo sedación o anestesia. Por tanto, el estímulo nociceptivo será aquel que sea capaz de desencadenar dicho proceso de nocicepción, independientemente de su naturaleza (térmica, química o mecánica).

El dolor se puede clasificar de diferentes formas según el criterio que sea empleado. Según su duración será dolor agudo o crónico (también llamado dolor persistente) (Basbaum *et al.* 2009). Atendiendo a su fisiología se puede clasificar a su vez como dolor nociceptivo cuando es originado por la estimulación de nociceptores (receptores cutáneos o subcutáneos especializados en la detección de estímulos dañinos/nocivos) o dolor neuropático cuando es originado por una lesión o enfermedad en el sistema nervioso somatosensorial (Boyd *et al.* 1994).

La analgesia se puede definir entonces como la ausencia de dolor frente a una estimulación que normalmente produciría dolor (Boyd *et al.* 1994). Si esta disminución del dolor no fuese total la podríamos denominar hipoalgesia (Boyd *et al.* 1994), aunque normalmente el término analgesia es el más empleado en ambos casos.

La hiperalgesia, por el contrario es un aumento de la sensibilidad al dolor en respuesta a un estímulo nociceptivo (Fishbain *et al.* 2009) producida tanto por una disminución en el umbral como por un aumento en la respuesta por encima de su umbral (Sandkuhler 2009). La hiperalgesia puede ser primaria si ocurre en el punto de la lesión, secundaria si es en un área adyacente al sitio de la lesión, o referida si existe tanto dentro del área de lesión tisular como en una zona de la piel alejada del órgano o músculo que está afectado (Sandkuhler 2009). La alodinia es un tipo de hiperalgesia en que existe dolor ocasionado por estímulos que en individuos normales no producirían dolor como pueda ser el tacto (Boyd *et al.* 1994; Sandkuhler 2009).

## 1.2.2 Transmisión nociceptiva

### a) Fibras aferentes primarias: nociceptores

Los nociceptores o fibras aferentes primarias son receptores sensoriales que son capaces de detectar los estímulos térmicos, mecánicos o químicos de un estímulo nocivo, traducirlo y codificarlo (Basbaum *et al.* 2009; Sandkuhler 2009). Los cuerpos celulares de estos nociceptores se localizan en los ganglios de la raíz dorsal o en el ganglio trigémino (según se localicen estos

nociceptores en el cuerpo o en la cara, respectivamente), y tienen un axón periférico y otro central que son bioquímicamente equivalentes (figura 1). Se clasifican según su estructura como fibras A $\alpha$  de diámetro mediano, mielinizadas que median el dolor rápido y bien localizado; y las fibras C, de pequeño calibre, sin mielina que transmiten el dolor lento y pobremente localizado. Según la expresión de diferentes canales les confieren sensibilidad al calor (receptor de potencial transitorio V1 o *TRPV1*), frío (receptor de potencial transitorio M8 o *TRPM8*), medio ácido (canales iónicos sensibles a la acidez o *ASIC*) o irritantes químicos (receptor de potencial transitorio A o *TRPA*). Habría un tercer tipo de fibras nerviosas aferentes, las fibras A $\beta$ , que transmiten el tacto.

La señal nociceptiva transducida por el terminal de la fibra aferente primaria genera un potencial de acción que se propagará por la activación de canales iónicos de sodio, potasio y calcio hasta hacer sinapsis en el asta dorsal de la médula espinal (ADME) (Basbaum *et al.* 2009).

#### b) **Asta dorsal de la médula espinal**

Estos nociceptores o fibras aferentes primarias llegan hasta la sustancia gris del ADME a distintas profundidades (llamadas láminas) según el tipo de nociceptor; así las fibras A $\alpha$  llegan a las láminas I y V mientras que las fibras C se quedan principalmente en la parte más superficial (láminas I y II). Aquí hacen sinapsis con las neuronas de segundo orden, cuyos axones transmiten la información hacia centros superiores. En circunstancias normales en estas sinapsis se producen potenciales postsinápticos de corta duración mediados por transmisores excitatorios como el glutamato que actúan sobre receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) y otros (AMPA/kainato) y por péptidos como la sustancia P que actúa sobre receptores de neuroquina 1 (NK-1) entre otros.

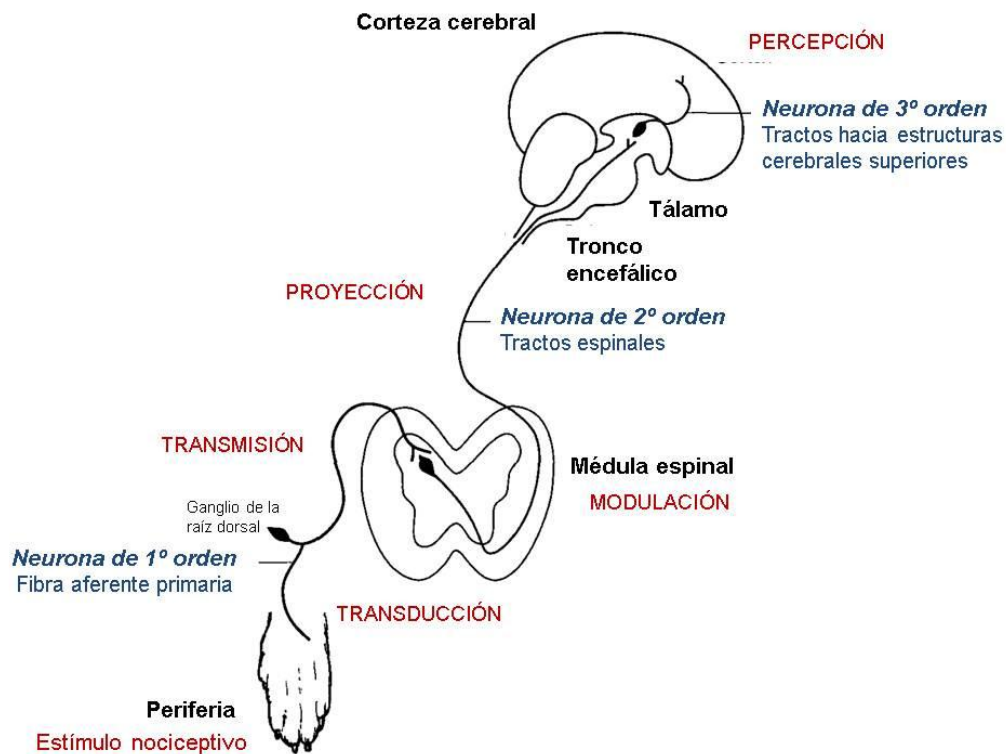
Es en este lugar donde se producen los principales fenómenos de modulación de la información nociceptiva gracias a la interneuronas localizadas en el ADME. Este fenómeno se explicará más adelante (ver apartado 1.2.3).

#### c) **Vías ascendentes y centros supraespinales**

Los estímulos dolorosos se transmiten desde las láminas I y V de la médula espinal hasta las estructuras corticales a través de las vías ascendentes o neuronas de segundo orden, donde

destacan las del tracto espinotalámico y espinoreticulotalámico llegando al tálamo directamente o pasando por el bulbo raquídeo (tronco encefálico) respectivamente.

Por otro lado los estímulos nociceptivos de la zona de la cara viajan por el tracto trigémino pasando por el ganglio trigémino y núcleos craneales, entrando en el tronco encefálico y bajando así por el bulbo raquídeo y cruzando al otro lado hasta llegar al tálamo (Patel 2010). En la corteza cerebral se activan distintas estructuras asociadas a las propiedades discriminativas sensoriales y a los aspectos emocionales del dolor.



**Figura 1.** Representación simplificada del proceso de nocicepción. El estímulo nociceptivo de la periferia activa la neurona aferente primaria que lo transduce (transducción) a señales eléctricas que se transmiten (transmisión) al asta dorsal de la médula espinal. Aquí, se modulan (modulación) antes de dirigirse por la neurona de segundo orden (proyección) al tálamo. En este lugar, la neurona de tercer orden transmite la información hacia la corteza cerebral para su procesamiento final (percepción).

*Adaptado de Gaynor et al., 2009 y Lamont et al., 2000.*

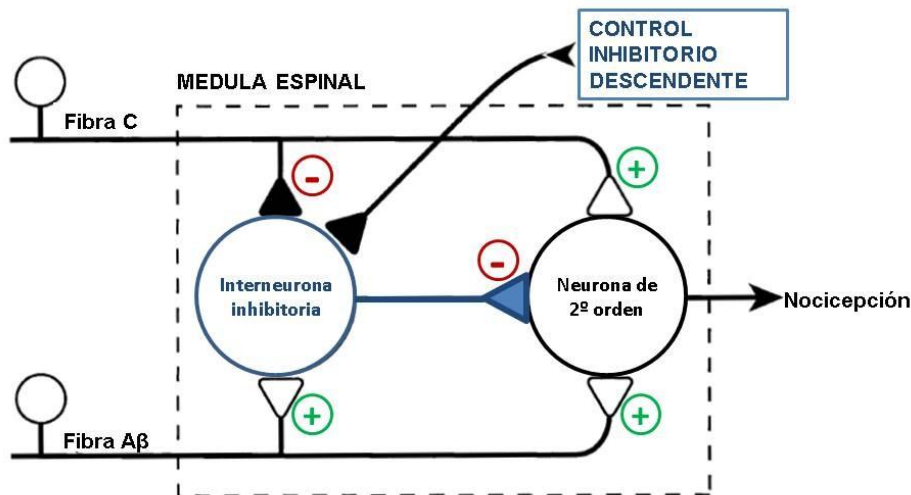
### 1.2.3 Modulación nociceptiva

La información nociceptiva es modulada por un sistema de control de dolor que produce la inhibición de la percepción dolorosa. Sin embargo, la modulación del dolor es bidireccional, es decir, la sensación dolorosa puede ser suprimida o amplificada. De esta forma, los circuitos que modulan el dolor no sólo producen analgesia sino que también son capaces de aumentar la sensibilidad al dolor. Este fenómeno paradójico se explicará más adelante (ver apartado 1.2.4). La modulación nociceptiva actúa a través de tres mecanismos fundamentales: la inhibición segmental, el sistema opioide endógeno y el sistema nervioso inhibitorio descendente.

#### a) Inhibición segmental

En el ADME se localizan una serie de interneuronas que modulan la transmisión de la información, pudiendo ser excitatorias (mediadas por glutamato), inhibitorias (mediadas por ácido  $\gamma$ -aminobutírico, GABA) o fibras descendentes supraespinales tanto excitatorias como inhibitorias.

En circunstancias normales las interneuronas inhibitorias disminuyen o incluso bloquean la transmisión de la información interviniendo en la sinapsis entre las fibras nerviosas aferentes y la células del ADME (teoría del control de la puerta o *gate theory of pain control*; figura 2). Las fibras A $\alpha$  y C que transmiten la sensación dolorosa además de activar las neuronas de segundo orden para transmitir la información hacen sinapsis con estas interneuronas inhibitorias inhibiendo su acción. Mientras que las fibras nerviosas mielinizadas A $\beta$ , asociadas con mecanorreceptores de bajo umbral (p. ej. tacto), activan las neuronas inhibitorias de la médula espinal inhibiendo la transmisión sináptica; explicando p. ej. porque acariciar una zona dañada reduce la sensación dolorosa (Patel 2010).



**Figura 2.** Teoría del control de la puerta o *gate theory of pain control* la modulación del dolor en el SNC. La información de las fibras nerviosas A $\beta$ , que normalmente transmiten información sensorial no dolorosa, activan (+) las neuronas inhibitorias de la médula espinal, inhibiendo a su vez la proyección de la información dolorosa hacia el cerebro. La activación por otro lado de las fibras nerviosas A $\delta$  y C, con información nociceptiva, inhibe (-) estas interneuronas inhibitorias.

Fuente Gaynor et al., 2009.

#### b) Sistema opioide endógeno

Tres grupos de sustancias endógenas constituyen el sistema opioide endógeno: encefalinas, dinorfinas y endorfinas. Todas ellas se unen a los receptores opioides de la periferia, la médula espinal y el cerebro participando en la modulación de la nocicepción mediante la inhibición local de neurotransmisores excitatorios, p. ej. glutamato y sustancia P (Patel 2010).

#### c) Sistema nervioso inhibitorio descendente

Las fibras nerviosas descendentes parten desde ciertas áreas del tronco encefálico (sustancia gris periacueductal y la médula rostral ventromedial) hacia la médula espinal donde harán sinapsis con las interneuronas localizadas aquí. Estas vías pueden ser activadas por un suceso estresante, como dolor o miedo, produciendo efectos analgésicos, conocida como *analgesia inducida por estrés*, modulando la actividad neuronal y controlando el ascenso de la información nociceptiva al cerebro. Los principales neurotransmisores de esta ruta de modulación nociceptiva son la serotonina y la noradrenalina (Patel 2010). Paradójicamente la activación de estas

vías suprime la liberación del neurotransmisor GABA producida por las interneuronas inhibitorias, conduciendo a una desensibilización local y a un potencial aumento en la percepción del dolor. Como veremos más adelante este fenómeno estará implicado en procesos de dolor crónico patológico (Muir 2009).

#### 1.2.4 Fisiopatología de la sensibilización central y periférica: hiperalgesia

En la mayoría de las situaciones clínicas, el estímulo nocivo no es transitorio (dolor fisiológico o nociceptivo) y está asociado a una inflamación o a un daño nervioso. Bajo estas circunstancias, se producen unos cambios dinámicos en el sistema nervioso central y periférico que produce fenómenos de hiperalgesia (o hipersensibilidad al dolor). A este tipo de dolor se le denomina frecuentemente dolor patológico. En su forma aguda, este mecanismo actúa como protección de la zona dañada, evitando daños futuros en la misma y facilitando así el proceso de reparación. Cuando este dolor es severo o muy prolongado desencadena cambios fisiopatológicos a largo plazo que reducen la intensidad del estímulo requerida para producir dolor, originando así fenómenos de hiperalgesia y alodinia, incluso cuando la causa del dolor ha desaparecido.

La hiperalgesia o aumento de la sensibilidad al dolor es una consecuencia de una perturbación del sistema nociceptivo que origina una sensibilización periférica, central o ambas. El proceso de sensibilización es producido por un aumento en la respuesta de las neuronas nociceptivas a la entrada normal de estímulos nociceptivos, y/o en la respuesta a estímulos nociceptivos que normalmente están bajo el umbral de respuesta (Boyd *et al.* 1994).

##### a) Sensibilización periférica

La lesión o enfermedad causante del dolor persistente en el sistema periférico produce la alteración de las propiedades de los nervios periféricos, ya sea dañando las fibras nerviosas o alterando su conducción. La lesión tisular va acompañada de una inflamación producida por la acumulación de factores endógenos liberados por los nociceptores y por las células no neurales (p. ej. las células inflamatorias o las células dañadas) llamados comúnmente *sopa inflamatoria*. Estas sustancias incluyen neurotransmisores, péptidos (p. ej. la sustancia P), eicosanoides y sustancias relacionadas (p. ej. prostaglandinas), neurotropinas, citoquinas, etc. De entre estas sustancias, el factor de crecimiento neuronal (NGF, *nerve growth factor*) activa las fibras

C produciendo una hipersensibilidad mecánica y al calor. Por otro lado las citoquinas (interleuquinas (IL) 1 $\beta$  y 6, factor de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ) potencian la respuesta inflamatoria estimulando a su vez la producción de sustancias proalgésicas. Todas estas moléculas activan canales tipo TRPV1, TRPA1 y ASIC en los nociceptores (Basbaum *et al.* 2009).

b) **Sensibilización central**

La sensibilización central se define como un aumento en la respuesta de las neuronas nociceptoras del SNC ante estímulos nociceptivos aferentes normales, supraumbrales, o por debajo de su umbral (Boyd *et al.* 1994) estableciendo un estado de hiperexcitabilidad en el SNC que conduce a un aumento en el procesamiento de los mensajes nociceptivos (Basbaum *et al.* 2009).

En la inducción y mantenimiento de la sensibilización central juega un papel muy importante la medula espinal, concretamente el ADME. En ella, se producen una serie de mecanismos como son la potenciación a largo plazo de la potencia sináptica, la plasticidad intrínseca neuronal, los cambios en el control inhibitorio y la modulación descendente (Sandkuhler 2009).

El fenómeno de potenciación a largo plazo (LTP, *long term potentiation*) de la potencia sináptica es una intensificación duradera de la señal nociceptiva en la sinapsis entre las fibras C aferentes y las neuronas de la superficie del ADME producidas por cambios presinápticos y postsinápticos. Cuando el dolor iniciado por un daño tisular es severo y constante se produce una mayor liberación a nivel central de sustancias excitatorias como el glutamato o la sustancia P. La suma espacial y temporal de estos potenciales excitatorios originan esta sensibilización central. Se han identificado múltiples mecanismos implicados en la LTP como son la síntesis y liberación de neurotransmisores o cambios en la densidad, distribución y activación de los receptores de estos neurotransmisores entre otros (Sandkuhler *et al.* 2012). Este fenómeno se expresa preferencialmente en la sinapsis de las fibras aferentes primarias nociceptivas con las proyecciones neuronales de la lámina I que expresan receptores NK-1 (Mantyh *et al.* 1997; Nichols *et al.* 1999; Ikeda *et al.* 2003).

Otro mecanismo implicado en la sensibilización central es la plasticidad intrínseca que consiste en una serie de cambios en la excitabilidad de la membrana de las neuronas de la medula espinal que producen una alteración en su patrón normal de descarga de los potenciales de ac-

ción. En este mecanismo están involucrados entre otros las corrientes de sodio y potasio dependientes de voltaje (Sandkuhler 2009).

Aunque hay muchos mecanismos pre- y postsinápticas implicados en estos procesos de hiperalgia el más evidente es el aumento de calcio (Ikeda *et al.* 2003; Kim *et al.* 2008) y la sensibilización central mediada por glutamato y receptores NMDA (Basbaum *et al.* 2009). En las terminaciones centrales de los nociceptores se libera glutamato generando una corriente excitatoria postsináptica en la neurona de segundo orden a través de receptores glutaminérgicos tipo AMPA y kainato. Cuando hay una lesión y se activa este mecanismo, silente en circunstancias normales, la suma de estas corrientes postsinápticas podría disparar un potencial de acción y la transmisión del dolor a vías superiores debido a un aumento de la entrada del calcio que aumenta la fuerza de las conexiones sinápticas entre los nociceptores y las neuronas del ADME. Este mecanismo exagera la respuesta al estímulo nocivo (hiperalgia) así como la respuesta a un estímulo no nocivo por facilitación heterosináptica con las fibras A $\beta$  (alodinia).

Por último, la modulación descendente también se encuentra implicados en los fenómenos de hiperalgia mediante la estimulación de la facilitación descendente y la reducción de la inhibición descendente (Sandkuhler 2009).

Por otro lado, se ha visto recientemente que las células gliales, sobre todo la glía y los astrocitos, están implicados en el desencadenamiento y perpetuación de la sensibilización central. La microglía, que en circunstancias normales actúa como macrófagos del SNC, en presencia de una lesión nerviosa se acumulan en la terminación de los nervios periféricos dañados del ADME y alrededor de los cuerpos celulares de las motoneuronas dañadas en el asta ventral. Su activación produce la liberación de citoquinas como TNF- $\alpha$ , IL- $\beta$  e IL-6 que aumenta la sensibilización central neuronal y la hiperalgia. Por otro lado los astrocitos, debido a su activación más tardía y duradera, están más implicado en el mantenimiento de la sensibilización central más que en su inducción (Basbaum *et al.* 2009). Además, ambos tipos celulares gliales (microglia y astrocitos) se activan también en el tronco del encéfalo estimulando la facilitación descendente.

---

## 1.3 Hiperalgnesia y tolerancia inducida a opioides

---

Los analgésicos agonistas opioides como la morfina o el remifentanilo proporcionan analgesia (o hipotalgesia) mediante su unión a los receptores opioides pero a su vez activan otras vías que conllevan paradójicamente a un aumento en la sensibilidad del dolor en el paciente y una disminución del efecto de esta terapia analgésica a lo largo del tiempo. Como explicaremos a continuación en el desarrollo de estos fenómenos de hiperalgnesia y tolerancia están implicados muchos de los mecanismos y vías que se han visto anteriormente en la sensibilización periférica y central (apartado 1.2.4). Previamente se realizará una descripción de los fenómenos de tolerancia e hiperalgnesia inducida por opioides y su implicación clínica en el paciente.

### 1.3.1 Conceptos y definiciones

#### a) Tolerancia

La tolerancia a un fármaco se define como la pérdida o disminución del efecto terapéutico de dicho fármaco tras su exposición repetida, lo que conlleva una necesidad de aumentar la dosis para mantener el mismo efecto (Bekhit 2010). En el caso de los fármacos opioides se denomina tolerancia a opioides y generalmente hace referencia a sus efectos analgésicos pero también podría ser relacionado con otros efectos tales como depresión respiratoria o sedación.

De acuerdo a su curso temporal no hay una clasificación convencional aceptada de forma global, pero de forma práctica se podemos clasificar como: tolerancia aguda (TAO) que se desarrollará en el transcurso de horas, p. ej. durante una infusión continua de remifentanilo; tolerancia retardada que tendrá lugar tras varios días de tratamiento, p. ej. en pacientes en el periodo postoperatorio; y tolerancia crónica que puede ocurrir a las semanas o meses de iniciar un tratamiento en p. ej. en pacientes con dolor crónico por cáncer o procesos neuropáticos.

También se puede definir tolerancia cruzada como aquel fenómeno ocasionado tras la administración de un fármaco que afecta al efecto de otro fármaco administrado a continuación, es decir, que la administración de un fármaco previo condiciona que se desarrolle tolerancia (tenga menos efecto) a un segundo fármaco que se administre a continuación. Estos fenómenos ocurren normalmente en fármacos que tienen mecanismos de acción comunes, como es el

caso de los opioides. Igualmente la tolerancia cruzada puede transcurrir a corto plazo (aguda), p. ej. cuando la administración de remifentanilo durante una cirugía hace aumentar las necesidades postoperatorias de morfina (Cooper *et al.* 1997); o a largo plazo en pacientes con tratamientos analgésicos crónicos con opioides por cáncer cuando se desarrollan estrategias de rotación de opioides (Mercadante *et al.* 2009).

Por otro lado, hay que diferenciarlo de la tolerancia farmacocinética que implicaría diferencias en la distribución o metabolismo del fármaco que produciría menores concentraciones plasmáticas o en el receptor (Bekhit 2010). Este tipo de tolerancia no se ha observado en el caso los opioides (Ouellet *et al.* 1997). Desde el punto de vista de mecanismo de acción se puede definir también una tolerancia farmacodinámica que refleja cambios en cómo el sistema es afectado por el opioide, como cambios en densidad de receptores o desensibilización de los mismos; es decir, una desensibilización de las vías antinociceptivas opioides (Bekhit 2010).

#### b) **Hiperalgnesia**

La hiperalgnesia puede definirse como un aumento en la sensibilidad dolorosa de un individuo (Boyd *et al.* 1994). Este fenómeno se puede clasificar en función de su localización, encontrando hiperalgnesia primaria (en el punto de la lesión) o secundaria (en un área adyacente o lejana del lugar de lesión).

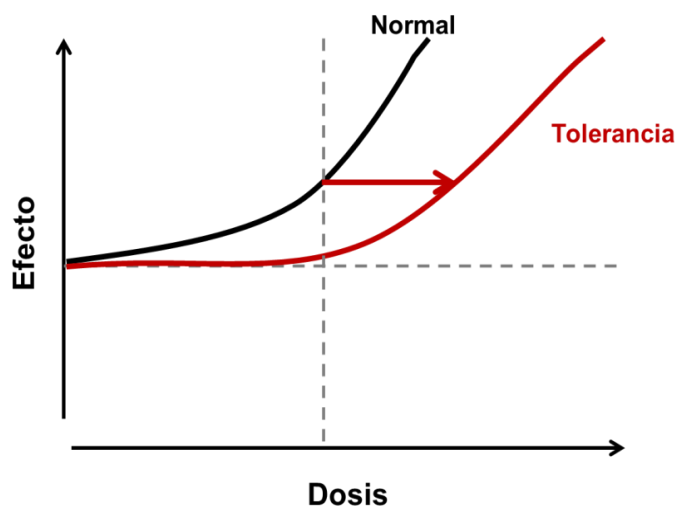
Además de ser causada por una lesión tisular (p. ej. dolor inflamatorio) o en el sistema nervioso (p. ej. dolor neuropático) la hiperalgnesia puede estar producida a su vez por fármacos como los opioides, en cuyo caso se denomina hiperalgnesia inducida por opioides (HIO) (Low *et al.* 2012). Así, los opioides además de producir un efecto analgésico o antinociceptivo desencadenan a su vez un efecto hiperalgésico o pronociceptivo.

#### c) **Tolerancia vs. hiperalgnesia**

En muchas ocasiones cuando se observa un fenómeno de tolerancia a opioides en el ámbito clínico, es decir, la pérdida de eficacia analgésica de un fármaco opioide, puede estar implicado un mecanismo en que el fármaco *per sé* haga menos efecto (efecto de tolerancia que implicaría un cambio farmacodinámico en la relación entre el fármaco y sus receptores diana) y/o que haya aumentado la sensibilidad al dolor del paciente (efecto de hiperalgnesia en la que hay una

activación de otros sistemas pronociceptivos independientes de los receptores diana del fármaco). En ambos casos observaríamos una disminución de analgesia y un aumento del dolor en el paciente; y por ello, en el ámbito clínico es muy difícil diferenciar con seguridad de que mecanismo se trata (tolerancia vs. hiperalgesia) o si ambos estuviesen implicados. Su discriminación exacta se puede hacer teóricamente y en modelos experimentales donde si es posible medir su sensibilidad basal al dolor (Chu *et al.* 2012).

Si observamos la curva dosis-respuesta de un individuo normal y la comparamos con un individuo tolerante observaríamos un desplazamiento de la curva a la derecha (Angst *et al.* 2006) debido a la disminución de la potencia del fármaco o desensibilización de vías antinociceptivas por los opioides. Así, para empezar a producir analgesia en un individuo tolerante se necesita más dosis pero no se altera la sensibilidad del individuo ya que una dosis que no es efectiva nunca produciría más dolor que en un paciente normal (obsérvese que la nueva curva nunca sobrepasa los valores basales de efecto del individuo normal) (Figura 3). La tolerancia se manifestaría clínicamente como la necesidad de aumentar la dosis de opioides a lo largo del tiempo para conseguir el mismo nivel de analgesia.

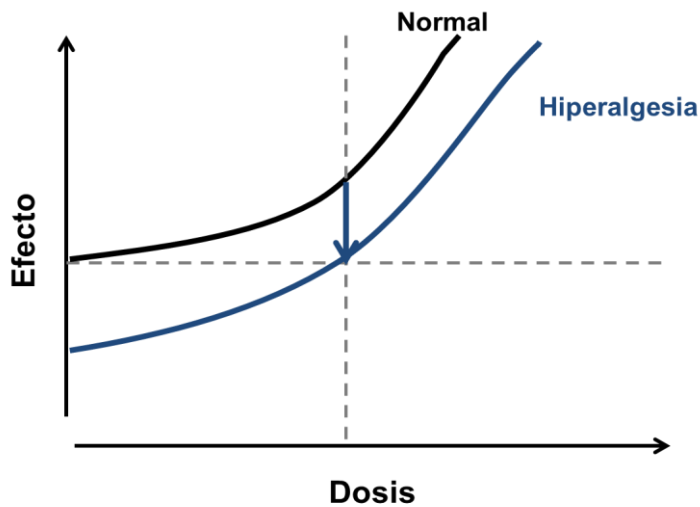


**Figura 3.** Desplazamiento hacia la derecha de la curva dosis-efecto producida por un fenómeno de tolerancia a opioides.

*Adaptado de Angst, 2006.*

Por otro lado, si tenemos en cuenta la misma curva dosis-efecto y ahora la comparamos con un paciente con hiperalgesia observamos que la curva sufre un desplazamiento hacia abajo de la curva dosis-respuesta normal (Angst *et al.* 2006) debido al aumento de la sensibilidad al dolor o

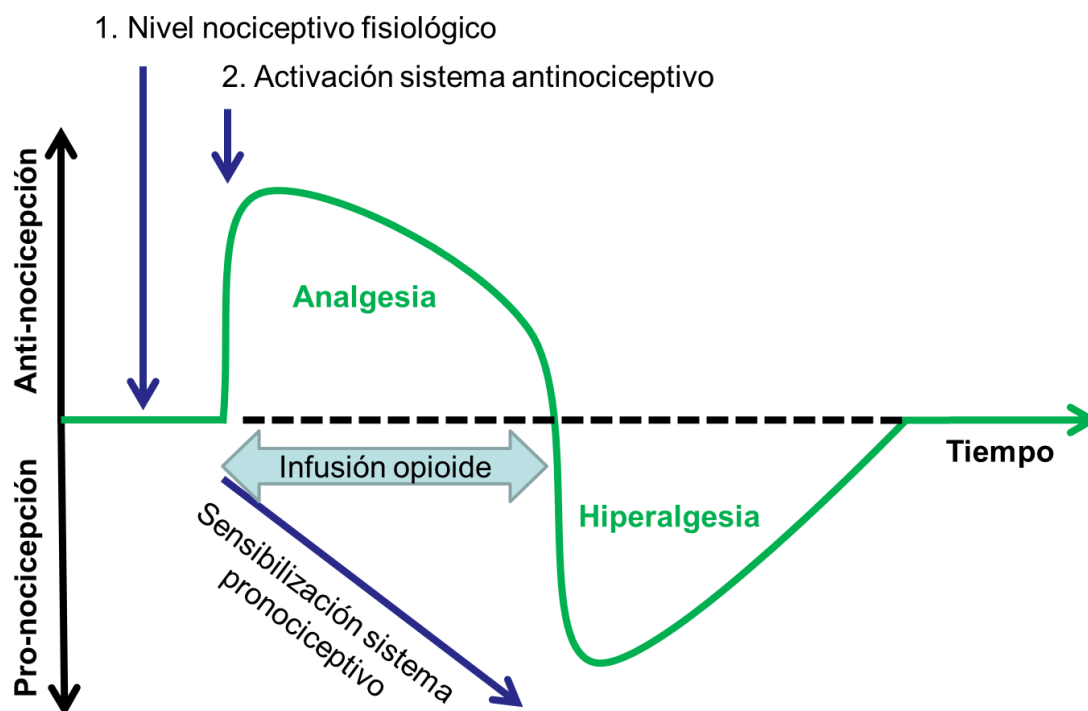
sensibilización de las vías pronociceptivas por los opioides. Así, para empezar a producir la misma analgesia en un individuo hiperalgésico se necesita más dosis pero en este caso se altera la sensibilidad del individuo ya que una dosis que no es efectiva produciría más dolor que en un paciente normal (obsérvese que la nueva curva sobrepasa los valores basales de efecto del individuo normal) (Figura 4). La hiperalgesia se manifestaría como un aumento paradójico de dolor no relacionado con el estímulo nociceptivo original que resulta de la administración de opioides.



**Figura 4.** Desplazamiento hacia abajo de la curva dosis-efecto producida por un fenómeno de hiperalgesia inducida por opioides.

*Adaptado de Angst, 2006.*

Cuando se administra un opioide a un paciente ambos efectos farmacológicos pueden desarrollarse simultáneamente, tanto la desensibilización de vías antinociceptivas como la sensibilización de vías pronociceptivas. Cuando el paciente presenta una disminución del efecto de la analgesia producida por opioides puede ser causado por cualquiera de los dos mecanismos o ambos, se dice de forma general que ha desarrollado tolerancia. Después si el paciente suspende el tratamiento y presenta una sensibilidad al dolor mayor que otros pacientes sin tratamiento o que él mismo antes de iniciarlo, se habla habitualmente de un fenómeno de hiperalgesia; causado por la sensibilización de vías pronociceptivas (figura 5). Hace tiempo había una gran controversia con la terminología empleada y se utilizaban en la práctica estas dos palabras prácticamente como sinónimos (Angst *et al.* 2006) pero recientemente se está realizando más énfasis en que son fenómenos separados y deben tratarse como tal (Richebe *et al.* 2012).



**Figura 5.** Representación simplificada de los procesos de tolerancia e hiperalgnesia inducida por opioides. El paciente presenta un nivel nociceptivo fisiológico en equilibrio entre sus sistemas antinociceptivo y pronociceptivo. Cuando se le administra una infusión de opioide se activa el sistema antinociceptivo produciendo analgesia, pero a su vez de forma simultánea y gradual se produce también la sensibilización del sistema pronociceptivo. El resultado final será una disminución del efecto analgésico a lo largo del tiempo que se administre la infusión del opioide, es decir, un fenómeno de tolerancia. Cuando la infusión finaliza cesa la activación antinociceptiva y el resultado neto es un predominio del sistema pronociceptivo sobre el antinociceptivo con lo que el paciente sufrirá un fenómeno de hiperalgnesia, es decir, mayor sensibilidad al dolor. Con el paso del tiempo, ambos sistemas alcanzaran el equilibrio entre ellos y el nivel nociceptivo del paciente vuelve a su estado basal.

*Adaptado de Celerier, 2001.*

### 1.3.2 Mecanismos de acción de la hiperalgnesia y la tolerancia inducida por opioides

Hay distintas vías neuroanatómicas implicadas en el desarrollo de hiperalgnesia y tolerancia a opioides, muchas de ellas comunes al desarrollo de hiperalgnesia en el dolor patológico. Desde la periferia hasta las estructuras centrales son: la sensibilización de las terminaciones nerviosas periféricas; el aumento de la producción y liberación de neurotransmisores excitadores así como la inhibición de su recaptación en el ADME; la sensibilización de las neuronas de segundo

orden a estos neurotransmisores excitadores y los cambios neuroplásticos en la medula rostro-ventral (RVM) que incrementa la facilitación descendente de la transmisión nociceptiva de origen supraespinal (Angst *et al.* 2006; Chu *et al.* 2008). Molecularmente en estos puntos se produce tanto una desensibilización del sistema antinociceptivo opioide como una sensibilización de los sistemas pronociceptivos que explicaremos a continuación:

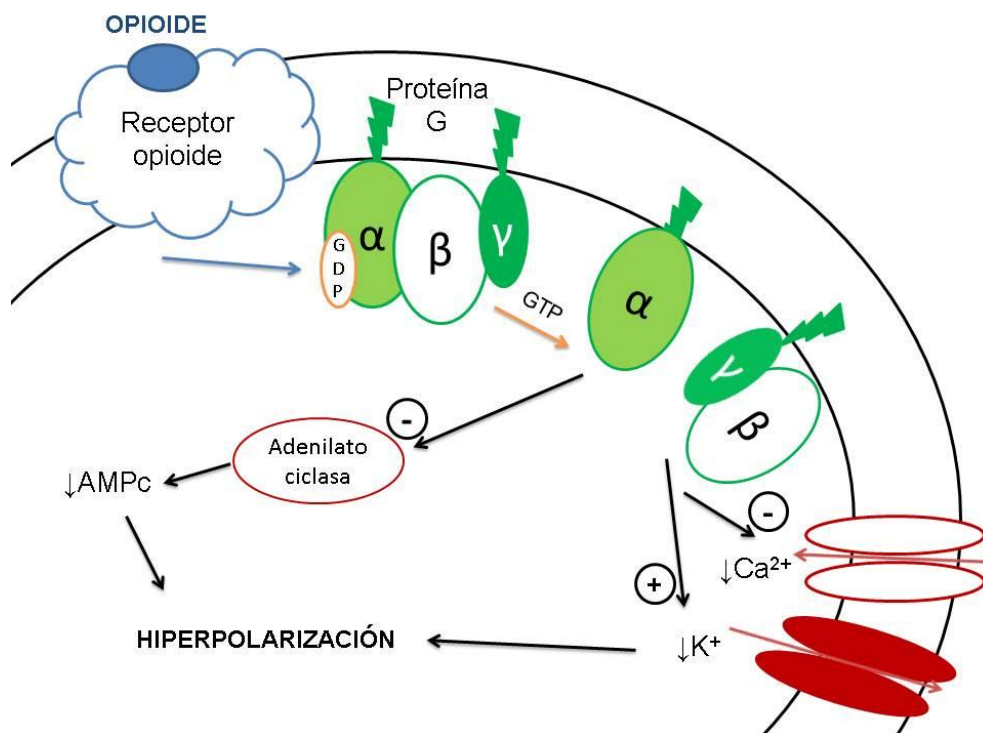
a) **Desensibilización sistema antinociceptivo opioide**

Los opioides actúan sobre los receptores opioides acoplados a proteínas G produciendo su acción analgésica o antinociceptiva. Con el paso del tiempo estas vías se desensibilizan a la acción del opioide, ya sea mediante cambios en los sistemas de señalización intracelular o actuando sobre el propio receptor opioide por procesos de internalización del mismo.

**Cambios en los sistemas de señalización intracelular**

El receptor opioide en reposo al unirse a un agonista opioide se asocia a una proteína G inhibitoria  $G_{i/o}$  que se disocia en dos subunidades:  $\alpha$  y  $\beta\gamma$ . La subunidad  $\alpha$  inhibe la ruta de la adenilato ciclasa/adenil mono fosfato cíclico (AMPc) y la subunidad  $\beta\gamma$  activa los canales de entrada de potasio y bloquea los de calcio dependientes de voltaje, entre otros mecanismos, produciendo una hiperpolarización celular e impidiendo así la transmisión de potenciales de acción y la liberación de neurotransmisores resultante en los efectos analgésicos de los opioides (Ingram *et al.* 1998; Law *et al.* 2000) (Figura 6).

Como hemos comentado los agonistas opioides son inicialmente inhibidores (uniéndose a la proteína  $G_{i/o}$  pero también se convierten en excitatorios, mediante su actividad constante en el receptor opioide (Feldman *et al.* 1997). Con la administración crónica de opioides la vía de la adenilato ciclasa/AMPc se hipertrofia o superactiva (por la disminución en la eficacia de su inhibición) causando un importante aumento de la acumulación de AMPc (Schallmach *et al.* 2006), se desensibilizan los canales de potasio y se estimulan la expresión y activación de los canales de calcio dando lugar a fenómenos de tolerancia.



**Figura 6.** Principales sistemas intracelulares activados por los opioides. El receptor opioide activado disocia la proteína G inhibitoria (Gi/o) en dos subunidades:  $\alpha$  y  $\beta\gamma$ . La  $\alpha$  reduce los niveles de AMPc a través de la inhibición de la adenilato ciclasa mientras que la  $\beta\gamma$  facilita la apertura de canales de entrada de potasio e inhibe los canales de calcio dependientes de voltaje. Mediante estos mecanismos producen la hiperpolarización celular impidiendo la transmisión de los potenciales de acción.

*Adaptado de Hernández –Delgadillo, 2005 (a su vez modificado de Feldman, 1997, Neuro-psycopharmacology, 'Sinauer Associates, Massachuttes).*

Por otro lado en este proceso la subunidad  $\beta\gamma$  de la proteína G también activa la fosfolipasa C que desencadenará un aumento de calcio citoplasmático a través de la producción de inositol trifosfato (IP<sub>3</sub>), aunque esta vía se desensibilizará muy rápidamente (Crain *et al.* 1998) puede cobrar importancia después de exposiciones prolongadas (Varga *et al.* 2003). De hecho, la inactivación de esta ruta por el M119 (inhibidor de la subunidad  $\beta\gamma$  de la proteína G) aumenta la analgesia de la morfina y atenúa el desarrollo de tolerancia (Mathews *et al.* 2008).

También la estimulación del receptor mu opioide por los agonistas opioides causa su interacción con la filamina A (proteína de andamiaje que interacciona con el receptor opioide) que provocan la liberación de la proteína Gi/o a la que están acoplados por la proteína G estimula-

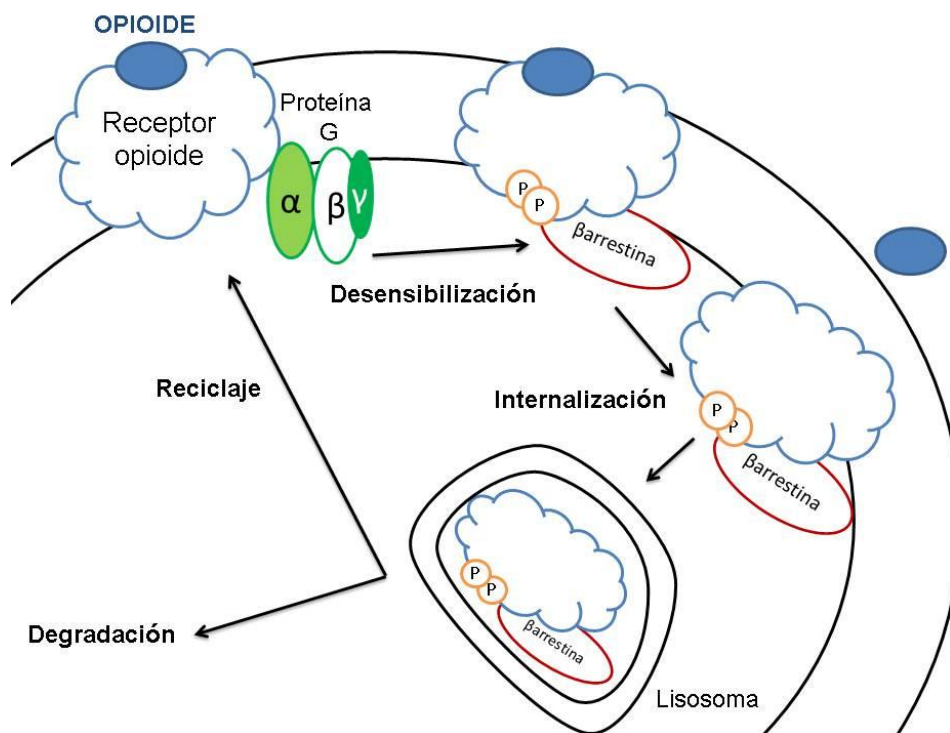
toria Gs, resultando en una señal excitatoria (Wang *et al.* 2005) que produce en este caso la estimulación de la ruta adenilato ciclasa / AMPc por el dímero  $\beta\gamma$  de la proteína Gs (Chakrabarti *et al.* 2005; Wang *et al.* 2005). Este cambio está asociado al desarrollo de tolerancia a opioides y dependencia en los tratamiento crónicos de opioides (Wang *et al.* 2005; Webster 2007; Largent-Milnes *et al.* 2008), pero también se ha demostrado que ocurre tras la administración aguda de morfina en solo cuestión de minutos (Wang *et al.* 2009). Este mecanismo no ha sido demostrado aun que ocurra con otros agonistas opioides como el remifentanilo pero se cree que pueda ser similar (Wang *et al.* 2009).

La unión entre el receptor mu opioide y la proteína Gs en respuesta a morfina es inicialmente transitoria; ya que debido al reciclaje del receptor éste se recupera de nuevo unido a  $G_o$ . Pero cuando la estimulación del receptor es repetida y/o prolongada el receptor podría perder la capacidad de reciclarse y continuar unido a Gs (Wang *et al.* 2009). La rapidez en producirse este fenómeno y su persistencia ante estimulaciones continuadas (Wang *et al.* 2009) lo hace un posible candidato de mecanismo que media también la tolerancia aguda a opioides observada en voluntarios (Lee *et al.* 2011).

Los antagonistas opioides (p. ej. naloxona) cuando se administran a dosis muy bajas se acoplan a la filamina A previniendo esta rotación de la proteína  $G_i/o$  a Gs (Wang *et al.* 2009) pudiendo la combinación de un agonista y un antagonista opioide reducir la conversión de un receptor inhibitorio a excitatorio, disminuyendo el desarrollo de tolerancia (Webster 2007).

