



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTINOCICEPTIVO DEL
PIRITINOL EN COMBINACIÓN CON GABAPENTINA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

P R E S E N T A

LAURA ITZEL PACHECO PUENTE



MÉXICO, D.F.

2008.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar agradezco a la vida misma porque cada día me ofrece la oportunidad de ser una mejor persona.

Gracias a La Máxima Casa de Estudios por abrirme sus puertas en Ciudad Universitaria. Porque además de formar una profesionista, mi estancia en esta gran institución fomentó mi acercamiento con las actividades culturales.

Agradezco también a la siempre querida Facultad de Química, maestros y compañeros, porque la mejor parte de mi vida la pasé aquí y logré cumplir un objetivo. Sólo me resta continuar dejando muy en alto el nombre de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Mi entero agradecimiento a la Dra. Myrna Déciga Campos, porque más allá del grado académico es una persona a quien admiro mucho. Gracias por permitirme aprender tantas cosas de ti; por guiarme en todo momento y desarrollar con éxito este proyecto. Fue un honor trabajar bajo tu dirección y asesoría.

Gracias al INER y todo su personal por darme la grandiosa oportunidad de trabajar en mi proyecto de tesis.

A mi Jurado por tomarse el tiempo de revisar mi escrito.

¡México, Pumas, Universidad!



ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE.....	I
ÍNDICE DE FIGURAS.....	II
ÍNDICE DE TABLAS.....	III
ABREVIATURAS.....	IV
RESUMEN.....	1
1. FUNDAMENTO TEÓRICO.....	2
1.1. Definición de dolor.....	2
1.2. Definición de nocicepción.....	3
1.3. Mediadores que participan en la nocicepción.....	7
1.4. Tratamiento del dolor.....	8
1.4.1. AAINÉ's.....	8
1.4.2. Opioides.....	9
1.4.3. Adyuvantes.....	10
1.5. Gabapentina.....	14
1.5.1. Efectos farmacológicos de la gabapentina.....	17
1.5.2. Farmacodinamia.....	18
1.5.3. Farmacocinética.....	19
1.6. Piritinol.....	19
1.6.1. Farmacocinética y Farmacodinamia.....	20
1.7. Especies reactivas de oxígeno.....	21
1.8. Evaluación de combinaciones mediante el método isoblográfico.....	22
1.9. Prueba de la formalina.....	23
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	25
3. HIPÓTESIS.....	26
4. OBJETIVOS.....	26
4.1. Objetivos específicos.....	26
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	27
5.1. Material biológico.....	27
5.1.1. Fármacos y reactivos.....	27
5.1.1.1. Administración de fármacos.....	27
5.2. Métodos.....	28
5.2.1. Prueba de la formalina.....	28
5.2.2. Construcción de isobogramas.....	29
5.3. Diseño experimental.....	30
6. ANÁLISIS DE DATOS Y ESTADÍSTICA.....	32
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	34
7.1. Efecto de la administración de formalina (1%) en rata.....	34
7.2. Evaluación del efecto antinociceptivo de gabapentina.....	36
7.3. Evaluación del efecto del piritinol en la prueba de la formalina.....	37
7.4. Evaluación del efecto antinociceptivo de la combinación de gabapentina con piritinol.....	39
8. CONCLUSIONES.....	48
9. PERSPECTIVAS.....	49
10. BIBLIOGRAFÍA.....	50



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Clasificación de los tipos de dolor.....	4
Figura 2	Mecanismo del proceso nociceptivo.....	6
Figura 3.	Estructura química de GABA y gabapentina.....	14
Figura 4.	Esquema del receptor GABA _A y sus sitios de unión.....	15
Figura 5.	Estructura química de la Vitamina B6 y del piritinol.....	20
Figura 6.	Isoblograma de la combinación de dos fármacos.....	23
Figura 7.	Fotografía que muestra el período de ambientación en el modelo de la formalina.....	28
Figura 8.	Diagrama del diseño experimental.....	31
Figura 9.	Efecto nociceptivo en la prueba de la formalina.....	34
Figura 10.	Efecto antinociceptivo del diclofenaco en la prueba de la formalina.....	35
Figura 11.	Efecto antinociceptivo de la gabapentina en la prueba de la formalina.....	36
Figura 12.	Efecto antinociceptivo del piritinol en la prueba de la formalina....	38
Figura 13.	Efecto antinociceptivo de la combinación de gabapentina con piritinol (0.67:0.33) en la prueba de la formalina.....	42
Figura 14.	Efecto antinociceptivo de la combinación de gabapentina con piritinol (0.5:0.5) en la prueba de la formalina.....	43
Figura 15.	Isoblograma de la combinación de gabapentina con piritinol (0.67:0.33).....	44
Figura 16.	Isoblograma de la combinación de gabapentina con piritinol (0.5:0.5).....	45
Figura 17.	Efecto antinociceptivo de la combinación de gabapentina (10 y 1 mg/Kg) con piritinol (1 y 10 mg/Kg) en la prueba de la formalina...	46
Figura 18.	Efecto antinociceptivo de la combinación de gabapentina (10 y 1 mg/Kg) con piritinol (1 y 10 mg/Kg) en la prueba de la formalina...	47

**ÍNDICE DE TABLAS**

Tabla 1.	Fármacos comúnmente utilizados en el tratamiento del dolor; analgésicos clásicos y nuevos adyuvantes.....	11
Tabla 2.	Características de los receptores del GABA.....	16
Tabla 3.	Efecto antinociceptivo de gabapentina en la prueba de la formalina.....	39
Tabla 4.	Efecto antinociceptivo de piritinol en la prueba de la formalina.....	39
Tabla 5.	Dosis de la combinación de gabapentina con piritinol (0.67:0.33) para la construcción del isoblograma.....	40
Tabla 6.	Dosis de la combinación de gabapentina con piritinol (0.5:0.5) para la construcción del isoblograma.....	40