### **Desensibilización e internalización de receptores**

Los receptores opioides se desensibilizan al ser fosforilados reduciendo su afinidad por el agonista, se desacoplan de la proteína G y se unen a las proteínas  $\beta$ -arrestinas que promueve su internalización (Ferguson 2001; Claing *et al.* 2002). Una vez internalizado el receptor puede resensibilizarse y volver a su superficie (proceso denominado reciclaje) o si interacciona con la proteína GASP (*G protein coupled receptor associated sorting protein*) pueden degradarse en los lisosomas (proceso conocido como regulación a la baja) (Ferguson 2001; Whistler *et al.* 2002) (Figura 7).



**Figura 7.** Representación simplificada del proceso de desensibilización e internalización de receptores. Cuando opioides activan los receptores opioides se acoplan a la proteína G. Estos receptores activados pueden ser fosforilados incrementando su afinidad por las β-arrestinas. La unión de ambos libera a los receptores de las proteínas G y se inicia la internalización del receptor. Los receptores internalizados pueden ser defosforilados y reciclados a la membrana plasmática siendo totalmente competentes; o por otro lado, ser degradados por proteasas de los lisosomas.

*Adaptado de Zou, 2005.*

Los procesos de sensibilización del receptor opioide y de su internalización fueron asociados con los fenómenos de tolerancia en roedores (Sim *et al.* 1996; Bohn *et al.* 1999) pero actualmente se cree más bien lo contrario ya que la internalización de receptores desensibilizados produce una re-sensibilización a través de receptores reciclados o nuevos disminuyendo así la aparición de tolerancia (Finn *et al.* 2001).

La implicación de estos fenómenos en el desarrollo de tolerancia no está clara aún y se cree que podrían actuar solo parcialmente o bajo ciertas circunstancias. Esto es debido entre otras causas a que hay importantes diferencias en el fenómeno de fosforilación dependiendo del tipo de receptor y del agonista opioide (Alvarez *et al.* 2002; Koch *et al.* 2008), p. ej., el receptor mu opioide estimulado por la morfina se fosforila peor que el fentanilo, por lo que el receptor se

desensibilizaría e internalizaría menos produciendo menos tolerancia (Keith *et al.* 1996). Estos descubrimientos desencadenaron la teoría RAVE donde se mostraba para cada agonista el grado relativo de señalización celular producida comparado con su capacidad de producir endocitosis (Whistler *et al.* 1999). Así, los fármacos con mayor índice RAVE producirían mayor tolerancia ya que presentarían una escasa internalización frente a una importante señalización intracelular compensatoria más permanente (Kieffer *et al.* 2002).

#### b) **Sensibilización de los sistemas pronociceptivos**

Los opioides además de actuar sobre los sistemas antinociceptivos produciendo analgesia como ya hemos visto, también activan sistemas pronociceptivos localizados en la periferia y en el SNC, tanto en el ADME como en los sistemas supraespinales.

#### **Terminación periférica**

En las terminaciones nerviosas periféricas se han reconocido receptores opioides tanto en la terminación central como la periférica, así la administración local de agonistas opioides produce de forma aguda analgesia pero su administración repetida desarrolla tolerancia e hiperalgesia (Aley *et al.* 1997).

#### **ADME**

En la medula espinal, y concretamente en el ADME, es el lugar central de los diferentes mecanismos de acción que convergen en el desarrollo de HIO (Lee *et al.* 2011).

Como se ha explicado anteriormente en esta zona se desarrollan fenómenos de sensibilización central como la potenciación a largo plazo de la potencia sináptica, que también están implicado en el desarrollo de HIO (Drdla *et al.* 2009). En ella hay una amplificación de la señal nociceptiva en la sinapsis entre las fibras C aferentes primarias y las neuronas de la superficie del ADME que expresan receptores NK-1 (Ikeda *et al.* 2003). Los agonistas opioides interaccionan con receptor opioide produciendo la inhibición presináptica en las fibras C aferentes (mediante la depresión de los potenciales de acción y de la liberación de neurotransmisores) produciendo antinocicepción (Heinl *et al.* 2011). Pero tras su retirada, se produce una fuerte potenciación de la transmisión sináptica mediante la intensificación de los potenciales de campo evocados de

las fibras C (*C-fiber evoked field potentials*) mediado por receptores NMDA y serotoninérgicos espinales (Heinl *et al.* 2011). Curiosamente la implicación de estos últimos receptores no ha podido demostrarse con remifentanilo aunque si se ha determinado con morfina o con fentanilo, mientras que los receptores NMDA si están involucrados independientemente del opioide utilizado (Heinl *et al.* 2011) y son actualmente es el mecanismo de HIO más ampliamente aceptado (Low *et al.* 2012). Concretamente, se produce una disminución de la recaptación de neurotransmisores en la neurona aferente primaria (Mao *et al.* 2002), una mayor respuesta de las neuronas espinales a neurotransmisores nociceptivos como la sustancia P y el glutamato así como un aumento en la expresión de receptores NK-1 (Li *et al.* 2002; King *et al.* 2005). Por otro lado, la administración crónica de opioides también produce la regulación a la baja de los sistemas transportadores de glutamato aumentando la cantidad de glutamato libre para los receptores NMDA (Mao *et al.* 2002).

Además se ha demostrado que los agonistas opioides como el remifentanilo producen mediante su unión a los receptores opioides la activación de forma directa de los receptores NMDA (Guntz *et al.* 2005; Zhao *et al.* 2008; Gu *et al.* 2009) y de la fosfoquinasa C (PKC) de forma indirecta (Mao *et al.* 2001). Esta PKC fosforila a los receptores NMDA provocando un cambio conformacional que provoca la retirada del magnesio que los estaba bloqueando (Chen *et al.* 1992). La activación de estos receptores NMDA produce un aumento del flujo de calcio al citoplasma y por tanto una mayor excitabilidad neuronal. A su vez el aumento de calcio hace que haya mayor actividad de la PKC que como habíamos explicado antes sensibilizaba al receptor NMDA y retroalimenta el sistema. La implicación de este sistema se evidencia en distintos estudios donde la acción de antagonistas del receptor NMDA como la ketamina reducen la HIO en animales (Celerier *et al.* 2000; Kissin *et al.* 2000; Laulin *et al.* 2002; Richebe *et al.* 2005; Minville *et al.* 2010) y personas (Angst *et al.* 2003; Koppert *et al.* 2003; Joly *et al.* 2005), aunque clínicamente existen resultados contradictorios (Luginbuhl *et al.* 2003; Carstensen *et al.* 2010).

El aumento del calcio intracelular como consecuencia de la acción de los opioides en los receptores opioides y NMDA produce una disminución del umbral despolarización en la neurona de segundo orden así como la activación de enzimas como la óxido nítrico sintasa y la ciclooxigenasa (COX). El aumento en la producción de óxido nítrico (NO) incrementa la liberación de glutamato en la terminal sináptica de la neurona aferente primaria. La activación de la COX

ocasionada por el aumento de calcio intracelular, produce un aumento en la producción y liberación de sustancias hiperalgésicas como son las prostaglandinas; mientras que la fosfolipasa A2 (PLA2) incrementa la disponibilidad de ácido araquidónico (Wong *et al.* 2000; Wong *et al.* 2000), sustrato de la COX. Las prostaglandinas a su vez son capaces de estimular la liberación de sustancia P y de glutamato (Baba *et al.* 2001) produciéndose la retroalimentación del sistema (Hua *et al.* 1999; Powell *et al.* 2003).

Como ya comentamos anteriormente la glía tiene un papel importante en la iniciación y mantenimiento del incremento de la nocicepción en respuesta a una lesión nerviosa periférica, pero recientemente se ha demostrado que también juega un papel relevante en el desarrollo de hiperalgesia inducida a opioides (Hutchinson *et al.* 2007). Los agonistas opioides producen una activación directa de la glía a través los receptores TLR4 (receptor tipo Toll) la cual libera citoquinas (tales como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6) que median en la sinapsis neuronal (pre- y/o post-sináptica) favoreciendo la tolerancia e HIO (Hutchinson *et al.* 2007). La neuroinflamación producida por los opioides también sensibilizan al SNC para producir una respuesta exacerbada frente a una inflamación o un daño nervioso (Loram *et al.* 2012). La activación glial ocurre en cuestión de minutos después de la administración sistémica o intratecal de morfina y va aumentando con la cronicidad del tratamiento (Hutchinson *et al.* 2007).

### **Efectos supraespinales**

Otro de los sistemas implicados en el desarrollo de HIO y tolerancia es la activación de las vías de facilitación descendiente desde la medula rostroventral (MRV) (Vanderah *et al.* 2001; Vera-Portocarrero *et al.* 2007) gracias a la desinhibición de las neuronas inhibitorias y posiblemente también la sensibilización de las neuronas excitatorias de la MRV por acción de los agonistas opioides sobre los receptores opioides (Vanderah *et al.* 2001). La morfina y el fentanilo, pero no el remifentanilo, activan la facilitación descendente serotoninérgica (Heinl *et al.* 2011) que comienza en cuestión de minutos después de la aplicación sistémica del opioide y aumenta gradualmente durante su aplicación continuando incluso después de su retirada (Heinl *et al.* 2011). Además estas vías pueden ser activadas por vías ascendentes que contengan receptores NK-1 en sus proyecciones neuronales (Suzuki *et al.* 2002) y ser desinhibidas directamente por los agonistas opioides (Marinelli *et al.* 2002).

El inicio inmediato de este mecanismo facilitador descendente requiere la activación de receptores serotoninérgicos espinales (Millan 2002) que potenciarían la liberación de neurotransmisores desde el terminal presináptico de la fibras aferentes (Suzuki *et al.* 2004). Sin embargo, un estudio más reciente no encuentra estos cambios en la superficie del ADME durante la facilitación descendente (Heinl *et al.* 2011).

### 1.3.3 Evidencias de la presencia de tolerancia e hiperalgesia inducida por opioides

#### a) En medicina humana

La tolerancia a opioides después de la administración de fármacos como la morfina es conocido desde hace años (Ueda *et al.* 2003). Hay clara evidencia que afirma que las personas adictas a opioides desarrollan una disminución en su umbral nociceptivo (Fishbain *et al.* 2009). Diversos estudios a este respecto han observado que las personas adictas a la heroína, en tratamiento con metadona o no, presentan un aumento en la sensibilidad dolorosa (Compton 1994; Compton *et al.* 2001; Doverty *et al.* 2001; Doverty *et al.* 2001).

Las evidencias sobre el desarrollo de hiperalgesia y/o tolerancia en tratamientos para el dolor crónico con opioides son múltiples. Un ensayo prospectivo en el cual se administró a los pacientes morfina de larga duración para el tratamiento de dolor crónico lumbar se observó el desarrollo de hiperalgesia al mes del inicio del tratamiento (Chu *et al.* 2006). Por otro lado, un estudio observacional demostró que los pacientes con dolor crónico no canceroso que tomaban morfina o metadona presentaban hiperalgesia en relación a un grupo control en la prueba de presión por frío (*cold pressor test*) aunque no con el estímulo eléctrico (Hay *et al.* 2009).

Existen evidencias claras de la existencia de HIO en voluntarios sanos que desarrollan hiperalgesia secundaria debido a la administración de opioides (Petersen *et al.* 2001; Angst *et al.* 2003; Hood *et al.* 2003; Koppert *et al.* 2003; Koppert *et al.* 2003); y menos consistente, aunque ampliamente aceptada (Fishbain *et al.* 2009), de que estos fármacos producen una disminución del umbral nociceptivo y tolerancia (Vinik *et al.* 1998; Gustorff *et al.* 2002; Luginbuhl *et al.* 2003). Hay una cierta controversia porque existen tanto estudios que lo afirman (Vinik *et al.* 1998; Luginbuhl *et al.* 2003; Troster *et al.* 2006) como otros que no lo observan (Gustorff *et al.*

2002). El efecto analgésico del remifentanilo fue evaluado en voluntarios sanos durante 4h de infusión y se observó un aumento del umbral nociceptivo térmico y mecánico en un inicio, con un efecto máximo a los 60-90 minutos, seguido de una disminución del efecto analgésico a pesar de mantener la infusión continua, llegando a ser la mitad y la cuarta parte del pico analgésico inicial a las 2 y 3 horas del inicio de la infusión respectivamente (Vinik *et al.* 1998). Este efecto no ha sido demostrado en pacientes clínicos, pero de ocurrir podría ser de relevancia clínica en el periodo intraoperatorio donde se utilizan infusiones de remifentanilo.

La mayoría de estudios que valoran el uso de opioides perioperatorio (Fishbain *et al.* 2009) confirman que podrían producir un aumento en el dolor postoperatorio y/o necesidades de opioides postoperatorias (Cooper *et al.* 1997; Chia *et al.* 1999; Guignard *et al.* 2000) aunque también hay estudios donde no observan diferencias (Schraag *et al.* 1999; Cortinez *et al.* 2001). Se postula que estas diferencias pudiesen ser debidas a un buen manejo de dolor postoperatorio polimodal que no permite ver diferencias asociadas al uso del opioide, ya que en ambos grupos el grado de analgesia obtenida es muy alto (Fishbain *et al.* 2009). Es por ello, que aunque se cree que la aparición de hiperalgesia es una realidad, no se sabe aún cuál es su relevancia clínica (Lee *et al.* 2011). Un detalle importante es que la tolerancia se desarrolla tanto usando el mismo opioide durante los periodos perioperatorio y el postoperatorio, p. ej. el fentanilo (Chia *et al.* 1999), como rotando a morfina en el postoperatorio (Cooper *et al.* 1997). Este desarrollo de tolerancia cruzada ha sido más estudiado con el uso de remifentanilo intraoperatorio en relación al consumo de morfina en el periodo postoperatorio inmediato (Guignard *et al.* 2000; Hansen *et al.* 2005; Lee *et al.* 2005; Engelhardt *et al.* 2008). A pesar de todos los estudios y meta-análisis del tema, la implicación clínica de este fenómeno aún no está clara (Lee *et al.* 2011).

#### b) **En modelos animales**

Los estudios con animales que reciben tratamientos crónicos con opioides son bastante coherentes y de indiscutible evidencia. Las ratas o ratones que reciben opioides durante varios días, ya sea por vía intratecal (Mao *et al.* 1994; Ibuki *et al.* 1997; Mao *et al.* 2002) o subcutánea mediante la aplicación de morfina en un pellet (Romero *et al.* 2010), fentanilo (Celerier *et al.* 2000; Laulin *et al.* 2002) o heroína (Celerier *et al.* 2001), muestran una reducción en el umbral de

nocicepción a estímulos nociceptivos térmicos y mecánicos (HIO). Mientras estos animales continúan con el tratamiento puede observarse además una disminución de la eficacia anti-nociceptiva del fármaco (tolerancia) (Celerier *et al.* 2001; Vanderah *et al.* 2001; Mao *et al.* 2002). El aumento de los umbrales nociceptivos puede desarrollarse rápidamente (Cox *et al.* 1968) y persistir incluso varios días tras la retirada de un tratamiento crónico con opioides p. ej. durante varios días tras la administración de morfina (Li *et al.* 2001).

Con tratamientos agudos de una única administración de opioides como fentanilo (Celerier *et al.* 1999; Celerier *et al.* 2000), o tras varios minutos u horas de la administración de una infusión continua de opioides como fentanilo, alfentanilo y remifentanilo, produce igualmente una disminución del umbral nociceptivo siendo el efecto más pronunciado con este último opioide (Celerier *et al.* 2006). Los efectos pronociceptivos del remifentanilo fueron dependientes de la dosis pero independientes de la duración de su administración (Cabanero *et al.* 2009).

#### 1.3.4 Tratamientos preventivos y/o curativos de la tolerancia e hiperalgesia

##### a) **Ketamina**

La ketamina es un fármaco antagonista del receptor glutaminérgico NMDA (Yamamura *et al.* 1990) con propiedades anestésicas, pero también asociado con efectos adversos clínicamente relevantes que han limitado su uso como agente anestésico (Eger 2004). Debido a ello, la ketamina se emplea actualmente a dosis más bajas aprovechando sus propiedades analgésicas (Schmid *et al.* 1999) y anti-hiperalgésicas (Luginbuhl *et al.* 2003; Joly *et al.* 2005) mediadas por dicho receptor. La utilización de dosis bajas de ketamina intraoperatorias mejora el manejo del dolor postoperatorio y disminuye las necesidades de morfina durante las primeras 24 h en personas (Schmid *et al.* 1999; Menigaux *et al.* 2000; Guignard *et al.* 2002; Subramaniam *et al.* 2004; Bell *et al.* 2005; Elia *et al.* 2005; Joly *et al.* 2005; Visser *et al.* 2006; Remerand *et al.* 2009; Carstensen *et al.* 2010) y también en animales (Hoffmann *et al.* 2003; Holtman *et al.* 2008; Kosson *et al.* 2008). Estos resultados se obtienen con la administración de ketamina mediante un catéter epidural o por vía sistémica, pero preferiblemente si se administra por vía intravenosa a través de una infusión continua (Schmid *et al.* 1999; Subramaniam *et al.* 2004; Bell *et al.* 2005; Elia *et al.* 2005; Visser *et al.* 2006). A pesar de la fuerte evidencia que sustenta

la mejora con dosis bajas de ketamina en la terapia analgésica con opioides y la reducción de las necesidades de opioides cuando son combinados con la ketamina (Subramaniam *et al.* 2001; Van Elstraete *et al.* 2004; Himmelseher *et al.* 2005; Batra *et al.* 2007; Engelhardt *et al.* 2008; Parikh *et al.* 2011), también se ha demostrado una ausencia de mejora en la analgesia postoperatoria (Carstensen *et al.* 2010). Una revisión cualitativa reciente concluye que el beneficio de añadir ketamina a una PCA de morfina IV después de una cirugía abdominal u ortopédica parece claro en cinco estudios clínicos, mientras otros seis de los once analizados no pudieron demostrar mejoría en la analgesia postoperatoria (Carstensen *et al.* 2010). Por otro lado parece que esta combinación de ketamina y un opioide para el tratamiento del dolor postoperatorio de cirugía torácica si podría ser más eficaz (Mathews *et al.* 2012).

Posteriormente, en 2011, se realiza una nueva revisión que evalúa el efecto de la ketamina intravenosa en el dolor postoperatorio y engloba setenta estudios y casi cinco mil pacientes (Laskowski *et al.* 2011). En ella se observó una reducción del consumo de opioides y un aumento relevante en el tiempo hasta la primera analgesia en los pacientes que recibieron ketamina, mucho más evidente en procedimientos dolorosos como cirugía torácica, abdominal superior y ortopédica. A pesar de utilizar menos opioides, la mayoría (80%) de los pacientes experimentaron menos dolor con la administración de la ketamina que con el tratamiento placebo, independientemente del tipo de opioide intraoperatorio que fuese administrado y de la dosis de ketamina empleada. Los efectos adversos neuropsiquiátricos como alucinaciones o pesadillas fueron mayores en los pacientes que recibieron ketamina, aunque por otro lado la incidencia de náuseas y vómitos fue menor en este grupo, sin diferencias en el nivel de sedación.

#### b) **Antiinflamatorios no esteroideos (AINEs)**

Los AINEs son utilizados habitualmente en el tratamiento del dolor agudo y postoperatorio por su acción analgésica y antiinflamatoria mediante la inhibición de la enzima COX. Como ya describimos anteriormente, tras un tratamiento crónico con agonistas opioides se producen una serie de mecanismos que llevan a un aumento del calcio citoplasmático activando la COX, que produce un aumento en la producción y liberación de sustancias hiperalgésicas como son las prostaglandinas; y activando también la PLA2 que incrementa la disponibilidad de ácido araquidónico (Wong *et al.* 2000; Wong *et al.* 2000), sustrato de la COX. Estas prostaglandinas liberadas son capaces de estimular la liberación de glutamato en las neuronas del asta dorsal

(Baba *et al.* 2001); es por ello que los inhibidores de la COX han demostrado a su vez antagonizar la función de los receptores NMDA en el SNC (Malmberg *et al.* 1992; Yaksh *et al.* 1993).

Los AINEs como el parecoxib y el ketorolaco han demostrado ser eficaces modulando la HIO en personas (Troster *et al.* 2006; Lenz *et al.* 2011) siendo más efectivo el primero, por lo que se especula que tiene una mayor implicación en la reducción de hiperalgesia la inhibición COX-2 que la COX-1 (Lenz *et al.* 2011). En animales también se demostró una buena eficacia de los AINEs en el desarrollo de tolerancia a opioides (Powell *et al.* 1999; Wong *et al.* 2000), aunque se cree que no es el principal mecanismo (Lee *et al.* 2011)

#### c) **Gabapentina**

La gabapentina es un fármaco comúnmente utilizado como antiepiléptico que también es empleado en el tratamiento del dolor neuropático (O'Connor *et al.* 2009) y en el manejo del dolor perioperatorio (Pandey *et al.* 2004; Rorarius *et al.* 2004; Peng *et al.* 2007). Actúa sobre receptores implicados directamente en el desarrollo de HIO y tolerancia a opioides interactuando con la subunidad  $\alpha_2\delta$  de los canales de calcio voltaje dependientes (Gee *et al.* 1996), involucrados en la transmisión del dolor hacia la médula espinal, o con receptores glutamérgicos (Shimoyama *et al.* 2000), como los receptores NMDA (Roh *et al.* 2008), involucrados en mecanismos de hiperalgesia y dolor neuropático.

Se ha evaluado un efecto preventivo de la gabapentina en el desarrollo de HIO (Kuraishi *et al.* 2003; Van Elstraete *et al.* 2008; Van Elstraete *et al.* 2011; Wei *et al.* 2012) y tolerancia retardada a opioides (Gilron *et al.* 2003; Hansen *et al.* 2004; Pakulska *et al.* 2004; Lin *et al.* 2005) en animales, pero todavía solo unos pocos estudios han demostrado una acción similar en personas y los resultados son aun contradictorios (Gustorff *et al.* 2004; Compton *et al.* 2010).

#### d) **Fármacos antidepresivos**

Los fármacos antidepresivos tricíclicos inhiben la recaptación de noradrenalina y serotonina en las fibras nerviosas terminales, potenciando así la acción de estos neurotransmisores. La amitriptilina, incluida entre ellos, puede producir además la inhibición de la captación de adenosina celular (Sawynok *et al.* 1999; Esser *et al.* 2001), antagonizar el receptor NMDA (Reynolds *et al.* 1988) y actuar como agonista de los receptores opioides (Onali *et al.* 2010). Todos estos mecanismos juntos podrían explicar la eficacia de este fármaco antidepresivo en procesos de hi-

peralgesia (Lee *et al.* 2011; Liang *et al.* 2011) y tolerancia (Liang *et al.* 2011; Huang *et al.* 2012; Ozdemir *et al.* 2012). No obstante, su uso está más extendido en el tratamiento de dolor persistente (p.ej. dolor neuropático) (Dharmshaktu *et al.* 2011) y hay todavía pocos estudios en personas valorando su efectividad como inhibidor de la tolerancia o la HIO.

e) **Moduladores de la glía**

La minociclina es un inhibidor de la microglía la cual prolifera y se activa liberando citoquinas (tales como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6) promoviendo la sensibilización central y el dolor persistente inducido por una lesión nerviosa (neuropático) (Clark *et al.* 2007). El desarrollo de tolerancia retardada a morfina en ratones (Mika *et al.* 2009) y ratas (Habibi-Asl *et al.* 2009) es posiblemente debido a la inhibición de la activación de la p38 MAPK en la microglía espinal (Cui *et al.* 2008) y la atenuación del número de células apoptóticas en el SNC (Hassanzadeh *et al.* 2011). Además, los inhibidores de la microglía son efectivos en dolor neuropático e hipersensibilidad visceral (Saab *et al.* 2007; Mika 2008). En personas aún no ha sido evaluada su eficacia en el tratamiento de la tolerancia y a HIO.

f) **Antagonista opioides**

Los antagonistas opioides a dosis muy bajas, mediante su unión a la filamina A (Wang *et al.* 2009), previenen la alteración en los receptores mu opioides (acoplándose a proteína Gs en lugar de Gi/o) que resultan en una señal excitatoria asociada al desarrollo de tolerancia a opioides y dependencia (Webster 2007; Largent-Milnes *et al.* 2008). Los antagonistas opioides a dosis bajas previenen esta modificación (Wang *et al.* 2009) pudiendo la combinación de ambos fármacos (agonista y antagonista) reducir la conversión de un receptor inhibitorio a excitatorio, disminuyendo el desarrollo de tolerancia (Webster 2007). Además el bloqueo del receptor TLR4 de la glia (Hutchinson *et al.* 2007) y la disminución de la neurotransmisión en el receptor NMDA en la médula espinal (Lin *et al.* 2010) completan una serie de mecanismos que justifican su eficacia en situaciones de tolerancia a opioides.

Los antagonistas opioides como la naloxona y la naltrexona, a dosis ultra-bajas, en combinación con opioides producen una potenciación del efecto analgésico de los opioides (Tuerke *et al.* 2011) y una disminución, o bloqueo, del desarrollo de tolerancia a opioides en roedores (Powell

*et al.* 2002; McNaull *et al.* 2007; Lin *et al.* 2010; Mattioli *et al.* 2010; Tuerke *et al.* 2011). En personas, la naltrexona ha demostrado también una potenciación del efecto antinociceptivo de la metadona (Cruciani *et al.* 2003) mientras que la naloxona produce una disminución del consumo de opioides en el periodo postoperatorio (Gan *et al.* 1997).

Además se ha desarrollado recientemente un fármaco (Oxytrex) que combina la acción de un agonista opioides (oxicodona) y un antagonista opioide a dosis muy baja (naltrexona) para el tratamiento del dolor crónico severo a moderado evitando así el desarrollo de tolerancia a opioides en personas (Webster 2007) y animales (Largent-Milnes *et al.* 2008).

En animales además la naltrexona a dosis ultra-bajas ha demostrado inhibir la hiperalgesia termal aguda producida por dosis bajas de morfina (Crain *et al.* 2001).

#### g) **Otros fármacos**

La metadona es un fármaco opioide sintético que ha mostrado una débil actividad antagonista NMDA (Callahan *et al.* 2004) por lo que parece ser útil reduciendo la HIO mediante la rotación con este fármaco (Low *et al.* 2012). Aunque parece presentar tolerancia cruzada incompleta con la morfina (Axelrod *et al.* 2007) hay estudios que no lo observan (Doverty *et al.* 2001). Sin embargo, como con el resto de opioides se han descrito también casos de tolerancia e hiperalgesia en personas adictas a opioides mantenidos con metadona (Doverty *et al.* 2001; Hay *et al.* 2009) y en pacientes con dolor crónico (Hay *et al.* 2009). Se ha sugerido que incluso una única administración del opioide podría producir hiperalgesia después de la analgesia inicial (Holtman *et al.* 2007).

Por otro lado la buprenorfina es un opioide agonista parcial del receptor mu y kappa opioide (Villiger *et al.* 1981; Huang *et al.* 2001) usado para el tratamiento de dolor crónico (van Ojik *et al.* 2012) y dolor perioperatorio no severo (Kimoto 2011). Estas propiedades lo hacen también útil para el tratamiento de HIO (Koppert *et al.* 2005) o la tolerancia en tratamientos con opioides prolongados (Compton *et al.* 2001)

Algunas evidencias sugieren que el propofol, por su interacción con los receptores GABA supraespinales, pudiese tener un débil efecto modulador sobre la HIO del remifentanilo aunque su significación clínica es aún desconocida (Singler *et al.* 2007).

Por otro lado, el grupo de los fármacos agonistas de los receptores alfa2 entre los que destaca la clonidina en medicina humana han sido también evaluados respecto a su uso en la prevención y/o tratamiento de tolerancia e HIO (Lee *et al.* 2011). Aunque hay estudios en voluntarios que muestra como estos fármacos pueden atenuar el desarrollo de HIO después de una exposición aguda a opioides (Koppert *et al.* 2003), hay cierta controversia en estudios en animales de si estos fármacos pueden producir o no hiperalgesia (Davies *et al.* 2003; Quartilho *et al.* 2004).

---

## 1.4 Concentración Alveolar Mínima (CAM)

---

### 1.4.1 Definición e historia de la CAM

La Concentración Alveolar Mínima (CAM) se define como la concentración alveolar mínima de un anestésico que previene el movimiento en respuesta a un estímulo nociceptivo en el 50% de los individuos (Merkel *et al.* 1963). La CAM es un concepto similar a la dosis eficaz 50 (DE50) de un fármaco y viene expresada como porcentaje de una atmósfera (760 mm Hg) de la presión parcial del gas anestésico, ya que se ve influenciada por la altitud (Eger *et al.* 1965; Quasha *et al.* 1980).

Este concepto de CAM apareció como parte de una investigación llevada a cabo en 1963 por Edmond Eger II y Giles Merkel sobre un nuevo anestésico inhalatorio, el halopropano (Merkel *et al.* 1963). Estos investigadores buscaban una medida o índice de anestesia que fuese fiable para poder definir las propiedades del halopropano en perros (Eger 2002) y definieron la CAM bajo dos premisas. La primera, el movimiento es una respuesta categórica consistente, no como la frecuencia cardiaca o presión arterial que podía modificarse por otros factores como reflejos vagales (Eger 2002). La segunda era que si mantenían la concentración final espirada de halopropano estable por un periodo suficiente de tiempo podría darles una medida de la presión parcial del anestésico en su lugar de acción, ya que la presión parcial en el cerebro de una gas inerte se equilibra rápidamente con la de la sangre arterial (Eger 2002).

El siguiente paso, junto a Larry Saidman, fue determinar la CAM en humanos para lo cual tuvieron que sustituir el pinzamiento de la cola que hacían en perros por la incisión en piel quirúrgica

(Saidman *et al.* 1964). Un año más tarde, en 1965, llegó toda una serie de artículos centrados en la demostración de la CAM para una mayor variedad de anestésicos (Eger *et al.* 1965) y en la revisión de una serie de factores que podrían influenciar la CAM (Eger *et al.* 1965; Eger *et al.* 1965), todos ellos en perros. Pocos años después llegarían los estudios de CAM en ratas (Miller *et al.* 1968; Vitez *et al.* 1973).

#### 1.4.2 Usos y limitaciones de la CAM

##### a) Comparación entre anestésicos inhalatorios

La CAM se ha convertido actualmente en la medida estándar de la potencia de un anestésico inhalatorio a pesar de sus imperfecciones y limitaciones, ya que no se conoce otro método más eficaz (Eger 2002). Sirve también para expresar la profundidad anestésica alcanzada con el agente inhalatorio como la relación entre la concentración alveolar del anestésico respecto a 1,0 x CAM (0,5 x CAM, 2 x CAM) garantizando que a iguales valores de CAM obtendremos un plano anestésico similar aunque las concentraciones de anestésicos puedan ser muy diferentes entre sí. Así, permite caracterizar y comparar distintos anestésicos con una depresión del SNC similar y valorar otras características como p. ej. grado de depresión cardiorrespiratoria o bloqueo neuromuscular y flujo sanguíneo a órganos vitales como el corazón, el riñón, el hígado o el cerebro (Quasha *et al.* 1980). Además facilita y unifica estudios de mecanismos de acción donde actúan los anestésicos inhalatorios. Y lo más importante es una importante herramienta clínica muy útil para estimar la profundidad anestésica del paciente y darse cuenta de los factores que pueden alterar las necesidades de anestésicos.

##### b) Reducción de la CAM por fármacos

La CAM es una medida muy útil para conocer cómo distintos fármacos usados habitualmente en la práctica clínica como sedantes (Hall *et al.* 1988) otros anestésicos o analgésicos (McEwan *et al.* 1993) pueden alterar los requerimientos anestésicos de un paciente.

Desafortunadamente con el animal anestesiado no se pueden realizar estudios convencionales de nocicepción empleando estímulos mecánicos (von Frey, Randall Selitto o plantar test) o térmicos, y solo es posible evaluar la analgesia intraoperatoria de forma indirecta. Uno de los métodos más empleados habitualmente en los estudios animales es valorar la reducción de la

CAM que producen estos fármacos. Este método tiene notables ventajas, entre ellas, da una cuantificación fidedigna del efecto observado, evita falsos positivos producidas por el estrés en el manejo de los animales, simula la situación intraoperatoria y es éticamente más aceptable ya que el animal está inconsciente (Docquier *et al.* 2003). Los resultados obtenidos con este método son comparables con aquellos obtenidas con el animal despierto (Docquier *et al.* 2003).

Los resultados obtenidos de la reducción de la CAM por fármacos entre la CAM de inmovilidad y la CAM de respuesta del sistema nervioso autónomo ( $CAM_{BAR}$ ), calculados como porcentaje de reducción respecto a su basal), depende del fármaco evaluado. Por ejemplo, la clonidina (agonista  $\alpha_2$ ) da valores de CAM similares mientras que el sufentanilo (agonista opioide) muestra diferencias en su patrón de reducción entre las dos CAM. Esto podría ser causado por cambios hemodinámicos que altere la respuesta autónoma sin modificar la nocicepción; debido a ello, no siempre puede resultar fiable la  $CAM_{BAR}$  para este propósito (Docquier *et al.* 2003).

#### c) **Limitaciones de la CAM**

La CAM está considerado un método para evaluar nocicepción objetivo, reproducible y con resultados comparables a métodos nociceptivos comportamentales (Docquier *et al.* 2003). Su principal limitación es que al realizarse bajo anestesia inhalatoria el resultado obtenido no es únicamente la potencia antinociceptiva del fármaco si no que hay que tener en cuenta las posibles interacciones entre el halogenado y el fármaco que se está evaluando (Docquier *et al.* 2003). De igual forma, la reducción de la CAM no es una medición de analgesia o nocicepción solo porque hay fármacos sedantes, sin capacidad analgésica, como la acepromacina o el diazepam que también disminuyen la CAM (Tsunoda *et al.* 1971; Heard *et al.* 1986). Sin embargo, sus resultados son muy útiles para la práctica anestésica diaria ya que nos proporciona una idea de la disminución de los requerimientos inhalatorios que producirían estos fármacos durante una anestesia.

Otra de las limitaciones del método es que la CAM se ve alterada por mucho factores comentados en otros apartados tan habituales como la edad (Eger 2001), la temperatura (Eger *et al.* 1965) o el dióxido de carbono (Brosnan *et al.* 2007). Por ello es muy importante conocerlos y controlarlos para que no haya modificaciones de los mismos durante el estudio ni sean diferentes entre grupos.

### 1.4.3 Determinación de la CAM

Los primeros estudios en animales y personas empezaron en 1963 y 1964, respectivamente, donde se determinaba la CAM poblacional (*quantal study design*), es decir, cuál era la concentración de mínima de un anestésico que previene el movimiento en respuesta a un estímulo nociceptivo en el 50% de los individuos (Merkel *et al.* 1963; Saidman *et al.* 1964). Con este método cada animal se anestesiaba a una concentración concreta y se evaluaba si respondía o no a un único estímulo nociceptivo (la incisión quirúrgica en piel en el caso de las personas y el pinzamiento de la cola en caso de perros). Con todas las respuestas positivas y negativas de los individuos se ajustaba a una curva dosis-respuesta y se determinaba la CAM para el 50% de los individuos.

Este método de CAM poblacional se emplea actualmente en pacientes ya que solo se puede realizar un único estímulo por paciente, pero ha sido modificado ligeramente con el método de arriba-abajo (*Up & Down*) de Dixon (Dixon 1965). En él, la respuesta de cada individuo condiciona la concentración de anestésico inhalatorio que recibe el siguiente paciente. Si la respuesta es positiva se aumenta el anestésico inhalatorio en un porcentaje determinado en el siguiente paciente y si es negativa se disminuye el anestésico en esa misma proporción. El cambio en la respuesta (positivo a negativo o viceversa) se denomina cruce y su valor será la media de las dos concentraciones de cada paciente, siendo la CAM final la media obtenida de cuatro o más cruces. Este método se ha demostrado ser muy fiable y reproducible (Paul *et al.* 2001) y es el empleado actualmente en estudios clínicos (Chen *et al.* 2011).

El segundo método para determinar la CAM (*bracketing study design*) fue introducido por Waizer en 1973 (Waizer *et al.* 1973) y se realiza a partir de la CAM individual de cada sujeto siendo el que se utiliza con mayor frecuencia en estudios con animales. Se induce la anestesia al animal con el anestésico inhalatorio, sin premedicación previa ni otros agentes anestésicos, y se mantiene a una concentración constante hasta la aplicación del estímulo nociceptivo (llamado tiempo de equilibrado, generalmente entre 10 y 30 minutos según el agente empleado). Se considera que la respuesta es positiva si el animal realiza un movimiento brusco de la cabeza, las extremidades o el cuerpo y que es una respuesta negativa si no realiza ningún movimiento, deglute, mastica o mueve la cola. Si la respuesta es positiva, la concentración de anestésico se

aumenta un determinado porcentaje; y viceversa, si la respuesta es negativa la concentración de anestésico se disminuirá en esa misma proporción. Y así sucesivamente con cada estímulo hasta que la respuesta positiva se convierta en negativa y viceversa. La CAM de inmovilidad del individuo será la media entre la concentración que prevenga el movimiento y aquella que lo favorezca. Para un grupo de animales la CAM es la media aritmética de las diferentes CAM individuales. Los resultados obtenidos de esta forma son iguales que obteniendo la CAM poblacional (*quantal design*) (Sonner 2002).

Por otro lado, también se ha desarrollado la CAM<sub>BAR</sub> donde no se valora el movimiento como respuesta sino los cambios cardiovasculares producidos al aplicar el estímulo nociceptivo; considerando respuestas positivas un aumento en la frecuencia cardíaca y/o la presión arterial por encima de un 10-15% (Roizen *et al.* 1981; Docquier *et al.* 2003). En ratas, la CAM<sub>BAR</sub> da valores significativamente iguales que la CAM de inmovilidad aunque hay una tendencia a ser ligeramente mayores (Docquier *et al.* 2003); mientras que en personas, la CAM<sub>BAR</sub> es mayor (por ejemplo, la CAM<sub>BAR</sub> de sevoflurano es el doble que la CAM de inmovilidad (Kato *et al.* 1987; Kato *et al.* 1999). Este valor de CAM podría ser más útil clínicamente ya que refleja como los cambios en el anestésico inhalatorio se realizan en base a la respuesta cardiovascular frente al estímulo nociceptivo, pero por otro lado se ve más alterada por cambios los cambios producidos por el fármaco, paciente o cirugía (p. ej. reflejos vagales).

Además se han evaluado también otras CAM valorando la respuesta a otros parámetros como la intubación endotraqueal (*CAM intubación*) (Kimura *et al.* 1994) o la recuperación de la anestesia (*CAM despertar*) (Stoelting *et al.* 1970) entre otros.

#### 1.4.4 Mecanismo de acción: anestésicos inhalatorios e inmovilidad

Todos los anestésicos inhalatorios comparten la característica de producir inmovilidad frente a una estimulación nociceptiva. A pesar de los numerosos estudios realizados durante las últimas dos décadas todavía no está claro cuál es el mecanismo de acción implicado detrás de ello (Sonner *et al.* 2003; Eger *et al.* 2008) ya que no hay ningún ligando, canal u otra diana ni combinación de ellos que sea capaz de explicar más que una pequeña parte de la inmovilidad producida por los anestésicos inhalatorios (Eger *et al.* 2008).

Lo que sí parece estar claro es el lugar predominante de acción de estos fármacos para producir inmovilidad: la medula espinal (Antognini 2011). Rampil demostró que la descerebración y la sección de la medula espinal a distintos niveles en ratas no modificaba las necesidades de anestésico inhalatorio (Rampil *et al.* 1993; Rampil 1994). Resultados similares se obtuvieron con cabras donde observaron que se necesitaban concentraciones de anestésico inhalatorio dobles o triples en el cerebro que en la medula espinal para producir inmovilidad (Antognini *et al.* 1993) lo cual por otro lado no descarta la participación, aunque minoritaria, del cerebro en este proceso. Estudios recientes siguen validando esta teoría ya que en el torso (y presumiblemente la medula espinal) se concentra más cantidad de anestésico inhalatorio que a nivel espinal (Yang *et al.* 2009).

Dentro de la medula espinal no está claro que zona o tipo celular juega un mayor papel en la inmovilidad pero se cree que podría ser la zona ventral más que la dorsal por ser más sensibles a los anestésicos en concentraciones cercanas a la CAM (Kim *et al.* 2007) y dentro de ella, se especula como mejores candidatos las neuronas CPG (*central pattern generators*) frente a las motoneuronas.

No hay establecido ningún mecanismo molecular que explique más que parcialmente la inmovilidad producida por los anestésicos inhalatorios. Los estudios genéticos modernos con ratones knock-out y knock-in han excluido como mecanismos de acción a varios canales y receptores que habían sido hasta entonces buenos candidatos (Eger *et al.* 2008). Hasta hace muy pocos años uno de estos candidatos era el receptor de glicina debido a que tenía una amplia distribución en la medula espinal y al hecho de que la glicina producía una disminución de la CAM (Zhao *et al.* 2008) así como sus antagonistas como la estriquina la aumentan (Zhang *et al.* 2003). Estudios recientes con líneas de ratones con mutaciones en el receptor de la glicina han observado una mayor sensibilidad o resistencia al anestésico inhalatorio según cuál de ellos se tratara (Quinlan *et al.* 2002) por lo que ha sido relegado a un papel secundario o menos influyente en los fenómenos de inmovilidad. Un proceso similar ocurrió con otros plausibles candidatos (Eger *et al.* 2008) como los canales de potasio (Gerstin *et al.* 2003), los receptores NMDA (Eger *et al.* 2006), GABA (Liao *et al.* 2005) o serotoninérgicos (Zhang *et al.* 2003).

Actualmente los canales de sodio son los que tienen más probabilidades de ser los principales mecanismos de acción por varios factores: la modificación de la CAM lineal producida por cambios en las concentraciones de sodio en el sistema nervioso central (Tanifuji *et al.* 1978), la disminución de la CAM producida por lidocaína (Valverde *et al.* 2004) así como el aumento producido por la veratridina, fármaco que potencia la acción de los canales de sodio (Zhang *et al.* 2008) y la inhibición de algunas isoformas de canales de sodio por los anestésicos inhalatorios (Rehberg *et al.* 1996) mantienen hasta el momento a este candidato.

#### 1.4.5 Factores que afectan a la CAM

##### a) Variaciones intra- e inter-especies

Para la mayoría de las especies la CAM varía entre el 10 y el 20% (Quasha *et al.* 1980). Por ejemplo, el halotano tiene una CAM de 0,74%vol en el hombre (Saidman *et al.* 1964) , 0,82 %vol en conejos (Davis *et al.* 1975), 0,86%vol. en el perro (Eger *et al.* 1965), 0,88%vol en el caballo (Steffey *et al.* 1977), o 1,17%vol en ratas (Waizer *et al.* 1973). Todavía menor (<10%) es la variación encontrada para diferentes determinaciones dentro del mismo individuo (Quasha *et al.* 1980).

##### b) Estímulo nociceptivo

En general no hay diferencias en la CAM según el estímulo nociceptivo empleado siempre que este sea supramáximo. El tipo de estímulo nociceptivo empleado no es relevante, ya sea mecánico por pinzamiento de la cola (*tail clamp*) o eléctrico, y dan resultados similares (Valverde *et al.* 2003). La incisión en piel, en cambio, da resultados de CAM menores ya que es un estímulo menos intenso (Valverde *et al.* 2003). En ratas, el pinzamiento de la cola es un estímulo más importante que la presión en la pata trasera (*paw pressure*, Randal Selitto) (Docquier *et al.* 2003).

##### c) Sexo

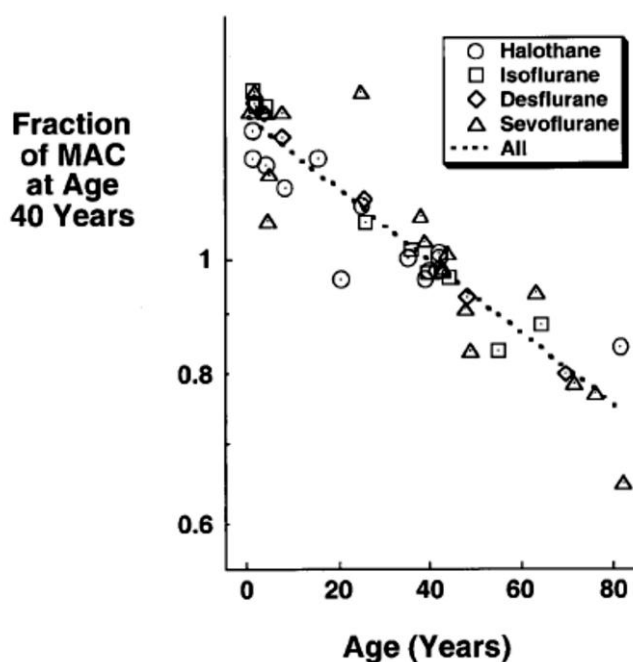
La CAM en personas es igual entre hombres y mujeres (Eger *et al.* 2003; Wadhwa *et al.* 2003).

d) **Edad**

La CAM sufre variaciones con la edad siendo mayor cuanto más joven es la persona. Por ejemplo, la CAM de halotano en recién nacidos es de 1,1 %vol frente a ancianos que es de casi la mitad (0,64 %vol.) (Gregory *et al.* 1969).

Así, se ha determinado esta misma relación con varios agentes anestésicos inhalatorios como el isoflurano (Stevens *et al.* 1975) o el sevoflurano (Lerman *et al.* 1994; Fragen *et al.* 1996). En líneas generales se ha determinado que la CAM disminuye aproximadamente un 6-7% con cada década de vida (Mapleson 1996; Eger 2001) (Figura 8).

Una variación similar se observa en ratas bajo anestesia inhalatoria que tienen una CAM de halotano un 15-17% menor en los animales de mayor edad (25 meses, equivalente a ancianas, CAM de 1,05 %vol.) respecto a los jóvenes (5 ó 14 meses, equivalente a ratas adultas, CAM de 1,2 %vol.) (Loss *et al.* 1989).



**Figura 8.** Modificación de la CAM de anestésico en función de la edad y recta de regresión de todos ellos. La CAM disminuye un 6,7% con cada década de vida en personas.

*Fuente: Eger, 2001.*

e) **Ritmo circadiano**

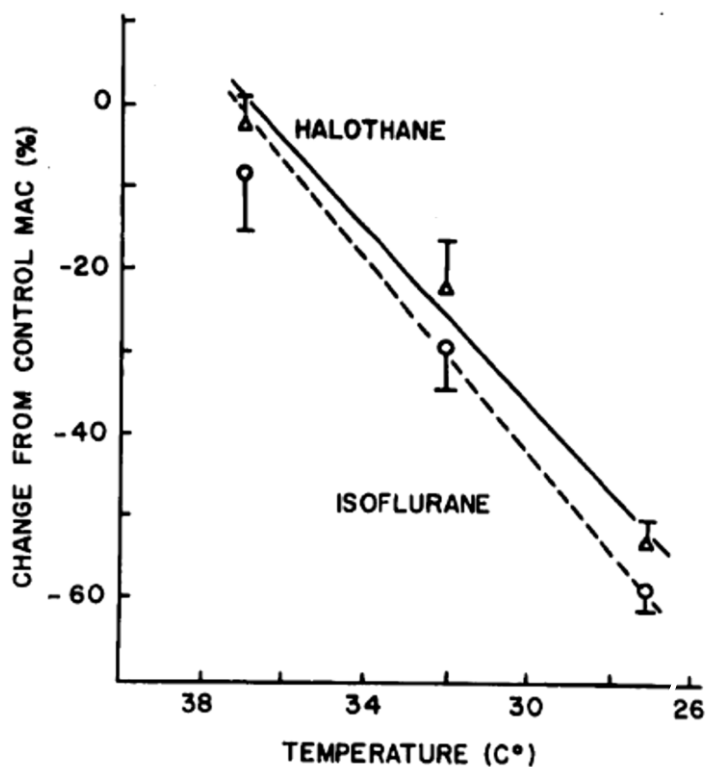
En roedores, la CAM varía ligeramente en el mismo individuo (10% aproximadamente) según la hora a la que sea determinada, siendo mayor en la fase de oscuridad (Eger *et al.* 1965).

f) **Tiempo de anestesia**

El tiempo de anestesia no influye en la CAM ni unas horas después (Eger *et al.* 1965) ni dos semanas más tarde (Eger *et al.* 1965) aunque hay que tomar precaución porque muchos estímulos nociceptivos en la misma zona podrían producir sensibilización central y una disminución de la CAM tras 150 minutos con 40 pinzamientos de la cola (Docquier *et al.* 2003).

g) **Temperatura**

La disminución en la temperatura corporal disminuye los requerimientos anestésicos y por tanto la CAM. Por ejemplo en perros el halotano y el ciclopropano disminuyen la CAM proporcionalmente con la caída en la temperatura pero en distinta magnitud; así, la disminución de 10 °C de la temperatura corporal produce una disminución de la CAM del 50% con halotano pero solo un 25% con ciclopropano (Eger *et al.* 1965). En esta misma especie se examinó el efecto de la hipotermia con otros agentes inhalatorios mostrando una caída rectilínea más pronunciada cuanto más liposoluble sea el anestésico (Regan *et al.* 1967). También se observó en ratas una disminución de la CAM con la hipotermia de forma lineal y similar entre el halotano y el isoflurano (Vitez *et al.* 1974) (Figura 9). Generalizando se puede concluir que la CAM disminuye de forma lineal en un 4-5% por cada °C disminución de la temperatura (Eger 2001).



**Figura 9.** Efecto de la temperatura sobre la CAM de halotano (triángulos) e isoflurano (círculos) en ratas respirando espontáneamente. Los valores son medias  $\pm$  DE.

*Fuente: Vitez et al, 1974.*

#### h) Hipocapnia e hipercapnia

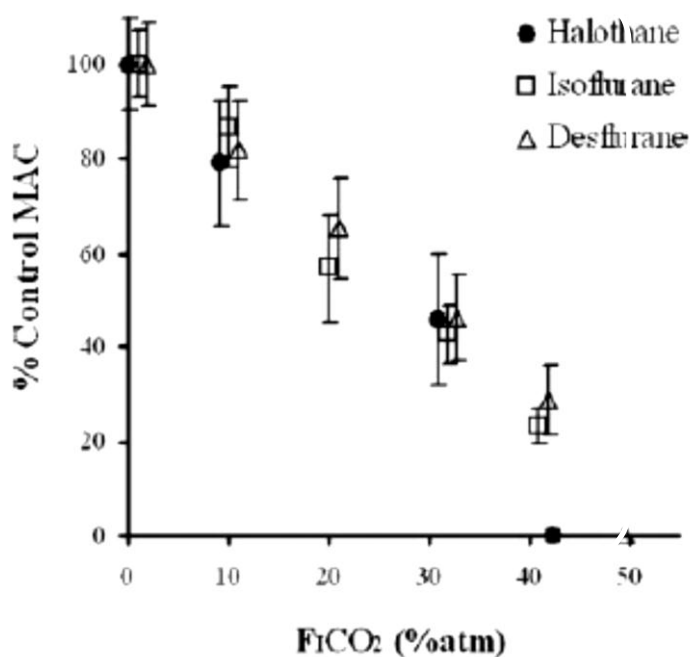
La disminución de la presión arterial de dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) o hipocapnia no altera la CAM de halotano en perros (14 mm Hg) ni en personas (21 mm Hg) (Eger *et al.* 1965; Bridges *et al.* 1966). Por otro lado, niveles de  $\text{CO}_2$  por encima de 95 mm Hg ( $\text{PaCO}_2$ ) si producen un efecto narcótico y una disminución de la CAM en perros dosis dependiente hasta no necesitar anestésico inhalatorio a una  $\text{PaCO}_2$  de 245 mm Hg (Eisele *et al.* 1967).

Más recientemente, se ha evaluado en ratas el efecto de concentraciones crecientes de  $\text{CO}_2$  en la CAM de distintos anestésicos inhalatorios: halotano, isoflurano y desflurano (Brosnan *et al.* 2007) (Figura 10). Se ha observado una disminución lineal en la CAM en un 20% aproximadamente por cada 10% de incremento de la  $\text{FiCO}_2$ , equivalente aproximadamente a 80 mmHg. (Brosnan *et al.* 2007).

#### i) Hipoxia e hiperoxia

La CAM de halotano en perros no se ve alterada entre valores de presión arterial de oxígeno ( $\text{PaO}_2$ ) entre 38 y 500 mmHg (Eger *et al.* 1965; Cullen *et al.* 1970). Con hipoxia severa ( $\text{PaO}_2$

de 38 mmHg) o muy severa ( $\text{PaO}_2$  de 28 mmHg) la CAM cae en un 40 y 80% respectivamente (Cullen *et al.* 1970).



**Figura 10.** Modificación de la CAM de anestésico inhalatorio (halotano, isoflurano o desflurano) en función de la fracción de dióxido de carbono inspirada ( $\text{FiCO}_2$ ). Los valores son medias  $\pm$  DE de 8 animales.

Fuente: Brosnan *et al.*, 2007.

#### j) Hipotensión e hipertensión

La disminución de la presión arterial media a 40-50 mm Hg provoca una disminución de la CAM del 20% en la primera hora manteniéndose estable las siguientes 3 horas. Con presiones arteriales más bajas (presión arterial media de 20-30 mm Hg) la CAM disminuye hasta un 70% si la hipotensión es rápida y continua, o un 40% si ésta es gradual. En resumen, la caída de la CAM es mayor cuanto más brusca se produce una hipotensión (Tanifuji *et al.* 1976).

Por otro lado la hipertensión arterial por sí misma no altera la CAM aunque si ésta está producida por sustancias que produzcan a su vez aumento de la liberación de catecolaminas en el SNC (p. ej. efedrina) si pueden observarse aumentos en la CAM (Steffey *et al.* 1975).

#### k) Otros factores

Existen más factores que podrían alterar el valor de la CAM como la acidosis metabólica o la función tiroidea (Quasha *et al.* 1980) en los cuales no profundizaremos por ser alteraciones menos frecuentes.



## **OBJETIVOS**



- Determinar si la TAO asociada a una infusión continua de remifentanilo pudiera desarrollarse durante la anestesia inhalatoria,
  - disminuyendo la reducción de la CAM de sevoflurano producida por el remifentanilo.
  - compensándose mediante un aumento de dosis de remifentanilo.
  
- Determinar si fármacos como la ketamina, gabapentina, amitriptilina, minociclina o meprobamita,
  - pueden prevenir o bloquear el desarrollo de TAO al remifentanilo, determinado como una disminución de la reducción de la CAM producida por el opioide.
  - si, además, estos fármacos pueden reducir la CAM de forma aislada o asociados a remifentanilo, potenciando su efecto.
  
- Determinar si las dosis ultra-bajas de naloxona administradas junto al remifentanilo en infusión continua podría inhibir el desarrollo de TAO (horas), de tolerancia retardada (días) pero también de hiperalgesia asociada a la administración del remifentanilo.





## **MATERIAL Y MÉTODOS**



El presente estudio fue aprobado por el Comité de Ética y Bienestar Animal del Hospital Universitario La Paz (Madrid, España) en cuyas instalaciones de Cirugía Experimental fue realizada la parte experimental.

El desarrollo del estudio fue llevado a cabo bajo la concesión de dos proyectos del Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS) del Instituto de Salud Carlos III, del Ministerio de Sanidad y Consumo (PI050441 y PI080422).

---

### 3.1 Animales

---

Todos los animales empleados (n=307) fueron ratas Wistar macho adultas procedentes de Charles River Laboratories (Barcelona, España). Se alojaron en el animalario de la Unidad de Investigación del Hospital Universitario La Paz (Madrid, España) distribuidas en grupos de 4-6 animales por cubeta (macrolon tipo IV). El ciclo de luz (12 horas luz: 12 horas oscuridad), la temperatura ( $20\pm 2^{\circ}\text{C}$ ) y la humedad ambiental (40-70%) estuvieron controladas en todo momento. El agua y la comida (A03 dieta de mantenimiento para roedores, SAFE, Panlab, Barcelona, España) era suministrado *ad libitum*.

Tras un periodo de cuarentena y aclimatación de al menos una semana desde su llegada al animalario, las ratas eran empleadas en los distintos experimentos empezando a primera hora de la mañana (8 am).

---

### 3.2 Anestesia, instrumentación y monitorización

---

#### 3.2.1 Inducción a la anestesia

Las ratas se colocaban en una cámara de inducción de metacrilato donde se aplicaba un flujo de oxígeno 100% de 3 l/min con 8%vol de sevoflurano (Sevorane, Abbott Laboratories. Madrid, España). Una vez perdían el reflejo de estación se disminuía el flujo de oxígeno a 0,75-1 l/min y los animales se sacaban de la cámara de inducción colocándose de cubito esternal para termi-

nar su inducción mediante mascarilla. Este momento era aprovechado para realizar el pesaje del animal.

### 3.2.2 Intubación endotraqueal

La intubación endotraqueal permite la administración de la anestesia inhalatoria, en nuestro estudio con sevoflurano, facilitando un mejor control de la vía aérea y de la ventilación, así como una disminución de la contaminación del laboratorio. Para ello, usábamos un otoscopio con cono largo y fino, una guía metálica flexible con punta roma (en nuestro caso era obtenida de equipos de catéteres yugulares) y un venocatóter de polietileno 14G (Terumo Surflo, Terumo Europe NV, Leuven, Bélgica), que sustituía al tubo endotraqueal.

Una vez la rata estaba anestesiada (figura 11, izquierda) y posicionada en decúbito esternal abríamos la boca del animal y extraíamos la lengua con nuestros dedos de manera delicada. Con la mano contraria sujetábamos el otoscopio introduciendo el cono hacia el interior de la cavidad bucal. A través de él se visualizaba la epiglotis y el cartílago aritenoides, abriendo y cerrándose rítmicamente siguiendo la inspiración y la espiración del animal. Introducíamos la guía por el otoscopio, y haciendo coincidir con la fase de inspiración y apertura de las alas del aritenoides la deslizábamos con delicadeza unos centímetros hacia el interior de la tráquea. Sujetando el extremo distal de la guía extraíamos suavemente el cono del otoscopio. Por el extremo libre de la guía introducíamos el catéter y avanzando éste deslizándolo suavemente sobre la guía hacia el interior de la boca, intentando coincidir con el momento de inspiración. Introducíamos el tubo hasta dejar el cono del catéter a la altura de los incisivos y extraíamos la guía metálica del interior. Comprobábamos la posición correcta del tubo, verificando la entrada y salida de aire con la respiración mediante el hilo de la gasa colocado delante del cono del venocatóter (figura 11, centro).

A continuación fijábamos correctamente el cono del catéter con esparadrapo (figura 11, derecha). Si hubiese secreciones aspiraremos con una jeringa de 5ml y un catéter (sirve un catéter de epidural acoplado a una jeringa de 25G). Introduciremos el catéter en un movimiento rápido y suave en la cavidad oral hasta acercarnos a la carina y aspirando continuamente tanto al

introducirlo como al extraerlo, tantas veces sea necesario hasta que se escuchase ruido respiratorio alguno y la curva de capnografía fuese normal.



**Figura 11.** Intubación endotraqueal en la rata.

### 3.2.3 Cateterización de arteria carótida

El acceso a la arteria carótida se realiza para la medición y monitorización invasiva de la presión arterial y la extracción de gasometrías arteriales al final del estudio.

Una vez la rata estaba intubada y conectada a un pequeña T-Ayre, diseñada para minimizar el espacio muerto entre el circuito y la boca del paciente (figura 12, izquierda), se mantiene anestesiada con un 4%vol de sevoflurano en un flujo de oxígeno 100% de 0,75-1 l/min. Pelábamos la zona ventral del área del cuello y desinfectábamos con povidona yodada diluida al 10%. Realizábamos una incisión en la zona del cuello ventrolateral con una tijera de Iris recta y diseccionamos la zona subcutánea hasta localizar los músculos esternohioideo y omohioideo entre los cuales se localiza ventralmente la arteria carótida, ventromedial a la vena yugular. Exponemos la arteria carótida y la separaremos del nervio vago con cuidado. Colocamos una ligadura lo más proximal a la cabeza y distalmente una lazada más larga para crear tensión en el vaso durante la venotomía e inserción del catéter. Colocaremos en la zona intermedia del área expuesta, una tercera lazada para fijar el catéter y que no se deslice por la propia presión arterial existente. Realizamos una pequeña incisión en la arteria carótida con una tijera Wescott-hoja larga, lo suficientemente grande para permitir el paso de nuestro catéter, e introducimos éste siempre con el bisel hacia abajo. Debemos sobrepasar la lazada más distal y para ello aseguraremos el catéter anudando la lazada intermedia. Sobrepasada la más distal, anudamos la misma sobre el catéter fijándolo definitivamente. Podemos también anudar la ligadura proximal

sobre el catéter para asegurarlo con mayor eficacia. Comprobamos que sale sangre del catéter, mediante una jeringa de insulina con suero heparinizado unida al mismo.

Una vez validado el modelo y visto que la presión arterial así como las gasometrías arteriales se mantienen normales durante todos los experimentos, en la parte 5 a 8 (apartados 3.4.5 a 3.4.8) no se realizó dicho procedimiento ya que la incisión quirúrgica necesaria podría desencadenar un fenómeno de hiperalgesia (Celerier *et al.* 2006; Cabanero *et al.* 2009).

### 3.2.4 Monitorización

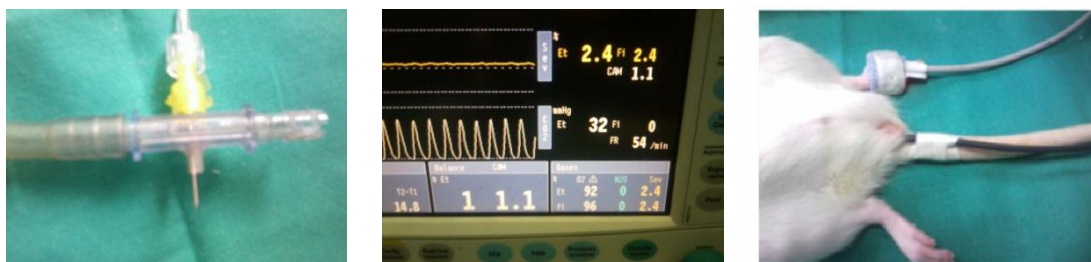
Las ratas una vez instrumentalizadas se mantienen con ventilación espontánea en un flujo de oxígeno 100% de 0,75-1 l/min durante todo el experimento. Es en este momento en el que monitorizaban.

Mediante la cateterización invasiva de la arteria carótida (apartado 3.2.3) se registraba de forma continua la frecuencia cardíaca y la presión arterial invasiva; a través de la pulsoximetría colocada en las patas posteriores se mide la saturación de oxígeno por la hemoglobina. La temperatura corporal se monitorizaba a través de una sonda rectal y se mantuvo en rangos normales (37,5-38,5°C) gracias al uso de una manta de agua circulante (Heat Therapy Pump, modelo TP-220, Gaymar, Orchard Park, NY) y un flexo con bombilla tradicional de 60W. Todos estos parámetros se monitorizan mediante el monitor RGB (Medical Devices, Madrid, España).

La capnografía (medición de dióxido de carbono) así como la medición de la concentración del anestésico inhalatorio inspirada y espirada se realizó mediante el Capnomac Ultima (Datex-Ohmeda, Hertfordshire, Inglaterra) conectando el tubo prolongador a una aguja 14G que se insertaba dentro del cono a través de un orificio en la pieza en T del circuito llegando el extremo distal a la altura de la boca del animal. En los experimentos 5 a 8 (apartados 3.4.5 a 3.4.8) en cambio se usó el monitor SA5 (Datex -Ohmeda, Helsinki, Finlandia) para registrar estos parámetros respiratorios así como la pulsoximetría y la temperatura. (Figura 12, centro y derecha).

Para evaluar la concentración de gas anestésico empleada para la determinación de la CAM se emplearon muestras de gas intratraqueales (Pajewski *et al.* 1996). Para ello, se introducía un catéter muy fino (0,9 mm de diámetro externo) a través de la pieza en T hasta alojar su extremo

distal en la carina. El extremo proximal se conectaba a una jeringa de cristal de 10 ml (Hamilton 26211-U100, Series Gastight; Sigma Aldrich, St. Louis, MO). La muestra de gas se obtenía por aspirado de 10 ml durante los 5 min previos a la estimulación de la CAM mediante una bomba de infusión-aspiración (Modelo 55-2226, Harvard Apparatus, Milis, MA) y se analizaban mediante la inyección en el capnógrafo (Datex-Ohmeda, Hertfordshire, Inglaterra). La muestra obtenida así resulta de la mezcla de gas inspirado y espirado pero al tratarse de un gas poco soluble en sangre ambas medidas suelen ser iguales a los 5 minutos de realizar cualquier cambio de concentración en el vaporizador. Si no hay secreciones en el tubo normalmente esta medida coincide con el gas anestésico obtenido con capnógrafo mientras que el CO<sub>2</sub> obtenido por aspiración es ligeramente mayor al CO<sub>2</sub> espirado del capnógrafo. El catéter se extraía entre las distintas mediciones obtenidas para no aumentar el esfuerzo respiratorio del animal.



**Figura 12.** Monitorización en la rata.

Al final del experimento en los estudios 1 a 4 (apartados 3.4.1 a 3.4.4) se extrajeron muestras arteriales de gasometría en jeringas heparinizadas (1ml) que eran analizadas el laboratorio de Urgencias del Hospital Universitario La Paz (Rapilab 860 de Bayer AG, Leverkusen, Alemania). El objetivo era asegurar que los valores se encontraban dentro de los límites aceptables: el pH entre 7,34 y 7,44; la presión arterial de oxígeno por encima de 90 mmHg y la presión parcial de dióxido de carbono por debajo de 55 mmHg.

### 3.2.5 Administración de remifentanilo

En todos los animales que recibieron remifentanilo se administró como una infusión continua intravenosa a 120 o 240 µg/kg/h (dosis baja y alta, respectivamente), sin bolo de carga previo. Para ello se cateterizaba la vena lateral de la cola con un venocatóter 22G (Terumo Surflo, Terumo Europe NV, Leuven, Bélgica), se fijaba convenientemente con esparadrapo, se hepari-

nizaba y se conectaba a través de un prolongador previamente purgado a la jeringa de infusión (bomba de infusión Sep11S de Ascor SA Medical Equipment; Warsaw, Polonia).

El remifentanilo empleado fue Ultiva® 5mg de Glaxo-Wellcome Laboratories (Madrid, España). El vial se reconstituía con 10 ml de suero fisiológico y con él se prepara una dilución de 25 o 50 µg/ml (para la dosis de 120 o 240 µg/kg/h respectivamente) en una jeringa de 20 ml, es decir, se tomaban 1 o 2 ml del remifentanilo reconstituido respectivamente, y era diluido hasta 20ml con salino. La infusión de remifentanilo (o el salino en el caso de controles) se administra siempre a una velocidad de 4,8 ml/kg/h.

### 3.2.6 Administración de otros fármacos

La ketamina empleada fue Ketolar 500®, obtenida de Parke-Davis de Pzifer (Madrid, España). El rango de dosis empleado fue seleccionadas en base a estudios previos en ratas donde las dosis subanestésicas bloquean la hiperalgesia a opioides (Celerier *et al.* 2000; Van Elstraete *et al.* 2011) y dosis más altas para producir reducciones de la CAM clínicamente relevantes, sin producir considerables efectos adversos. Se administraron diluidas en 1ml de salino por vía IP.

La naloxona empleada en el estudio de ketamina fue obtenida de Sigma-Aldrich (St. Quentin Fallavier, Francia) y administrada diluida con salino hasta 1ml por vía IP. La dosis empleada fue seleccionada de estudios previos donde afirmaban que la dosis para inhibir la ketamina era superior en roedores que para antagonizar los agonistas opioides (Pekoe *et al.* 1982; Smith *et al.* 1987; Hance *et al.* 1989; Crisp *et al.* 1991).

La gabapentina utilizada (Pharmagenus, grupo Uriach, Barcelona, España) se presentaba como capsulas de 300 mg. Previa a su administración se diluye con 2ml de salino y seguidamente era administrado vía oral. Para ello se realizaba el sondaje oral después de la inducción, con un catéter flexible colocado a la parte final del esófago con el animal en vertical y en un plano de anestesia superficial. Se administra el fármaco (o salino) después de comprobar la colocación correcta del catéter (mediante la ausencia de dióxido de carbono en el capnógrafo colocado en extremo distal) y se deja al animal unos segundos en posición vertical para evitar una posible neumonía por aspiración. La dosis seleccionadas de gabapentina se realizó a su eficacia

cia produciendo analgesia en ratas (Ortega-Varela *et al.* 2004) o antihiperalgésica inducida por opioides (Van Elstraete *et al.* 2011).

La amitriptilina fue suministrada por Sigma-Aldrich (St. Quentin Fallavier, Francia), se diluyó en salino y se administró por vía intraperitoneal (diluida hasta 1ml de salino). Las dosis baja de amitriptilina, vía y de administración fue establecida de acuerdo a estudios previos (Esser *et al.* 1999; Esser *et al.* 2001; Bomholt *et al.* 2005). La dosis alta de amitriptilina fue obtenida por quintuplicar la dosis baja para asegurar que la posible ausencia de efecto sobre la tolerancia no fuese debida al uso de una dosis insuficiente.

La minociclina fue obtenida también de Sigma-Aldrich (St. Quentin Fallavier, Francia), se diluyó en salino y se administró por vía intraperitoneal (diluida hasta 2ml de salino). Las dosis baja de minociclina, así como el momento de administración, fue establecida de acuerdo a estudios previos (Mika *et al.* 2009; Mika *et al.* 2010). La dosis alta de minociclina fue obtenida por triplicar la dosis baja para asegurar que la posible ausencia de efecto sobre la tolerancia no fuese debida al uso de una dosis insuficiente y ajustarlo a la reducción media que se obtenida con la dosis alta de amitriptilina.

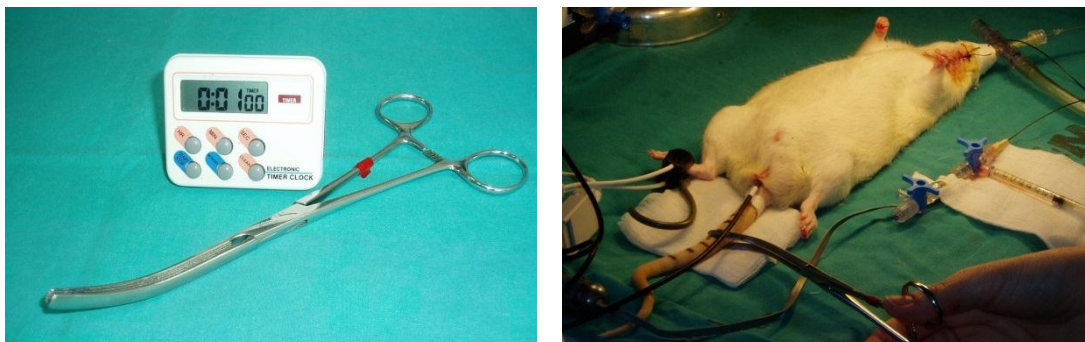
El maropitant empleado fue Cerenia® comercializado por Pzifer como antiemético para perros (Madrid, España). Las dosis baja de maropitant fue establecida por extrapolación de acuerdo a estudios previos en jerbos (de la Puente-Redondo *et al.* 2007) y perros (de la Puente-Redondo *et al.* 2007) y ajustado mediante un estudio piloto previo en ratas. La dosis alta de maropitant fue tres veces mayor a la dosis baja para asegurar que la posible ausencia de efecto sobre la tolerancia no fuese debida al uso de una dosis insuficiente. En el estudio piloto, se emplearon mayores dosis de maropitant (50 mg/kg) consiguiendo un mayor grado de reducción de la CAM (22%); pero al ser combinadas con remifentanilo se alcanzaba una reducción de la CAM del 100% con lo que no podía evaluarse un efecto de tolerancia. Además, un animal murió durante la infusión, por lo que finalmente esta dosis fue excluida del estudio.

La naloxona empleada fue comercializada por Kern Pharma (Tarrasa, España). La dosis empleada fue una administración intravenosa de 10 ng/kg seguida de una infusión continua de 10 ng/kg/h (administrada en la misma jeringa que el remifentanilo o salino), seleccionadas en base a su efecto inhibitor de la tolerancia a la morfina en ratas (Powell *et al.* 2002).

### 3.3 Determinación de la CAM

La determinación de la CAM en la rata se hizo siguiendo el método de Eger modificado por Roizen (Eger *et al.* 1965; Waizer *et al.* 1973) y mediante el uso de muestras de gas intratraqueales (ver aptdo. 3.2.4). Hay varios métodos nociceptivos validados que reproducen un estímulo supramáximo; en este caso empleamos un estímulo de tipo mecánico (presión) realizado por el pinzamiento en la cola (*tail-clamp*, figura 13) con una pinza hemostática (8-inch hemostatic Forceps, Martin, Tuttlingen, Alemania).

Se comienza a determinar la CAM en la concentración de anestésico inhalatorio más cercana al valor esperado y después de un tiempo adecuado de equilibrado: 30 min después de la instrumentación inicial y 10 min entre cambios de concentración del vaporizador. El primer pinzamiento lo realizamos a 6 cm de la base de la cola y apretando la pinza hasta la primera pestaña de la cremallera durante un minuto o hasta observar una respuesta positiva. Consideramos que la respuesta es positiva si la rata realiza un movimiento brusco de la cabeza, las extremidades o el cuerpo y que es una respuesta negativa si no realiza ningún movimiento, deglute, mastica o mueve la cola. Si la respuesta fue positiva, la concentración de sevoflurano se aumenta un 0,2%vol. y el siguiente estímulo lo haremos un cm. hacia proximal, Y viceversa, si la respuesta es negativa la concentración de sevoflurano se disminuirá un 0,2%vol. y la pinzaríamos la siguiente vez hacia distal. Y así sucesivamente con cada estímulo hasta que la respuesta positiva se convierta en negativa y viceversa. Se considera el valor de CAM como la media de las dos concentraciones más altas que permitan el movimiento en respuesta al estímulo y las dos más bajas que lo prevengan.



**Figura 13.** Determinación de la CAM en la rata mediante el pinzamiento de la cola

---

### 3.4 Diseño experimental

---

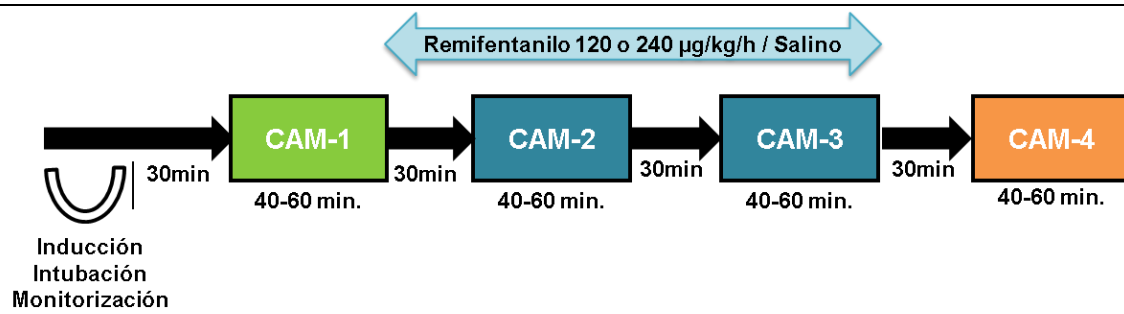
Generalmente en todos los animales una vez fueron anestesiados, intubados y monitorizados (ver aptdo. 3.2), se determina la CAM basal (CAM-1) para poder calcular después las reducciones relativas de cada fármaco o combinación de fármacos respecto a ésta; actuando así cada animal como su propio control. Durante la infusión de remifentanilo (ver aptdo. 3.2.5) se determinan dos determinaciones de CAM adicionales con 90 min aprox. de separación, si estas fuesen significativamente distintas sugerimos entonces que hay desarrollo de tolerancia aguda al remifentanilo. Se esperan 30 min. de equilibrado desde la instrumentación del animal y la determinación de la CAM basal y entre cada determinación de CAM. Generalmente se tarda entre 40 y 60 min. para determinar una CAM; así un experimento con 4 determinaciones de CAM normal puede tardar entre 6 y 7 horas. Al final del experimento se obtiene una muestra de sangre arterial para gasometría (estudios 3.4.1.1 a 3.4.1.3) y se eutanasia al animal mediante inyección IV de potasio bajo en un plano anestésico profundo.

En cada estudio concreto que se detalla a continuación este diseño experimental puede verse ligeramente alterado para adaptarse al uso de cada fármaco o estrategia concreta que se quiera evaluar. Se detallarán a continuación.

#### 3.4.1 Tolerancia aguda

La CAM de sevoflurano fue determinada 4 veces en cada animal. Una vez los animales fueron anestesiados, intubados y monitorizados se determinó la CAM basal (CAM-1). Entonces se administraba el remifentanilo en infusión continua IV a 120 o 240  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{h}$  o salino, durante la cual se determinaban dos CAM (CAM-2 y CAM-3) con 90 min aprox. de separación. Finalmente, la infusión de remifentanilo se detenía y se determinaba la última CAM (CAM-4) (Figura 14).

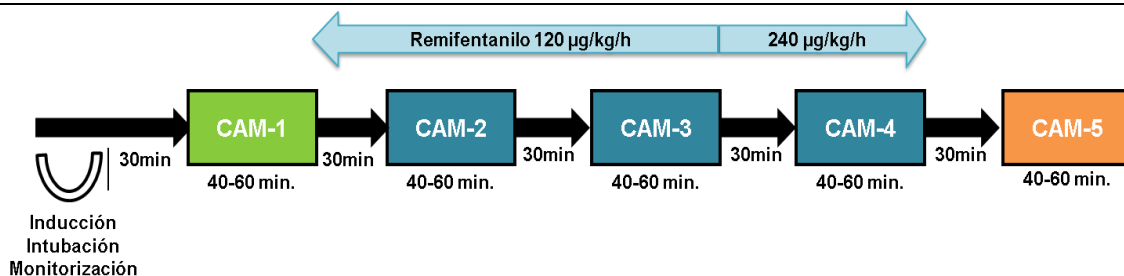
Para ello, se analizan 2 grupos ( $n=14$  por grupo) correspondientes a la dosis baja y alta de remifentanilo (120 o 240  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{h}$ , respectivamente) y un tercer grupo ( $n=5$ ) con salino en lugar del opioide.



**Figura 14.** Diseño experimental para la evaluación de la tolerancia aguda al remifentanilo

### 3.4.2 Tolerancia vs. hiperalgesia

Se realizó un único grupo (n=19) con un diseño similar al anterior (aptdo. 3.4.1.1) en que los animales recibían la dosis baja de la infusión continua de remifentanilo (120 µg/kg/h) y tras las realización de las dos determinaciones de CAM que manifestaban el desarrollo de un fenómeno de tolerancia aguda al opioide (CAM-2 y CAM-3), la dosis de remifentanilo se duplicó (240 µg/kg/h para determinar entonces una nueva CAM (CAM-4). Igualmente se paró la infusión de remifentanilo y se determinó la última CAM (CAM-4) (Figura 15).

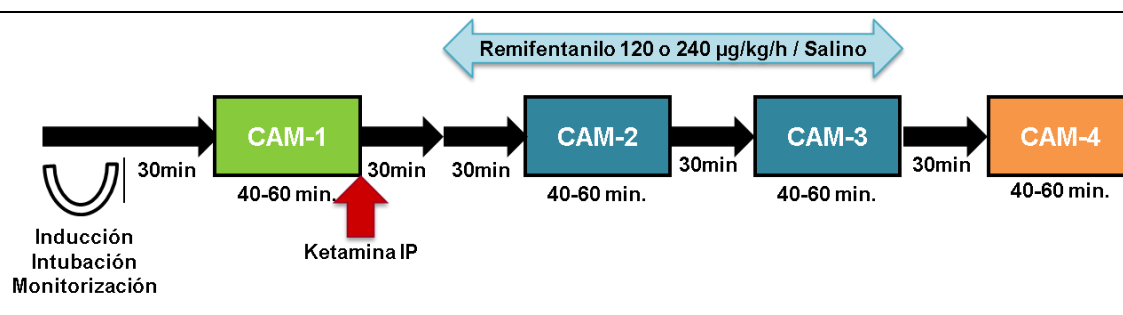


**Figura 15.** Diseño experimental para la evaluación de tolerancia vs. hiperalgesia mediante el aumento de la dosis de remifentanilo

### 3.4.3 Ketamina

En el experimento 1, el objetivo era determinar el efecto de la ketamina sobre la CAM como fármaco único (usando salino en lugar del remifentanilo) y asociado al remifentanilo (dosis baja y alta); y si la administración de ketamina pudiese prevenir el fenómeno de TAO. Para ello, se determinaba la CAM basal (CAM-1) en primer lugar y a continuación se administraba la ketamina intraperitoneal. A los 30 min., se inicia una infusión de remifentanilo como anteriormente las

dos determinaciones de CAM (CAM-2 y CAM-3). Finalmente se para la infusión de remifentanilo y se determina una nueva CAM (CAM-4) (Figura 16).

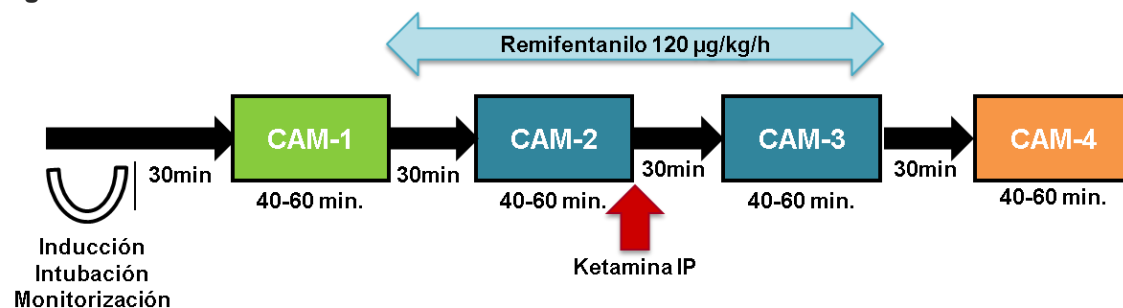


**Figura 16.** Diseño experimental para la evaluación del efecto de la ketamina sobre la CAM y la TAO.

En esta fase se realizaron 15 grupos (n=6 por grupo) correspondientes a las combinaciones de ketamina a 10, 20, 40 y 80 mg/kg o salino IP junto a las infusiones de remifentanilo a 120 y 240 µg/kg/h o salino.

En el experimento 2, se hizo un grupo adicional cuyo objetivo era evaluar la eficacia de la ketamina sobre la TAO del remifentanilo administrada una vez se hubiese desarrollado la tolerancia. Para ello, se determinaba la CAM basal (CAM-1) y se inicia una infusión de remifentanilo como anteriormente las dos determinaciones de CAM (CAM-2 y CAM-3). La administración de ketamina intraperitoneal se realizaba justo al finalizar la determinación de la primera CAM con remifentanilo (CAM-2). Finalmente se para la infusión de remifentanilo y se determina una nueva CAM (CAM-4) (Figura 17). En este único grupo (n=6) se evaluó el efecto de ketamina a 10 mg/kg junto a remifentanilo a 120 µg/kg/h.

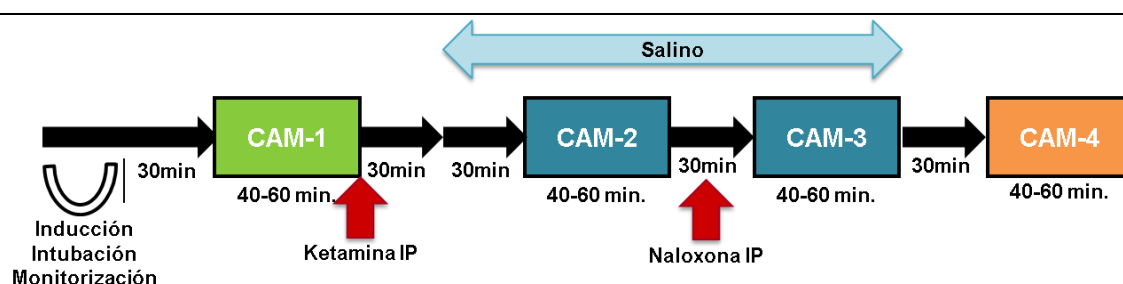
**Figura**



**Figura 17.** Diseño experimental para la evaluación del efecto de la ketamina administrada una vez se hubiese desarrollado la TAO.

En el experimento 3 de este bloque se quiso evaluar si la antagonización de la ketamina y el remifentanilo era debida a un efecto de competencia sobre el receptor opioide; para ello, evaluamos si el efecto de reducción de la CAM de la ketamina se podía bloquear mediante la administración de naloxona, un fármaco antagonista opioide (Figura 18).

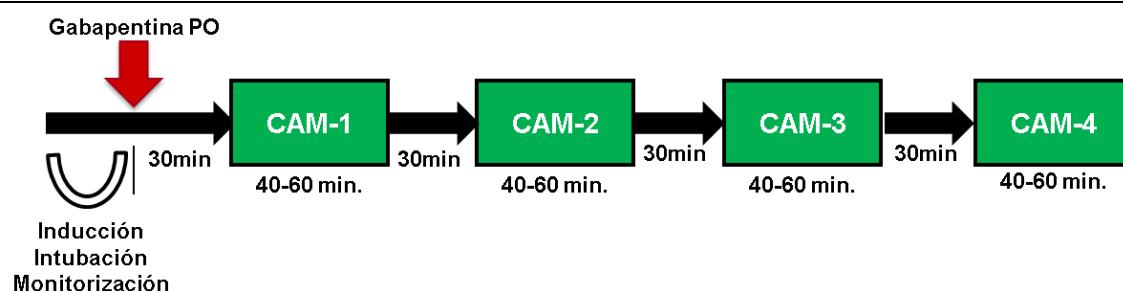
Para comprobarlo, utilizamos un grupo adicional que seguía el diseño del estudio 1 usando ketamina a 40 mg/kg y salino en lugar de remifentanilo, y se le administraba naloxona 10 mg/kg IP 15 min después de la determinación de la CAM-2.



**Figura 18.** Diseño experimental para la evaluación del efecto de la naloxona sobre la reducción de la CAM producida por la ketamina.

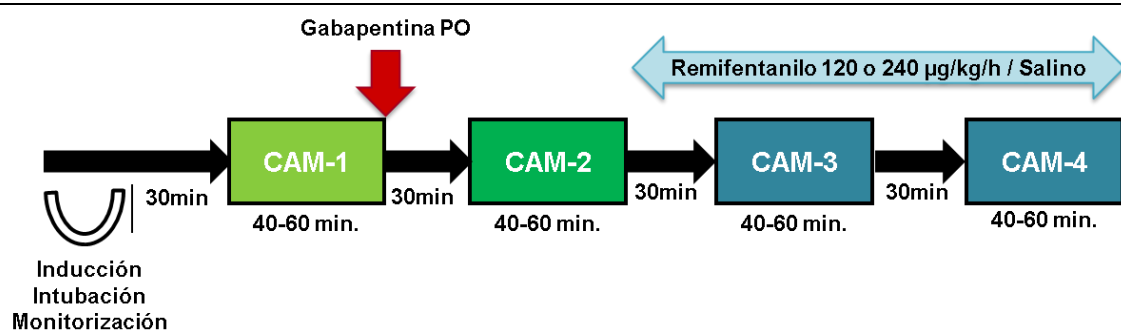
#### 3.4.4 Gabapentina

El objetivo del experimento 1 era ver si la gabapentina reduce la CAM de sevoflurano. Para ello, se administró por sondaje la gabapentina (o salino) una vez los animales fueron anestesiados, intubados y monitorizados; y se determinó después la CAM de sevoflurano 4 veces en cada animal (CAM-1 a CAM-4) (Figura 19). Para ello, se emplearon 3 grupos (n=6 por grupo) correspondientes a la dosis baja y alta de gabapentina (150 o 300 mg/kg, respectivamente) o salino.