**ABREVIATURAS**

AAINE's	Analgésicos anti-inflamatorios no esteroideos
ABC	Área bajo la curva
ADP	Adenosín difosfato
ATP	Adenosín trifosfato
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
ANOVA	Análisis de varianza
C _{máx}	Concentración máxima
CGRP	Péptido relacionado al gen de la calcitocina
Cl ⁻	Cloro
CMC	Carboximetilcelulosa
COX-1	Ciclooxigenasa-1
COX-2	Ciclooxigenasa-2
DE ₅₀	Dosis efectiva 50
e.e	Error estándar
GABA	Ácido γ -amonobutírico
GMPc	Guanosín monofostato cíclico
GRD	Ganglio de la raíz dorsal
H ⁺	Protones
IASP	Asociación Internacional para el Estudio del Dolor.
i.p.	Via intraperitoneal
NMDA	Ácido <i>N</i> -metil- <i>D</i> -aspártico
ON	Óxido nítrico
PKA	Proteína cinasa A
PKC	Proteína cinasa C
PKG	Proteína cinasa G
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SNC	Sistema Nervioso Central
VGCS	Canales de calcio dependientes de voltaje



RESUMEN

El propósito del presente trabajo fue evaluar el efecto antinociceptivo que presenta la combinación de gabapentina con piritinol como una alternativa terapéutica para el tratamiento del dolor. Se utilizó gabapentina debido a que ha mostrado tener utilidad terapéutica en el tratamiento del dolor. El piritinol se seleccionó debido a sus propiedades antioxidantes. Se utilizaron ratas macho *Wistar* (180-220 g) a las que se les indujo nocicepción mediante la administración de formalina (1%) en la parte dorsal de la pata derecha. La inyección de formalina produce sacudidas en la pata administrada. La disminución del número de sacudidas se consideró como el efecto antinociceptivo. Se realizaron curvas dosis respuesta de la administración individual de gabapentina (3-300 mg/kg, i.p.) y piritinol (0.3-5.6 mg/kg, i.p.), obteniendo una DE_{50} de 91.96 ± 16.71 y 6.34 ± 2.0 mg/kg, respectivamente. Considerando las DE_{50} se construyeron dos isobogramas de la combinación de gabapentina con piritinol en una proporción 0.67:0.33 ($DE_{50} = 85.87 \pm 43.81$ mg/kg, i.p.) y 0.5:0.5 ($DE_{50} = 13.23 \pm 1.27$ mg/kg i.p.). Mediante una prueba de t de *Student* se determinó que no existe diferencia estadística entre la DE_{50} de la combinación de gabapentina y piritinol en proporción 0.5:0.5 con respecto al valor teórico de Z_{add} (34.59 ± 5.67 mg/kg), por lo que no existe interacción entre ambos fármacos. En el caso de la combinación de gabapentina con piritinol en proporción 0.67:0.33 se presenta un efecto de antagonismo. Estos datos sugieren que la mezcla de gabapentina y piritinol no representa ventajas con respecto a su administración individual.



1. FUNDAMENTO TEÓRICO

1.1. Definición de dolor

Cada individuo aprende el significado de la palabra dolor a través de la experiencia personal. El dolor es una sensación desagradable que cuando se presenta puede tener diversas intensidades así como orígenes. La Asociación Internacional para el Estudio del Dolor (IASP, 1986) lo ha definido como “una experiencia sensorial y emocional desagradable relacionada con daño potencial o real a un tejido o descrito en términos de tal daño”. El dolor es un proceso que sirve para proteger al organismo y es uno de los responsables de mantener la homeostasis. Además es un estado subjetivo, debido a que los factores ambientales, sociales y culturales modifican la percepción del dolor.

Existen diferentes clasificaciones del dolor. A continuación se describe una clasificación de acuerdo a su patogenia (Figura 1) (Woolf, 2004; Puebla-Díaz, 2005).

- **Dolor nociceptivo:** es el resultado de la activación directa de receptores específicos (nociceptores) en la piel o en los tejidos blandos en respuesta a una lesión tisular, generalmente se acompaña de una inflamación, es el tipo de dolor más frecuente. La activación de estos receptores produce una disminución en el umbral nociceptivo, este fenómeno se conoce como **hiperalgesia**, que se refiere a una respuesta aumentada ante cualquier estímulo doloroso. El dolor puede ser somático (piel y estructuras superficiales), el cual está bien localizado, y se describe como punzante y agudo. Puede ser visceral (estructuras profundas), que no está bien localizado y generalmente está descrito en un área mayor, a menudo referido a estructuras cutáneas.



- **Dolor inflamatorio:** es un dolor espontáneo que se presenta en respuesta a inflamación y daño tisular, que permite la liberación de mediadores químicos que activan las terminales periféricas nociceptivas. Este tipo de dolor previene el contacto o el movimiento de la región afectada, al menos hasta que se reestablece el tejido, favoreciendo así su reparación y la disminución del daño ya ocasionado.

- **Dolor neuropático:** es producido por una lesión directa, enfermedad o disfunción del sistema nervioso, que involucra a los nervios periféricos, el ganglio de la raíz dorsal o el SNC. En este tipo de dolor se presentan los fenómenos de hiperalgesia y alodinia. La **alodinia** es la respuesta dolorosa que se debe a un estímulo que normalmente no provoca dolor.

- **Dolor funcional:** se caracteriza por una hipersensibilidad al dolor que resulta de un proceso central alterado, sin daño aparente en los nervios. El dolor en este caso se debe a una sensibilidad o función anormal del SNC (migraña).

La transmisión del dolor es un mecanismo que involucra una compleja interacción de estructuras periféricas y centrales desde la superficie de la piel hasta la corteza cerebral (Calixto y col., 2000)

1.2. Definición de nocicepción

El término **nocicepción** se refiere a un mecanismo mediante el cual un estímulo nocivo es transmitido al sistema nervioso central (SNC) que se origina por la activación de receptores sensoriales (**nociceptor**) localizados en la periferia como piel, vasos, músculos, articulaciones y vísceras, los cuales nos informan acerca del daño en algún tejido (Figura 2) (Calixto y col., 2000).

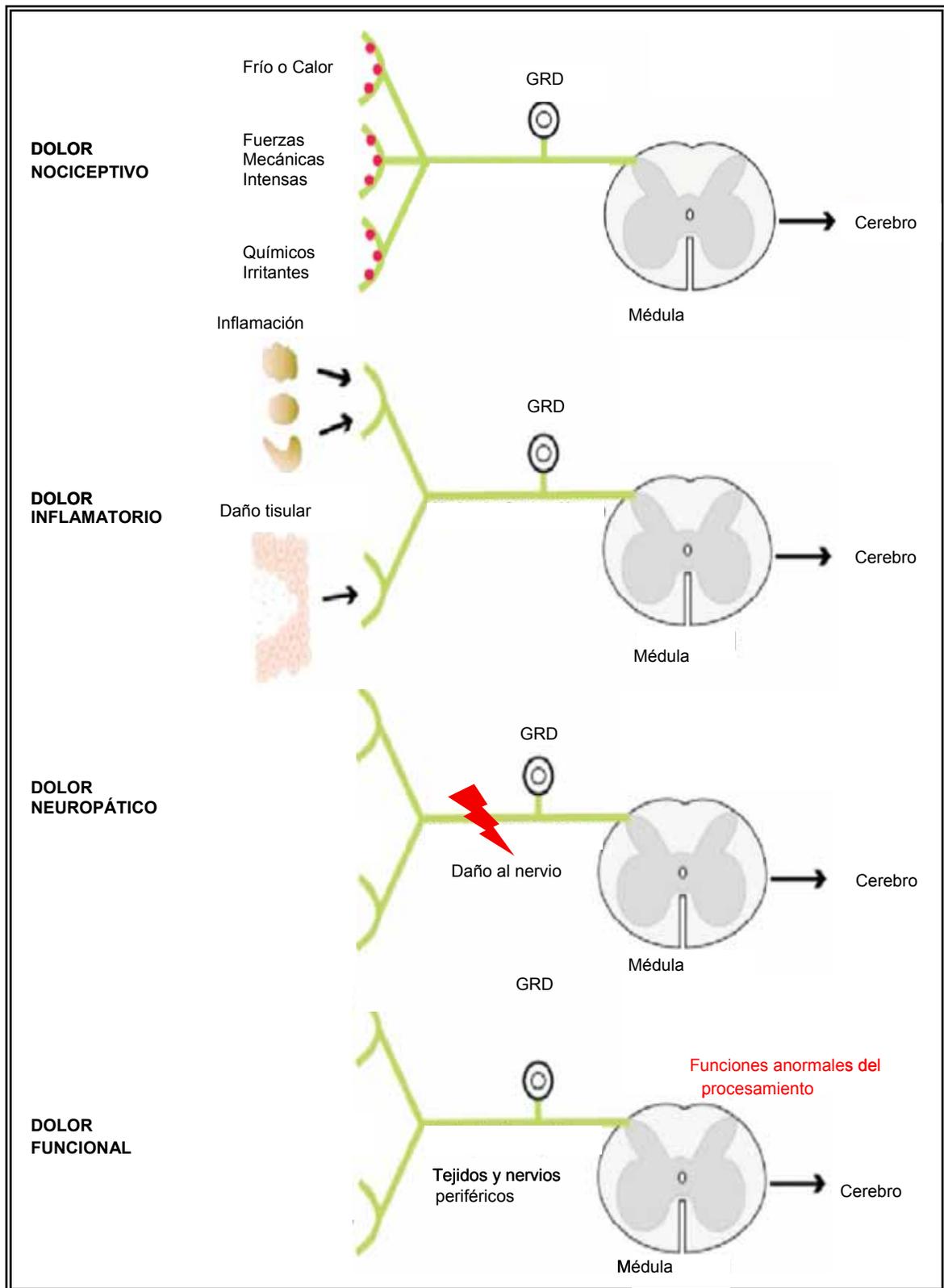


Figura 1. Clasificación de los tipos de dolor (modificación de Woolf, 2004).



Existen tres tipos de estímulos que excitan a los receptores del dolor: mecánicos, térmicos y químicos. Cualquiera que sea la forma original del estímulo, éste se tiene que transformar en potenciales de acción (señales eléctricas). Los sistemas encargados de transformar esta información se denominan **nociceptores**, son neuronas sensitivas del dolor que consisten en terminaciones nerviosas especializadas, también conocidas como fibras aferentes primarias, ya sean mielinizadas o no mielinizadas, que conducen estas señales al SNC.

Las fibras nociceptivas se clasifican en tres clases de acuerdo al tipo de estímulo al que responden, a su diámetro y al grado de mielinización. Estas clases de fibras, que a menudo actúan juntas, están ampliamente diseminadas por la piel y algunas vísceras (Julius y Basbaum, 2001).

- **Fibras A α y A β :** son células con axones de gran diámetro altamente mielinizados, de las cuales la gran mayoría detecta estímulos inocuos en la piel, músculo y articulaciones.
- **Fibras A δ :** están finamente mielinizadas y son de diámetro pequeño. Tienen la capacidad de conducir las señales rápidamente, a través de potenciales de acción, que alcanzan velocidades de 5 a 30 m/s y son activadas por una presión intensa aplicada a la piel y por temperaturas extremas (mayores a 45°C y menores a 5°C).
- **Fibras C:** son fibras que no están mielinizadas y de pequeño diámetro que conducen las señales lentamente, por lo general alcanzan velocidades inferiores a 1m/s. Son activados por estímulos mecánicos, químicos o térmicos de gran intensidad, por lo que también son conocidas como polimodales. Representan el 80% de todos los nociceptores.