**Figura 19.** Diseño experimental para la evaluación del efecto de la gabapentina sobre la reducción de la CAM.

El objetivo del experimento 2 era evaluar la interacción de la gabapentina y el remifentanilo en la reducción de la CAM de sevoflurano y si la gabapentina podría prevenir el desarrollo de TAO. Para ello, una vez determinaba la CAM basal (CAM-1) se administraba la gabapentina vía oral y tras 30min. se determinaba una nueva CAM (CAM-2). Entonces se inicia una infusión de remifentanilo durante la cuales realizan dos determinaciones de CAM (CAM-3 y CAM-4) (Figura 20). En esta fase se realizaron 4 grupos (n=6 por grupo) correspondientes a las combinaciones de gabapentina a 300 mg/kg o salino junto a las infusiones de remifentanilo 120 y 240  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{h}$  o salino.

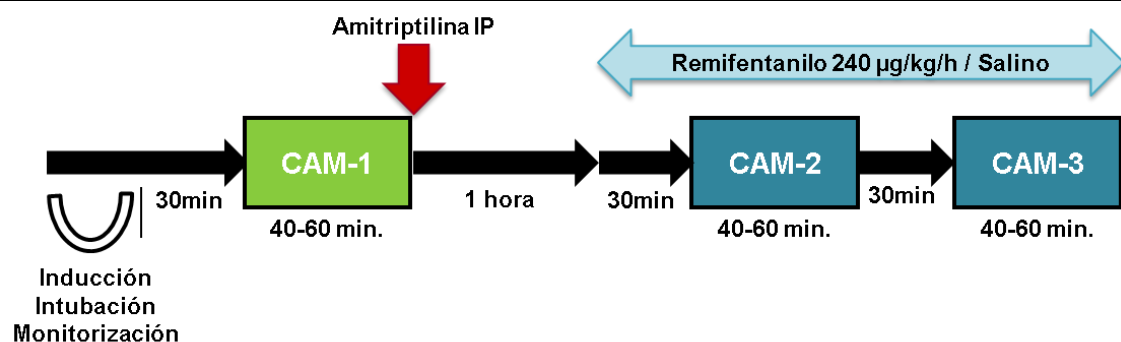


**Figura 20.** Diseño experimental para la evaluación del efecto de la gabapentina sobre la reducción de la CAM del remifentanilo y la TAO.

### 3.4.5 Amitriptilina

En este estudio el objetivo era determinar el efecto de la amitriptilina sobre la CAM como fármaco único (usando salino en lugar del remifentanilo) y asociado al remifentanilo; y si la administración de amitriptilina pudiese prevenir el fenómeno de TAO. Para ello, determinaba la CAM basal (CAM-1) en primer lugar y a continuación se administraba la amitriptilina intraperitoneal. Una hora después se inicia una infusión de remifentanilo mientras se realizan las dos determinaciones de CAM (CAM-2 y CAM-3) (Figura 21). En esta fase se realizaron 12 grupos (n=6 por grupo) correspondientes a las combinaciones de amitriptilina a 10 y 50 mg/kg o salino IP junto a las infusiones de remifentanilo 240  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{h}$  o salino.

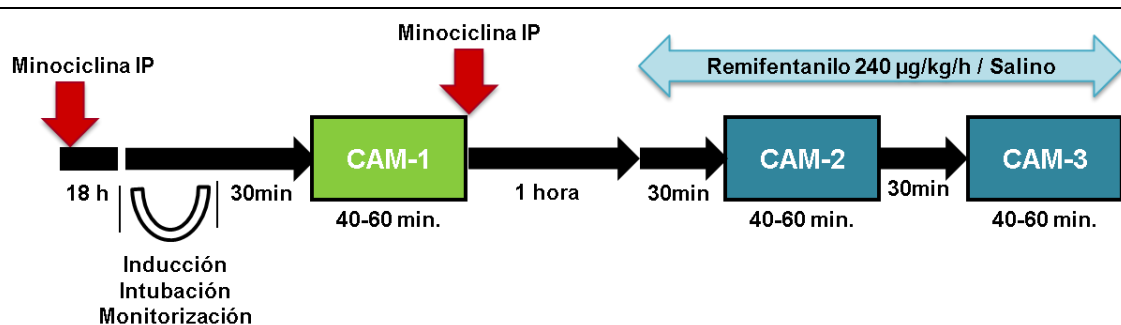
Esta parte se realizó de forma simultánea al estudio de minociclina y maropitant de forma que los grupos con salino IP en lugar de fármaco (amitriptilina, minociclina o maropitant) junto a la infusión de remifentanilo (240  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{h}$ ) o salino son comunes entre los tres estudios.



**Figura 21.** Diseño experimental para la evaluación del efecto de la amitriptilina sobre la CAM y la TAO al remifentanilo

### 3.4.6 Minociclina

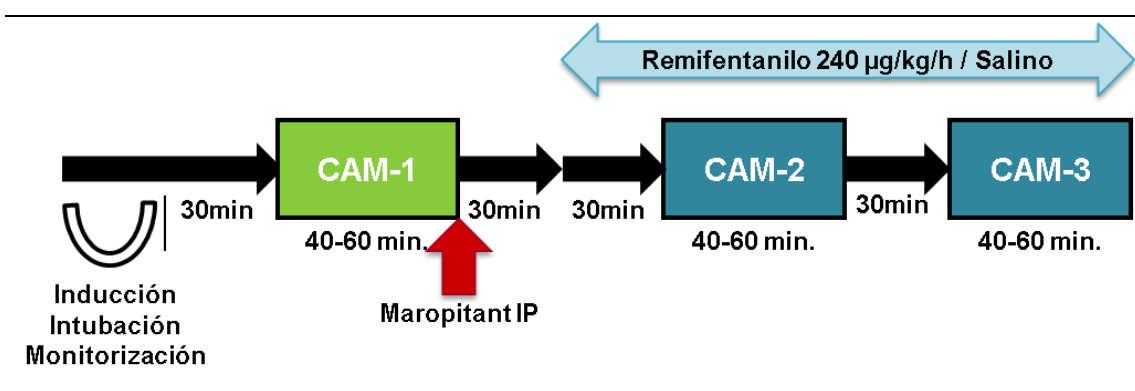
En este estudio el objetivo era determinar el efecto de la minociclina sobre la CAM como fármaco único (usando salino en lugar del remifentanilo) y asociado al remifentanilo; y si la administración de minociclina pudiese prevenir el fenómeno de TAO. Para ello, se determinaba la CAM basal (CAM-1) y a continuación se administraba la minociclina intraperitoneal. Una hora después se inicia una infusión de remifentanilo como se ha descrito anteriormente y se realizan las dos determinaciones de CAM (CAM-2 y CAM-3). La minociclina era también administrada el día antes al experimento, aprox. 20h antes de la administración del remifentanilo (Figura 22). En esta fase se realizaron 6 grupos (n=6 por grupo) correspondientes a las combinaciones de minociclina a 10 y 50 mg/kg o salino IP junto a las infusiones de remifentanilo 240 µg/kg/h o salino.



**Figura 22.** Diseño experimental para la evaluación del efecto de la minociclina sobre la CAM y la TAO al remifentanilo

### 3.4.7 Maropitant

En este estudio el objetivo era determinar el efecto del maropitant sobre la CAM como fármaco único (usando salino en lugar del remifentanilo) y asociado al remifentanilo; y si la administración de maropitant pudiese prevenir el fenómeno de TAO. Para ello, determinaba la CAM basal (CAM-1) en primer lugar y a continuación se administraba el maropitant intraperitoneal. Media hora después se inicia una infusión de remifentanilo como anteriormente las dos determinaciones de CAM (CAM-2 y CAM-3) (Figura 23). En esta fase se realizaron 6 grupos (n=6 por grupo) correspondientes a las combinaciones de maropitant a 10 y 30 mg/kg o salino IP junto a las infusiones de remifentanilo 240 µg/kg/h o salino.



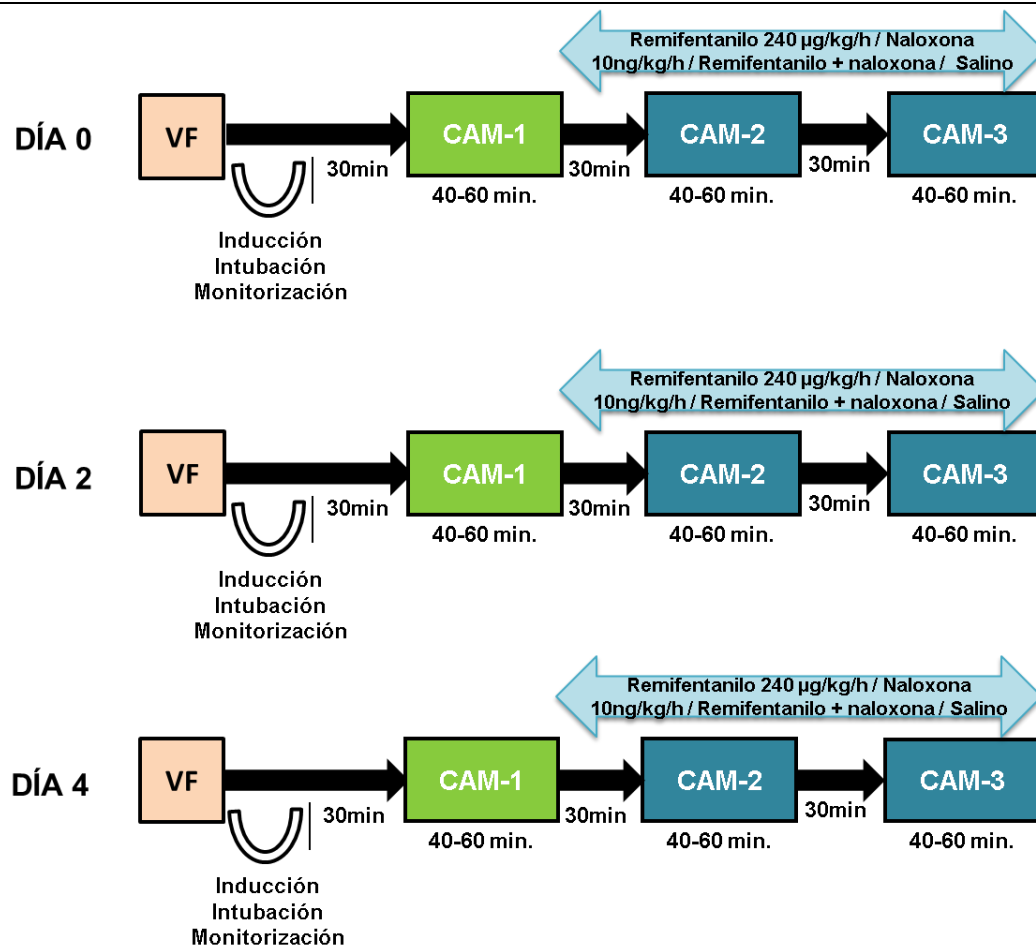
**Figura 23.** Diseño experimental para la evaluación del efecto del maropitant sobre la CAM y la TAO al remifentanilo

### 3.4.8 Naloxona

En este estudio el objetivo era determinar si la naloxona administrada en infusión continua junto al remifentanilo puede potenciar la reducción de la CAM del remifentanilo e inhibir el desarrollo de TAO a lo largo de la infusión de remifentanilo. Para ello la CAM de sevoflurano fue determinada 3 veces en cada animal: la CAM basal (CAM-1) y dos más (CAM-2 y CAM-3) después de una infusión continua IV de remifentanilo.

Como objetivo adicional se quería comprobar si existe tolerancia retardada entre distintos tratamientos con remifentanilo a lo largo de los días y si la administración de naloxona administrada en infusión continua junto al remifentanilo puede inhibirla; para ello, se repetía el mismo procedimiento con cada animal 3 veces seguidas en días alternos (día 0, 2 y 4). Además se quería determinar también si existía un fenómeno de hiperalgesia simultáneo con lo que se

midieron los umbrales nociceptivos mecánicos con el von frey antes de cada anestesia en cada uno de los tres días (Figura 24). En total se evaluaron 4 grupos (n=6-7 por grupo) correspondientes a remifentanilo (240  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{h}$ ), naloxona (10  $\text{ng}/\text{kg}$  seguido de una infusión de 10  $\text{ng}/\text{kg}/\text{h}$ ), la combinación de ambos o salino.



**Figura 24.** Diseño experimental para la evaluación del efecto de la naloxona sobre la TAO, la tolerancia retardada y la HIO al remifentanilo.

---

## 3.5 Diseño estadístico

---

### 3.5.1 Evaluación del tamaño muestral

Se realizó una estimación de tamaño muestral (N Query Advisor 2.0. de Statistical Solutions, Saugus, MA, USA) indicando que era necesario un valor  $n$  de 6 para determinar diferencias del 10% en la reducción de la CAM con una potencia del 80% y un valor de  $p$  de 0.05. Para ello empleamos la media y desviación típica de un grupo piloto las primeras ratas obtenidas del estudio de detección de tolerancia aguda (aptdo. 3.4.1). Si una vez cerrado el grupo a  $n=6$  se vio que no había diferencias significativas pero si se apreciaba una tendencia, se iba aumentando el  $n$  hasta obtenerlas. Así, para el estudio del punto 3.4.1 y 3.4.2 se aumentaron a  $n=14$  y 17 respectivamente para demostrar diferencias significativas también con los valores de CAM absolutos (no solo el porcentaje de reducción).

### 3.5.2 Aleatorización de los animales

Las ratas dentro de cada estudio y experimento fueron asignadas de forma aleatoria a cada grupo asociadas a un número generado de forma aleatoria (Excel 2007, Microsoft Office).

### 3.5.3 Comparación de medias (valores de CAM y reducciones de CAM)

Todos los resultados se presentan como media  $\pm$  desviación estándar (DE) y se estableció un valor  $p < 0.05$  para afirmar la existencia de diferencias significativas. Los datos de CAM y sus reducciones relativas a la CAM basal fueron analizados para ver si se ajustaban a una distribución normal con el test Kolmogorov-Smirnov para poder realizar test paramétricos.

Dentro de cada estudio y experimento correspondiente, se realizó un análisis univariante (Modelo lineal general, SPSS) de una o dos vías en función de uno (por ejemplo, fármaco) o dos factores (por ejemplo, fármaco y dosis) considerados. En el caso de medidas repetidas se empleó el ajuste de medidas repetidas. Para la comparación entre grupos en tiempos concretos o entre dos tiempos para un mismo grupo, se empleó el ANOVA de una vía. Por ejemplo, en muchos análisis se han comparado las distintas CAM dos a dos a lo largo del tiempo, por ejemplo para determinar si había reducción de la CAM por el fármaco administrado o bien dos

CAM determinadas variaban durante la infusión de remifentanilo (para determinar si había desarrollo de TAO). En todos los casos y para la comparación entre los diferentes grupos o frente al valor basal, se empleó el test post-hoc de Bonferroni. Todos los análisis fueron realizados mediante el paquete estadístico SPSS (SPSS versiones 15-19 para Windows, Wacker Drive, Chicago, IL, USA)



## **RESULTADOS**



#### 4.1 Tolerancia aguda

En el grupo control en que solo se administró salino no se observaron diferencias entre los distintos valores de CAM a lo largo del tiempo (tabla 1).

CAM de sevoflurano (%vol.) - Grupo control (salino)			
CAM-1	CAM-2	CAM-2	CAM-4
2,2±0,1	2,3±0,2	2,2±0,1	2,2±0,2

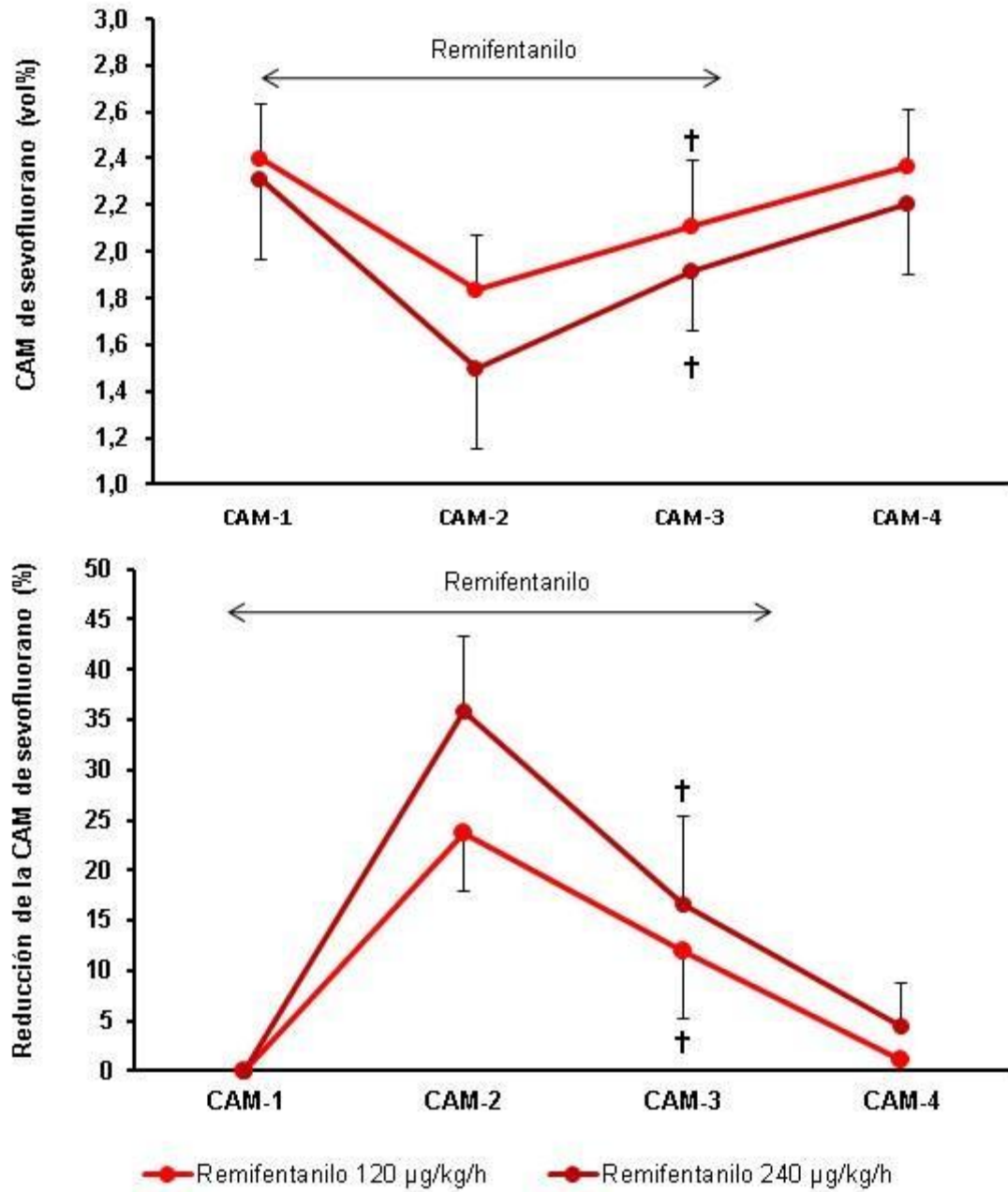
**Tabla 1.** Variación de la CAM de sevoflurano en el grupo control (salino). Datos expresados como media ± desviación estándar, n=5.

En los grupos en que se administró remifentanilo la CAM basal (CAM-1) varió en ambos grupos de 1,7 a 2,8%vol., con una media de 2,3±0,3%vol., siendo similar en ambos grupos: 2,4±0,2 y 2,3±0,3%vol para la dosis baja y alta de remifentanilo respectivamente ( $p>0,05$ ).

Cuando se administró la infusión continua de remifentanilo la CAM (CAM-2) se redujo de forma dosis dependiente a 1,8±0,2%vol. y 1,5±0,3%vol con la dosis baja y alta respectivamente, ( $p<0,05$ ); correspondiendo a una reducción sobre la CAM basal de 24±6% y 36±7% respectivamente. Estos resultados fueron obtenidos después de 90 y 81 min desde el inicio de la infusión de remifentanilo (dosis de remifentanilo baja y alta respectivamente).

Aproximadamente media hora después, se determinó un nuevo valor de CAM (CAM-3) y se observó que era mayor que la previamente determinada con la misma infusión de remifentanilo (CAM-2). La nueva CAM obtenida era de 2,1±0,3%vol y 1,9±0,3%vol con la dosis baja y alta respectivamente, ( $p<0,05$ ); correspondiendo a una reducción sobre la CAM basal de 12±7% y 17±9% respectivamente, aproximadamente el 50% de la reducción de la CAM previamente obtenida con el opioide. Estos resultados fueron obtenidos después de 89 y 76 min desde la anterior CAM con remifentanilo, es decir, después de 179 y 157 min desde el inicio de la infusión de remifentanilo (dosis de remifentanilo baja y alta respectivamente).

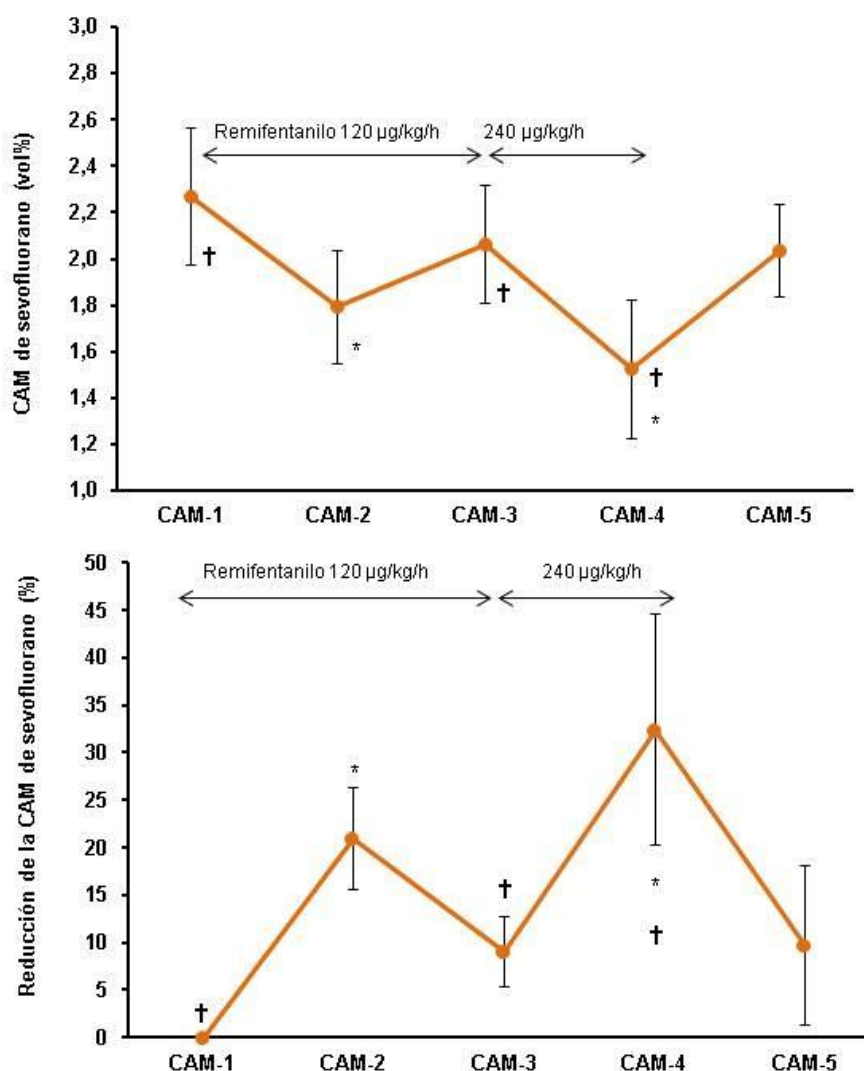
Al interrumpir la infusión de remifentanilo la determinación de la CAM volvió a valores similares a la CAM basal ( $p>0,05$ ) (Figura 25).



**Figura 25.** CAM de sevoflurano (%vol.) (arriba) y reducción de la CAM (%) (abajo) producida por remifentanilo a 120 o 240 µg/kg/h, durante la CAM-2 y CAM-3. Datos expresados como media ± desviación estándar, n=14 en todos los grupos. † Diferente de CAM-2 (CAM-3), p<0,05.

## 4.2 Tolerancia vs. hiperalgesia

La CAM basal este grupo fue de  $2,3 \pm 0,3\%$  vol y de forma similar al estudio anterior el remifentanilo a  $120 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{h}$  produjo una reducción de la CAM (CAM-2:  $1,8 \pm 0,3\%$  vol) que fue disminuyendo a lo largo del tiempo por un efecto de tolerancia (CAM-3:  $2,1 \pm 0,3\%$  vol). Entonces, la dosis de remifentanilo se duplicó de  $120$  a  $240 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{h}$  volviendo a obtenerse la reducción de la CAM por remifentanilo inicial (CAM-4:  $1,5 \pm 0,3\%$  vol). Esta observación, junto al regreso de la CAM a su valor basal, sugiere un predominio del fenómeno de tolerancia frente al de HIO (que hubiese provocado un aumento de la CAM al subir la dosis y una CAM final superior a la CAM basal) (Figura 26).



**Figura 26.** CAM de sevoflurano (%vol.) (arriba) y reducción de la CAM (%) (abajo) producida por remifentanilo a  $120 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{h}$ , durante la CAM-2 y CAM-3, aumentando a  $240 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{h}$ , durante la CAM-4. Datos expresados como media  $\pm$  desviación estándar,  $n=19$ . \* Diferente de CAM-1, † diferente de CAM-2,  $p<0,05$ .

---

### 4.3 Ketamina

---

En todos los animales (n=102) la CAM basal (CAM-1) fue de  $2,3 \pm 0,3\%$  vol., siendo similar entre grupos ( $p=1,00$ ).

a) **Efecto de la ketamina, el remifentanilo y su combinación sobre la CAM y la tolerancia aguda al remifentanilo**

#### **Efecto de la ketamina sobre la CAM**

La ketamina reduce la CAM de forma dosis dependiente con una reducción máxima en CAM-2 de  $4 \pm 8\%$ ,  $12 \pm 8\%$ ,  $25 \pm 2\%$  y  $41 \pm 10\%$  con 10, 20, 40 y 80 mg/kg respectivamente. La reducción de la CAM determinada en la siguiente CAM (CAM-3) fue similar a la calculada en CAM-2 con 10, 20 y 40 mg/kg de ketamina (reducción de la CAM-3:  $6 \pm 10\%$ ,  $13 \pm 9\%$  y  $16 \pm 11\%$ , respectivamente;  $p > 0,05$ ) pero no con 80 mg/kg de ketamina en que la reducción de la CAM ( $29 \pm 12\%$ ) fue menor ( $p=0,008$ ). En la última determinación de la CAM (CAM-4), los valores de reducción de la CAM fueron similares a la CAM basal (CAM-1) ( $p > 0,05$ ) en todos los grupos, excepto en el grupo con 80 mg/kg en el cual la reducción de la CAM ( $22 \pm 7\%$ ) fue mayor que la basal ( $p < 0,001$ ).

#### **Efecto del remifentanilo sobre la CAM**

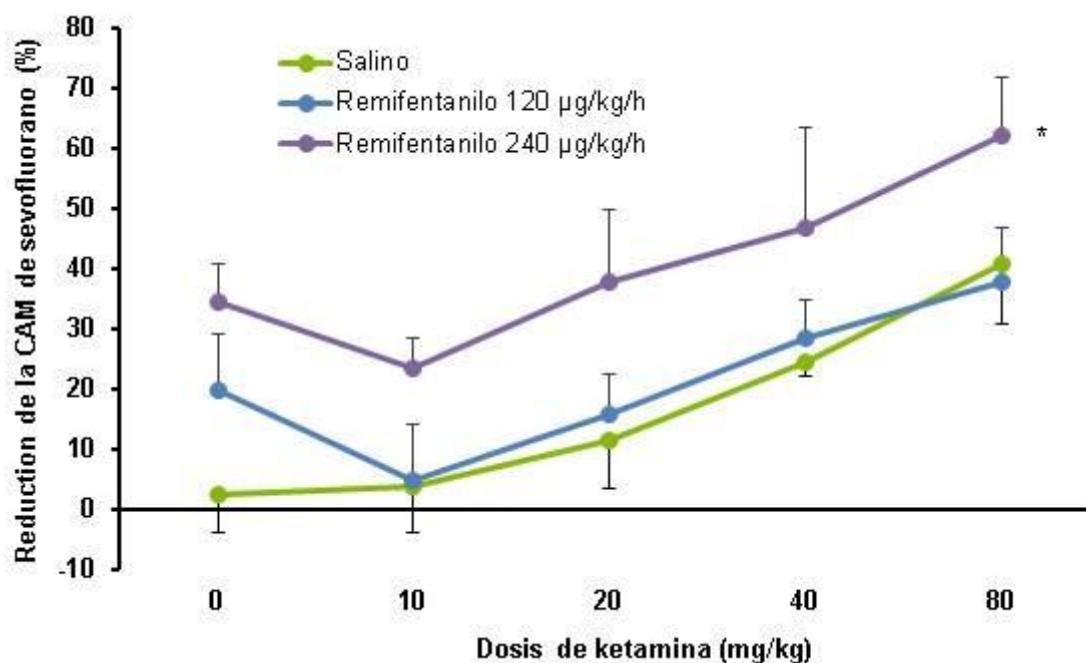
El remifentanilo redujo la CAM de forma dosis dependiente con una reducción máxima en CAM-2 de  $20 \pm 9\%$  y  $30 \pm 9\%$  con la dosis baja y alta de remifentanilo, respectivamente. En la siguiente determinación de la CAM (CAM-3) la reducción de la CAM respecto a la basal fue menor, con una reducción de  $14 \pm 8\%$  y  $18 \pm 2\%$  con la dosis baja y alta de remifentanilo, respectivamente.

#### **Efecto de la combinación de la ketamina y el remifentanilo sobre la CAM.**

Para evaluar la interacción de los dos fármacos sobre la CAM evaluaremos su efecto reductor de la CAM en CAM-2, donde se obtuvieron las máximas reducciones de ambos fármacos. No se determinaron ninguna interacción significativa entre el remifentanilo y la ketamina ( $p=0,032$ ). La dosis alta de remifentanilo fue capaz de potenciar el incremento de la CAM producido por la ketamina (todas dosis) ( $p < 0,001$ ) aunque su efecto reductor de la CAM final fue menor que la suma del efecto de cada fármaco por separado. Por otro lado, la dosis baja de remifentanilo no fue capaz de potenciar el incremento de la CAM producido por la ketamina (todas dosis) ( $p=0,32$ ); es decir, la administración de remifentanilo  $120 \mu\text{g/kg/h}$  añadida a la ketamina, a

cualquier dosis, no produce ninguna reducción de la CAM adicional. Este fenómeno sugiere un efecto infra-aditivo o antagónico entre ambos fármacos (Tabla 2 y figura 27).

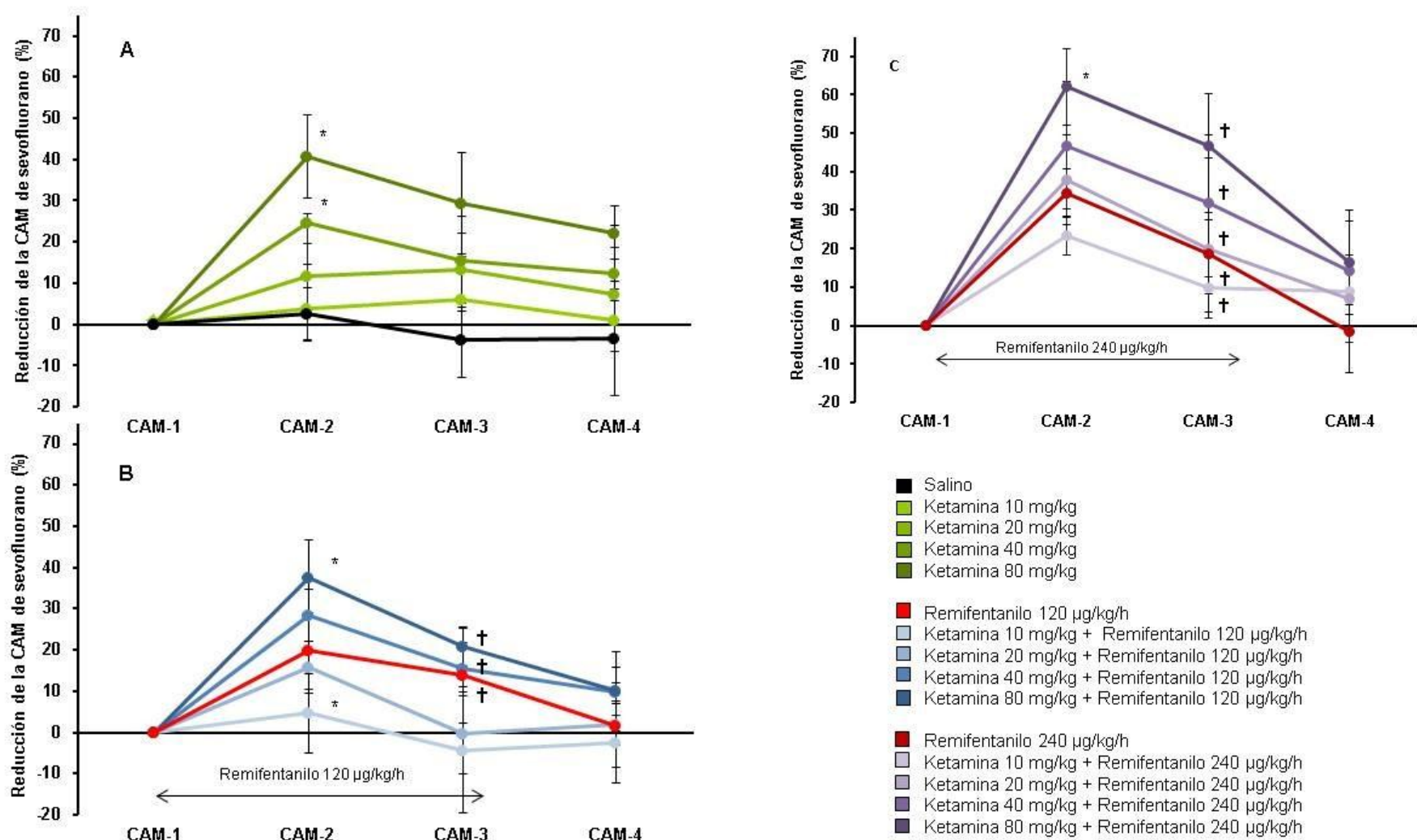
Reducción de la CAM-2 (%)					
Ketamina (mg/kg)	0	10	20	40	80
Salino	3±6	4±8	12±8	25±2	41±10
Remifentanilo 120 µg/kg/h	20±9	5±10	16±6	28±6	38±9
Remifentanilo 240 µg/kg/h	34±6	23±5	38±12	47±16	62±10



**Tabla 2 y figura 27.** Reducción de la CAM (%) producida por remifentanilo, ketamina o la combinación de los dos fármacos. (MAC-2). Datos expresados como media ± desviación estándar, n=6 en todos los grupos. \* Diferente de los grupos control (salino, misma dosis de ketamina), p<0,05.

#### Efecto de la combinación de la ketamina sobre la tolerancia aguda del remifentanilo

En todos los grupos donde se administró remifentanilo, ya sea con la dosis baja o alta, se produjo un efecto de tolerancia aguda al opioide observado como una disminución significativa en la reducción de la CAM determinada en CAM-2 y CAM-3 determinada 90 min. aprox. después (p<0,05); excepto el grupo donde se administraron las dosis bajas de ambos fármacos, ya que no se observó reducción de la CAM significativa (Figura 28).



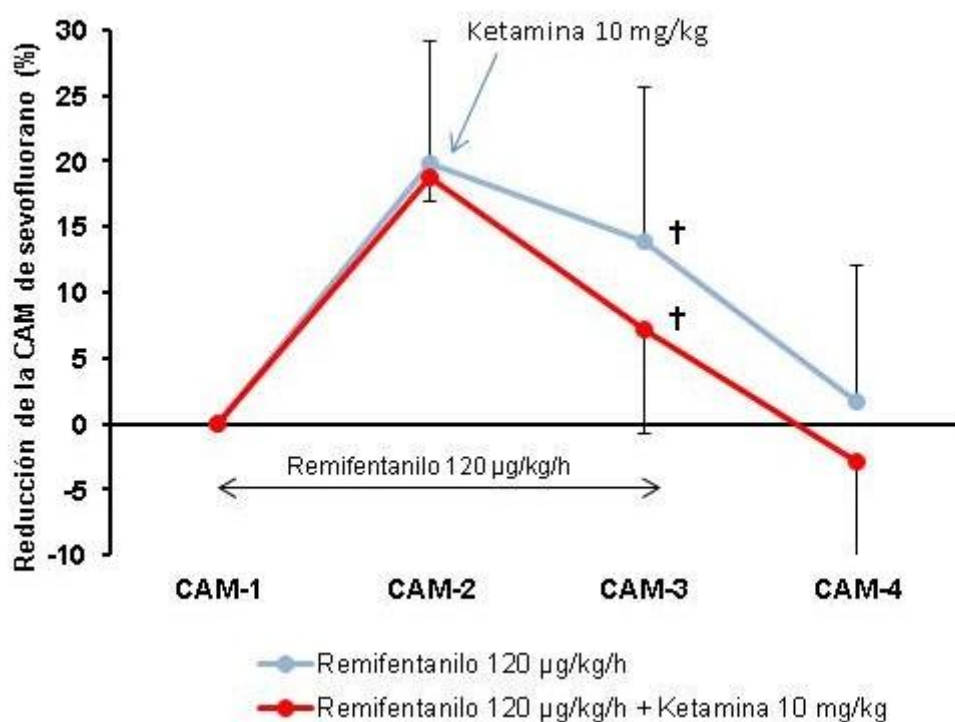
**Figura 28.** Reducción de la CAM (%) producida por ketamina después de la CAM-1 combinado con salino (A), remifentanilo a 120 µg/kg/h (B) o 240 µg/kg/h (C), durante la CAM-2 y CAM-3. Datos expresados como media ± desviación estándar, n=6 en todos los grupos. \* Diferente de grupos control (salino, misma dosis de remifentanilo) (CAM-2), † diferente de CAM-2 (CAM-3, grupos con remifentanilo), p<0,05.

b) **Efecto de la administración retardada de ketamina sobre la tolerancia aguda al remifentanilo**

Cuando el remifentanilo a dosis baja (120 µg/kg/h) se administra como fármaco único se observa un efecto de tolerancia aguda (1,7±0,2%vol. y 1,9±0,3%vol. en CAM-2 y CAM-3, respectivamente; p=0,01). Cuando se administra junto al opioide una dosis baja de ketamina (10 mg/kg), administrado una vez iniciada la infusión de remifentanilo y determinada la primera CAM con el opioide (CAM-2), el efecto de tolerancia aguda sigue observándose (2,0±0,2%vol. y 1,8±0,2%vol. en CAM-2 y CAM-3, respectivamente; p=0,007) (Tabla 3 y figura 29).

CAM de sevoflurano (%vol.) y reducción de la CAM (%)				
CAM (%vol.)	CAM-1	CAM-2	CAM-3	CAM-4
Remifentanilo 120 µg/kg/h	2,2±0,2	1,7±0,2	1,9±0,3†	2,1±0,4
Remifentanilo 120 µg/kg/h + Ketamina 10 mg/kg	2,2±0,2	1,8±0,2	2,0±0,2†	2,2±0,3
Reducción de la CAM (%)	CAM-1	CAM-2	CAM-3	CAM-4
Remifentanilo 120 µg/kg/h	0±0	20±9	14±12 †	2±10
Remifentanilo 120 µg/kg/h + Ketamina 10 mg/kg	0±0	19±2	7±8 †	-3±11

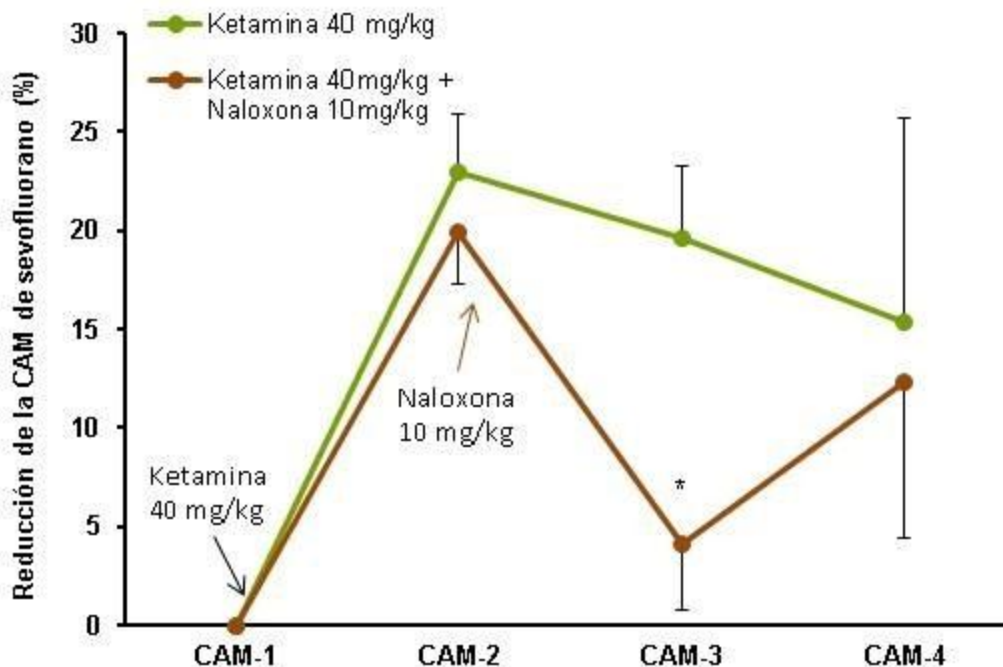
**Tabla 3.** CAM de sevoflurano (%vol.) determinada antes (CAM-1) y después de remifentanilo a 120 µg/kg/h (CAM-2 y CAM-3). La ketamina se administró después de la CAM-2. Datos expresados como media ± desviación estándar, n=6 en ambos grupos. † Diferente de CAM-2 (CAM-3), p<0,05



**Figura 29.** Reducción de la CAM (%) determinada antes (CAM-1) y después de remifentanilo a 120 µg/kg/h (CAM-2 y CAM-3). La ketamina se administró después de la CAM-2. Datos expresados como media ± desviación estándar, n=6 en ambos grupos. † Diferente de CAM-2 (CAM-3), p<0,05.

c) **Efecto de la naloxona sobre la reducción de la CAM producida por la ketamina**

La ketamina administrada como fármaco único a 40 mg/kg reduce la CAM (CAM-2) en un  $23\pm 3\%$  y  $20\pm 3\%$  para los grupos con ketamina sola y ketamina junto a naloxona, respectivamente. Cuando la naloxona se administra a 10 mg/kg IP (en el grupo de ketamina y naloxona) se produce en CAM-3 un bloqueo de la reducción de la CAM inducida por ketamina siendo la reducción de la CAM mucho menor ( $4\pm 3\%$ ) que con solo la ketamina ( $20\pm 4\%$ ) ( $p=0,001$ ) (Figura 30).