La nocicepción es un mecanismo electroquímico que comprende cuatro procesos fisiológicos (Figura 2), (Millan, 2002):

- 1. Transducción.** Es la conversión de los estímulos nocivos en señales eléctricas por las terminaciones nerviosas periféricas.
- 2. Transmisión.** Es la propagación de las señales eléctricas a lo largo de las vías nociceptivas.
- 3. Modulación.** Es la alteración de las señales nociceptivas dentro del asta dorsal de la médula espinal; aquí se puede inhibir o amplificar la señal sensorial.
- 4. Percepción.** Es el proceso por el cual se integran los impulsos nociceptivos con factores cognoscitivos y emocionales para crear la experiencia subjetiva de dolor.

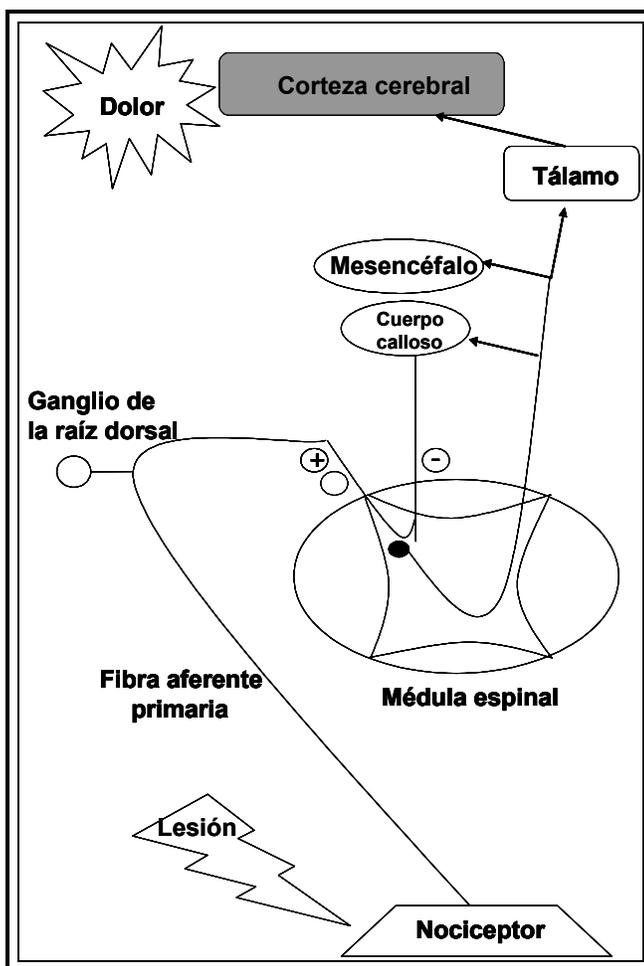




Figura 2. Mecanismo del proceso nociceptivo (Millan, 2002).

1.3 Mediadores que participan en la nocicepción

En el proceso nociceptivo, que va de los nervios periféricos a la médula espinal y subsecuentemente al cerebro, participan diversos neurotransmisores como mediadores químicos que se liberan y estimulan este proceso (Millan, 2002). La acción directa o indirecta de los mediadores químicos, como los metabolitos del ácido araquidónico (prostaglandinas y leucotrienos), péptidos (quininas, taquiquininas, péptido relacionado con el gen de la calcitonina, galanina, colecistoquinina, péptido vasoactivo intestinal), serotonina, acetilcolina, citocinas, factor de crecimiento, glutamato, óxido nítrico (ON), ATP, ADP, adenosina, protones (H^+), pueden ser producidos o liberados por daño a un tejido o por irritantes exógenos (formalina, ácido acético, capsaicina, algunos venenos, etc.), son responsables de los múltiples eventos que ocurren durante la transmisión del dolor tanto en el SNC como en el periférico.

Existen varias fuentes patofisiológicas por las cuales se generan los mediadores: daño a tejidos, la vasculatura, células inmunitarias y tejidos circundantes, nervios sensoriales y simpáticos. Estos mediadores pueden actuar en múltiples receptores, los cuales están ampliamente distribuidos a través de nervios centrales y periféricos, muchos de los cuales están acoplados a proteínas G y asociados con segundos mensajeros como proteínas cinasas (PKA, PKC y PKG), AMPc, GMPc y movilización intracelular de calcio. Otros neurotransmisores como los aminoácidos excitatorios, acetilcolina, (actuando en el receptor nicotínico), activar directamente canales iónicos, y a su vez, el control de la permeabilidad de la membrana de iones. Varios factores, entre ellos el daño a tejidos, exposición a algunos mediadores de la inflamación tales como la prostaglandina E₂, la bradicinina, la sustancia P, la histamina, la adenosina, la serotonina se sabe que causan la sensibilización de la terminación de los nervios nociceptores a estímulos mecánicos y térmicos (Calixto, y col., 2000).



1.4 Tratamiento del dolor

El alivio del dolor se puede lograr mediante diferentes estrategias. La más común y efectiva es la administración de analgésicos. Algunos analgésicos imitan la acción de algunas sustancias endógenas que ayudan normalmente a controlar el dolor, mientras que otros bloquean la función de sustancias que transmiten la información nociva. Como es de esperar, el uso de los analgésicos tiene ventajas y desventajas que van a depender de las dosis empleadas, de los esquemas de dosificación, de las características químicas y farmacológicas propias de cada sustancia y de los pacientes o sujetos que reciban dichos tratamientos (López Muñoz y Granados, 1998).

Una alternativa más para aliviar el dolor es la utilización de las combinaciones de analgésicos (López-Muñoz y Granados, 1998). La combinación de fármacos es una propuesta utilizada para obtener mejores resultados en el tratamiento del dolor debido a que disminuye la incidencia y severidad de los efectos adversos. La administración simultánea de dos fármacos puede producir un efecto aditivo, sin embargo, el efecto observado puede ser de mayor o menor magnitud dando como resultado sinergismo o antagonismo (Pozos-Guillén y col., 2006) y las dosis individuales de los fármacos pueden reducirse considerablemente (Miranda y col., 2006).

1.4.1. AAINE's

Los analgésicos antiinflamatorios no esteroideos (AAINE's) son agentes muy eficientes para tratar el dolor, sobre todo de tipo inflamatorio o agudo. Son conocidos como analgésicos, antiinflamatorios y antipiréticos.



La acción nociceptiva de los AAIINE's es principalmente debida a la inhibición de la biosíntesis de prostaglandinas a través del bloqueo de la enzima COX (Miranda y col., 2006). Con el descubrimiento de dos isoformas (COX-1 y COX-2) de esta enzima se propuso que la COX-1 (constitutiva) participaba principalmente en funciones fisiológicas como protección gástrica y regulación del flujo renal, en tanto que la COX-2 (inducible) contribuía principalmente a la generación de dolor e inflamación (Tabla 1), (López-Muñoz y Granados, 1998; Miranda y col., 2006)

1.4.2. Opioides

Los compuestos opioides, cuyo prototipo es la morfina, son sustancias de origen natural o sintético que producen efectos similares a los que produce la morfina (Tabla 1). En términos generales estos compuestos causan hiperpolarización de las células nerviosas e inhibición presináptica de liberación de neurotransmisores excitadores. Esta acción farmacológica la realizan mediante la interacción con receptores opioides específicos que se encuentran en la membrana de las neuronas sensoriales a nivel del SNC y periférico. Esta interacción simula la acción de neurotransmisores inhibidores endógenos, como por ejemplo las endorfinas. El efecto de los opioides se produce por la interacción del analgésico con tres familias de receptores: μ (mu), δ (delta) y κ (kappa), cada uno de los cuales exhibe diferentes especificidades de unión por los fármacos. Los receptores a opioides están presentes en alta densidad en varias áreas del SNC que se sabe están involucradas en el procesamiento integrativo del dolor: corteza cerebral, sistema límbico, hipotálamo, tálamo medio, médula espinal y más recientemente en tejidos periféricos inflamados. (López-Muñoz y Granados, 1998).

La combinación de opioides con otros fármacos, como agonistas de los receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) pueden mejorar el equilibrio entre la analgesia y los efectos adversos (Portenoy, 2000). Las bases fisiopatológicas del dolor neuropático se sustentan, periféricamente, en las alteraciones de la excitabilidad neuronal mediada por canales de sodio dependientes de



voltaje; desde el punto de vista central, el principal neurotransmisor involucrado es el glutamato, que permite la entrada de calcio a través del receptor N-metil-D-aspartato, el cual condiciona una despolarización más prolongada y la activación de segundos mensajeros; ello determina la cronificación del dolor. Gracias a estos hallazgos fisiopatológicos sobre el dolor, a los fármacos clásicos (antidepresivos tricíclicos, carbamacepina, opiáceos) se han incorporado algunos de los nuevos fármacos antiepilépticos, que inhiben canales de sodio o canales de calcio, aumentan el GABA o disminuyen el glutamato en las sinapsis (Caviedes, 2002)

1.4.3 Adyuvantes

Los fármacos adyuvantes se utilizan para el tratamiento del dolor que no disminuye ante la administración de AAINE's y opioides, incluso con la combinación de ellos (Onghena y Van-Houdenhove, 1992; Watson, 2000).

Los adyuvantes son compuestos que por sí solos pueden o no tener efectos colaterales o de baja potencia pero en combinación con (Buvanendran y Kroin, 2007) otro tipo de fármacos son efectivos para el tratamiento de diferentes tipos de dolor, mientras que otros son específicos para dolor neuropático o nociceptivo (Onal, 2006). El uso adecuado de los medicamentos adyuvantes es una de las claves para el éxito en el tratamiento eficaz del dolor (Knotkova y Pappagallo, 2007). En la tabla 1 se muestran algunos agentes adyuvantes, como son los antidepresivos, anticonvulsivos, neurolépticos, antiarrítmicos, antihistamínicos, antagonistas de los receptores NMDA, esteroides, relajantes musculares, biofosfonatos y radiofarmacéuticos (Onal; 2006).

Tabla 1. Fármacos comúnmente utilizados en el tratamiento del dolor; analgésicos clásicos y nuevos adyuvantes (Guindon y col., 2007).

<p>Opioides: alfentanil, buprenorfina, butorfanol, fentanil, hidromorfina, petidina (meperidina), metadona, morfina, nalbufina, oxicodona, menifentanil, sufentanil, tramadol.</p> <p>AAINE's: diclofenaco, ibuprofeno, ketoprofeno, ketorolaco, naproxeno.</p>



Coxibs^a: celecoxib, etoricoxib, lumiracoxib, parecoxib.

Antidepressivos: bupropion, duloxetine, imipramina, venlafaxina.

Cannabinoides: ácido ayulémico, cannabis, Δ^9 -tetrahidrocannabinol/cannabidiol, dronabinol, nabilona.

Anestésicos locales: bupivacaína, levobupivacaína, lidocaína 5%, ropivacaína.

Otros: clonidina, ketamina, nefopam, neostigmina, paracetamol (acetaminofén)

^a Inhibidores selectivos de COX-2

▪ **Anticonvulsivos:** existen evidencias de que los anticonvulsivos son útiles en el tratamiento del dolor neuropático. La expansión de los Anticonvulsivos comenzó con la introducción de la gabapentina (Neurontin). La eficacia analgésica de la gabapentina ha sido establecida en muchos tipos de dolor neuropático no maligno, varios tipos de dolor no maligno neuropático y ahora es muy utilizado para el tratamiento de cáncer relacionado con dolor neuropático. Debido a que ha demostrado tener efecto analgésico en varios tipos de dolor neuropático, buena tolerancia y muy poca interacción fármaco-fármaco, la gabapentina es recomendada como agente de primera línea para el tratamiento de dolor neuropático de diversas etiologías (Lussier y col., 2004).