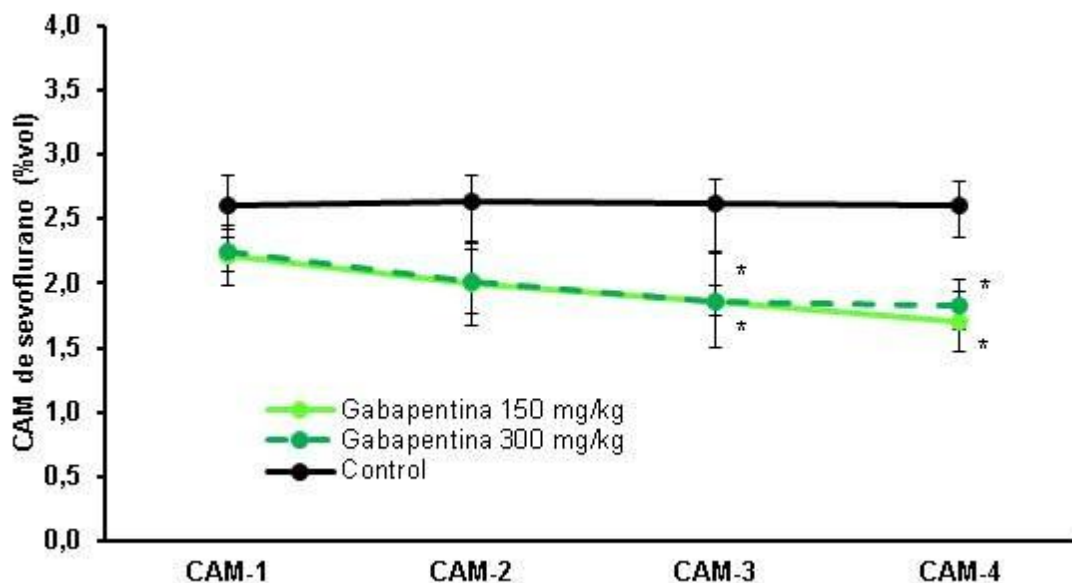
**Figura 30.** Reducción de la CAM (%) producida por ketamina administrada después de la CAM-1, sola o con naloxona administrada después de la CAM-2. Datos expresados como media  $\pm$  desviación estándar,  $n=6$  en todos los grupos. \* Diferente del grupo de ketamina,  $p<0,05$ .

#### 4.4 Gabapentina

##### Efecto de la gabapentina sobre la CAM

La CAM en el grupo control que se administró salino ( $n=6$ ) fue de  $2,3\pm 0,3\%$  vol., siendo similar en todos los tiempos (CAM-1 a 4;  $p>0,05$ ). La gabapentina a 150 y 300 mg/kg PO redujo la CAM en un 26% en la CAM-3 ( $1,7\pm 0,3\%$  vol. y  $1,7\pm 0,1\%$  vol. con la dosis baja y alta de gabapentina, respectivamente) y en un 25-30% en la CAM-4 ( $1,6\pm 0,2\%$  vol. y  $1,7\pm 0,2\%$  vol. con la dosis

baja y alta de gabapentina, respectivamente). No se determinaron diferencias significativas entre ambas dosis de gabapentina en ningún tiempo (CAM-1 a CAM-4;  $p > 0,05$ ) (Figura 31).



**Figura 31.** Reducción de la CAM de sevoflurano (%vol.) producida por gabapentina o salino. Datos expresados como media  $\pm$  desviación estándar,  $n=6$  en todos los grupos. \* Diferente del grupo control,  $p < 0,05$ .

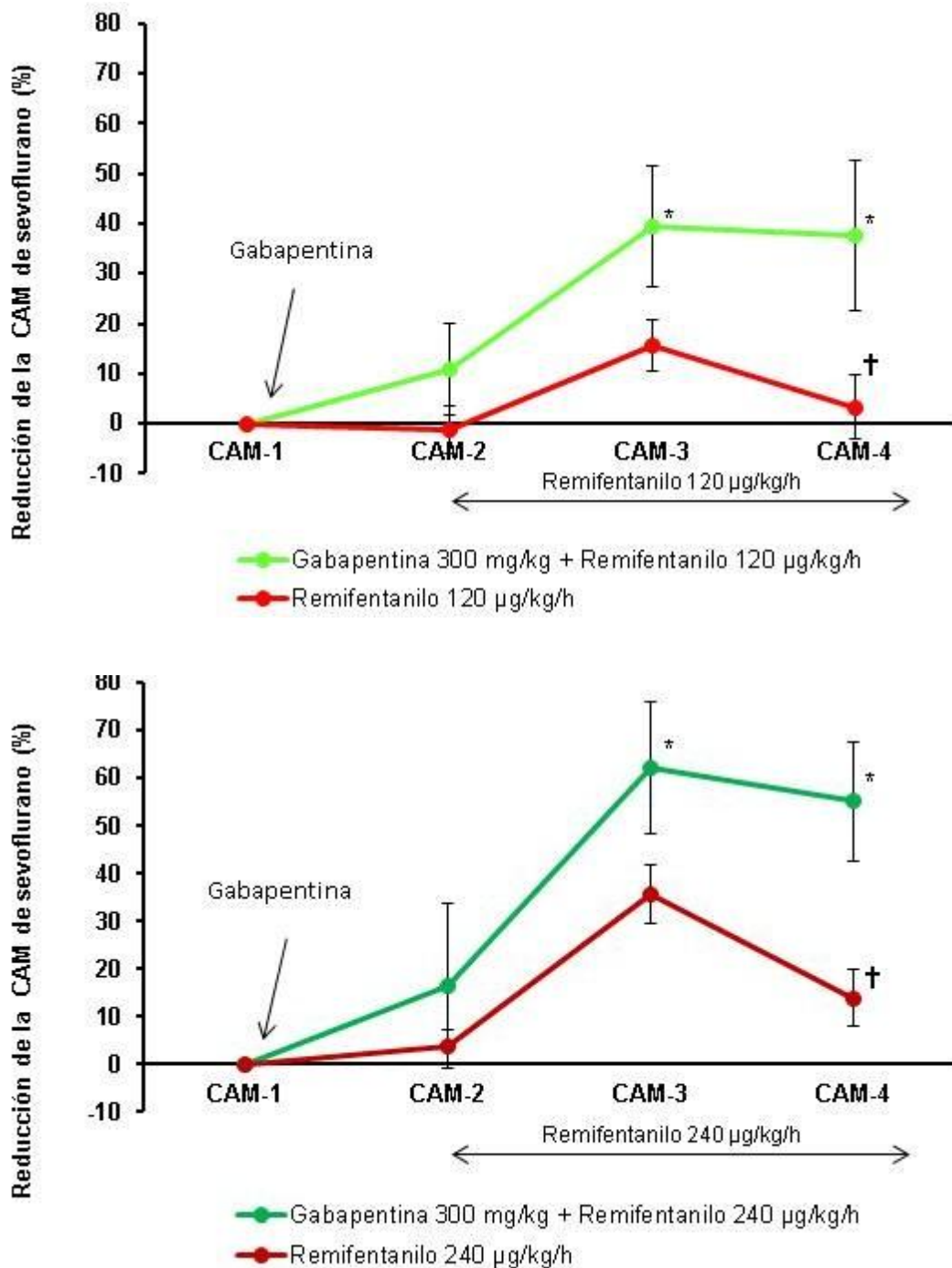
#### Efecto de la gabapentina junto al remifentanilo sobre la CAM

La CAM basal (CAM-1) en todos los grupos que llevaron remifentanilo ( $n=24$ ) fue de  $2,2 \pm 0,3\%$  vol., siendo similar entre grupos ( $p > 0,05$ ). El remifentanilo administrado solo redujo la CAM (CAM-3) en un  $16 \pm 5\%$  y un  $36 \pm 5\%$  con la dosis baja y alta, respectivamente ( $p > 0,01$ ). Cuando se administró gabapentina a  $300 \text{ mg/kg}$  PO previamente a la infusión de remifentanilo, la reducción de la CAM fue potenciada hasta  $39 \pm 12\%$  y  $62 \pm 14\%$  con el remifentanilo administrado a dosis baja y alta, respectivamente ( $p < 0,01$  respecto al grupo con solo remifentanilo) (Figura 32).

#### Efecto de la gabapentina sobre la tolerancia aguda al remifentanilo

Cuando el remifentanilo se administró solo a cualquier dosis se observa un efecto de tolerancia aguda con una disminución de la reducción de la CAM-4 respecto a la CAM-3 ( $p=0,03$  y  $p < 0,01$  para la dosis baja y alta de remifentanilo, respectivamente). Cuando se administró la gabapentina a  $300 \text{ mg/kg}$  PO previamente a la infusión de remifentanilo (después de la CAM-1), la re-

ducción de la CAM no fue diferente en estos mismos tiempos (CAM-4 respecto a CAM-3;  $p=0,511$  y  $p=0,051$  para la dosis baja y alta de remifentanilo, respectivamente) sugiriendo una ausencia de tolerancia aguda en relación a la reducción de la CAM. (Figura 32).



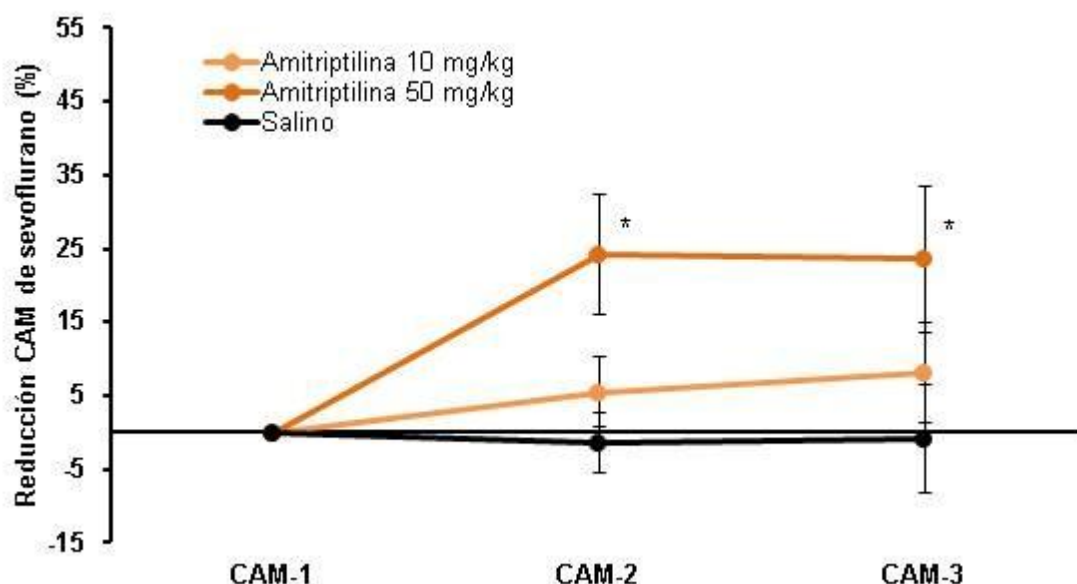
**Figura 32.** Reducción de la CAM de sevoflurano (%) producida por gabapentina o salino administrado después de la CAM-1 y remifentanilo (arriba: 120 µg/kg/h; abajo: 240 µg/kg/h) administrado después de la CAM-2. Datos expresados como media ± desviación estándar,  $n=6$  en todos los grupos. \* Diferente del grupo de remifentanilo, † diferente de CAM-3 (CAM-4),  $p<0,05$ .

## 4.5 Amitriptilina

### Efecto de la amitriptilina sobre la CAM

La CAM basal (CAM-1) en el grupo control en que se administró salino (común en estudio de amitriptilina, minociclina y maropitant) (n=6) fue de  $2,6 \pm 0,2\%$  vol., manteniéndose similar en todos los tiempos estudiados (CAM-2 y CAM-3) ( $p=1,000$ ).

La amitriptilina a dosis alta (50 mg/kg) redujo la CAM de sevoflurano en un  $24 \pm 8\%$  en la CAM-2 y en un  $24 \pm 10\%$  en la CAM-3 ( $p < 0,001$ ); mientras que la dosis baja (10 mg/kg) no redujo la CAM de forma significativa ( $p > 0,05$ ) (Figura 33).

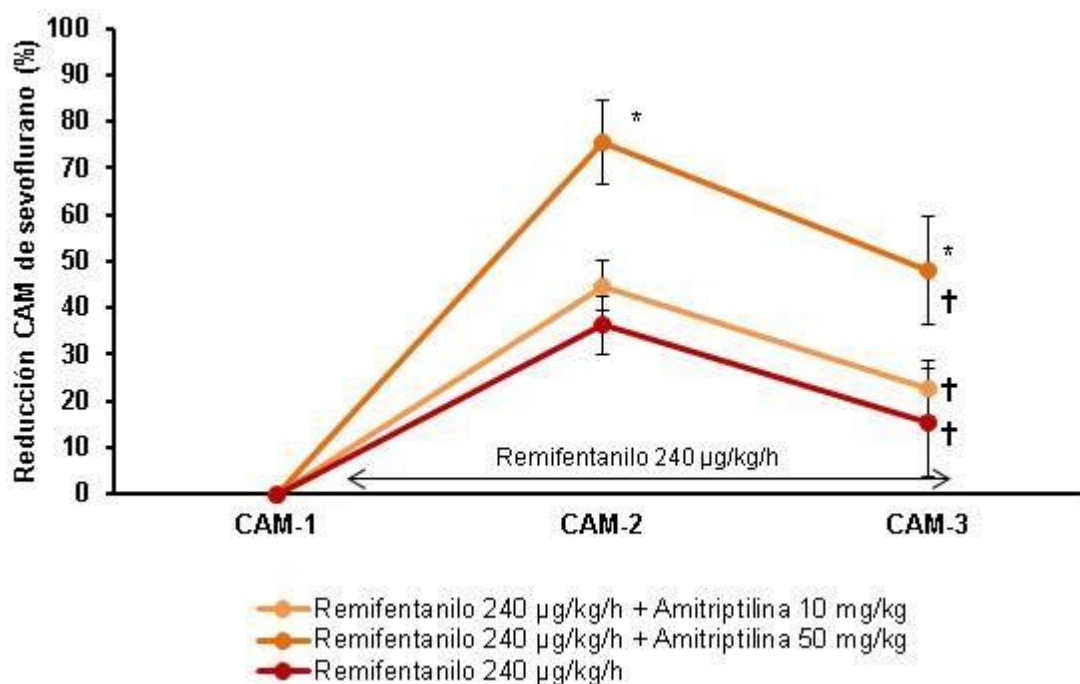


**Figura 33.** Reducción de la CAM de sevoflurano (%) producida por amitriptilina o salino. Datos expresados como media  $\pm$  desviación estándar, n=6 en todos los grupos. \* Diferente del grupo control (salino),  $p < 0,05$ .

### Efecto de la amitriptilina junto al remifentanilo sobre la CAM y la tolerancia aguda

La dosis alta de remifentanilo ( $240 \mu\text{g/kg/h}$ ) redujo la CAM en un  $36 \pm 6\%$  (CAM-2) ( $p < 0,001$ ). Cuando se administró amitriptilina a 50 mg/kg IP 1 hora antes de la infusión de remifentanilo, la reducción de la CAM fue potenciada hasta  $76 \pm 9\%$  ( $p < 0,001$  respecto al grupo con solo remifentanilo) mientras que la dosis baja de amitriptilina (10 mg/kg) no produjo ningún efecto adicional sobre la CAM (reducción en la CAM-2 de  $45 \pm 5\%$ ,  $p > 0,05$ ).

Una hora y media más tarde, el remifentanilo reduce un  $16\pm 12\%$  en la CAM-3, observándose un efecto de tolerancia aguda valorado como una disminución de la reducción de la CAM-3 respecto a la anterior CAM-2. En los grupos con amitriptilina a 300 mg/kg IP se mantiene la potenciación de la reducción también en CAM-3 (con una reducción de la CAM de  $48\pm 12\%$ ) mientras que la dosis baja de amitriptilina (10 mg/kg) no produjo ningún efecto sobre la CAM (reducción en CAM-3 de  $23\pm 6\%$ ,  $p > 0,05$ ). Por otro lado, la amitriptilina no consigue prevenir la aparición de la tolerancia aguda (CAM-3 respecto a CAM-2;  $p < 0,01$ ) (Figura 34).

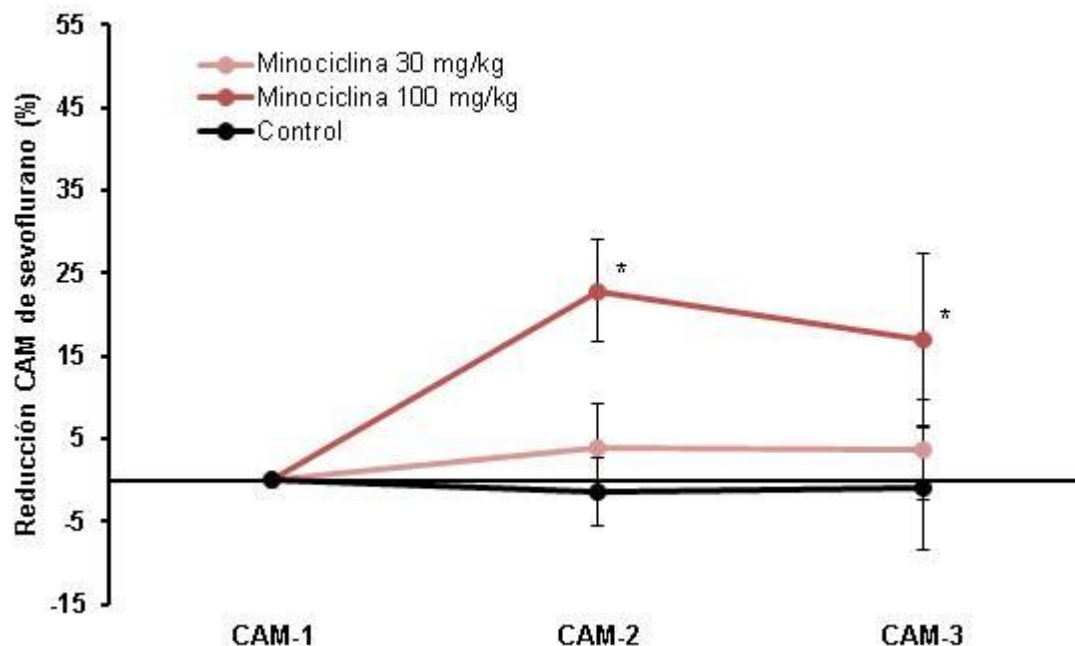


**Figura 34.** Reducción de la CAM de sevoflurano (%) producida por amitriptilina o salino administrado antes de remifentanilo. Datos expresados como media  $\pm$  desviación estándar,  $n=6$  en todos los grupos. \* Diferente del grupo control (remifentanilo con salino), † diferente de CAM-2 (CAM-3),  $p < 0,05$ .

## 4.6 Minociclina

### Efecto de la minociclina sobre la CAM

La minociclina a dosis alta (100 mg/kg) redujo la CAM de sevoflurano en un  $23\pm 6\%$  en la CAM-2 y en un  $17\pm 10\%$  en la CAM-3 ( $p < 0,001$  y  $p = 0,005$ , respectivamente); mientras que la dosis baja de minociclina (30 mg/kg) no redujo la CAM de forma significativa ( $p > 0,05$ ) (Figura 35).

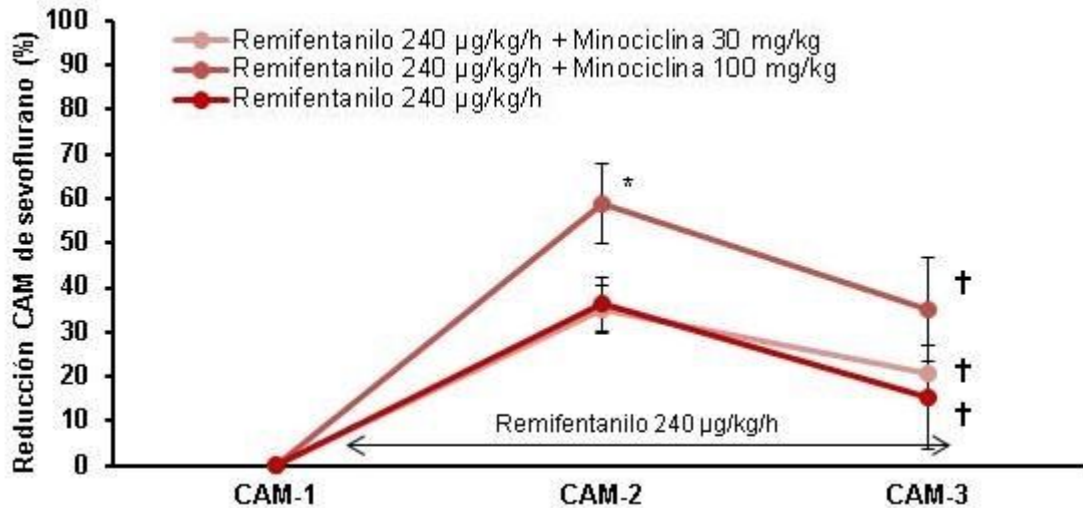


**Figura 35.** Reducción de la CAM de sevoflurano (%) producida por minociclina o salino. Datos expresados como media  $\pm$  desviación estándar,  $n=6$  en todos los grupos. \* Diferente del grupo control (salino),  $p<0,05$ .

#### Efecto de la minociclina junto al remifentanilo sobre la CAM y la tolerancia aguda

La dosis alta de remifentanilo ( $240 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{h}$ ) administrado redujo la CAM en un  $36\pm 6\%$  (CAM-2) ( $p<0,001$ ). Cuando se administró la minociclina a  $100 \text{ mg}/\text{kg}$  IP 20 horas y 1 hora antes de la infusión de remifentanilo, la reducción de la CAM fue potenciada hasta  $59\pm 15\%$  ( $p<0,001$  respecto al grupo con solo remifentanilo) mientras que la dosis baja de minociclina ( $30 \text{ mg}/\text{kg}$ ) no produjo ningún efecto sobre la CAM (reducción en CAM-2 de  $35\pm 11\%$ ,  $p>0,05$ ).

Una hora y media más tarde, el remifentanilo reduce la CAM un  $16\pm 12\%$  en la CAM-3, observándose un efecto de tolerancia aguda visto como una disminución de la reducción de la CAM-3 respecto a la anterior CAM-2. Cuando se añade la minociclina a  $100 \text{ mg}/\text{kg}$  IP se mantiene la potenciación de la reducción también en CAM-3 (con una reducción de la CAM de  $35\pm 15\%$ ) mientras que la dosis baja de minociclina ( $30 \text{ mg}/\text{kg}$ ) no produjo ningún efecto sobre la CAM (reducción en la CAM-3 de  $21\pm 7\%$ ,  $p>0,05$ ). Por otro lado, la amitriptilina no consigue prevenir la aparición de la tolerancia aguda (CAM-3 respecto a CAM-2;  $p<0,01$ ) (Figura 36).

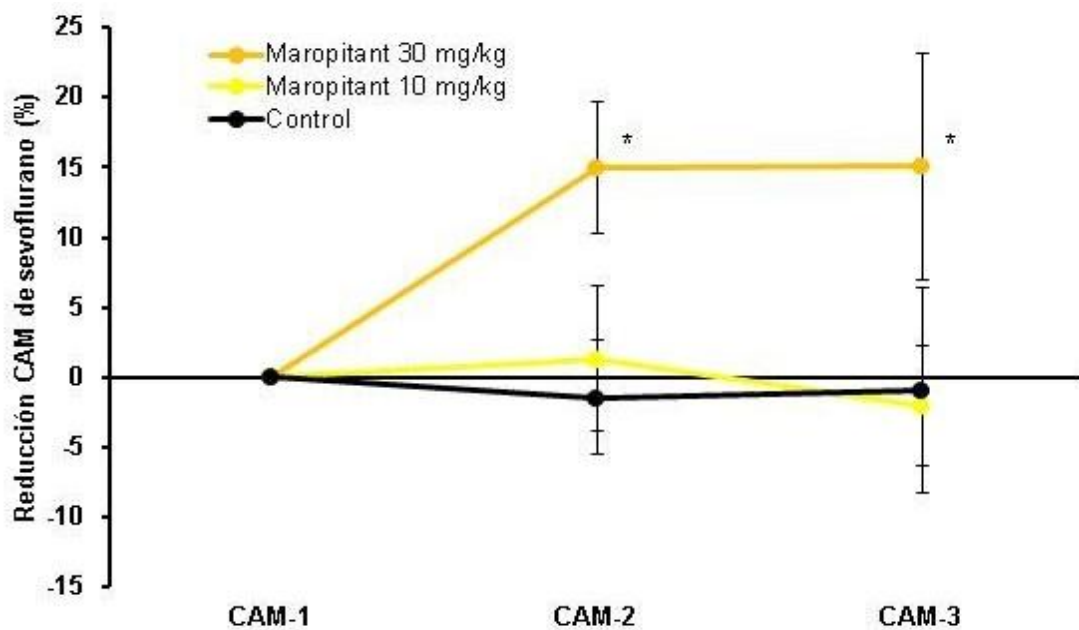


**Figura 36.** Reducción de la CAM de sevoflurano (%) producida por minociclina o salino administrada antes de remifentanilo. Datos expresados como media  $\pm$  desviación estándar,  $n=6$  en todos los grupos. \* Diferente del grupo control (remifentanilo con salino), † diferente de CAM-2 (CAM-3),  $p<0,05$ .

#### 4.7 Maropitant

##### Efecto del maropitant sobre la CAM

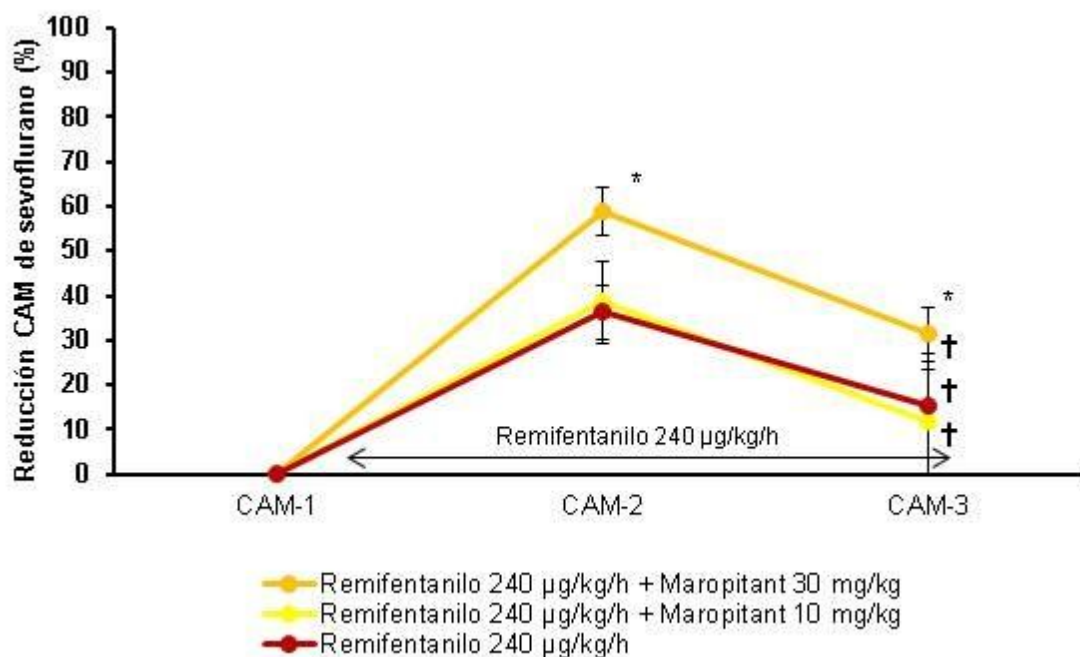
El maropitant a dosis alta (30 mg/kg) redujo la CAM de sevoflurano en un  $15\pm 5\%$  en la CAM-2 y un  $15\pm 8\%$  en la CAM-3 ( $p<0,001$  y  $p=0,003$ , respectivamente); mientras que la dosis baja (10 mg/kg) no redujo la CAM de forma significativa ( $p>0,05$ ) (Figura 37).



**Figura 37.** Reducción de la CAM de sevoflurano (%) producida por maropitant o salino. Datos expresados como media  $\pm$  desviación estándar,  $n=6$  en todos los grupos. \* Diferente del grupo control (salino),  $p<0,05$ .

### Efecto del maropitant junto al remifentanilo sobre la CAM y la tolerancia aguda

La dosis alta de remifentanilo (240  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{h}$ ) administrado redujo la CAM en un  $36\pm 6\%$  (CAM-2) ( $p < 0,001$ ). Cuando se administró maropitant a 30  $\text{mg}/\text{kg}$  IP media hora antes de la infusión de remifentanilo, la reducción de la CAM fue potenciada hasta una reducción de  $59\pm 5\%$  mientras que con la dosis baja de maropitant (10  $\text{mg}/\text{kg}$ ) no se produjo ningún efecto adicional sobre la CAM. De forma similar el maropitant tampoco tuvo efecto en prevenir la aparición de la tolerancia aguda (CAM-3 respecto a CAM-2;  $p < 0,01$ ) (Figura 38).



**Figura 38.** Reducción de la CAM de sevoflurano (%) producida por maropitant o salino administrado antes de remifentanilo. Datos expresados como media  $\pm$  desviación estándar,  $n=6$  en todos los grupos. \* Diferente del grupo control (remifentanilo con salino), † diferente de CAM-2 (CAM-3),  $p < 0,05$ .

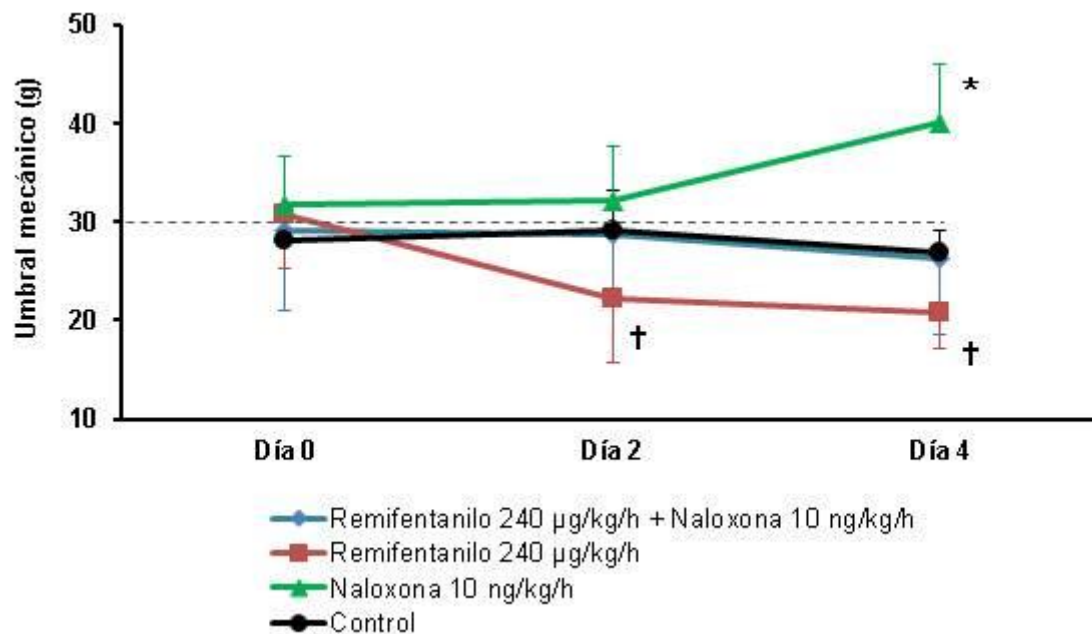
## 4.8 Naloxona

### Efecto de la naloxona sobre la hiperalgesia

Los umbrales nociceptivos mecánicos basales (día 0) analizados en todas las ratas fueron de  $29,9\pm 5,6$  g ( $n=26$ ) y fueron similares en todos los grupos ( $p=1,000$ ). Dos animales, uno en el

grupo control y otro en el grupo de remifentanilo más naloxona, mostraron un comportamiento nervioso durante el test por lo que estos datos no pudieron ser incluidos en el análisis.

El remifentanilo produjo un descenso significativo en los umbrales nociceptivos en los días 2 y 4 (comparados con el día 0 o basal,  $p=0,022$  y  $p=0,007$ , respectivamente). Contrariamente, la naloxona produjo un aumento significativo de los umbrales mecánicos en el día 4 siendo diferente del grupo control (salino) ( $p=0,002$ ). La combinación de naloxona y remifentanilo no produjo ningún cambio en los umbrales nociceptivos ( $p=1,000$  en los días 2 y 4) siendo similares al grupo control ( $p=1,000$ ). (Figura 39).

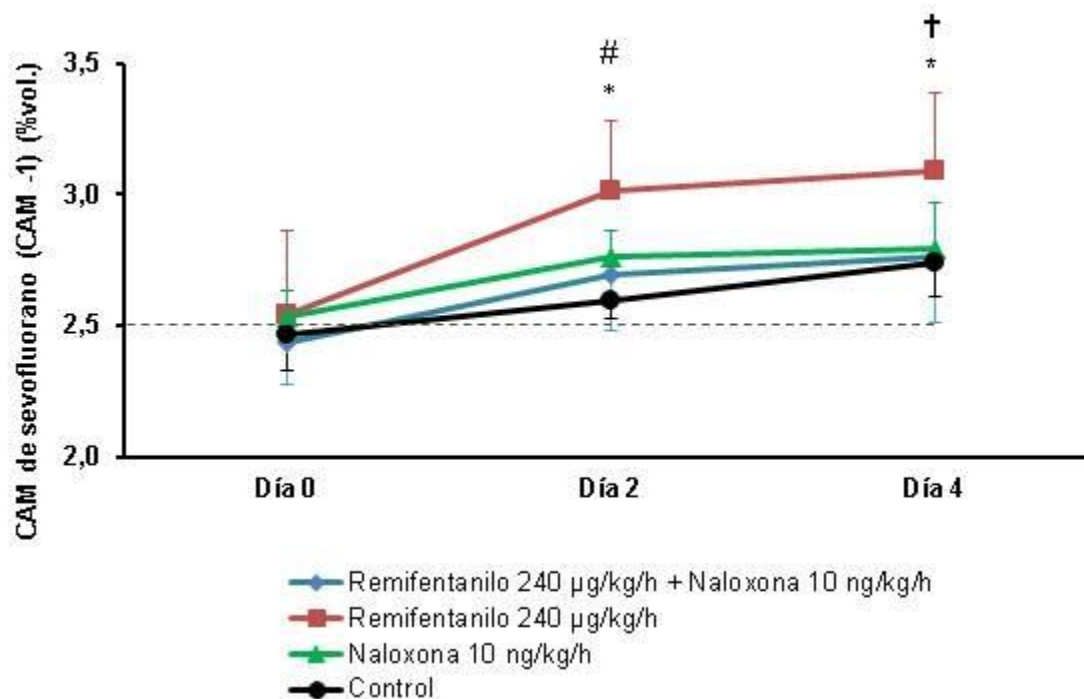


**Figura 39.** Umbrales nociceptivos mecánicos determinados con el test de von Frey antes de la administración del remifentanilo con naloxona, remifentanilo, naloxona o salino (control) en los días 0, 2 y 4. Datos expresados como media  $\pm$  desviación estándar,  $n=6-7$  en todos los grupos. \* Diferente del grupo control (salino), † diferente de la determinación basal (día 0);  $p<0,05$ .

#### Efecto de la naloxona sobre el aumento de la CAM basal

La CAM basal (CAM-1) en el día 0 en todas las ratas fue de  $2,5\pm 0,2\%$  vol ( $n=28$ ) y fue similar entre grupos ( $p=1,000$ ). Se observó un incremento gradual de la CAM basal (CAM-1) a lo largo del tiempo determinado en el grupo control alcanzando significación estadística en el día 4 (aumento del 10%;  $p=0,001$ ). Un incremento similar al grupo control en la CAM basal pudo observarse en los días 2 y 4 en las ratas que recibieron naloxona y la combinación de remifen-

tanilo con naloxona ( $p=0,023$  y  $p=0,098$ , en el día 2, y  $p=0,010$  y  $p=0,026$ , en el día 4, respectivamente), mientras que el remifentanilo administrado solo produjo un mayor incremento en la CAM basal que el grupo control, sobre un 20% ( $p=0,023$  y  $p=0,008$ , en el día 2 y 4 respectivamente) (Figura 40).

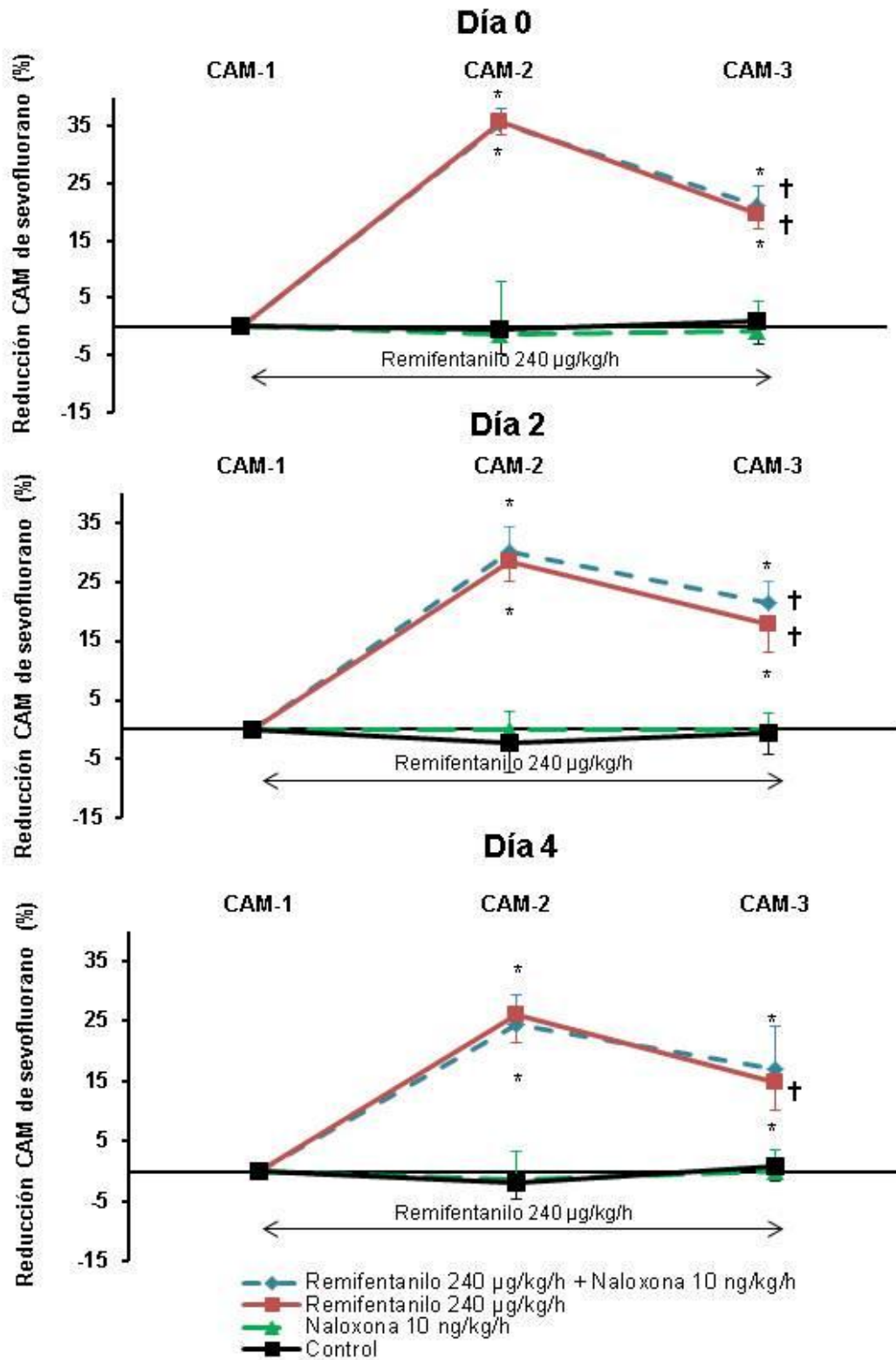


**Figura 40.** CAM de sevoflurano (%vol.) en la CAM basal (CAM-1) seguida de la administración del remifentanilo con naloxona, remifentanilo, naloxona o salino (control) en los días 0, 2 y 4. Datos expresados como media  $\pm$  desviación estándar,  $n=6-7$  en todos los grupos. \* Diferente del grupo control (salino), † todos los grupos en el día 4 son diferentes de la determinación basal (MAC-1 en el día 0); # todos los grupos, excepto el grupo control, en el día 2 son diferentes de la determinación basal (MAC-1 en el día 0),  $p<0,05$ .

#### Efecto de la naloxona sobre junto al remifentanilo sobre la CAM y la tolerancia aguda

Cuando la naloxona se administró sola, la CAM no se modificó en ningún tiempo estudiado en ningún día ( $p=1,000$ ). El remifentanilo administrado solo redujo la CAM (CAM-2) en un  $36\pm 2\%$ ,  $28\pm 4\%$  y  $26\pm 5\%$  en los días 0, 2 y 4, respectivamente. Cuando la naloxona se combinó con el remifentanilo la reducción de la CAM fue similar,  $35\pm 3\%$ ,  $30\pm 4\%$  y  $20\pm 12$  en los días 0, 2 y 4, respectivamente. Se observó un efecto de TAO aproximadamente 1,5 horas después con una disminución de la reducción de la CAM -3 respecto a la CAM-2 ( $p<0,001$ ) cuando se administró el remifentanilo, con o sin naloxona; excepto el día 4 en la ratas que recibieron remifentanilo

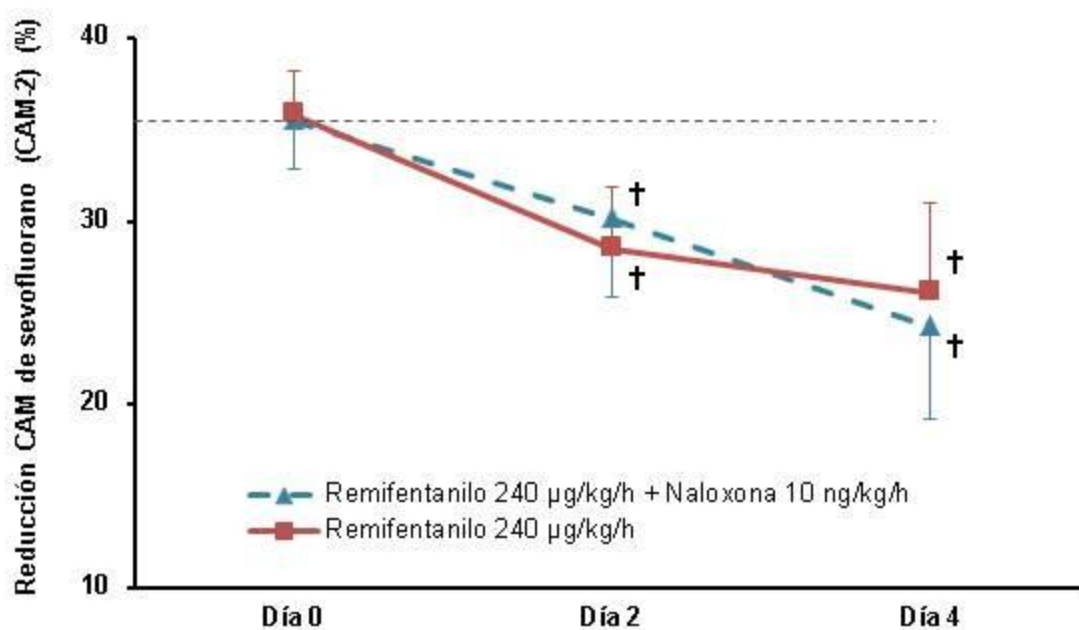
con naloxona (la CAM-3 y la CAM-2 fueron similares,  $p=0,582$ ). El hecho de añadir naloxona al remifentanilo produce una leve disminución, aunque no significativa (5-10%) de efecto de tolerancia aguda considerada como la disminución de la CAM durante la administración de opioides (CAM-3 respecto a CAM-2) en todos los días estudiados (día 0, 2 y 4). (Figura 41).



**Figura 41.** Reducción de la CAM de sevoflurano (%) producida por remifentanilo con naloxona, remifentanilo, naloxona o salino (control) en los días 0, 2 y 4. Datos expresados como media  $\pm$  desviación estándar,  $n=6-7$  en todos los grupos. \* Diferente del grupo control (salino), † diferente de CAM-2 (CAM-3),  $p<0,05$ .