▪ **Anestésicos locales:** los anestésicos locales que son administrados para bloquear la conducción nerviosa en la anestesia quirúrgica y proporcionar analgesia en el manejo del dolor agudo se han convertido en un estándar de la práctica anestesiológica. Los anestésicos locales son analgésicos, aunque no en el tradicional sentido clínico y farmacológico. Las pruebas sugieren que la administración intravenosa es un tratamiento eficaz en los síndromes de dolor neuropático crónico. También hay pruebas de que los anestésicos locales por vía intravenosa pueden aliviar el dolor agudo. Además, la nueva idea de que el dolor agudo y postquirúrgico se puede controlar con anestésicos locales podría prevenir el desarrollo de dolor crónico, incluyendo los síndromes de dolor neuropático crónico y añade otra dimensión importante a la función de los anestésicos locales en el manejo del dolor (Backonja, 1994).



▪ **Cafeína:** la cafeína ha sido un aditivo en los analgésicos durante muchos años. Un análisis realizado en 1984 demostró que la cafeína reduce la cantidad de paracetamol (acetaminofén) que se necesita para el mismo efecto en aproximadamente un 40%. *In vitro* e *in vivo* la investigación farmacológica ha proporcionado pruebas de que la cafeína puede tener acciones antinociceptivas a través del bloqueo de los receptores de adenosina, inhibición de la COX-2 o la síntesis de las enzimas por los cambios en el estado emocional. Se ha sugerido que las dosis utilizadas de analgésicos y cafeína pueden influir en los efectos adyuvantes de la cafeína y dosis muy bajas o muy altas pueden no mejorar la analgesia (Zhang, 2001).

▪ **Vitaminas:** el tratamiento del dolor neuropático es un área que requiere el desarrollo de nuevos fármacos. En la búsqueda de alternativas, se ha encontrado que las vitaminas del grupo B son una herramienta farmacológica clínicamente útil para pacientes con dolor neuropático (Caram-Salas y col., 2006). Además, las vitaminas B han mostrado reducir la nocicepción inflamatoria en rata, en la prueba de la formalina (Reyes-García y col., 2001). Estas vitaminas también generaron antinocicepción en un modelo de dolor neuropático, en donde se ligan los nervios espinales L5 y L6 (Granados-Soto y col., 2004).

Con el objetivo de aumentar los efectos terapéuticos y disminuir los efectos adversos, la combinación de fármacos resulta ser una alternativa para el tratamiento de estos padecimientos. Es por ello que se han realizado estudios donde la combinación de vitaminas B con ketorolaco (Medina-Santillán y col., 2004) o con diclofenaco (Reyes-García y col., 1999; Rocha-González y col., 2004) producen una interacción sinérgica que reduce el dolor inflamatorio en la prueba de la formalina. También se ha estudiado la combinación de vitamina B₁ (tiamina) con vitamina B₆ (piridoxina) y con vitamina B₁₂ (cobalamina) donde se presenta un efecto analgésico en modelos de dolor neuropático y dolor de origen músculo-



esquelético, dicho efecto es atribuido a un incremento en la disponibilidad y/o la efectividad de la noradrenalina y la serotonina que actúan como neurotransmisores inhibidores en el sistema nociceptivo (Jurna, 1998). La mezcla de las 3 vitaminas también ha resultado efectiva en la disminución de la nocicepción en el modelo de estiramiento abdominal y la prueba de la formalina en ratones; sin embargo, en la prueba de la placa caliente no se observó el mismo efecto (Franca y col., 2001)



1.5. Gabapentina

La gabapentina (Gp) es un fármaco desarrollado originalmente como antiepiléptico debido a que penetra al SNC. Actualmente, se utiliza ampliamente para aliviar el dolor, especialmente el dolor neuropático, así como la neuralgia post-herpética y como tratamiento de crisis parciales con o sin generalización secundaria en pacientes de más de 12 años de edad con epilepsia. La gabapentina es bien tolerada en la mayoría de los pacientes, tiene pocos efectos secundarios, y pasa a través del cuerpo sin ser metabolizado.

Estructuralmente la gabapentina es parecida al neurotransmisor inhibitorio ácido γ -aminobutírico (GABA), en la Figura 3 se muestra la estructura química de ambos (Ortiz y col., 2006; Cheng y Chiou, 2006). La gabapentina se une a la subunidad $\alpha_2\delta$ de los canales de calcio dependientes de voltaje (Ortiz y col., 2006; Cheng y Chiou, 2006; Field y col., 1997).

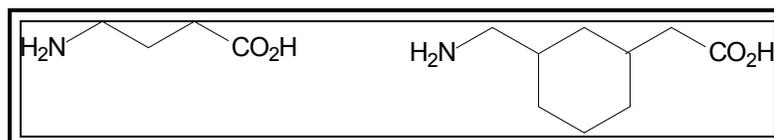


Figura 3. Estructura química de GABA y gabapentina respectivamente (Cheng y Chiou, 2006).

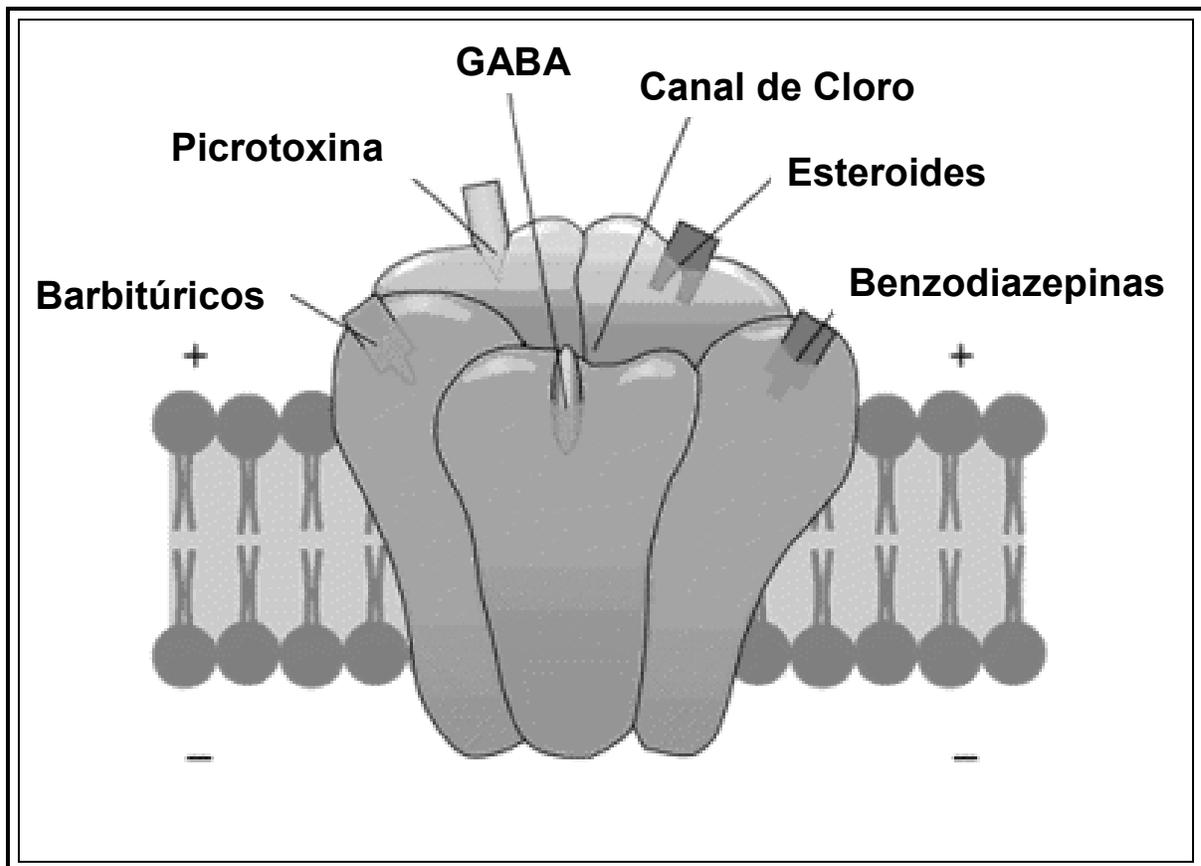


Figura 4. Esquema del receptor GABA_A y sus sitios de unión (Millan, 2002)

El ácido gamma-aminobutírico se encuentra en la sustancia negra, el núcleo caudado, el globo pálido, el putamen y la corteza cerebral. Se conocen pocas vías GABA-érgicas largas, como la vestibulo-cerebelosa, la estrío-nigral y la estrío-palidal.

Se han identificado dos tipos importantes de receptores para el ácido gamma-aminobutírico: el receptor GABA_A, localizado en un canal iónico que permite el paso de iones de cloruro, y el receptor GABA_B, que no está acoplado directamente a un canal y puede modificar los niveles de 3' – 5' AMP cíclico, aumentar la permeabilidad al potasio o disminuir la permeabilidad al calcio. Recientemente se ha propuesto por exclusión un tercer tipo de receptor GABA_C, al que no se fijarían



los antagonistas de GABA_A (bicuculina) ni los agonistas selectivos de GABA_B (baclofeno).

El receptor GABA_A es una estructura muy compleja. Se han descrito en él varias subunidades (alfa, beta, gamma, delta y ro) y subtipos de algunas de ellas. Las Benzodiazepinas parecen fijarse a las subunidades alfa; al unirse aumentan la afinidad de GABA por su *locus* de fijación (cooperatividad positiva). Los barbitúricos y las hidantoínas también amplifican las inhibiciones GABAérgicas, si bien actuando en un locus distinto del receptor GABA_A (Velasco, 1993).

Tabla 2. Características de los receptores del GABA (Velasco, 1993)

Receptor	GABA _A	GABA _B	GABA _C
Agonistas	GABA	GABA	GABA
Agonistas selectivos	Muscimol	L-Baclofeno	
Antagonistas	Bicuculina	Saclofeno	
Reguladores	Sitio (receptor) de las Benzodiazepinas :		
	- Agonistas:		
	Diazepam		
	- Agonistas inversos:		
	β-Carbolinas		
	- Antagonistas:		
	Flumazenil		
	- Otros sitios de fijación:		



	Barbitúricos	
	Picrotoxina	
	Otros convulsivos	
	Neuroesteroides	
Tansducción	Canales de Cl ⁻	Modificación del AMPc, e indirectamente aumento de la permeabilidad a K ⁺ y disminución a la del Ca ²⁺
Funciones	Inhibiciones en todo el SNC	Inhibiciones en el SNC, muchas de ellas presinápticas

1.5.1 Efectos farmacológicos de la gabapentina

La gabapentina tiene diversos efectos farmacológicos:

1. Analgésico
2. Ansiolítico
3. Anticonvulsivo
4. Antimaniático
5. Antiparkinsoniano
6. Bloqueador de los canales de calcio
7. Antagonista de los aminoácidos excitatorios



Gabapentina y antinocicepción: Se ha demostrado que la administración local de la gabapentina a nivel periférico genera un efecto antinociceptivo dependiente de la dosis en la prueba de la formalina (Ortiz y col., 2006). Particularmente la fase II en esta prueba de nocicepción es inhibida por la administración de gabapentina a la dosis de 10 y 30 mg/Kg (i.t.) (Field col., 1997).

1.5.2 Farmacodinamia

Los posibles blancos farmacológicos de la gabapentina son la activación selectiva de los receptores heterodiméricos GABA_B; indirectamente aumenta los niveles del N-metil-D-aspartato (NMDA) en las interneuronas GABAérgicas; bloquea la transmisión mediada por los receptores de glutamato en la médula espinal; unión al transportador L-aminoácido; activación de adenosina trifosfato sensible a los canales de K⁺ (KATP); genera hiperpolarización por la activación de las corrientes iónicas de canales de potasio y la modulación de corrientes de calcio. La subunidad $\alpha_2\delta$ de los canales de calcio dependientes de voltaje (VGCCs) son el blanco antinociceptivo más probable de la gabapentina. Posiblemente la consecuencia de la unión de la gabapentina a la subunidad $\alpha_2\delta$ es una reducción en la liberación de neurotransmisores y por lo tanto una disminución de la hiperexcitabilidad neuronal (Irwin y Kong, 2007).