### Efecto de la naloxona junto al remifentanilo sobre la tolerancia retardada

El remifentanilo solo o combinado con naloxona redujo la CAM (CAM-2) en el día 0 de forma similar (cercano al 35%). En el día 2, la reducción de la CAM disminuyó un 17-20% ( $p=0,01$  y  $0,027$ , para remifentanilo administrado solo o combinado con naloxona respectivamente). En el día 4, se observe una reducción de la CAM de hasta un 25%, es decir un 27-33% menos que el día 0 ( $p<0,001$  para remifentanilo administrado solo o combinado con naloxona) (Figura 42).



**Figura 42.** Reducción de la CAM de sevoflurano (%) en CAM-2 producida por remifentanilo con naloxona o remifentanilo los días 0, 2 y 4. Datos expresados como media  $\pm$  desviación estándar,  $n=6-7$  en todos los grupos. † Todos los grupos son diferentes significativamente de la CAM basal (reducción de la CAM-2 en el día 0),  $p<0,05$ .





## DISCUSIÓN



---

## 5.1 Tolerancia aguda

---

El remifentanilo, al igual que otros opioides, reduce la CAM de sevoflurano en la rata de forma dosis-dependiente (Criado *et al.* 2003). Sin embargo, esta reducción no es constante en el tiempo y disminuye su eficacia rápidamente ya que se observa una disminución significativa de la reducción de la CAM a las 1,5 horas de empezar la infusión de remifentanilo. Este hecho es consistente con trabajos previos que reflejan el rápido desarrollo de TAO al remifentanilo en pacientes en el periodo postoperatorio inmediato (Guignard *et al.* 2000; Crawford *et al.* 2006); aunque la ausencia de dicho efecto ha sido también evidenciada, la mayoría en el paciente postquirúrgico (Schraag *et al.* 1999; Cortinez *et al.* 2001; Kucukemre *et al.* 2005; Lee *et al.* 2005). De forma similar, un efecto de TAO (Vinik *et al.* 1998) e HIO (Hood *et al.* 2003) han sido también observado en personas voluntarias sanas que recibieron remifentanilo. Ya que se mantiene la reducción inicial en la CAM de sevoflurano al aumentar la dosis de la infusión de remifentanilo, se sugiere preferentemente un efecto de tolerancia donde se precisa un aumento de dosis para mantener el mismo nivel analgésico.

El método más empleado para determinar TAO al remifentanilo es mediante la aparición de tolerancia cruzada en el periodo postoperatorio midiendo la dosis de opioides administrados (cantidad de morfina necesitada en las primeras 24h de postoperatorio, normalmente a través de administración controlada por el paciente o PCA). Este método ha sido probado ser muy reproducible y fiable puesto que es una medida relativamente objetiva, aunque grandes diferencias interindividuales pueden ocurrir, y esto reduce la fiabilidad del método. Sin embargo, no se han realizado estudios todavía para demostrar la existencia de TAO en el periodo intraoperatorio donde una reducción de la CAM bajo anestesia inhalatoria podría posiblemente reflejar el efecto analgésico de los opioides y tener implicaciones clínicas relevantes.

Cuando se observa el efecto de TAO, la reducción de la CAM por remifentanilo es aproximadamente un 50% de la medición previa. Un efecto de tolerancia similar, o incluso mayor, ha sido descrito en personas voluntarias conscientes en las que el efecto analgésico disminuye, a pesar de la infusión continua, después de 3h de iniciar la infusión a solo la cuarta parte del máximo valor, el cual se observó 1-1,5 horas después de iniciar la infusión (Vinik *et al.* 1998), y

se observó un aumento en el umbral del dolor. Dado el rápido desarrollo de TAO al remifentanilo la reducción de la CAM determinada después de la infusión de remifentanilo puede no haber reflejado el máximo nivel de reducción potencialmente alcanzado puesto que se necesitan normalmente 80-90 minutos para determinar la CAM en ratas en este estudio. Del mismo modo, la tolerancia podría haber sido mayor permitiendo un mayor periodo de tiempo entre determinaciones de CAM durante la infusión de remifentanilo. La magnitud del cambio de la CAM producida por remifentanilo es suficientemente alta como para ser clínicamente relevante puesto que podría aumentarse cualquiera de las dosis de remifentanilo o la concentración de anestésico inhalatorio para mantener el mismo nivel de anestesia. Obviamente, esto podría conducir a un potencial aumento en la aparición de efectos adversos derivados de las mayores dosis de opioides y anestésicos inhalatorios. Sin embargo, puesto que se han mostrado hallazgos contradictorios en algunos ensayos clínicos (Vinik *et al.* 1998; Schraag *et al.* 1999; Guignard *et al.* 2000; Cortinez *et al.* 2001; Hood *et al.* 2003; Luginbuhl *et al.* 2003; Kucukemre *et al.* 2005; Lee *et al.* 2005; Crawford *et al.* 2006; Troster *et al.* 2006), se debería tener precaución a la hora de extrapolar estos descubrimientos al ámbito clínico y se necesitarían posteriores estudios en medicina humana para confirmar los resultados observados en la rata.

Aunque hay evidencia de que diferentes estímulos nociceptivos pueden reflejar una respuesta similar de TAO (Vinik *et al.* 1998), se ha sugerido una respuesta diferencial, p. ej., ante los estímulos térmicos (calor o frío), mecánicos o eléctricos, y no podría descartarse una respuesta distinta (Luginbuhl *et al.* 2003). El estímulo nociceptivo producido por la cirugía puede realmente producir una respuesta diferente, por ello, la tolerancia aguda producida por remifentanilo debería ser confirmada en el ámbito clínico. Así, las publicaciones conflictivas sobre la existencia de TAO podrían ser una consecuencia del estímulo nociceptivo empleado, entre otras muchas cosas (Gustorff *et al.* 2002). Los resultados obtenidos indican que una infusión de remifentanilo a dosis capaces de disminuir la CAM en la rata disminuye a corto plazo (90 minutos o menos) la efectividad del efecto analgésico del opioide. El efecto observado podría ser una consecuencia de tolerancia aguda con implicaciones clínicas relevantes.

---

## 5.2 Ketamina

---

La ketamina, administrada sola, así como el remifentanilo, reducen la CAM de sevoflurano de forma dosis dependiente en la rata. Sin embargo, la combinación de ambos fármacos durante la anestesia con sevoflurano potencia la reducción de la CAM producida por cada fármaco por separado de forma subaditiva o antagónica. De hecho, el efecto ahorrador de anestésico inhalatorio de la ketamina es dosis-dependiente y no mejoró al combinarlo con la dosis baja de remifentanilo, mientras que con la dosis alta del opioide redujo solo un 20% más la CAM en cada dosis de ketamina administrada.

Hay evidencias que sugieren que la ketamina en dosis subanestésica (dosis inferior a la que produce anestesia) administrada en el periodo intraoperatorio es efectiva reduciendo las necesidades de opioides en el periodo postoperatorio en personas (Schmid *et al.* 1999; Menigaux *et al.* 2000; Guignard *et al.* 2002; Subramaniam *et al.* 2004; Bell *et al.* 2005; Elia *et al.* 2005; Joly *et al.* 2005; Visser *et al.* 2006; Remerand *et al.* 2009; Carstensen *et al.* 2010) y animales (Hoffmann *et al.* 2003; Holtman *et al.* 2008; Kosson *et al.* 2008). Sin embargo, se han publicado resultados controvertidos sobre la eficacia de la ketamina para mejorar el alivio del dolor combinada con opioides.

Una revisión cualitativa de ensayos aleatorizados concluyó que el beneficio de añadir ketamina a morfina en un sistema de PCA IV para cirugía ortopédica o abdominal no queda claro con solo cinco ensayos clínicos de once demostrando mejora en la analgesia postoperatorio (Carstensen *et al.* 2010). Por otro lado parece esta combinación para el tratamiento del dolor postoperatorio de cirugía torácica si podría ser más eficaz (Mathews *et al.* 2012). Posteriormente, en 2011, una nueva revisión evaluó el efecto de la ketamina intravenosa en el dolor postoperatorio englobando setenta estudios y casi cinco mil pacientes (Laskowski *et al.* 2011). En ella se observó una reducción del consumo de opioides y un aumento en el tiempo hasta la primera analgesia muy significativo en los pacientes que recibieron ketamina, siendo mucho más evidente en procedimientos dolorosos como cirugía torácica, de abdomen superior y ortopédica. A pesar de utilizar menos opioides, la mayoría de los pacientes (80%) experimentan menos dolor que el placebo, independientemente del tipo de opioide intraoperatorio administrado y la dosis de la ketamina.

Aunque la mayoría de estudios han evaluado dolor postoperatorio ningún estudio hasta la fecha ha estudiado los efectos de estos fármacos en el periodo intraoperatorio, bajo anestesia inhalatoria. Los resultados de nuestros estudios sugieren una interacción subaditiva entre el remifentanilo y la ketamina en términos de reducción de la CAM puesto que el efecto final de la combinación de ambos fármacos es menor que la suma de los efectos esperados de cada fármaco por separado. Es más, la dosis baja de remifentanilo, que por si misma reduce la CAM en un 20%, no mejoró la acción reductora de anestésico inhalatorio producida por la ketamina.

El uso de opioides está asociado con una disminución gradual de su eficacia analgésica debido al desarrollo de tolerancia a los opioides, y ocasionalmente, un aumento escalado en la dosis del opioide es necesario para mantener el mismo efecto analgésico neto a largo plazo (Angst *et al.* 2006; Gomez de Segura *et al.* 2009). Se ha propuesto una conexión entre la tolerancia a opioides y la potenciación del receptor NMDA producida por opioides (Hahnenkamp *et al.* 2004; Zhao *et al.* 2008) en pacientes con cáncer (Chazan *et al.* 2008) o quirúrgicos (Luginbuhl *et al.* 2003; Joly *et al.* 2005). El remifentanilo no solo actúa sobre receptores opioides sino también en receptores NMDA, desencadenando potencialmente la tolerancia a opioides (Ghelardini *et al.* 2008; Zhao *et al.* 2008). La morfina induce una regulación a la alta de la expresión espinal de la subunidad NR 2B del receptor NMDA conduciendo a tolerancia antinociceptiva a la morfina (Guo *et al.* 2009), la cual puede prevenirse o revertirse por antagonistas NMDA (Yamamura *et al.* 1990; Celerier *et al.* 2000; Kissin *et al.* 2000; Laulin *et al.* 2002). Debido a ello, la HIO y TAO por remifentanilo (Vinik *et al.* 1998; Guignard *et al.* 2000) podría tratarse con la administración de ketamina. Sin embargo, aunque se ha observado un efecto de TAO en la disminución de la reducción de la CAM producida por remifentanilo en ratas (Gomez de Segura *et al.* 2009) la acción preventiva de la ketamina no pudo ser determinada de los resultados obtenidos en este estudio.

Una explicación potencial para la limitada acción aditiva de la ketamina y el remifentanilo, comparado con la morfina, es un grado de interacción de la ketamina con los opioides en el receptor  $\mu$  potencialmente variable. La ketamina se une a receptores  $\mu$  opioides (Finck *et al.* 1982; Smith *et al.* 1987; Hirota *et al.* 1999) y su activación puede reducir la CAM de sevoflurano (Koyama *et al.* 2009) mientras que su bloqueo por el antagonista opioide naloxona (Crisp *et al.* 1991) produce la supresión de la reducción de la CAM inducida por ketamina. Otra evidencia

para explicar esta interacción entre opioides y ketamina se encuentra en la médula espinal. La ketamina por vía epidural potencia selectivamente a la morfina epidural pero podría antagonizar la actividad antinociceptiva del fentanilo en ratas (Hoffmann *et al.* 2003). También se ha determinado una falta de interacción analgésica de la ketamina con la petidina por vía epidural en perros (Amarpal *et al.* 2003). La combinación de dos agentes lipofílicos y de rápido inicio de acción como la ketamina (Smith *et al.* 1987; Sarton *et al.* 2001) y el remifentanilo, podría causar una competición por el receptor  $\mu$  opioide, resultando en una menor ocupación del receptor por remifentanilo y así, un potencial antagonismo de la antinocicepción del remifentanilo con la ketamina. Otras explicaciones potenciales (Hoffmann *et al.* 2003) podrían involucrar una afinidad variable de la morfina y el fentanilo por el receptor opioide, una dificultad competitiva en la difusión pasiva de ambos fármacos, una competición en la unión al mismo transportador a través de la barrera hematoencefálica, o un metabolismo reducido de la glucuronidación de morfina por la ketamina (Qi *et al.* 2010).

El estímulo empleado para la determinación de la CAM puede también influenciar la interacción observada entre el remifentanilo y la ketamina. El remifentanilo aumenta todos los umbrales de presión para la detección de dolor y tolerancia así como a los estímulos nociceptivos eléctricos (Luginbuhl *et al.* 2003). La ketamina no previene la tolerancia a remifentanilo e HIO en personas voluntarias ante un estímulo mecánico nociceptivo, similar a aquel que se emplea en el método de la CAM. Sin embargo, una acción preventiva de la ketamina sí se ha observado con estimulación eléctrica repetida (Arendt-Nielsen *et al.* 1994).

En resumen, los resultados sugieren un efecto subaditivo entre la ketamina y el remifentanilo en términos de reducción de la CAM de sevoflurano en el que podría verse implicado una interacción de ambos fármacos en el receptor opioide. Además la ketamina no fue capaz de bloquear la TAO bajo anestesia inhalatoria. De confirmarse estos hallazgos en estudios clínicos posteriores podría alcanzar gran relevancia clínica debido al creciente uso de esta combinación en medicina humana.

---

### 5.3 Gabapentina

---

La gabapentina reduce la CAM en ratas (25-30%) de forma clínicamente significativa con un lento y gradual inicio de acción y sin observarse diferencias entre las dos dosis evaluadas. Sin

embargo, la gabapentina disminuye la CAM de forma aditiva cuando se combina con remifentanilo a las dosis estudiadas. Además, la administración preventiva de gabapentina previene el desarrollo de TAO al remifentanilo, aunque no puede descartarse que sea debido a un efecto aditivo de los dos fármacos.

Se ha descrito un efecto analgésico de la gabapentina en roedores (Gilron *et al.* 2003) y personas (Gustorff *et al.* 2004), aunque hay algunos estudios en los que no se establece un efecto analgésico (Lin *et al.* 2005). Se ha publicado que la administración preventiva de gabapentina reduce de dolor postoperatorio y el consumo de analgésicos (Pandey *et al.* 2004; Rorarius *et al.* 2004). No hay publicaciones previas que hayan demostrado un potencial efecto reductor de anestésico inhalatorio producido por la gabapentina en humanos; aunque si ha sido demostrado recientemente en ratas (Boruta *et al.* 2012). De hecho, la reducción de la CAM determinada en este estudio fue menor y puede reflejar diferencias en el tiempo de administración del fármaco ya que la gabapentina fue dada solo 15 min. antes de la determinación de la CAM probablemente antes de que los niveles máximos en sangre del fármaco y consecuente efecto en la CAM fuese alcanzado. Trabajos previos en gatos no demostraron este efecto ahorrador de anestésico inhalatorio (Reid *et al.* 2010), a diferencia de los resultados obtenidos en las ratas de nuestro estudio. La falta de efecto podría ser debido a algunas causas tales como una insuficiente concentración plasmática de gabapentina o un inicio de acción en la CAM retrasado, aunque las concentraciones plasmáticas de gabapentina en el estado estacionario se mantuvieron similares a estudios realizados en humana durante al menos 2,5h (Reid *et al.* 2010). Por otro lado, en nuestro estudio en ratas, ambas dosis de gabapentina empleadas producen un efecto similar en la CAM, sugiriendo que no se podría esperar una reducción de la CAM adicional aumentando la dosis. Igualmente la absorción saturable de la gabapentina debería ser tenida en cuenta en este hallazgo (Radulovic *et al.* 1995).

La reducción de la CAM producida por gabapentina aumenta gradualmente en el transcurso del experimento. La gabapentina fue administrada oralmente 40 min. antes de empezar la determinación de la CAM, y la última determinación de la CAM fue medida aproximadamente 4 horas más tarde. Debido a ello, este fármaco debería darse preferentemente antes de la inducción anestésica para asegurar el máximo nivel en plasma (Reid *et al.* 2010) y los efectos sobre la CAM durante el mantenimiento anestésico. De hecho, la mayoría de estudios clínicos publican

su administración 1-2 horas antes de la anestesia (Pandey *et al.* 2004; Turan *et al.* 2004; Al-Mujadi *et al.* 2006).

La administración de gabapentina ha sido publicada recientemente para el tratamiento del dolor perioperatorio (Peng *et al.* 2007) en un régimen de analgesia multimodal (Rasmussen *et al.* 2010). El fármaco podría potenciar el efecto analgésico de la morfina (Eckhardt *et al.* 2000), disminuyendo su consumo en el periodo postoperatorio (Clarke *et al.* 2009). Sin embargo, hay también estudios en los que la gabapentina no produce mejora en el dolor postoperatorio (Clarke *et al.* 2009; Rapchuk *et al.* 2010). En modelos animales, la combinación de gabapentina con opioides también presenta resultados contradictorios. Ha sido determinada una potenciación de la acción analgésica con tramadol (Dai *et al.* 2008) y morfina (Shimoyama *et al.* 1997) usando estímulos térmicos, pero no con fentanilo usando estímulos mecánicos (Van Elstraete *et al.* 2008). La acción aditiva de la gabapentina y el remifentanilo en la CAM encontrada en este estudio podría sugerir una potenciación del efecto analgésico de estos fármacos.

En animales, se ha observado un efecto preventivo de la gabapentina en el desarrollo de HIO (Kuraishi *et al.* 2003; Van Elstraete *et al.* 2008) y tolerancia a opioides (Gilron *et al.* 2003; Hansen *et al.* 2004; Pakulska *et al.* 2004; Lin *et al.* 2005), sin embargo en humanos, pocos estudios han evaluado una acción similar y los resultados son controvertidos (Gustorff *et al.* 2004; Compton *et al.* 2010).

El remifentanilo administrado solo reduce la CAM en ratas de forma dosis dependiente aunque se desarrolla una rápida TAO, caracterizada por una reducción de la CAM menos 1,5 horas más tarde (Gomez de Segura *et al.* 2009). Esta menor eficacia del remifentanilo reduciendo la CAM de sevoflurano a corto plazo se ha descrito en este estudio, pero la administración de gabapentina previno este fenómeno. Sin embargo, no podría determinarse si la falta de tolerancia al remifentanilo se debe a un efecto aditivo entre ambos fármacos o una interacción farmacodinámica. Un aumento gradual en los valores de CAM a pesar del mantenimiento de la infusión de remifentanilo (CAM-3 vs CAM-4,  $P=0.051$  con la dosis alta de gabapentina y de remifentanilo) sugiere que podría persistir un efecto de tolerancia.

La posibilidad de una posible interferencia de la gabapentina en el desarrollo de tolerancia no podría ser descartada tampoco. Se ha demostrado que la gabapentina interactúa directamente con los receptores involucrados en el desarrollo de hiperalgesia y tolerancia interactuando con

una subunidad de los canales de calcio voltaje dependientes (Gee *et al.* 1996) implicados en la transmisión del dolor en la médula espinal (Dickenson *et al.* 2007), o con los receptores glutaminérgicos (Shimoyama *et al.* 2000), tales como los receptores NMDA (Roh *et al.* 2008) involucrados en los mecanismos de tolerancia e HIO (Zhao *et al.* 2008).

La extrapolación de los resultados del presente estudio evaluados en ratas al ámbito clínico tiene sus limitaciones. La farmacocinética de la gabapentina es similar entre ratas y personas, consiguiendo su máxima concentración plasmática a las 2-3 horas (Radulovic *et al.* 1995; Jalalizadeh *et al.* 2007). Desafortunadamente, los niveles plasmáticos de los fármacos no se han podido determinar; debido a ello, deberían llevarse a cabo más estudios para determinar si la interacción observada en ratas es de relevancia clínica.

En resumen, los resultados indican que la gabapentina reduce la CAM de sevoflurano y potencia la reducción de la CAM del remifentanilo previniendo también el desarrollo de TAO bajo anestesia inhalatoria.

---

#### 5.4 Amitriptilina

---

La amitriptilina es un fármaco antidepresivo tricíclico que inhibe la recaptación de serotonina y noradrenalina en las fibras nerviosas, potenciando así la acción de estos neurotransmisores. Además, también produce una inhibición de la recaptación de adenosina celular (Sawynok *et al.* 1999; Esser *et al.* 2001), la antagonización de los receptores NMDA (Reynolds *et al.* 1988) y la actividad agonista en los receptores opioides (Onali *et al.* 2010). Todos estos mecanismos juntos, podrían explicar la eficacia como analgésico de este fármaco antidepresivo en dolor agudo (Sacerdote *et al.* 1987) y persistente y en el desarrollo de estados de hiperalgesia (Lee *et al.* 2011; Liang *et al.* 2011) y tolerancia (Liang *et al.* 2011) donde estos receptores están también involucrados. Sin embargo, el efecto analgésico de este fármaco es algo controvertido y se ha observado tanto de un efecto analgésico tras la administración aguda y única del amitriptilina (Sacerdote *et al.* 1987) como de una falta de antinocicepción en diferentes modelos animales de dolor agudo (Bomholt *et al.* 2005). En nuestro estudio, una dosis relativamente alta de amitriptilina disminuye la CAM de sevoflurano aunque un efecto analgésico per sé no ha podido ser determinado.

La mayoría de estudios que emplean fármacos antidepresivos como analgésicos se realizaron en estados de dolor neuropático donde los antidepresivos tricíclicos son considerados uno de los fármacos más efectivos en estas condiciones (Dharmshaktu *et al.* 2011). En modelos animales, la amitriptilina administrada de forma aguda previene la hipersensibilidad térmica (Esser *et al.* 1999; Bomholt *et al.* 2005) y reduce la hiperalgesia mecánica (Bomholt *et al.* 2005). Por otro lado, solo en tratamientos crónicos con antidepresivos fueron efectivos para tratar la alodinia mecánica desarrollada en un modelo de dolor neuropático (Benbouzid *et al.* 2008). En ratas que recibieron una infusión intratecal de morfina con amitriptilina se observó una disminución en la tolerancia observada (Huang *et al.* 2012). Sin embargo, durante la anestesia inhalatoria, una dosis única no consigue bloquear la TAO según nuestros estudios. Otros factores como el estímulo nociceptivo empleado o la falta de dolor persistente en nuestro modelo deben ser valorados en la falta de respuesta de la amitriptilina.

Por otro lado, el remifentanilo a diferencia de otros opioides como la morfina o el fentanilo, no induce hiperalgesia a través de la facilitación descendente serotoninérgica (Heinl *et al.* 2011) lo cual podría explicar la ausencia de efecto de la amitriptilina en prevenir la tolerancia aguda en nuestro estudio.

En resumen, la amitriptilina aunque ha demostrado reducir la CAM por sí misma y potenciar la reducción de la CAM del remifentanilo no es capaz de bloquear la TAO bajo anestesia inhalatoria como podría esperarse.

---

## 5.5 Minociclina

---

La minociclina es un inhibidor de la microglía la cual prolifera y se activa liberando citoquinas, tales como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, previniendo la sensibilización neural central y el dolor persistente inducido por lesión nerviosa (Clark *et al.* 2007). La minociclina por sí misma no produce analgesia en pruebas térmicas (*tail flick* y *Hargreaves*) (Hutchinson *et al.* 2008) pero sí potencia sinérgicamente la analgesia de la morfina (Habibi-Asl *et al.* 2009). En nuestro estudio encontramos que la minociclina redujo la CAM de sevoflurano y potenció la reducción de la CAM de remifentanilo de forma aditiva. Sin embargo, aunque existen estudios que indican una atenua-

ción de la tolerancia a opioides administrando minociclina (Habibi-Asl *et al.* 2009; Mika *et al.* 2009) en nuestro estudio no fue capaz de bloquear la TAO al remifentanilo. Esto contrasta con un desarrollo lento de tolerancia retardada a la morfina en ratones (Mika *et al.* 2009) y ratas (Habibi-Asl *et al.* 2009) posiblemente debido a la inhibición de la activación del p38 en la glía espinal (Cui *et al.* 2008) y la atenuación del número de células apoptóticas en el SNC (Hassanzadeh *et al.* 2011). Además, los inhibidores de la microglía reportan eficacia en situaciones de dolor neuropático e hipersensibilidad visceral (Saab *et al.* 2007; Mika 2008). Podría haber diferentes causas para explicar los controvertidos resultados de nuestro estudio. Primero, la efectividad de la minociclina podría ser mayor si hay lesión nerviosa comparado con otras situaciones dolorosas como en el dolor agudo inflamatorio (Clark *et al.* 2007; Padi *et al.* 2008; McMahon *et al.* 2009) donde la glía no ha sido activada por estimulación mecánica. Segundo, un dosis única de minociclina no consigue prevenir o tratar la hiperalgesia inducida por el dolor neuropático mientras que la administración crónica de este fármaco si lo previene (Padi *et al.* 2008). Y por último, se ha sugerido que la inhibición no específica de las células gliales podría no bloquear todos los aspectos pronociceptivos de la glía activada (McMahon *et al.* 2009).

En resumen, los resultados muestran que la minociclina reduce la CAM por sí misma y potencia la reducción de la CAM del remifentanilo pero no es capaz de bloquear la TAO bajo anestesia inhalatoria.

---

## 5.6 Maropitant

---

El maropitant antagoniza la expresión del receptor NK-1 (Huang *et al.* 2010) en el asta dorsal de la medula espinal los cuales se unen a la sustancia P, un neurotransmisor excitatorio liberado por las fibras nociceptoras aferentes primarias (Mantyh *et al.* 1997; Vera-Portocarrero *et al.* 2007). La administración mantenida de opioides, como la morfina, aumenta la sustancia P y la expresión de NK-1 en el SNC (King *et al.* 2005). La administración de los antagonista NK-1 atenuaron la hiperalgesia en un modelo de dolor neuropático en ratas (Cahill *et al.* 2002) y además, también tiene un papel importante en la HIO en ratas y ratones (King *et al.* 2005). Un fármaco antagonista NK-1 selectivo (SR140333) previno la tolerancia a opioides asociada con

la administración crónica de morfina por vía intratecal en ratas (Powell *et al.* 2003). Sin embargo, los resultados obtenidos en nuestro estudio demuestran que el maropitant aunque produce una ligera reducción de la CAM no bloquea la TAO.

El maropitant ha sido descrito que disminuye la CAM de sevoflurano en perros entre un 15 y un 30% usando como estímulos nociceptivos el pinzamiento de la cola y la estimulación visceral respectivamente (Boscan *et al.* 2011; Alvillar *et al.* 2012). En ratas, la administración de antagonista del receptor NK-1 disminuyen la CAM de isoflurano un 15% (Ishizaki *et al.* 1997), un reducción similar a la encontrada en nuestro estudio.

En resumen, el maropitant puede resultar útil para reducir la CAM por sí misma y potencia la reducción de la CAM del remifentanilo pero no presenta ninguna ventaja frente a la prevención de TAO.

---

## 5.7 Naloxona

---

El antagonista opioide naloxona a dosis ultra-bajas inhibió la hiperalgesia inducida por remifentanilo y el aumento de la CAM asociado a ella, pero no consiguió inhibir la tolerancia al remifentanilo medida como reducción de la CAM. Esto sugiere que tanto la tolerancia como la hiperalgesia pueden ser dos fenómenos diferentes aunque ambos pueden desarrollarse simultáneamente. Esta dicotomía entre hiperalgesia y tolerancia ha sido recientemente observada en pacientes con lumbalgia donde el tratamiento con morfina desarrollo tolerancia al remifentanilo en ausencia de hiperalgesia (Chu *et al.* 2012). No hay estudios previos del uso de la combinación de naloxona a dosis ultra-bajas con remifentanilo como infusión constante durante anestesia inhalatoria evaluando estos efectos.

El uso de dosis ultra-bajas de antagonistas de los receptores opioides combinados con agonistas opioides (p. ej. morfina) pueden producir un aumento en la eficacia analgésica del opioide (Powell *et al.* 2002; Tuerke *et al.* 2011) pero también una disminución o inhibición de la tolerancia, desarrollada en días (Powell *et al.* 2002; McNaull *et al.* 2007; Lin *et al.* 2010; Mattioli *et al.* 2010; Tuerke *et al.* 2011), semanas o meses (Crain *et al.* 1995; Shen *et al.* 1997), en roedores. Este efecto ha sido también observado en personas donde una dosis baja de antagonistas

opioides potenció la analgesia del opioide y minimizó el desarrollo de tolerancia (Chindalore *et al.* 2005; Webster *et al.* 2006).

En la última década, se ha desarrollado una nueva combinación de fármacos consistente en una dosis ultra-baja de naltrexona junto con oxycodona para el tratamiento del dolor crónico de severo a moderado (Webster 2007). Esta combinación potenció y prolongó la analgesia del opioide a la vez que reducía la tolerancia analgésica y la dependencia (Chindalore *et al.* 2005; Webster *et al.* 2006). De igual forma, la buprenorfina se combina también con naloxona, potenciando su efecto antinociceptivo en pacientes (La Vincente *et al.* 2008; Hay *et al.* 2011).

El remifentanilo desarrolló TAO durante la infusión en solo 90 minutos, igual que ya habíamos descrito en otras ocasiones. Además, el remifentanilo también produjo un efecto de tolerancia retardada con una disminución del 30% en la eficacia reductora de la CAM en el tercer día de infusión comparado con el primer día del estudio. Sin embargo, la naloxona administrada junto al remifentanilo no consiguió bloquear la tolerancia producida en horas (TAO) o retardada (días) de la infusión. Este efecto diferencial comparado con otros agonistas opioides podría ser explicado por la existencia de diferentes mecanismos de acción pronociceptivos entre distintos opioides (Heinl *et al.* 2011) o por la presencia de sevoflurano que podría producir cierta resistencia a la acción de la naloxona. De igual forma la ketamina, que previene el desarrollo de tolerancia a opioides (Kissin *et al.* 2000), no tuvo ningún efecto en la tolerancia aguda al remifentanilo bajo anestesia inhalatoria.

Por otro lado el remifentanilo produjo una disminución significativa de los umbrales nociceptivos mecánicos en torno a un 30%, el cual fue bloqueado por la dosis ultra-baja de naloxona. Dosis ultra-bajas de naltrexona también inhibieron la hiperalgia termal aguda producida por una dosis baja de morfina en ratones (Crain *et al.* 2001). Sin embargo, no hay estudios previos que hayan evaluado la función de antagonistas opioides en la HIO por remifentanilo. HIO ha sido descrito ampliamente en el periodo postoperatorio (Guignard *et al.* 2000; Joly *et al.* 2005) y puede ser mayor cuando la anestesia se basa en dosis altas de opioides como el remifentanilo en el periodo intraoperatorio (Shin *et al.* 2010). En este sentido, las dosis ultra bajas de naloxona podrían mejorar el tratamiento del dolor postoperatorio en aquellos pacientes que hayan

tenido una anestesia con remifentanilo o en cualquier otra situación clínica en que pueda desarrollarse HIO.

La disminución en los umbrales nociceptivos producida por el remifentanilo (hiperalgesia) estuvo asociada a un aumento de la CAM cercano al 20%. Este efecto fue evaluado en ratas por nuestro grupo observando como la administración de remifentanilo estaba asociada con aumento similar de la CAM 24h después de su administración y durando incluso varias semanas (Abreu *et al.* 2011). La extrapolación de estos datos al ámbito clínico sugiere un aumento en las necesidades de anestésicos inhalatorios en aquellos pacientes que se hayan administrado previamente opioides. Sin embargo, un ligero incremento gradual de la CAM basal en las ratas control ha sido también observado. Este efecto podría deberse a hiperalgesia local producida por repetidos pinzamientos de la cola; sin embargo este estímulo no produjo hiperalgesia sistémica puesto que los umbrales nociceptivos no cambiaron en el transcurso del tiempo. A diferencia de nuestro estudio una disminución de la CAM fue observada tras varias determinaciones de la CAM consecutivas (Docquier *et al.* 2003).

La naloxona a dosis bajas no produce antinocicepción (Lin *et al.* 2010; Tuerke *et al.* 2011); e incluso produjo mayor dolor e hiperalgesia mecánica cuando fue administrada en personas (Woolf 1980; Koppert *et al.* 2003). Curiosamente en nuestro estudio la naloxona en el día dos no desarrolló ningún efecto antinociceptivo aunque sí se observó un incremento de los umbrales nociceptivos en el día 4, sugiriendo una posible acción analgésica. Esta acción diferencial ha sido publicada previamente en roedores y puede ser un efecto dosis dependiente (Kayser *et al.* 1981; Attal *et al.* 1989), donde dosis más bajas producen un efecto analgésico mientras que las dosis más altas producen efectos hiperalgésicos en ratas. Este efecto diferencial se ha observado también en pacientes en el periodo postoperatorio (Levine *et al.* 1979). Un posible mecanismo de acción propone que los antagonistas opioides pueden unirse a la filamina A con alta afinidad, la cual interactúa con el receptor opioide evitando su unión a la proteína Gs. Sin embargo, se han observados dos diferentes afinidades, nanomolar y picomolar, en su unión a la proteína filamina A y esta diferente afinidad puede ser el responsable de la potenciación de la analgesia de los opioides y la prevención de la aparición de tolerancia así como de los efectos hiperalgésicos de la naloxona (Burns *et al.* 2010).

Cuando la naloxona fue asociada el remifentanilo no se observaron efectos antinociceptivos adicionales en términos de reducción de la CAM, mientras que otros artículos sugirieron una potenciación de la analgesia del opioide con morfina (Crain *et al.* 1995; Gan *et al.* 1997) , buprenorfina (La Vincente *et al.* 2008; Hay *et al.* 2011) y metadona (Cruciani *et al.* 2003). Sin embargo, otros estudios tampoco demostraron ninguna ventaja al uso de dosis ultra-bajas de naloxona en analgesia con morfina en PCA (Mehlich 2003; Cepeda *et al.* 2004) o en las necesidades de fentanilo en pacientes críticos pediátricos (Darnell *et al.* 2008).

La naloxona se une a un segmento del pentapéptido de una proteína estructural llamada filamina A previniendo la transformación de la proteína G de Gi/o a Gs por el receptor mu opioide (Wang *et al.* 2008; Wang *et al.* 2009). Este mecanismo de acción de la naloxona podría explicar la inhibición de la tolerancia a opioides (Powell *et al.* 2002) por su efecto sobre el sistema antinociceptivo del paciente (Lee *et al.* 2011). Pero además la naloxona actúa sobre otros mecanismos de acción diferentes que pueden explicar el efecto antihiperalgésico cuando se administró junto al remifentanilo. Entre ellos se incluye la atenuación de la neurotransmisión del receptor NMDA en la medula espinal (Lin *et al.* 2010) que está relacionado con el desarrollo de HIO (Guntz *et al.* 2005; Zhao *et al.* 2008). También la naloxona inhibe la gliosis espinal (Mattioli *et al.* 2010) implicada a su vez en la HIO (Hutchinson *et al.* 2007).

En resumen, el empleo de una dosis ultra-baja de naloxona previno el desarrollo de hiperalgnesia, pero no de tolerancia, inducida por remifentanilo, así como el aumento de la CAM asociado a ella.

---

## 5.8 Limitaciones del estudio

---

Las diferencias en las dosis empleadas entre personas y ratas deberían tenerse en cuenta en los efectos observados. La extrapolación de dosis de ratas a humanos debería ser basado en una escala alométrica, referida a la superficie corporal más que el peso corporal. Las dosis de remifentanilo empleadas aquí (Criado *et al.* 2003) fueron basadas en su capacidad de producir un reducción de la CAM relevante (Lang *et al.* 1996). Sin embargo, los resultados observados no deberían ser directamente extrapolados entre especies puesto que los mismos opioides y

dosis pueden realmente producir grandes variaciones en la CAM según la especie (Steffey *et al.* 1994; Brosnan *et al.* 2009).

La disminución de la CAM con las dosis altas de minociclina y amitriptilina podrían no ser extrapolables al ámbito clínico ya que estas dosis altas empleadas son mayores que las empleadas para tratamientos analgésicos y antihiperálgicos en roedores. Si buscásemos este efecto reductor de la CAM con estos fármacos en humanos es posible que debiésemos de aumentar las dosis empleadas clínicamente por 3 o 5 veces y puede estar limitado el uso de dosis tan altas por los efectos adversos consecuentes. Además, como se indicó previamente los tiempos de administración (agudo vs. crónico) de los fármacos empleados en este estudio puede no ser adecuado para bloquear TAO; pero el objetivo del estudio era determinar el efecto de una dosis única de estos fármacos es adecuado para un régimen de analgesia multimodal perioperatoria, y no determinar sus acciones cuando se dan crónicamente.

Desafortunadamente no fue posible la determinación de concentraciones plasmáticas de remifentanilo ni otros fármacos empleados en este estudio. En un estudio piloto pudimos comprobar que la extracción de sangre suficiente para el estudio farmacológico altera considerablemente el valor de la CAM y además las concentraciones obtenidas son casi indetectables por lo que no es posible valorar cambios en las mismas. Por ello, no se puede garantizar que no haya diferencias en los niveles plasmáticos de remifentanilo que puedan afectar a los resultados de los diferentes estudios.

Otro tema relevante determinando la potenciación entre los distintos fármacos y los opioides es el método de medida empleado. La CAM es un medida estándar de potencia de los anestésicos inhalatorios (Eger *et al.* 1965), se puede comparar diferentes sustancias analgésicas entre si determinando el grado de reducción de la CAM que producen. Además, este método es de gran valor clínico ya que simula el periodo intraoperatorio. Sin embargo, la reducción de la CAM no es solo el resultado de los efectos antinociceptivos de los fármacos si no también el resultado de complejas interacciones entre los fármacos analgésicos y los anestésicos inhalatorios (Docquier *et al.* 2003). La CAM realmente mide inmovilidad ante un estímulo nociceptivo (Brosnan *et al.* 2009), que es considerada ser el resultado de los efectos anestésicos en la médula espinal (Antognini *et al.* 1998). No se puede establecer una conexión directa entre po-

tenciación analgésica y reducción de la CAM cuando se usan anestésicos inhalatorios ya que la inmovilidad producida por los analgésicos y el efecto analgésico no son necesariamente fenómenos relacionados (Brosnan *et al.* 2009). Hay fármacos no analgésicos que también disminuyen la CAM (Heard *et al.* 1986; Hall *et al.* 1988). Desafortunadamente, los métodos comportamentales empleados comúnmente no pueden emplearse bajo anestesia, y en esta situación, el método de la CAM es el más fiable y reproducible que mejor simula la situación clínica preoperatoria usando anestésicos inhalatorios.



## **CONCLUSIONES**



1. La administración continua de remifentanilo a dosis capaces de reducir la CAM en la rata, pierde eficacia para producir este efecto a corto plazo (90 minutos o menos). El efecto observado podría ser probablemente una consecuencia de TAO ya que aumentando las dosis de remifentanilo es posible volver a alcanzar la reducción de la CAM inicial.
2. Se ha observado un efecto subaditivo entre la ketamina y el remifentanilo en la reducción de la CAM de sevoflurano, posiblemente debido a una competencia por el receptor opioide puesto que el antagonista opioide naloxona es capaz de bloquear la reducción de la CAM producida por la ketamina. Además, la ketamina no inhibe la TAO al remifentanilo.
3. La gabapentina reduce la CAM de sevoflurano de forma lenta y gradual con un posible efecto techo y también potencia la reducción de la CAM del remifentanilo. De hecho, esta potenciación previene el desarrollo de TAO en la rata.
4. La amitriptilina, la minociclina y el maropitant reducen la CAM de sevoflurano y potencian la reducción de la CAM producida por remifentanilo. Sin embargo, ninguno de los tres fármacos es capaz de bloquear la aparición de TAO producida por el opioide.
5. Una dosis ultra-baja de naloxona previene el desarrollo de hiperalgesia inducida por remifentanilo, así como el aumento de la CAM asociado a ella, pero no el desarrollo de tolerancia determinada bajo anestesia inhalatoria.
6. Futuros estudios adicionales deberían determinar si estos resultados observados en ratas pueden extrapolarse a otras especies incluida la humana; de confirmarse, podrían tener implicaciones clínicas relevantes.





## **CONCLUSIONS**



1. A constant rate infusion of remifentanil, at doses reducing the sevoflurane MAC in the rat, decreases its effectiveness to produce such an effect in the short term, i.e., 90 min or less. The observed effect would probably be a consequence of acute opioid tolerance (AOT) since increasing the remifentanil infusion dose regained the initial MAC reduction.
2. A subadditive effect between ketamine and remifentanil is found on the MAC reduction, possibly due to a competitive binding to the opioid receptor, since the opioid antagonist naloxone is able to block the ketamine MAC reduction. In addition, ketamine is unable to block AOT.
3. Gabapentin gradually reduces the MAC over the time and enhances the MAC reduction produced by remifentanil. This enhancement may limit AOT in rats.
4. Amitriptyline, minocycline and maropitant reduces the sevoflurane MAC and potentiated the remifentanil MAC reduction in rats. However, amitriptyline, minocycline or maropitant cannot block the AOT.
5. An ultra-low dose of naloxone blocks remifentanil-induced hyperalgesia but not prevent AOT under inhalant anesthesia. Moreover, the MAC increase associated with hyperalgesia was also blocked by naloxone.
6. Further studies are needed to determine if these findings observed in rats could be extrapolated to other species, including people, which may be of clinical relevance.





## **BIBLIOGRAFÍA**



- Abreu, M., D. Aguado, et al. (2011). "Immediate and late effects on MAC of a single dose of opioid in rats." *Vet Anaesth Analg* 38(1-35): 27-28.
- Al-Mujadi, H., A. R. Refai, et al. (2006). "Preemptive gabapentin reduces postoperative pain and opioid demand following thyroid surgery." *Can J Anaesth* 53(3): 268-273.
- Aley, K. O. and J. D. Levine (1997). "Multiple receptors involved in peripheral alpha 2, mu, and A1 antinociception, tolerance, and withdrawal." *J Neurosci* 17(2): 735-744.
- Alvarez, V. A., S. Arttamangkul, et al. (2002). "mu-Opioid receptors: Ligand-dependent activation of potassium conductance, desensitization, and internalization." *J Neurosci* 22(13): 5769-5776.
- Alvillar, B. M., P. Boscan, et al. (2012). "Effect of epidural and intravenous use of the neurokinin-1 (NK-1) receptor antagonist maropitant on the sevoflurane minimum alveolar concentration (MAC) in dogs." *Vet Anaesth Analg* 39(2): 201-205.
- Amarpal, H. P. Aithal, et al. (2003). "Interaction between epidurally administered ketamine and pethidine in dogs." *J Vet Med A Physiol Pathol Clin.Med.* 50(5): 254-258.
- Angst, M. S. and J. D. Clark (2006). "Opioid-induced hyperalgesia: a qualitative systematic review." *Anesthesiology* 104(3): 570-587.
- Angst, M. S., W. Koppert, et al. (2003). "Short-term infusion of the mu-opioid agonist remifentanyl in humans causes hyperalgesia during withdrawal." *Pain* 106(1-2): 49-57.
- Antognini, J. F. (2011). "Anesthetic action: the importance of the spinal cord to immobility." *Vet J* 187(2): 151-152.
- Antognini, J. F. and E. Carstens (1998). "Macroscopic sites of anesthetic action: brain versus spinal cord." *Toxicology Letters* 100-101: 51-58.
- Antognini, J. F. and K. Schwartz (1993). "Exaggerated anesthetic requirements in the preferentially anesthetized brain." *Anesthesiology* 79(6): 1244-1249.
- Arendt-Nielsen, L., J. Brennum, et al. (1994). "Electrophysiological and psychophysical quantification of temporal summation in the human nociceptive system." *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 68(3): 266-273.
- Attal, N., V. Kayser, et al. (1989). "Behavioural evidence for a bidirectional effect of systemic naloxone in a model of experimental neuropathy in the rat." *Brain Res* 494(2): 276-284.
- Axelrod, D. J. and B. Reville (2007). "Using methadone to treat opioid-induced hyperalgesia and refractory pain." *J Opioid Manag* 3(2): 113-114.
- Baba, H., T. Kohno, et al. (2001). "Direct activation of rat spinal dorsal horn neurons by prostaglandin E2." *J Neurosci* 21(5): 1750-1756.
- Basbaum, A. I., D. M. Bautista, et al. (2009). "Cellular and molecular mechanisms of pain." *Cell* 139(2): 267-284.
- Batra, Y. K., M. Shamsah, et al. (2007). "Intraoperative small-dose ketamine does not reduce pain or analgesic consumption during perioperative opioid analgesia in children after tonsillectomy." *Int J Clin Pharmacol Ther* 45(3): 155-160.
- Bekhit, M. H. (2010). "Opioid-induced hyperalgesia and tolerance." *Am J Ther* 17(5): 498-510.
- Bell, R. F., J. B. Dahl, et al. (2005). "Perioperative ketamine for acute post-operative pain: a quantitative and qualitative systematic review (Cochrane review)." *Acta Anaesthesiol.Scand.* 49(10): 1405-1428.
- Benbouzid, M., N. Choucair-Jaafar, et al. (2008). "Chronic, but not acute, tricyclic antidepressant treatment alleviates neuropathic allodynia after sciatic nerve cuffing in mice." *Eur J Pain* 12(8): 1008-1017.
- Bohn, L. M., R. J. Lefkowitz, et al. (1999). "Enhanced morphine analgesia in mice lacking beta-arrestin 2." *Science* 286(5449): 2495-2498.
- Bomholt, S. F., J. D. Mikkelsen, et al. (2005). "Antinociceptive effects of the antidepressants amitriptyline, duloxetine, mirtazapine and citalopram in animal models of acute, persistent and neuropathic pain." *Neuropharmacology* 48(2): 252-263.
- Boruta, D. T., G. Sotgiu, et al. (2012). "Effects of intraperitoneal administration of gabapentin on the minimum alveolar

- concentration of isoflurane in adult male rats." *Lab Anim* 46(2): 108-113.
- Boscan, P., E. Monnet, et al. (2011). "Effect of maropitant, a neurokinin 1 receptor antagonist, on anesthetic requirements during noxious visceral stimulation of the ovary in dogs." *Am J Vet Res* 72(12): 1576-1579.
- Boyd, D., M. Butler, et al. (1994). Part III: Pain terms, a current list with definitions and notes on usage. Classification of chronic pain. H. Merskey and N. Bogduk. Seattle, IASP Press: 209-214.
- Bridges, B. E., Jr. and E. I. Eger, 2nd (1966). "The effect of hypocapnia on the level of halothane anesthesia in man." *Anesthesiology* 27(5): 634-637.
- Brosnan, R. J., E. I. Eger, 2nd, et al. (2007). "Anesthetic properties of carbon dioxide in the rat." *Anesth Analg* 105(1): 103-106.
- Brosnan, R. J., E. I. Eger, et al. (2007). "Anesthetic properties of carbon dioxide in the rat." *Anesth Analg* 105(1): 103-106.
- Brosnan, R. J., B. H. Pypendop, et al. (2009). "Effects of remifentanil on measures of anesthetic immobility and analgesia in cats." *Am J Vet Res* 70(9): 1065-1071.
- Brosnan, R. J., B. H. Pypendop, et al. (2009). "Effects of remifentanil on measures of anesthetic immobility and analgesia in cats." *Am J Vet Res* 70(9): 1065-1071.
- Burns, L. H. and H. Y. Wang (2010). "PTI-609: a novel analgesic that binds filamin A to control opioid signaling." *Recent Pat CNS Drug Discov* 5(3): 210-220.
- Cabanero, D., A. Campillo, et al. (2009). "Pronociceptive effects of remifentanil in a mouse model of postsurgical pain: effect of a second surgery." *Anesthesiology* 111(6): 1334-1345.
- Cabanero, D., E. Celerier, et al. (2009). "The pro-nociceptive effects of remifentanil or surgical injury in mice are associated with a decrease in delta-opioid receptor mRNA levels: Prevention of the nociceptive response by on-site delivery of enkephalins." *Pain* 141(1-2): 88-96.
- Cahill, C. M. and T. J. Coderre (2002). "Attenuation of hyperalgesia in a rat model of neuropathic pain after intrathecal pre- or post-treatment with a neurokinin-1 antagonist." *Pain* 95(3): 277-285.
- Callahan, R. J., J. D. Au, et al. (2004). "Functional inhibition by methadone of N-methyl-D-aspartate receptors expressed in *Xenopus* oocytes: stereospecific and subunit effects." *Anesth Analg* 98(3): 653-659.
- Carstensen, M. and A. M. Moller (2010). "Adding ketamine to morphine for intravenous patient-controlled analgesia for acute postoperative pain: a qualitative review of randomized trials." *Br J Anaesth* 104(4): 401-406.
- Celerier, E., J. R. Gonzalez, et al. (2006). "Opioid-induced hyperalgesia in a murine model of postoperative pain: role of nitric oxide generated from the inducible nitric oxide synthase." *Anesthesiology* 104(3): 546-555.
- Celerier, E., J. Laulin, et al. (1999). "Evidence for opiate-activated NMDA processes masking opiate analgesia in rats." *Brain Res* 847(1): 18-25.
- Celerier, E., J. P. Laulin, et al. (2001). "Progressive enhancement of delayed hyperalgesia induced by repeated heroin administration: a sensitization process." *J Neurosci* 21(11): 4074-4080.
- Celerier, E., C. Rivat, et al. (2000). "Long-lasting hyperalgesia induced by fentanyl in rats: preventive effect of ketamine." *Anesthesiology* 92(2): 465-472.
- Cepeda, M. S., H. Alvarez, et al. (2004). "Addition of ultralow dose naloxone to postoperative morphine PCA: unchanged analgesia and opioid requirement but decreased incidence of opioid side effects." *Pain* 107(1-2): 41-46.
- Claing, A., S. A. Laporte, et al. (2002). "Endocytosis of G protein-coupled receptors: roles of G protein-coupled receptor kinases and beta-arrestin proteins." *Prog Neurobiol* 66(2): 61-79.
- Clark, A. K., C. Gentry, et al. (2007). "Role of spinal microglia in rat models of peripheral nerve injury and inflammation." *Eur J Pain* 11(2): 223-230.
- Clarke, H., S. Pereira, et al. (2009). "Adding gabapentin to a multimodal regimen does not reduce acute pain, opioid consumption or chronic pain after total hip arthroplasty." *Acta Anaesthesiol Scand* 53(8): 1073-1083.

- Clarke, H., S. Pereira, et al. (2009). "Gabapentin decreases morphine consumption and improves functional recovery following total knee arthroplasty." *Pain Res Manag* 14(3): 217-222.
- Compton, M. A. (1994). "Cold-pressor pain tolerance in opiate and cocaine abusers: correlates of drug type and use status." *J Pain Symptom Manage* 9(7): 462-473.
- Compton, P., V. C. Charuvastra, et al. (2001). "Pain intolerance in opioid-maintained former opiate addicts: effect of long-acting maintenance agent." *Drug Alcohol Depend* 63(2): 139-146.
- Compton, P., P. Kehoe, et al. (2010). "Gabapentin improves cold-pressor pain responses in methadone-maintained patients." *Drug Alcohol Depend* 109(1-3): 213-219.
- Cooper, D. W., S. L. Lindsay, et al. (1997). "Does intrathecal fentanyl produce acute cross-tolerance to i.v. morphine?" *Br J Anaesth* 78(3): 311-313.
- Cortinez, L. I., V. Brandes, et al. (2001). "No clinical evidence of acute opioid tolerance after remifentanyl-based anaesthesia." *Br J Anaesth* 87(6): 866-869.
- Cox, B. M., M. Ginsburg, et al. (1968). "Acute tolerance to narcotic analgesic drugs in rats." *Br J Pharmacol Chemother* 33(2): 245-256.
- Crain, S. M. and K. F. Shen (1995). "Ultra-low concentrations of naloxone selectively antagonize excitatory effects of morphine on sensory neurons, thereby increasing its antinociceptive potency and attenuating tolerance/dependence during chronic cotreatment." *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(23): 10540-10544.
- Crain, S. M. and K. F. Shen (1998). "Modulation of opioid analgesia, tolerance and dependence by Gs-coupled, GM1 ganglioside-regulated opioid receptor functions." *Trends Pharmacol Sci* 19(9): 358-365.
- Crain, S. M. and K. F. Shen (2001). "Acute thermal hyperalgesia elicited by low-dose morphine in normal mice is blocked by ultra-low-dose naltrexone, unmasking potent opioid analgesia." *Brain Res* 888(1): 75-82.
- Crawford, M. W., C. Hickey, et al. (2006). "Development of acute opioid tolerance during infusion of remifentanyl for pediatric scoliosis surgery." *Anesth Analg* 102(6): 1662-1667.
- Criado, A. B. and I. A. Gomez de Segura (2003). "Reduction of isoflurane MAC by fentanyl or remifentanyl in rats." *Vet Anaesth Analg* 30(4): 250-256.
- Criado, A. B. and I. A. Gomez e Segura (2003). "Reduction of isoflurane MAC by fentanyl or remifentanyl in rats." *Vet Anaesth Analg* 30(4): 250-256.
- Crisp, T., J. M. Perrotti, et al. (1991). "The local monoaminergic dependency of spinal ketamine." *Eur J Pharmacol* 194(2-3): 167-172.
- Cruciani, R. A., D. Lussier, et al. (2003). "Ultra-low dose oral naltrexone decreases side effects and potentiates the effect of methadone." *J Pain Symptom Manage* 25(6): 491-494.
- Cui, Y., X. X. Liao, et al. (2008). "A novel role of minocycline: attenuating morphine antinociceptive tolerance by inhibition of p38 MAPK in the activated spinal microglia." *Brain Behav Immun* 22(1): 114-123.
- Cullen, D. J. and E. I. Eger, 2nd (1970). "The effects of hypoxia and isovolemic anemia on the halothane requirement (MAC) of dogs. I. The effect of hypoxia." *Anesthesiology* 32(1): 28-34.
- Chakrabarti, S., A. Regec, et al. (2005). "Chronic morphine acts via a protein kinase Cgamma-G(beta)-adenylyl cyclase complex to augment phosphorylation of G(beta) and G(betagamma) stimulatory adenylyl cyclase signaling." *Brain Res Mol Brain Res* 138(1): 94-103.
- Chazan, S., M. P. Ekstein, et al. (2008). "Ketamine for acute and subacute pain in opioid-tolerant patients." *J Opioid Manag* 4(3): 173-180.
- Chen, L. and L. Y. Huang (1992). "Protein kinase C reduces Mg<sup>2+</sup> block of NMDA-receptor channels as a mechanism of modulation." *Nature* 356(6369): 521-523.
- Chen, Z. Y., W. F. Tu, et al. (2011). "[Measurement of the minimum alveolar concentration of sevoflurane during combined anesthesia with sevoflurane, small-dose dexmedetomidine and fentanyl]." *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao* 31(4): 718-720.

- Chia, Y. Y., K. Liu, et al. (1999). "Intraoperative high dose fentanyl induces postoperative fentanyl tolerance." *Can J Anaesth* 46(9): 872-877.
- Chindalore, V. L., R. A. Craven, et al. (2005). "Adding ultralow-dose naltrexone to oxycodone enhances and prolongs analgesia: a randomized, controlled trial of Oxytrex." *J Pain* 6(6): 392-399.
- Chu, L. F., M. S. Angst, et al. (2008). "Opioid-induced hyperalgesia in humans: molecular mechanisms and clinical considerations." *Clin J Pain* 24(6): 479-496.
- Chu, L. F., D. J. Clark, et al. (2006). "Opioid tolerance and hyperalgesia in chronic pain patients after one month of oral morphine therapy: a preliminary prospective study." *J Pain* 7(1): 43-48.
- Chu, L. F., N. D'Arcy, et al. (2012). "Analgesic tolerance without demonstrable opioid-induced hyperalgesia: a double-blinded, randomized, placebo-controlled trial of sustained-release morphine for treatment of chronic nonradicular low-back pain." *Pain* 153(8): 1583-1592.
- Dai, X., C. D. Brunson, et al. (2008). "Gender differences in the antinociceptive effect of tramadol, alone or in combination with gabapentin, in mice." *J Biomed Sci* 15(5): 645-651.
- Darnell, C. M., J. Thompson, et al. (2008). "Effect of low-dose naloxone infusion on fentanyl requirements in critically ill children." *Pediatrics* 121(5): e1363-1371.
- Davies, M. F., F. Haimor, et al. (2003). "Dexmedetomidine fails to cause hyperalgesia after cessation of chronic administration." *Anesth Analg* 96(1): 195-200.
- Davis, N. L., R. L. Nunnally, et al. (1975). "Determination of the minimum alveolar concentration (MAC) of halothane in the white New Zealand rabbit." *Br J Anaesth* 47(3): 341-345.
- de la Puente-Redondo, V., F. D. Tingley, 3rd, et al. (2007). "The neurokinin-1 antagonist activity of maropitant, an antiemetic drug for dogs, in a gerbil model." *J Vet Pharmacol Ther* 30(4): 281-287.
- de la Puente-Redondo, V. A., E. M. Siedek, et al. (2007). "The anti-emetic efficacy of maropitant (Cerenia) in the treatment of ongoing emesis caused by a wide range of underlying clinical aetiologies in canine patients in Europe." *J Small Anim Pract* 48(2): 93-98.
- Dharmshaktu, P., V. Tayal, et al. (2011). "Efficacy of antidepressants as analgesics: a review." *J Clin Pharmacol* 52(1): 6-17.
- Dickenson, A. H. and J. Ghandehari (2007). "Anti-convulsants and anti-depressants." *Handb Exp Pharmacol*(177): 145-177.
- Dixon, W. J. (1965). "The up-and-down method for small samples." *J Am Stat Assoc* 60: 967-978.
- Docquier, M. A., P. Lavand'homme, et al. (2003). "Can determining the minimum alveolar anesthetic concentration of volatile anesthetic be used as an objective tool to assess antinociception in animals?" *Anesth Analg* 97(4): 1033-1039.
- Docquier, M. A., P. Lavand'homme, et al. (2003). "Can determining the minimum alveolar anesthetic concentration of volatile anesthetic be used as an objective tool to assess antinociception in animals?" *Anesth Analg* 97(4): 1033-1039.
- Doverly, M., A. A. Somogyi, et al. (2001). "Methadone maintenance patients are cross-tolerant to the antinociceptive effects of morphine." *Pain* 93(2): 155-163.
- Doverly, M., J. M. White, et al. (2001). "Hyperalgesic responses in methadone maintenance patients." *Pain* 90(1-2): 91-96.
- Drdla, R., M. Gassner, et al. (2009). "Induction of synaptic long-term potentiation after opioid withdrawal." *Science* 325(5937): 207-210.
- Eckhardt, K., S. Ammon, et al. (2000). "Gabapentin enhances the analgesic effect of morphine in healthy volunteers." *Anesth Analg* 91(1): 185-191.
- Eger, E. I. (2004). "Characteristics of anesthetic agents used for induction and maintenance of general anesthesia." *Am J Health Syst Pharm* 61 Suppl 4: S3-10.
- Eger, E. I., 2nd (2001). "Age, minimum alveolar anesthetic concentration, and minimum alveolar anesthetic concentration-awake." *Anesth Analg* 93(4): 947-953.

- Eger, E. I., 2nd (2002). "A brief history of the origin of minimum alveolar concentration (MAC)." *Anesthesiology* 96(1): 238-239.
- Eger, E. I., 2nd, B. Brandstater, et al. (1965). "Equipotent alveolar concentrations of methoxyflurane, halothane, diethyl ether, fluroxene, cyclopropane, xenon and nitrous oxide in the dog." *Anesthesiology* 26(6): 771-777.
- Eger, E. I., 2nd, M. J. Laster, et al. (2003). "Women appear to have the same minimum alveolar concentration as men: a retrospective study." *Anesthesiology* 99(5): 1059-1061.
- Eger, E. I., 2nd, M. Liao, et al. (2006). "Contrasting roles of the N-methyl-D-aspartate receptor in the production of immobilization by conventional and aromatic anesthetics." *Anesth Analg* 102(5): 1397-1406.
- Eger, E. I., 2nd, D. E. Raines, et al. (2008). "Is a new paradigm needed to explain how inhaled anesthetics produce immobility?" *Anesth Analg* 107(3): 832-848.
- Eger, E. I., 2nd, L. J. Saidman, et al. (1965). "Minimum alveolar anesthetic concentration: a standard of anesthetic potency." *Anesthesiology* 26(6): 756-763.
- Eger, E. I., 2nd, L. J. Saidman, et al. (1965). "Temperature dependence of halothane and cyclopropane anesthesia in dogs: correlation with some theories of anesthetic action." *Anesthesiology* 26(6): 764-770.
- Eger, E. I., L. J. Saidman, et al. (1965). "Minimum alveolar anesthetic concentration: a standard of anesthetic potency." *Anesthesiology* 26(6): 756-763.
- Eisele, J. H., E. I. Eger, 2nd, et al. (1967). "Narcotic properties of carbon dioxide in the dog." *Anesthesiology* 28(5): 856-865.
- Elia, N. and M. R. Tramer (2005). "Ketamine and postoperative pain--a quantitative systematic review of randomised trials." *Pain* 113(1-2): 61-70.
- Engelhardt, T., C. Zaarour, et al. (2008). "Intraoperative low-dose ketamine does not prevent a remifentanil-induced increase in morphine requirement after pediatric scoliosis surgery." *Anesth Analg* 107(4): 1170-1175.
- Engelhardt, T., C. Zaarour, et al. (2008). "Intraoperative low-dose ketamine does not prevent a remifentanil-induced increase in morphine requirement after pediatric scoliosis surgery." *Anesth Analg* 107(4): 1170-1175.
- Esser, M. J., T. Chase, et al. (2001). "Chronic administration of amitriptyline and caffeine in a rat model of neuropathic pain: multiple interactions." *Eur J Pharmacol* 430(2-3): 211-218.
- Esser, M. J. and J. Sawynok (1999). "Acute amitriptyline in a rat model of neuropathic pain: differential symptom and route effects." *Pain* 80(3): 643-653.
- Feldman, R. S., J. S. Meyer, et al. (1997). *Principles of neuropsychopharmacology*. Massachusetts, Sinauer Associates.
- Ferguson, S. S. (2001). "Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling." *Pharmacol Rev* 53(1): 1-24.
- Finck, A. D. and S. H. Ngai (1982). "Opiate receptor mediation of ketamine analgesia." *Anesthesiology* 56(4): 291-297.
- Finn, A. K. and J. L. Whistler (2001). "Endocytosis of the mu opioid receptor reduces tolerance and a cellular hallmark of opiate withdrawal." *Neuron* 32(5): 829-839.
- Fishbain, D. A., B. Cole, et al. (2009). "Do opioids induce hyperalgesia in humans? An evidence-based structured review." *Pain Med* 10(5): 829-839.
- Fragen, R. J. and K. L. Dunn (1996). "The minimum alveolar concentration (MAC) of sevoflurane with and without nitrous oxide in elderly versus young adults." *J Clin Anesth* 8(5): 352-356.
- Gan, T. J., B. Ginsberg, et al. (1997). "Opioid-sparing effects of a low-dose infusion of naloxone in patient-administered morphine sulfate." *Anesthesiology* 87(5): 1075-1081.
- Gee, N. S., J. P. Brown, et al. (1996). "The novel anticonvulsant drug, gabapentin (Neurontin), binds to the alpha2delta subunit of a calcium channel." *J Biol Chem* 271(10): 5768-5776.
- Gerstin, K. M., D. H. Gong, et al. (2003). "Mutation of KCNK5 or Kir3.2 potassium channels in mice does not change minimum

- alveolar anesthetic concentration." *Anesth Analg* 96(5): 1345-1349.
- Ghelardini, C., N. Galeotti, et al. (2008). "Molecular interaction in the mouse PAG between NMDA and opioid receptors in morphine-induced acute thermal nociception." *J Neurochem.* 105(1): 91-100.
- Gilron, I., J. Biederman, et al. (2003). "Gabapentin blocks and reverses antinociceptive morphine tolerance in the rat paw-pressure and tail-flick tests." *Anesthesiology* 98(5): 1288-1292.
- Glass, P. S. (1995). "Remifentanil: a new opioid." *J Clin Anesth* 7(7): 558-563.
- Gomez de Segura, I. A., J. B. de la Vibora, et al. (2009). "Opioid tolerance blunts the reduction in the sevoflurane minimum alveolar concentration produced by remifentanil in the rat." *Anesthesiology* 110(5): 1133-1138.
- Gregory, G. A., E. I. Eger, 2nd, et al. (1969). "The relationship between age and halothane requirement in man." *Anesthesiology* 30(5): 488-491.
- Gu, X., X. Wu, et al. (2009). "Tyrosine phosphorylation of the N-Methyl-D-Aspartate receptor 2B subunit in spinal cord contributes to remifentanil-induced postoperative hyperalgesia: the preventive effect of ketamine." *Mol Pain* 5: 76.
- Guignard, B., A. E. Bossard, et al. (2000). "Acute opioid tolerance: intraoperative remifentanil increases postoperative pain and morphine requirement." *Anesthesiology* 93(2): 409-417.
- Guignard, B., C. Coste, et al. (2002). "Supplementing desflurane-remifentanil anesthesia with small-dose ketamine reduces perioperative opioid analgesic requirements." *Anesth Analg* 95(1): 103-108.
- Guntz, E., H. Dumont, et al. (2005). "Effects of remifentanil on N-methyl-D-aspartate receptor: an electrophysiologic study in rat spinal cord." *Anesthesiology* 102(6): 1235-1241.
- Guo, R. X., M. Zhang, et al. (2009). "NMDA receptors are involved in upstream of the spinal JNK activation in morphine antinociceptive tolerance." *Neurosci Lett* 467(2): 95-99.
- Gustorff, B., K. Hoechtl, et al. (2004). "The effects of remifentanil and gabapentin on hyperalgesia in a new extended inflammatory skin pain model in healthy volunteers." *Anesth Analg* 98(2): 401-407.
- Gustorff, B., G. Nahlik, et al. (2002). "The absence of acute tolerance during remifentanil infusion in volunteers." *Anesth Analg* 94(5): 1223-1228, table of contents.
- Habibi-Asl, B., K. Hassanzadeh, et al. (2009). "Central administration of minocycline and riluzole prevents morphine-induced tolerance in rats." *Anesth Analg* 109(3): 936-942.
- Hahnenkamp, K., J. Nollet, et al. (2004). "Remifentanil directly activates human N-methyl-D-aspartate receptors expressed in *Xenopus laevis* oocytes." *Anesthesiology* 100(6): 1531-1537.
- Hall, R. I., I. M. Schwieger, et al. (1988). "The anesthetic efficacy of midazolam in the enflurane-anesthetized dog." *Anesthesiology* 68(6): 862-866.
- Hance, A. J., W. D. Winters, et al. (1989). "Catalepsy induced by combinations of ketamine and morphine: potentiation, antagonism, tolerance and cross-tolerance in the rat." *Neuropharmacology* 28(2): 109-116.
- Hansen, C., I. Gilron, et al. (2004). "The effects of intrathecal gabapentin on spinal morphine tolerance in the rat tail-flick and paw pressure tests." *Anesth Analg* 99(4): 1180-1184.
- Hansen, E. G., T. H. Duedahl, et al. (2005). "Intra-operative remifentanil might influence pain levels in the immediate post-operative period after major abdominal surgery." *Acta Anaesthesiol Scand* 49(10): 1464-1470.
- Hassanzadeh, K., B. Habibi-asl, et al. (2011). "Minocycline prevents morphine-induced apoptosis in rat cerebral cortex and lumbar spinal cord: a possible mechanism for attenuating morphine tolerance." *Neurotox Res* 19(4): 649-659.
- Hay, J. L., S. F. La Vincente, et al. (2011). "Potentiation of buprenorphine antinociception with ultra-low dose naltrexone in healthy subjects." *Eur J Pain* 15(3): 293-298.
- Hay, J. L., J. M. White, et al. (2009). "Hyperalgesia in opioid-managed chronic

- pain and opioid-dependent patients." *J Pain* 10(3): 316-322.
- Heard, D. J., A. I. Webb, et al. (1986). "Effect of acepromazine on the anesthetic requirement of halothane in the dog." *Am J Vet Res* 47(10): 2113-2115.
- Heavner, J. E. (1983). "Veterinary anesthesia update. FDA Veterinary notes." *JAVMA* 182: 30.
- Heinl, C., R. Drdla-Schutting, et al. (2011). "Distinct mechanisms underlying pronociceptive effects of opioids." *J Neurosci* 31(46): 16748-16756.
- Himmelseher, S. and M. E. Durieux (2005). "Ketamine for perioperative pain management." *Anesthesiology* 102(1): 211-220.
- Hirota, K., H. Okawa, et al. (1999). "Stereoselective interaction of ketamine with recombinant mu, kappa, and delta opioid receptors expressed in Chinese hamster ovary cells." *Anesthesiology* 90(1): 174-182.
- Hoffmann, V. L., A. K. Baker, et al. (2003). "Epidural ketamine potentiates epidural morphine but not fentanyl in acute nociception in rats." *Eur J Pain* 7(2): 121-130.
- Holtman, J. R., Jr., P. A. Crooks, et al. (2008). "Interaction between morphine and norketamine enantiomers in rodent models of nociception." *Pharmacol Biochem Behav* 90(4): 769-777.
- Holtman, J. R., Jr. and E. P. Wala (2007). "Characterization of the antinociceptive and pronociceptive effects of methadone in rats." *Anesthesiology* 106(3): 563-571.
- Hood, D. D., R. Curry, et al. (2003). "Intravenous remifentanyl produces withdrawal hyperalgesia in volunteers with capsaicin-induced hyperalgesia." *Anesth Analg* 97(3): 810-815.
- Hua, X. Y., P. Chen, et al. (1999). "Intrathecal substance P-induced thermal hyperalgesia and spinal release of prostaglandin E2 and amino acids." *Neuroscience* 89(2): 525-534.
- Huang, P., G. B. Kehner, et al. (2001). "Comparison of pharmacological activities of buprenorphine and norbuprenorphine: norbuprenorphine is a potent opioid agonist." *J Pharmacol Exp Ther* 297(2): 688-695.
- Huang, S. C. and V. L. Korlipara (2010). "Neurokinin-1 receptor antagonists: a comprehensive patent survey." *Expert Opin Ther Pat* 20(8): 1019-1045.
- Huang, Y. N., R. Y. Tsai, et al. (2012). "Amitriptyline attenuates astrocyte activation and morphine tolerance in rats: role of the PSD-95/NR1/nNOS/PKCgamma signaling pathway." *Behav Brain Res* 229(2): 401-411.
- Hutchinson, M. R., S. T. Bland, et al. (2007). "Opioid-induced glial activation: mechanisms of activation and implications for opioid analgesia, dependence, and reward." *The Sci World J* 7: 98-111.
- Hutchinson, M. R., A. L. Northcutt, et al. (2008). "Minocycline suppresses morphine-induced respiratory depression, suppresses morphine-induced reward, and enhances systemic morphine-induced analgesia." *Brain Behav Immun* 22(8): 1248-1256.
- Ibuki, T., S. A. Dunbar, et al. (1997). "Effect of transient naloxone antagonism on tolerance development in rats receiving continuous spinal morphine infusion." *Pain* 70(2-3): 125-132.
- Ikeda, H., B. Heinke, et al. (2003). "Synaptic plasticity in spinal lamina I projection neurons that mediate hyperalgesia." *Science* 299(5610): 1237-1240.
- Ingram, S. L., C. W. Vaughan, et al. (1998). "Enhanced opioid efficacy in opioid dependence is caused by an altered signal transduction pathway." *J Neurosci* 18(24): 10269-10276.
- Ishizaki, K., S. Karasawa, et al. (1997). "Intrathecal neurokinin-1 receptor antagonist reduces isoflurane MAC in rats." *Can J Anaesth* 44(5 Pt 1): 543-549.
- Jalalizadeh, H., E. Souri, et al. (2007). "Validated HPLC method for the determination of gabapentin in human plasma using pre-column derivatization with 1-fluoro-2,4-dinitrobenzene and its application to a pharmacokinetic study." *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 854(1-2): 43-47.
- Joly, V., P. Richebe, et al. (2005). "Remifentanyl-induced postoperative hyperalgesia and its prevention with small-dose ketamine." *Anesthesiology* 103(1): 147-155.

- Katoh, T. and K. Ikeda (1987). "The minimum alveolar concentration (MAC) of sevoflurane in humans." *Anesthesiology* 66(3): 301-303.
- Katoh, T., S. Kobayashi, et al. (1999). "The effect of fentanyl on sevoflurane requirements for somatic and sympathetic responses to surgical incision." *Anesthesiology* 90(2): 398-405.
- Kayser, V. and G. Guilbaud (1981). "Dose-dependent analgesic and hyperalgesic effects of systemic naloxone in arthritic rats." *Brain Res* 226(1-2): 344-348.
- Keith, D. E., S. R. Murray, et al. (1996). "Morphine activates opioid receptors without causing their rapid internalization." *J Biol Chem* 271(32): 19021-19024.
- Kieffer, B. L. and C. J. Evans (2002). "Opioid tolerance-in search of the holy grail." *Cell* 108(5): 587-590.
- Kim, D. K., J. Kwak, et al. (2008). "Long-lasting enhancement in the intrinsic excitability of deep dorsal horn neurons." *Pain* 139(1): 181-189.
- Kim, J., A. Yao, et al. (2007). "Neurons in the ventral spinal cord are more depressed by isoflurane, halothane, and propofol than are neurons in the dorsal spinal cord." *Anesth Analg* 105(4): 1020-1026.
- Kimoto, M. (2011). "The effect of buprenorphine on postoperative analgesia following remifentanyl-based anesthesia." *Masui* 60(6): 656-660.
- Kimura, T., S. Watanabe, et al. (1994). "Determination of end-tidal sevoflurane concentration for tracheal intubation and minimum alveolar anesthetic concentration in adults." *Anesth Analg* 79(2): 378-381.
- King, T., L. R. Gardell, et al. (2005). "Role of NK-1 neurotransmission in opioid-induced hyperalgesia." *Pain* 116(3): 276-288.
- Kissin, I., C. A. Bright, et al. (2000). "The effect of ketamine on opioid-induced acute tolerance: can it explain reduction of opioid consumption with ketamine-opioid analgesic combinations?" *Anesth Analg* 91(6): 1483-1488.
- Koch, T. and V. Holtt (2008). "Role of receptor internalization in opioid tolerance and dependence." *Pharmacol Ther* 117(2): 199-206.
- Komatsu, R., A. M. Turan, et al. (2007). "Remifentanyl for general anaesthesia: a systematic review." *Anaesthesia* 62(12): 1266-1280.
- Koppert, W., M. Angst, et al. (2003). "Naloxone provokes similar pain facilitation as observed after short-term infusion of remifentanyl in humans." *Pain* 106(1-2): 91-99.
- Koppert, W., H. Ihmsen, et al. (2005). "Different profiles of buprenorphine-induced analgesia and antihyperalgesia in a human pain model." *Pain* 118(1-2): 15-22.
- Koppert, W., R. Sittl, et al. (2003). "Differential modulation of remifentanyl-induced analgesia and postinfusion hyperalgesia by S-ketamine and clonidine in humans." *Anesthesiology* 99(1): 152-159.
- Kosson, D., A. Klinowiecka, et al. (2008). "Intrathecal antinociceptive interaction between the NMDA antagonist ketamine and the opioids, morphine and buprenorphine." *Eur J Pain* 12(5): 611-616.
- Koyama, T., T. Mayahara, et al. (2009). "Deletion of mu-opioid receptor in mice does not affect the minimum alveolar concentration of volatile anaesthetics and nitrous oxide-induced analgesia." *Brit J Anaesth* 103(5): 744-749.
- Kucukemre, F., N. Kunt, et al. (2005). "Remifentanyl compared with morphine for postoperative patient-controlled analgesia after major abdominal surgery: a randomized controlled trial." *Eur J Anaesthesiol* 22(5): 378-385.
- Kuraishi, Y., Y. Iida, et al. (2003). "Suppression by gabapentin of pain-related mechano-responses in mice given orthotopic tumor inoculation." *Biol Pharm Bull* 26(4): 550-552.
- La Vincente, S. F., J. M. White, et al. (2008). "Enhanced buprenorphine analgesia with the addition of ultra-low-dose naloxone in healthy subjects." *Clin Pharmacol Ther* 83(1): 144-152.
- Lamont, L. A., W. J. Tranquilli, et al. (2000). "Physiology of pain." *Veterinary clinics of North America small animal practice* 30(4): 703-728.
- Lang, E., A. Kapila, et al. (1996). "Reduction of isoflurane minimal alveolar concentration

- by remifentanil." *Anesthesiology* 85(4): 721-728.
- Largent-Milnes, T. M., W. Guo, et al. (2008). "Oxycodone plus ultra-low-dose naltrexone attenuates neuropathic pain and associated mu-opioid receptor-Gs coupling." *J Pain* 9(8): 700-713.
- Laskowski, K., A. Stirling, et al. (2011). "A systematic review of intravenous ketamine for postoperative analgesia." *Can J Anaesth* 58(10): 911-923.
- Laulin, J. P., P. Maurette, et al. (2002). "The role of ketamine in preventing fentanyl-induced hyperalgesia and subsequent acute morphine tolerance." *Anesth Analg* 94(5): 1263-1269.
- Law, P. Y., Y. H. Wong, et al. (2000). "Molecular mechanisms and regulation of opioid receptor signaling." *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 40: 389-430.
- Lee, C., Y. K. Song, et al. (2011). "The effects of intraoperative adenosine infusion on acute opioid tolerance and opioid induced hyperalgesia induced by remifentanil in adult patients undergoing tonsillectomy." *Korean J Pain* 24(1): 7-12.
- Lee, L. H., M. G. Irwin, et al. (2005). "Intraoperative remifentanil infusion does not increase postoperative opioid consumption compared with 70% nitrous oxide." *Anesthesiology* 102(2): 398-402.
- Lee, M., S. M. Silverman, et al. (2011). "A comprehensive review of opioid-induced hyperalgesia." *Pain Physician* 14(2): 145-161.
- Lenz, H., J. Raeder, et al. (2011). "Effects of COX inhibition on experimental pain and hyperalgesia during and after remifentanil infusion in humans." *Pain* 152(6): 1289-1297.
- Lerman, J., N. Sikich, et al. (1994). "The pharmacology of sevoflurane in infants and children." *Anesthesiology* 80(4): 814-824.
- Levine, J. D., N. C. Gordon, et al. (1979). "Naloxone dose dependently produces analgesia and hyperalgesia in postoperative pain." *Nature* 278(5706): 740-741.
- Li, X., M. S. Angst, et al. (2001). "A murine model of opioid-induced hyperalgesia." *Brain Res Mol Brain Res* 86(1-2): 56-62.
- Li, X. and J. D. Clark (2002). "Hyperalgesia during opioid abstinence: mediation by glutamate and substance p." *Anesth Analg* 95(4): 979-984.
- Liang, D. Y., X. Li, et al. (2011). "5-hydroxytryptamine type 3 receptor modulates opioid-induced hyperalgesia and tolerance in mice." *Anesthesiology* 114(5): 1180-1189.
- Liao, M., J. M. Sonner, et al. (2005). "Beta3-containing gamma-aminobutyric acidA receptors are not major targets for the amnesic and immobilizing actions of isoflurane." *Anesth Analg* 101(2): 412-418.
- Lin, J. A., M. S. Lee, et al. (2005). "Attenuation of morphine tolerance by intrathecal gabapentin is associated with suppression of morphine-evoked excitatory amino acid release in the rat spinal cord." *Brain Res* 1054(2): 167-173.
- Lin, S. L., R. Y. Tsai, et al. (2010). "Co-administration of ultra-low dose naloxone attenuates morphine tolerance in rats via attenuation of NMDA receptor neurotransmission and suppression of neuroinflammation in the spinal cords." *Pharmacol Biochem Behav* 96(2): 236-245.
- Loram, L. C., P. M. Grace, et al. (2012). "Prior exposure to repeated morphine potentiates mechanical allodynia induced by peripheral inflammation and neuropathy." *Brain Behav Immun* 26(8): 1256-1264.
- Loss, G. E., Jr., E. Seifen, et al. (1989). "Aging: effects on minimum alveolar concentration (MAC) for halothane in Fischer-344 rats." *Anesth Analg* 68(3): 359-362.
- Low, Y., C. F. Clarke, et al. (2012). "Opioid-induced hyperalgesia: a review of epidemiology, mechanisms and management." *Singapore Med J* 53(5): 357-360.
- Luginbuhl, M., A. Gerber, et al. (2003). "Modulation of remifentanil-induced analgesia, hyperalgesia, and tolerance by small-dose ketamine in humans." *Anesth Analg* 96(3): 726-732.
- Malan, T. P., Jr., J. A. DiNardo, et al. (1995). "Cardiovascular effects of sevoflurane compared with those of isoflurane in volunteers." *Anesthesiology* 83(5): 918-928.

- Malmberg, A. B. and T. L. Yaksh (1992). "Hyperalgesia mediated by spinal glutamate or substance P receptor blocked by spinal cyclooxygenase inhibition." *Science* 257(5074): 1276-1279.
- Mantyh, P. W., S. D. Rogers, et al. (1997). "Inhibition of hyperalgesia by ablation of lamina I spinal neurons expressing the substance P receptor." *Science* 278(5336): 275-279.
- Mao, J. and D. J. Mayer (2001). "Spinal cord neuroplasticity following repeated opioid exposure and its relation to pathological pain." *Ann N Y Acad Sci* 933: 175-184.
- Mao, J., D. D. Price, et al. (1994). "Thermal hyperalgesia in association with the development of morphine tolerance in rats: roles of excitatory amino acid receptors and protein kinase C." *J Neurosci* 14(4): 2301-2312.
- Mao, J., B. Sung, et al. (2002). "Chronic morphine induces downregulation of spinal glutamate transporters: implications in morphine tolerance and abnormal pain sensitivity." *J Neurosci* 22(18): 8312-8323.
- Mapleson, W. W. (1996). "Effect of age on MAC in humans: a meta-analysis." *Br J Anaesth* 76(2): 179-185.
- Marinelli, S., C. W. Vaughan, et al. (2002). "Rostral ventromedial medulla neurons that project to the spinal cord express multiple opioid receptor phenotypes." *J Neurosci* 22(24): 10847-10855.
- Mathews, J. L., A. V. Smrcka, et al. (2008). "A novel Gbetagamma-subunit inhibitor selectively modulates mu-opioid-dependent antinociception and attenuates acute morphine-induced antinociceptive tolerance and dependence." *J Neurosci* 28(47): 12183-12189.
- Mathews, T. J., A. M. Churchhouse, et al. (2012). "Does adding ketamine to morphine patient-controlled analgesia safely improve post-thoracotomy pain?" *Interact Cardiovasc Thorac Surg* 14(2): 194-199.
- Mattioli, T. A., B. Milne, et al. (2010). "Ultra-low dose naltrexone attenuates chronic morphine-induced gliosis in rats." *Mol Pain* 6: 22.
- McEwan, A. I., C. Smith, et al. (1993). "Isoflurane minimum alveolar concentration reduction by fentanyl." *Anesthesiology* 78(5): 864-869.
- McMahon, S. B. and M. Malcangio (2009). "Current challenges in glia-pain biology." *Neuron* 64(1): 46-54.
- McNaull, B., T. Trang, et al. (2007). "Inhibition of tolerance to spinal morphine antinociception by low doses of opioid receptor antagonists." *Eur J Pharmacol* 560(2-3): 132-141.
- Mehlish, D. R. (2003). "The combination of low dose of naloxone and morphine in patient-controlled (PCA) does not decrease opioid requirements in the postoperative period." *Pain* 101(1-2): 209-211.
- Menigaux, C., D. Fletcher, et al. (2000). "The benefits of intraoperative small-dose ketamine on postoperative pain after anterior cruciate ligament repair." *Anesth Analg* 90(1): 129-135.
- Mercadante, S., P. Villari, et al. (2009). "Opioid switching and burst ketamine to improve the opioid response in patients with movement-related pain due to bone metastases." *Clin.J Pain* 25(7): 648-649.
- Merkel, G. and E. I. Eger, 2nd (1963). "A comparative study of halothane and halopropane anesthesia including method for determining equipotency." *Anesthesiology* 24: 346-357.
- Mika, J. (2008). "Modulation of microglia can attenuate neuropathic pain symptoms and enhance morphine effectiveness." *Pharmacol Rep* 60(3): 297-307.
- Mika, J., E. Rojewska, et al. (2010). "Minocycline reduces the injury-induced expression of prodynorphin and pronociceptin in the dorsal root ganglion in a rat model of neuropathic pain." *Neuroscience* 165(4): 1420-1428.
- Mika, J., A. Wawrzczak-Bargiela, et al. (2009). "Attenuation of morphine tolerance by minocycline and pentoxifylline in naive and neuropathic mice." *Brain Behav Immun* 23(1): 75-84.
- Millan, M. J. (2002). "Descending control of pain." *Prog Neurobiol* 66(6): 355-474.
- Miller, R. D., W. L. Way, et al. (1968). "The effects of alpha-methyldopa, reserpine, guanethidine, and iproniazid on minimum

- alveolar anesthetic requirement (MAC)." *Anesthesiology* 29(6): 1153-1158.
- Minville, V., O. Fourcade, et al. (2010). "Opioid-induced hyperalgesia in a mice model of orthopaedic pain: preventive effect of ketamine." *Br.J Anaesth.* 104(2): 231-238.
- Muir, W. W. (2009). *Physiology and pathophysiology of pain. Veterinary pain management.* J. S. Gaynor and W. W. Muir. St. Louis, Mosby Elsevier.
- Nichols, M. L., B. J. Allen, et al. (1999). "Transmission of chronic nociception by spinal neurons expressing the substance P receptor." *Science* 286(5444): 1558-1561.
- O'Connor, A. B. and R. H. Dworkin (2009). "Treatment of neuropathic pain: an overview of recent guidelines." *Am J Med* 122(10 Suppl): S22-S32.
- Onali, P., S. Dedoni, et al. (2010). "Direct agonist activity of tricyclic antidepressants at distinct opioid receptor subtypes." *J Pharmacol Exp Ther* 332(1): 255-265.
- Ortega-Varela, L. F., J. E. Herrera, et al. (2004). "Synergistic interaction between gabapentin and metamizol in the rat formalin test." *Proc West Pharmacol Soc* 47: 80-83.
- Ouellet, D. M. and G. M. Pollack (1997). "Pharmacodynamics and tolerance development during multiple intravenous bolus morphine administration in rats." *J Pharmacol Exp Ther* 281(2): 713-720.
- Ozdemir, E., S. GURSOY, et al. (2012). "The effects of serotonin/norepinephrine reuptake inhibitors and serotonin receptor agonist on morphine analgesia and tolerance in rats." *J Physiol Sci* 62(4): 317-323.
- Padi, S. S. and S. K. Kulkarni (2008). "Minocycline prevents the development of neuropathic pain, but not acute pain: possible anti-inflammatory and antioxidant mechanisms." *Eur J Pharmacol* 601(1-3): 79-87.
- Pajewski, T. N., C. A. DiFazio, et al. (1996). "Nitric oxide synthase inhibitors, 7-nitro indazole and nitroG-L-arginine methyl ester, dose dependently reduce the threshold for isoflurane anesthesia." *Anesthesiology* 85(5): 1111-1119.
- Pakulska, W. and E. Czarnecka (2004). "The effect of gabapentin on antinociceptive action of analgesics." *Acta Pol Pharm* 61(5): 393-400.
- Palmer, G. M., P. Pirakalathanan, et al. (2010). "A multi-centre multi-national survey of anaesthetists regarding the range of anaesthetic and surgical practices for paediatric scoliosis surgery." *Anaesth Intensive Care* 38(6): 1077-1084.
- Pandey, C. K., S. Sahay, et al. (2004). "Preemptive gabapentin decreases postoperative pain after lumbar discectomy." *Can J Anaesth* 51(10): 986-989.
- Parikh, B., J. Maliwad, et al. (2011). "Preventive analgesia: Effect of small dose of ketamine on morphine requirement after renal surgery." *J Anaesthesiol Clin Pharmacol* 27(4): 485-488.
- Patel, N. B. (2010). *Physiology of pain. Guide to pain management in low-resource settings.* A. Kopf and N. B. Patel. Seattle, IASP.
- Patel, S. S. and K. L. Goa (1996). "Sevoflurane. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and its clinical use in general anaesthesia." *Drugs* 51(4): 658-700.
- Paul, M. and D. M. Fisher (2001). "Are estimates of MAC reliable?" *Anesthesiology* 95(6): 1362-1370.
- Payne, K., E. W. Moore, et al. (2003). "Anaesthesia for day case surgery: a survey of adult clinical practice in the UK." *Eur J Anaesthesiol* 20(4): 311-324.
- Pekoe, G. M. and D. J. Smith (1982). "The involvement of opiate and monoaminergic neuronal systems in the analgesic effects of ketamine." *Pain* 12(1): 57-73.
- Peng, P. W., D. N. Wijesundera, et al. (2007). "Use of gabapentin for perioperative pain control -- a meta-analysis." *Pain Res Manag* 12(2): 85-92.
- Petersen, K. L., B. Jones, et al. (2001). "Effect of remifentanyl on pain and secondary hyperalgesia associated with the heat-capsaicin sensitization model in healthy volunteers." *Anesthesiology* 94(1): 15-20.
- Powell, K. J., N. S. Abul-Husn, et al. (2002). "Paradoxical effects of the opioid antagonist naltrexone on morphine analgesia,

- tolerance, and reward in rats." *J Pharmacol Exp Ther* 300(2): 588-596.
- Powell, K. J., A. Hosokawa, et al. (1999). "Comparative effects of cyclo-oxygenase and nitric oxide synthase inhibition on the development and reversal of spinal opioid tolerance." *Br J Pharmacol* 127(3): 631-644.
- Powell, K. J., R. Quirion, et al. (2003). "Inhibition of neurokinin-1-substance P receptor and prostanoid activity prevents and reverses the development of morphine tolerance in vivo and the morphine-induced increase in CGRP expression in cultured dorsal root ganglion neurons." *Eur J Neurosci* 18(6): 1572-1583.
- Qi, X., A. M. Evans, et al. (2010). "Inhibition of morphine metabolism by ketamine." *Drug Metab Dispos.* 38(5): 728-731.
- Quartilho, A., H. P. Mata, et al. (2004). "Production of paradoxical sensory hypersensitivity by alpha 2-adrenoreceptor agonists." *Anesthesiology* 100(6): 1538-1544.
- Quasha, A. L., E. I. Eger, et al. (1980). "Determination and applications of MAC." *Anesthesiology* 53(4): 315-334.
- Quinlan, J. J., C. Ferguson, et al. (2002). "Mice with glycine receptor subunit mutations are both sensitive and resistant to volatile anesthetics." *Anesth Analg* 95(3): 578-582.
- Radulovic, L. L., D. Turck, et al. (1995). "Disposition of gabapentin (neurontin) in mice, rats, dogs, and monkeys." *Drug Metab Dispos* 23(4): 441-448.
- Rampil, I. J. (1994). "Anesthetic potency is not altered after hypothermic spinal cord transection in rats." *Anesthesiology* 80(3): 606-610.
- Rampil, I. J., P. Mason, et al. (1993). "Anesthetic potency (MAC) is independent of forebrain structures in the rat." *Anesthesiology* 78(4): 707-712.
- Rapchuk, I. L., L. O'Connell, et al. (2010). "Effect of gabapentin on pain after cardiac surgery: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial." *Anaesth Intensive Care* 38(3): 445-451.
- Rasmussen, M. L., O. Mathiesen, et al. (2010). "Multimodal analgesia with gabapentin, ketamine and dexamethasone in combination with paracetamol and ketorolac after hip arthroplasty: a preliminary study." *Eur J Anaesthesiol* 27(4): 324-330.
- Regan, M. J. and E. I. Eger, 2nd (1967). "Effect of hypothermia in dogs on anesthetizing and apneic doses of inhalation agents. Determination of the anesthetic index (Apnea/MAC)." *Anesthesiology* 28(4): 689-700.
- Rehberg, B., Y. H. Xiao, et al. (1996). "Central nervous system sodium channels are significantly suppressed at clinical concentrations of volatile anesthetics." *Anesthesiology* 84(5): 1223-1233.
- Reid, P., B. H. Pypendop, et al. (2010). "The effects of intravenous gabapentin administration on the minimum alveolar concentration of isoflurane in cats." *Anesth Analg* 111: 633-637.
- Remerand, F., T. C. Le, et al. (2009). "The early and delayed analgesic effects of ketamine after total hip arthroplasty: a prospective, randomized, controlled, double-blind study." *Anesth. Analg.* 109(6): 1963-1971.
- Reynolds, I. J. and R. J. Miller (1988). "Tricyclic antidepressants block N-methyl-D-aspartate receptors: similarities to the action of zinc." *Br J Pharmacol* 95(1): 95-102.
- Richebe, P., A. Cahana, et al. (2012). "Tolerance and opioid-induced hyperalgesia. Is a divorce imminent?" *Pain* 153(8): 1547-1548.
- Richebe, P., C. Rivat, et al. (2005). "Ketamine improves the management of exaggerated postoperative pain observed in perioperative fentanyl-treated rats." *Anesthesiology* 102(2): 421-428.
- Roh, D. H., H. W. Kim, et al. (2008). "Intrathecal clonidine suppresses phosphorylation of the N-methyl-D-aspartate receptor NR1 subunit in spinal dorsal horn neurons of rats with neuropathic pain." *Anesth Analg* 107(2): 693-700.
- Roizen, M. F., R. W. Horrigan, et al. (1981). "Anesthetic doses blocking adrenergic (stress) and cardiovascular responses to incision--MAC BAR." *Anesthesiology* 54(5): 390-398.
- Romero, A., H. F. Miranda, et al. (2010). "Antinociceptive effects of morphine, fentanyl, tramadol and their combination, in

- morphine-tolerant mice." *Pharmacol Biochem Behav* 97(2): 363-369.
- Rorarius, M. G., S. Mennander, et al. (2004). "Gabapentin for the prevention of postoperative pain after vaginal hysterectomy." *Pain* 110(1-2): 175-181.
- Saab, C. Y., J. Wang, et al. (2007). "Microglia: a newly discovered role in visceral hypersensitivity?" *Neuron Glia Biol* 2(4): 271-277.
- Sacerdote, P., A. Brini, et al. (1987). "A role for serotonin and beta-endorphin in the analgesia induced by some tricyclic antidepressant drugs." *Pharmacol Biochem Behav* 26(1): 153-158.
- Saidman, L. J. and E. I. Eger, 2nd (1964). "Effect of nitrous oxide and of narcotic premedication on the alveolar concentration of halothane required for anesthesia." *Anesthesiology* 25: 302-306.
- Sandkuhler, J. (2009). "Models and mechanisms of hyperalgesia and allodynia." *Physiol Rev* 89(2): 707-758.
- Sandkuhler, J. and D. Gruber-Schoffnegger (2012). "Hyperalgesia by synaptic long-term potentiation (LTP): an update." *Curr Opin Pharmacol* 12(1): 18-27.
- Sarton, E., L. J. Teppema, et al. (2001). "The involvement of the mu-opioid receptor in ketamine-induced respiratory depression and antinociception." *Anesth Analg* 93(6): 1495-1500.
- Sawynok, J., A. R. Reid, et al. (1999). "Peripheral antinociceptive action of amitriptyline in the rat formalin test: involvement of adenosine." *Pain* 80(1-2): 45-55.
- Schallmach, E., D. Steiner, et al. (2006). "Adenylyl cyclase type II activity is regulated by two different mechanisms: implications for acute and chronic opioid exposure." *Neuropharmacology* 50(8): 998-1005.
- Schmid, R. L., A. N. Sandler, et al. (1999). "Use and efficacy of low-dose ketamine in the management of acute postoperative pain: a review of current techniques and outcomes." *Pain* 82(2): 111-125.
- Schraag, S., M. R. Checketts, et al. (1999). "Lack of rapid development of opioid tolerance during alfentanil and remifentanil infusions for postoperative pain." *Anesth Analg* 89(3): 753-757.
- Shen, K. F. and S. M. Crain (1997). "Ultra-low doses of naltrexone or etorphine increase morphine's antinociceptive potency and attenuate tolerance/dependence in mice." *Brain Res* 757(2): 176-190.
- Shimoyama, M., N. Shimoyama, et al. (2000). "Gabapentin affects glutamatergic excitatory neurotransmission in the rat dorsal horn." *Pain* 85(3): 405-414.
- Shimoyama, M., N. Shimoyama, et al. (1997). "Gabapentin enhances the antinociceptive effects of spinal morphine in the rat tail-flick test." *Pain* 72(3): 375-382.
- Shin, S. W., A. R. Cho, et al. (2010). "Maintenance anaesthetics during remifentanil-based anaesthesia might affect postoperative pain control after breast cancer surgery." *Br J Anaesth* 105(5): 661-667.
- Sim, L. J., D. E. Selley, et al. (1996). "Effects of chronic morphine administration on mu opioid receptor-stimulated [<sup>35</sup>S]GTPgammaS autoradiography in rat brain." *J Neurosci* 16(8): 2684-2692.
- Singler, B., A. Troster, et al. (2007). "Modulation of remifentanil-induced postinfusion hyperalgesia by propofol." *Anesth Analg* 104(6): 1397-1403.
- Smith, D. J., R. L. Bouchal, et al. (1987). "Properties of the interaction between ketamine and opiate binding sites in vivo and in vitro." *Neuropharmacology* 26(9): 1253-1260.
- Sonner, J. M. (2002). "Issues in the design and interpretation of minimum alveolar anesthetic concentration (MAC) studies." *Anesth Analg* 95(3): 609-614.
- Sonner, J. M., J. F. Antognini, et al. (2003). "Inhaled anesthetics and immobility: mechanisms, mysteries, and minimum alveolar anesthetic concentration." *Anesth Analg* 97(3): 718-740.
- Staahl, C., A. E. Olesen, et al. (2009). "Assessing efficacy of non-opioid analgesics in experimental pain models in healthy volunteers: an updated review." *Br J Clin Pharmacol* 68(3): 322-341.
- Steffey, E. P., J. D. Baggot, et al. (1994). "Morphine-isoflurane interaction in dogs,

- swine and rhesus monkeys." *J Vet Pharmacol Ther* 17(3): 202-210.
- Steffey, E. P. and E. I. Eger (1975). "The effect of seven vasopressors of halothane MAC in dogs." *Br J Anaesth* 47(4): 435-438.
- Steffey, E. P., D. Howland, Jr., et al. (1977). "Enflurane, halothane, and isoflurane potency in horses." *Am J Vet Res* 38(7): 1037-1039.
- Stevens, W. D., W. M. Dolan, et al. (1975). "Minimum alveolar concentrations (MAC) of isoflurane with and without nitrous oxide in patients of various ages." *Anesthesiology* 42(2): 197-200.
- Stoelting, R. K., D. E. Longnecker, et al. (1970). "Minimum alveolar concentrations in man on awakening from methoxyflurane, halothane, ether and fluroxene anesthesia: MAC awake." *Anesthesiology* 33(1): 5-9.
- Subramaniam, B., K. Subramaniam, et al. (2001). "Preoperative epidural ketamine in combination with morphine does not have a clinically relevant intra- and postoperative opioid-sparing effect." *Anesth Analg* 93(5): 1321-1326.
- Subramaniam, K., B. Subramaniam, et al. (2004). "Ketamine as adjuvant analgesic to opioids: a quantitative and qualitative systematic review." *Anesth Analg* 99(2): 482-495.
- Suzuki, R., S. Morcuende, et al. (2002). "Superficial NK1-expressing neurons control spinal excitability through activation of descending pathways." *Nat Neurosci* 5(12): 1319-1326.
- Suzuki, R., L. J. Rygh, et al. (2004). "Bad news from the brain: descending 5-HT pathways that control spinal pain processing." *Trends Pharmacol Sci* 25(12): 613-617.
- Tanifuji, Y. and E. I. Eger, 2nd (1976). "Effect of arterial hypotension on anaesthetic requirement in dogs." *Br J Anaesth* 48(10): 947-952.
- Tanifuji, Y. and E. I. Eger, 2nd (1978). "Brain sodium, potassium, and osmolality: effects on anesthetic requirement." *Anesth Analg* 57(4): 404-410.
- Troster, A., R. Sittl, et al. (2006). "Modulation of remifentanyl-induced analgesia and postinfusion hyperalgesia by parecoxib in humans." *Anesthesiology* 105(5): 1016-1023.
- Tsunoda, Y., Y. Hattori, et al. (1971). "Effect of diazepam on minimum alveolar concentration of halothane." *Masui* 20(4): 309-313.
- Tuerke, K. J., R. J. Beninger, et al. (2011). "Dissociable effects of ultralow-dose naltrexone on tolerance to the antinociceptive and cataleptic effects of morphine." *Behav Pharmacol* 22(5-6): 558-563.
- Turan, A., B. Karamanlioglu, et al. (2004). "The analgesic effects of gabapentin after total abdominal hysterectomy." *Anesth Analg* 98(5): 1370-1373.
- Ueda, H., M. Inoue, et al. (2003). "New approaches to study the development of morphine tolerance and dependence." *Life Sci* 74(2-3): 313-320.
- Valverde, A., T. J. Doherty, et al. (2004). "Effect of lidocaine on the minimum alveolar concentration of isoflurane in dogs." *Vet Anaesth Analg* 31(4): 264-271.
- Valverde, A., T. E. Morey, et al. (2003). "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* 64(8): 957-962.
- Van Elstraete, A. C., T. Lebrun, et al. (2004). "Ketamine does not decrease postoperative pain after remifentanyl-based anaesthesia for tonsillectomy in adults." *Acta Anaesthesiol Scand* 48(6): 756-760.
- Van Elstraete, A. C., P. Sitbon, et al. (2011). "The median effective dose of ketamine and gabapentin in opioid-induced hyperalgesia in rats: an isobolographic analysis of their interaction." *Anesth Analg* 113(3): 634-640.
- Van Elstraete, A. C., P. Sitbon, et al. (2008). "Gabapentin prevents delayed and long-lasting hyperalgesia induced by fentanyl in rats." *Anesthesiology* 108(3): 484-494.
- van Ojik, A. L., P. A. Jansen, et al. (2012). "Treatment of chronic pain in older people: evidence-based choice of strong-acting opioids." *Drugs Aging* 29(8): 615-625.
- Vanderah, T. W., M. H. Ossipov, et al. (2001). "Mechanisms of opioid-induced pain and antinociceptive tolerance: descending

- facilitation and spinal dynorphin." *Pain* 92(1-2): 5-9.
- Vanderah, T. W., N. M. Suenaga, et al. (2001). "Tonic descending facilitation from the rostral ventromedial medulla mediates opioid-induced abnormal pain and antinociceptive tolerance." *J Neurosci* 21(1): 279-286.
- Varga, E. V., H. I. Yamamura, et al. (2003). "Molecular mechanisms of excitatory signaling upon chronic opioid agonist treatment." *Life Sci* 74(2-3): 299-311.
- Vera-Portocarrero, L. P., E. T. Zhang, et al. (2007). "Spinal NK-1 receptor expressing neurons mediate opioid-induced hyperalgesia and antinociceptive tolerance via activation of descending pathways." *Pain* 129(1-2): 35-45.
- Villiger, J. W. and K. M. Taylor (1981). "Buprenorphine : characteristics of binding sites in the rat central nervous system." *Life Sci* 29(26): 2699-2708.
- Vinik, H. R. and I. Kissin (1998). "Rapid development of tolerance to analgesia during remifentanil infusion in humans." *Anesth Analg* 86(6): 1307-1311.
- Vinik, H. R. and I. Kissin (1998). "Rapid development of tolerance to analgesia during remifentanil infusion in humans." *Anesth Analg* 86(6): 1307-1311.
- Visser, E. and S. A. Schug (2006). "The role of ketamine in pain management." *Biomed Pharmacother* 60(7): 341-348.
- Vitez, T. S., W. L. Way, et al. (1973). "Effects of delta-9-tetrahydrocannabinol on cyclopropane MAC in the rat." *Anesthesiology* 38(6): 525-527.
- Vitez, T. S., P. F. White, et al. (1974). "Effects of hypothermia on halothane MAC and isoflurane MAC in the rat." *Anesthesiology* 41(1): 80-81.
- Wadhwa, A., J. Durrani, et al. (2003). "Women have the same desflurane minimum alveolar concentration as men: a prospective study." *Anesthesiology* 99(5): 1062-1065.
- Waizer, P. R., S. Baez, et al. (1973). "A method for determining minimum alveolar concentration of anesthetic in the rat." *Anesthesiology* 39(4): 394-397.
- Wang, H. Y. and L. H. Burns (2009). "Naloxone's pentapeptide binding site on filamin A blocks Mu opioid receptor-Gs coupling and CREB activation of acute morphine." *PLoS One* 4(1): e4282.
- Wang, H. Y., M. Frankfurt, et al. (2008). "High-affinity naloxone binding to filamin A prevents mu opioid receptor-Gs coupling underlying opioid tolerance and dependence." *PLoS One* 3(2): e1554.
- Wang, H. Y., E. Friedman, et al. (2005). "Ultra-low-dose naloxone suppresses opioid tolerance, dependence and associated changes in mu opioid receptor-G protein coupling and Gbetagamma signaling." *Neuroscience* 135(1): 247-261.
- Webster, L. R. (2007). "Oxytrex: an oxycodone and ultra-low-dose naltrexone formulation." *Expert Opin Investig Drugs* 16(8): 1277-1283.
- Webster, L. R., P. G. Butera, et al. (2006). "Oxytrex minimizes physical dependence while providing effective analgesia: a randomized controlled trial in low back pain." *J Pain* 7(12): 937-946.
- Wei, X. and W. Wei (2012). "Role of gabapentin in preventing fentanyl- and morphine-withdrawal-induced hyperalgesia in rats." *J Anesth* 26(2): 236-241.
- Whistler, J. L., H. H. Chuang, et al. (1999). "Functional dissociation of mu opioid receptor signaling and endocytosis: implications for the biology of opiate tolerance and addiction." *Neuron* 23(4): 737-746.
- Whistler, J. L., J. Enquist, et al. (2002). "Modulation of postendocytic sorting of G protein-coupled receptors." *Science* 297(5581): 615-620.
- Wong, C. S., M. M. Hsu, et al. (2000). "Intrathecal cyclooxygenase inhibitor administration attenuates morphine antinociceptive tolerance in rats." *Br J Anaesth* 85(5): 747-751.
- Wong, C. S., M. M. Hsu, et al. (2000). "Morphine tolerance increases [3H]MK-801 binding affinity and constitutive neuronal nitric oxide synthase expression in rat spinal cord." *Br J Anaesth* 85(4): 587-591.
- Woolf, C. J. (1980). "Analgesia and hyperalgesia produced in the rat by

- intrathecal naloxone." *Brain Res* 189(2): 593-597.
- Yaksh, T. L. and A. B. Malmberg (1993). "Spinal actions of NSAIDs in blocking spinally mediated hyperalgesia: the role of cyclooxygenase products." *Agents Actions Suppl* 41: 89-100.
- Yamamura, T., K. Harada, et al. (1990). "Is the site of action of ketamine anesthesia the N-methyl-D-aspartate receptor?" *Anesthesiology* 72(4): 704-710.
- Yang, J., Y. F. Chai, et al. (2009). "Further proof that the spinal cord, and not the brain, mediates the immobility produced by inhaled anesthetics." *Anesthesiology* 110(3): 591-595.
- Zhang, Y., M. J. Laster, et al. (2003). "Blockade of 5-HT<sub>2A</sub> receptors may mediate or modulate part of the immobility produced by inhaled anesthetics." *Anesth Analg* 97(2): 475-479.
- Zhang, Y., M. J. Laster, et al. (2003). "Glycine receptors mediate part of the immobility produced by inhaled anesthetics." *Anesth Analg* 96(1): 97-101.
- Zhang, Y., M. Sharma, et al. (2008). "Intrathecal veratridine administration increases minimum alveolar concentration in rats." *Anesth Analg* 107(3): 875-878.
- Zhao, J., Y. Zhang, et al. (2008). "Intrathecal glycine significantly decreases the minimum alveolar concentration of isoflurane in rats." *Chin Med Sci J* 23(1): 16-18.
- Zhao, M. and D. T. Joo (2008). "Enhancement of spinal N-methyl-D-aspartate receptor function by remifentanyl action at delta-opioid receptors as a mechanism for acute opioid-induced hyperalgesia or tolerance." *Anesthesiology* 109(2): 308-317.



**PUBLICACIONES Y  
TRABAJOS EN  
FASE DE REVISIÓN**



**Artículo 1**

Gómez de Segura IA, de la Vibora JB, Aguado D.

Opioid tolerance blunts the reduction in the sevoflurane minimum alveolar concentration produced by remifentanil in the rat.

Anesthesiology. 2009 May;110(5):1133-8.

**Artículo 2**

Aguado D., Abreu M, Benito J, García-Fernández J, Gómez de Segura IA.

Ketamine and remifentanil interactions on the sevoflurane minimum alveolar concentration and acute opioid tolerance in the rat.

Anesth Analg. 2011 Sep;113(3):505-12.

**Artículo 3**

Aguado D., Abreu M, Benito J, Garcia-Fernandez J, Gómez de Segura IA.

The effects of gabapentin on acute opioid tolerance to remifentanil under sevoflurane anesthesia in rats.

Anesth Analg. 2012 Jul;115(1):40-5.

**Artículo 4**

Aguado D., Abreu M, Benito J, Garcia-Fernandez J, Gómez de Segura IA

Amitriptyline, minocycline and maropitant effects on the sevoflurane minimum alveolar concentration and remifentanil acute tolerance in the rat

Enviado a Brit J Anaesth.

**Artículo 5**

Aguado D., Abreu M, Benito J, Garcia-Fernandez J, Gómez de Segura IA

Effects of naloxone on opioid-induced hyperalgesia and tolerance to remifentanil under sevoflurane anesthesia in rats

Bajo revisión en Anesthesiology.



# Opioid Tolerance Blunts the Reduction in the Sevoflurane Minimum Alveolar Concentration Produced by Remifentanil in the Rat

Ignacio A. Gómez de Segura, D.V.M.,\* Javier Benito de la Vibora, D.V.M.,† Delia Aguado, D.V.M.‡

**Background:** Acute opioid tolerance is a known entity leading to reduced analgesic efficacy of these drugs in the postoperative period. However, the development of acute opioid tolerance in the very short term, *i.e.*, during the intraoperative period when opioids are being administered, has not been reported. Therefore, the aim of this study was to determine if acute opioid tolerance could develop and limit the opioid-induced reduction in the minimum alveolar concentration (MAC) for inhalant anesthetics.

**Methods:** Male Wistar rats were randomly allocated to receive two doses of remifentanil (120 and 240  $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ) under sevoflurane anesthesia, and the sevoflurane MAC was determined before and at two time intervals afterwards. In a second experiment, the low dose of remifentanil was increased once an acute opioid tolerance effect was observed. The sevoflurane MAC was determined from alveolar gas samples at the time of tail clamp.

**Results:** A remifentanil constant rate of infusion dose-dependently reduced the sevoflurane MAC from 2.4 to  $1.8 \pm 0.2$  vol% and from  $2.3 \pm 0.3$  vol% to  $1.5 \pm 0.3$  vol%, at the low and high doses, respectively. However, 90 min later, when the sevoflurane MAC was redetermined, the observed reduction was blunted to nearly 50% of the previous sevoflurane MAC values. When this acute opioid tolerance effect was observed with the low dose, the sevoflurane MAC reduction originally achieved could be reattained by doubling the dose; *i.e.*, giving the high dose.

**Conclusions:** Remifentanil efficacy in reducing the sevoflurane MAC diminishes within a short term, suggesting that increased opioid doses may be required to maintain intraoperative analgesia during sevoflurane anesthesia.

REMIFENTANIL is a potent short-acting opioid characterized by a rapid recovery despite the dose or time of infusion and, therefore, additional opioids are commonly given before discontinuing a remifentanil infusion to prevent pain in the postoperative period. However, there is evidence indicating that the dose required to prevent pain postoperatively is higher than expected, and this has been associated with acute opioid tolerance and opioid-induced hyperalgesia.<sup>1</sup>

Opioid tolerance after the administration of drugs such as morphine has been known for many years.<sup>2</sup> After the

introduction of remifentanil in perioperative use, several reports have emphasized the potential for acute opioid tolerance and opioid-induced hyperalgesia in the postoperative period, characterized by increased postoperative pain and morphine consumption.<sup>3</sup> Acute opioid tolerance has been widely documented in animals for almost 40 yr<sup>4,5</sup> and has also recently been associated with the administration of short-acting and relatively high opioid doses to rats.<sup>6-9</sup>

Studies performed in human volunteers showed the development of acute opioid tolerance to the analgesic action of remifentanil only a few hours after the initiation of its administration *via* continuous infusion, suggesting a need to recalculate the dose administered postoperatively.<sup>10-13</sup> However, a lack of a tolerance effect to remifentanil has been reported, mostly in surgical patients in the postoperative period.<sup>14-17</sup>

Surprisingly, there are no studies that actually determine if acute opioid-induced tolerance or opioid induced hyperalgesia do occur over the very short term during the intraoperative period, limiting the intraoperative analgesic efficacy of opioids. Since studies in volunteers have observed the appearance of acute opioid tolerance within only 60 to 90 min after initiating a remifentanil infusion,<sup>13</sup> it has been suggested that intraoperative analgesia levels may decrease afterwards, and this reduction could become clinically relevant in longer surgeries.

An indirect, although clinically valuable method to determine the analgesic potency of opioids in the intraoperative period is the determination of the minimum alveolar concentration (MAC) of an inhalant anesthetic. We hypothesized that the decrease in the effectiveness of remifentanil-induced reduction in the sevoflurane MAC could occur within a relatively short time; *i.e.*, the onset of acute tolerance to remifentanil might occur before surgery is finished.

## Materials and Methods

After obtaining Institutional Animal Care Committee approval (Madrid, Spain), the reduction in the sevoflurane MAC in response to remifentanil given in continuous infusion was evaluated in rats. Sevoflurane was obtained from Abbott (Sevorane; Abbott Laboratories, Madrid, Spain), and remifentanil from Glaxo-Wellcome (Ultiva; Glaxo-Wellcome Laboratories, Madrid, Spain).

Fifty-two male Wistar rats (Charles River Laboratories, Barcelona, Spain) with an average weight of 391 g (SD,

\* Professor, ‡ Research Fellow, Department of Animal Medicine and Surgery, Universidad Complutense, Madrid, Spain. † ECLAM Resident, Department of Experimental Surgery, La Paz University Hospital, Madrid, Spain.

Received from the Department of Animal Medicine and Surgery, Universidad Complutense, Madrid, Spain. Submitted for publication August 5, 2008. Accepted for publication December 18, 2008. Supported by Projects FIS PI050441 and PI080422 from the Fondo de Investigaciones Sanitarias, Spanish Health Ministry, Madrid, Spain. Presented at Euroanesthesia 2008, Copenhagen, Denmark, May 31, 2008.

Address correspondence to Dr. Gómez de Segura: Department of Animal Medicine and Surgery, Universidad Complutense de Madrid, Avda. Puerta de Hierro s/n, 28040 Madrid, Spain. iagsegura@vet.ucm.es. Information on purchasing reprints may be found at [www.anesthesiology.org](http://www.anesthesiology.org) or on the masthead page at the beginning of this issue. ANESTHESIOLOGY's articles are made freely accessible to all readers, for personal use only, 6 months from the cover date of the issue.

# Ketamine and Remifentanil Interactions on the Sevoflurane Minimum Alveolar Concentration and Acute Opioid Tolerance in the Rat

Delia Aguado, DVM,\* Mariana Abreu, DVM,\* Javier Benito, DVM,† Javier García-Fernández, MD, PhD,‡ and Ignacio A. Gómez de Segura, DVM, PhD, DECLAM, DECVA\*

**BACKGROUND:** Ketamine is used at low doses for its analgesic and antihyperalgesic properties when combined with opioids but also when opioid-induced hyperalgesia and tolerance appear. In this study we determined the interaction of ketamine and remifentanil on the minimum alveolar concentration (MAC) of sevoflurane in rats and to determine whether ketamine may block acute opioid tolerance (AOT).

**METHODS:** Male Wistar rats were anesthetized with sevoflurane, and the MAC was determined before and after ketamine administration (10, 20, 40, and 80 mg kg<sup>-1</sup> or saline) alone or combined with remifentanil (120 and 240 µg kg<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>, low and high doses, respectively). One additional group received the lowest ketamine dose after starting a remifentanil infusion. Finally, naloxone was administered to determine the potential action of ketamine on opioid receptors. MAC was determined from intratracheal gas samples, and tail clamping was used as a supramaximal stimulus. End-tidal anesthetic concentrations were assayed using a side stream gas analyzer. Statistical analysis was performed with an analysis of variance.

**RESULTS:** Ketamine and remifentanil dose-dependently reduced the MAC. Adding the low dose of remifentanil to ketamine did not improve the MAC reduction, whereas the high dose of remifentanil enhanced ketamine reduction in a subadditive fashion. Nevertheless, ketamine was unable to block the development of AOT to remifentanil at either dose. Finally, naloxone blocked the MAC reduction produced by ketamine.

**CONCLUSIONS:** A subadditive effect between ketamine and remifentanil was found on the sevoflurane MAC reduction rats. In addition, ketamine was unable to block AOT. The clinical relevance of these findings should be elucidated in future studies to reduce anesthetic requirements. (Anesth Analg 2011;113:505–12)

Ketamine is an *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) antagonist<sup>1</sup> with anesthetic properties, but it is also associated with clinically relevant adverse effects that have limited its use.<sup>2</sup> Therefore, ketamine is used at lower doses for its analgesic<sup>3</sup> and for its antihyperalgesic properties.<sup>4,5</sup> Intraoperative use of low doses of ketamine improve postoperative pain relief and decrease morphine requirements during the first 24 hours. These results are obtained whether ketamine is administered via an epidural catheter or systemically, but it is preferably given at a constant rate of infusion.<sup>3,6–9</sup> Despite the strong evidence-based improvement in pain therapy and reduction in opioid requirements produced by ketamine,<sup>10–14</sup> a lack of improved postoperative analgesia has also been reported.<sup>15</sup>

Besides the antioioid-induced hyperalgesia action of ketamine, this drug has been used for its antitolerance action.<sup>5,8,16–18</sup> Therefore, because acute opioid tolerance may develop during anesthesia,<sup>19–21</sup> ketamine might be useful to limit or prevent it.<sup>22,23</sup>

A method to determine the relative analgesic potency of analgesic drugs used in the intraoperative period is the determination of the reduction in the minimum alveolar concentration (MAC) of inhalation anesthetics.<sup>24</sup> We hypothesized that the MAC reduction by ketamine and remifentanil would be additive or synergistic but also that ketamine, in combination with opioids, would block AOT. Therefore, the purpose of this study was to determine the effect of ketamine, administered alone or in combination with remifentanil, on the sevoflurane MAC (MAC<sub>SEV</sub>) in rats and to determine whether ketamine may blunt or prevent AOT.

## METHODS

After obtaining the approval of the Institutional Animal Care Committee (La Paz University Hospital, Madrid, Spain), the reduction of MAC<sub>SEV</sub> in response to ketamine and remifentanil was evaluated in rats. Sevoflurane was obtained from Abbott (Sevorane; Abbott Laboratories, Madrid, Spain), ketamine from Parke-Davis (Ketolar 500; Parke-Davis-Pfizer, Madrid, Spain), remifentanil from Glaxo-Wellcome (Ultiva; Glaxo-Wellcome Laboratories, Madrid, Spain), and naloxone from Sigma-Aldrich (naloxone hydrochloride dehydrate; Sigma-Aldrich, St. Quentin Fallavier, France).

From the \*Department of Animal Medicine and Surgery, Veterinary Faculty, Complutense University of Madrid, Madrid, Spain; †Comparative Pain Research Laboratory, Department of Clinical Sciences, College of Veterinary Medicine, North Carolina State University, Raleigh; ‡Department of Pediatric Anesthesiology, La Paz University Hospital, Madrid, Spain.

Accepted for publication May 12, 2011.

Funding: This work was supported by a grant from the Fondo de Investigaciones Sanitarias, Spanish Health Ministry, grant number FIS 08/0422.

The authors declare no conflicts of interest.

Reprints will not be available from the authors.

Address correspondence to Ignacio Álvarez Gómez de Segura, DVM, PhD, DECLAM, DECVA, Department of Animal Medicine and Surgery, Veterinary Faculty, Complutense University of Madrid, Avda, Puerta de Hierro s/n, 28040 Madrid, Spain. Address e-mail to iagsegura@vet.ucm.es.

Copyright © 2011 International Anesthesia Research Society

DOI: 10.1213/ANE.0b013e318227517a

# The Effects of Gabapentin on Acute Opioid Tolerance to Remifentanil Under Sevoflurane Anesthesia in Rats

Delia Aguado, DVM,\*† Mariana Abreu, DVM,\*† Javier Benito, DVM,‡  
Javier Garcia-Fernandez, MD, PhD,§ and Ignacio A. Gómez de Segura, DVM, PhD, DECLAM, DECVAA\*

**BACKGROUND:** Tolerance to remifentanil during sevoflurane anesthesia may blunt the ability of this drug to reduce anesthetic requirements. Gabapentin has been shown to be effective in reducing postoperative narcotic usage, a reduction that may be associated with a reduction in opioid-induced tolerance and hyperalgesia. We sought to determine whether gabapentin might prevent the observed acute opioid tolerance (AOT) produced by remifentanil in sevoflurane minimum alveolar concentration (MAC).

**METHODS:** Wistar rats were anesthetized with sevoflurane and the effects of gabapentin alone on sevoflurane MAC were determined at doses of 150 and 300 mg · kg<sup>-1</sup>. In a second experiment, gabapentin 300 mg · kg<sup>-1</sup> was administered before remifentanil (120 and 240 μg · kg<sup>-1</sup> · h<sup>-1</sup>). The MAC was determined before gabapentin administration and 3 more times at 1.5-hour intervals after drug administration to assess AOT. MAC was determined from intratracheal gas samples using a sidestream gas analyzer; tail clamping was used as a supramaximal stimulus. Statistical analysis was performed with the 1-way analysis of variance test.

**RESULTS:** Remifentanil reduced MAC (2.5% ± 0.2%) by 16% ± 5% and 36% ± 6% (120 and 240 μg · kg<sup>-1</sup> · h<sup>-1</sup>, respectively, *P* < 0.01) with a further reduction produced by coadministration with gabapentin 300 mg · kg<sup>-1</sup> to 39% ± 12% and 62% ± 14%, respectively (*P* < 0.01 versus remifentanil alone). Gabapentin given alone at 150 and 300 mg · kg<sup>-1</sup> reduced MAC by 26% (both doses, *P* < 0.01). AOT was observed with remifentanil and characterized by a lower degree of MAC reduction, approximately 1.5 hours later (*P* < 0.05). However, when remifentanil was administered with gabapentin, the AOT to remifentanil was not observed (*P* > 0.05).

**CONCLUSIONS:** Gabapentin reduced the sevoflurane MAC and enhanced the MAC reduction produced by remifentanil. This enhancement may limit AOT in rats. (Anesth Analg 2012;115:40–5)

Remifentanil is a potent opioid analgesic used during the perioperative and critical care period<sup>1</sup> for its favorable pharmacokinetic characteristics, including the rapid and predictable onset and offset of the analgesic effect. However, evidence suggests that opioid analgesic effectiveness may be limited by tolerance and opioid-induced hyperalgesia,<sup>2</sup> leading to increased postoperative pain and morphine consumption.<sup>3</sup> Studies performed in volunteers showed an early (3 hours) development of acute opioid tolerance (AOT) to the analgesic action of remifentanil.<sup>4</sup> However, a lack of tolerance to remifentanil has also been reported.<sup>5</sup> A recent study in rats showed that AOT blunted the sevoflurane minimum alveolar concentration

(MAC) reduction produced by remifentanil,<sup>6</sup> suggesting a perioperative decrease in analgesic efficacy.

Gabapentin, frequently used as an antiepileptic drug, is also used in the treatment of neuropathic pain,<sup>7</sup> perioperative pain management,<sup>8</sup> and opioid-induced hyperalgesia.<sup>9</sup> Gabapentin has also been shown to inhibit the development of morphine tolerance.<sup>10–12</sup> There is little information describing the potential interactions among gabapentin, inhaled anesthetics, and opioids. Therefore, we hypothesized that gabapentin might prevent AOT to remifentanil during inhaled anesthesia in terms of MAC reduction. Our aim was to determine whether gabapentin might prevent the observed AOT produced by remifentanil in the sevoflurane MAC.

## METHODS

After obtaining approval from the Institutional Animal Care Committee (La Paz University Hospital, Madrid, Spain), the reduction of the sevoflurane MAC in response to gabapentin and remifentanil was evaluated in rats. Sevoflurane was obtained from Abbott (Sevorane; Madrid, Spain); gabapentin was obtained from Pharmagenus (Gabapentina; Uriach Group, Barcelona, Spain); and remifentanil was obtained from Glaxo-Wellcome (Ultiva; Madrid, Spain).

Forty-two adult male Wistar rats (Charles River Laboratories, Barcelona, Spain) weighing 331 ± 42 g were housed in groups of 4 to 6 animals per cage (Macrolon type

Author affiliations are provided at the end of the article.

Accepted for publication February 24, 2012.

Supported by a grant from the Fondo de Investigaciones Sanitarias, Spanish Health Ministry, grant FIS 08/0422.

The authors declare no conflicts of interest.

This report was previously presented, in part, at Euroanaesthesia 2011: The European Anaesthesiology Congress, Amsterdam, The Netherlands, June 11–14, 2011.

Reprints will not be available from the authors.

Address correspondence to Ignacio A. Gómez de Segura, DVM, PhD, DECLAM, DECVAA, Department of Animal Medicine and Surgery, Veterinary Faculty, Complutense University of Madrid, Avda. Puerta de Hierro s/n, 28040 Madrid, Spain. Address e-mail to iagsegura@vet.ucm.es.

Copyright © 2012 International Anesthesia Research Society

DOI: 10.1213/ANE.0b013e3182542727



**Amitriptyline, minocycline and maropitant effects on the sevoflurane minimum alveolar concentration and remifentanil acute tolerance in the rat**

Journal:	<i>British Journal of Anaesthesia</i>
Manuscript ID:	BJA-2012-00749
Manuscript Type:	Laboratory Investigation
Date Submitted by the Author:	07-Aug-2012
Complete List of Authors:	Aguado, Delia; University Complutense, Animal Medicine and Surgery; La Paz University Hospital, Experimental Surgery Abreu, Mariana; University Complutense, Animal Medicine and Surgery; La Paz University Hospital, Experimental Surgery Benito, Javier; North Carolina State University, Clinical Sciences Garcia-Fernandez, Javier; La Paz University Hospital, Pediatric Anaesthesiology Gomez de Segura, Ignacio; University Complutense, Animal Medicine and Surgery
Key Words:	Anaesthetics volatile - sevoflurane, Analgesics non-opioid, Analgesics opioid - remifentanil, Model - rat, Potency - anaesthetic - MAC

## **Amitriptyline, minocycline and maropitant effects on the sevoflurane minimum alveolar concentration and remifentanil acute tolerance in the rat**

*Delia Aguado D.V.M. \*\*, Mariana Abreu Ph.D., D.V.M. \*\*, Javier Benito D.V.M. \*†, Javier García-Fernández Ph.D., M.D. ‡, Ignacio A Gómez de Segura Ph.D., D.V.M.\**

\* Dept. of Animal Medicine and Surgery, Veterinary Faculty, Complutense University of Madrid (UCM). Madrid, Spain.

† Comparative Pain Research Laboratory, Dept. of Clinical Sciences, College of Veterinary Medicine, North Carolina State University (NCSU), Raleigh, NC, USA.

\* Dept. of Experimental Surgery, La Paz University Hospital, Madrid. Spain.

‡ Dept. of Anaesthesiology and Critical Care, Puerta de Hierro University Hospital, Madrid, Spain.

### **Corresponding author:**

Dr. Ignacio A. Gómez de Segura.

Dept. of Animal Medicine and Surgery. Veterinary Faculty. Complutense University of Madrid (UCM).

Avda. Puerta de Hierro s/n. 28040 Madrid. Spain.

Tel.: +34 913 943 858 Fax: +34 913 943 808

E-mail: iagsegura@vet.ucm.es

**Running head:** Amitriptyline, minocycline and maropitant on MAC

**Summary Statement:** Amitriptyline, minocycline and maropitant reduced the sevoflurane MAC and potentiated the remifentanil MAC reduction. However, these drugs failed to block acute opioid tolerance.

# Anesthesiology

## Effects of Naloxone on Opioid-induced Hyperalgesia and Tolerance to Remifentanil under Sevoflurane Anesthesia in Rats

--Manuscript Draft--

<b>Manuscript Number:</b>	ALN201207098R1
<b>Full Title:</b>	Effects of Naloxone on Opioid-induced Hyperalgesia and Tolerance to Remifentanil under Sevoflurane Anesthesia in Rats
<b>Article Type:</b>	Perioperative Medicine
<b>Corresponding Author:</b>	Ignacio Alvarez Gómez de Segura, D.V.M. University Complutense Madrid, SPAIN
<b>Corresponding Author Secondary Information:</b>	
<b>Corresponding Author's Institution:</b>	University Complutense
<b>Corresponding Author's Secondary Institution:</b>	
<b>First Author:</b>	Delia Aguado, D.V.M.
<b>First Author Secondary Information:</b>	
<b>Order of Authors:</b>	Delia Aguado, D.V.M. Mariana Abreu, D.V.M. Javier Benito, D.V.M. Javier García-Fernández, M.D. Ignacio Alvarez Gómez de Segura, D.V.M.
<b>Order of Authors Secondary Information:</b>	
<b>Abstract:</b>	<p>Background: Opioid antagonists at ultra-low doses have been used with opioid agonists to prevent or limit opioid tolerance. The aim was to evaluate if an ultra-low dose of naloxone combined with remifentanil could block opioid-induced hyperalgesia and tolerance under sevoflurane anesthesia in rats.</p> <p>Methods: Male adult Wistar rats were allocated into one of four treatment groups, receiving a constant rate infusion of remifentanil (4 µg kg<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup>) combined with naloxone (0.17 ng kg<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup>), remifentanil alone (same dose), naloxone alone (same dose) or saline. Animals were evaluated for mechanical nociceptive thresholds (MNT) using von Frey filaments and subsequently anaesthetized with sevoflurane to determine the minimum alveolar concentration (MAC; baseline). Next, treatments were administered, and the MAC was re-determined twice during the infusion. The experiment was performed three times on non-consecutive days (days 0, 2 and 4). Hyperalgesia was considered to be a decrease in MNT, whereas opioid tolerance was considered to be a decrease in sevoflurane MAC reduction by remifentanil.</p> <p>Results: Remifentanil produced a significant decrease in MNT compared to baseline values at days 2 and 4 (p=0.02 and p=0.00, respectively) and an increase in MAC baseline values (p=0.00 vs. control group, both days). Both effects were blocked by naloxone coadministration. However, both remifentanil-treated groups (with or without naloxone) developed opioid tolerance determined by their decrease in MAC reduction.</p> <p>Conclusions: An ultra-low dose of naloxone blocked remifentanil-induced hyperalgesia but did not change opioid tolerance under inhalant anesthesia. Moreover, the MAC increase associated with hyperalgesia was also blocked by naloxone.</p>