Se ha demostrado que la gabapentina inhibe la liberación de glutamato, aspartato, sustancia P y el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP) en la médula espinal de ratas. Estudios recientes han demostrado que el sistema noradrenérgico descendiente, los receptores espinales α_2 -adrenérgicos y el circuito espino-bulbo-espinal son elementos fundamentales que influyen en los efectos analgésicos de la gabapentina además de la interacción $\alpha_2\delta$ (Irwin y Kong, 2007).



1.5.3. Farmacocinética

La absorción de la gabapentina es dependiente de la dosis debido al mecanismo saturable de la cadena transportadora de los L-aminoácidos del intestino. La biodisponibilidad oral varía inversamente con la dosis. La gabapentina se distribuye ampliamente en los tejidos y fluidos corporales después de su administración. No se une a las proteínas plasmáticas y tiene un volumen de distribución de 0.6-0.8 L/Kg. Se ioniza a pH fisiológico por lo que las concentraciones en los tejidos adiposos son bajas. Después de la administración de una sola cápsula de 300 mg, las concentraciones plasmáticas máximas ($C_{m\acute{a}x}$) de 2,7 mg/mL se logran dentro de 2-3 h, en humanos la gabapentina no es metabolizada y no induce enzimas microsomales hepáticas y se elimina de manera inalterada por la orina. En individuos sanos la gabapentina es generalmente bien tolerada con un favorable perfil de efectos secundarios (Irwin y Kong, 2007). La biodisponibilidad oral es aproximadamente del 60%, no se afecta por la ingesta de alimentos y la vida media es 5 – 7 h (Curry y Kulling, 1998)

1.6. Piritinol

El piritinol es un antioxidante sintético y un fármaco nootrópico. Químicamente, está relacionado con compuestos derivados de la vitamina B6 tales como piridoxina, en la Figura 5 se muestra la estructura química del piritinol y la vitamina B6. Incrementa la velocidad de disparo eléctrico en el cerebro y estimula el metabolismo de la glucosa. También se considera que tiene un efecto activador en el cerebro, que inhibe la glutamato carboxilasa en concentraciones de 0.05-1.0 mmol/L (Hindmarch y col., 1990; Turský, 1988). El piritinol inhibe la unión de GABA a los receptores GABA de las membranas sinaptosomales del cerebro. (Turský, 1988).

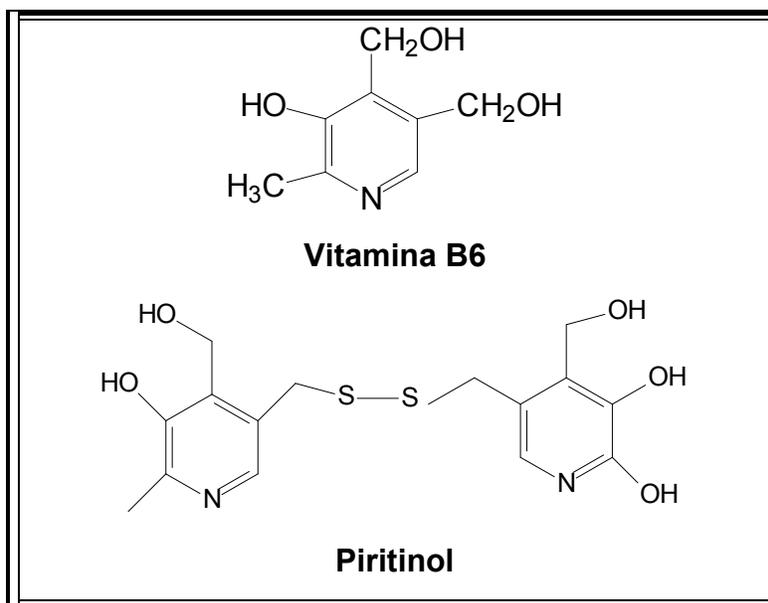


Figura 5. Estructura química de la Vitamina B6 (piridoxina) y del piritinol (Hindmarch y col., 1990).

1.6.1. Farmacocinética y farmacodinamia

El piritinol es metabolizado completamente por el organismo, eliminándose por orina. En un plazo de 2 a 4 h el nivel sanguíneo alcanza su valor máximo. Aumenta la flexibilidad del glóbulo, por consiguiente, la fluidez de la sangre. Incrementa la microcirculación cerebral y el aporte de oxígeno y glucosa al cerebro (Hindmarch y col., 1990)

El piritinol, aumenta la liberación de acetilcolina a nivel de la sinapsis. Activa el metabolismo de las neuronas mediante una mejor absorción y utilización de glucosa. Fomenta las funciones de la membrana neuronal y eritrocítica, especialmente si éstas se encuentran lesionadas, ya que actúa aumentando el potencial de membrana, así como la concentración de fosfolípidos (Hindmarch y col., 1990)

Debido a sus propiedades reológicas y metabólicas, incrementa la microcirculación y el riego sanguíneo cerebral. Activa regiones corticales y subcorticales del cerebro cuando están comprometidas, tales como tallo cerebral,



formación reticular mesencefálica y el sistema límbico. Este fármaco también incrementa el rendimiento psicomotor, coadyuva a la capacidad de aprendizaje, memoria y las alteraciones de la función psicomotora. Ejerce acción protectora frente a la disminución de oxígeno (hipoxia), disminución del riego sanguíneo (isquemia), déficit de proteínas o alteraciones de la síntesis proteica, e intoxicación por alcohol (Hindmarch y col., 1990).

1.7. Especies reactivas de oxígeno

Un desequilibrio entre los oxidantes y antioxidantes en favor de los primeros, produce un daño potencial llamado “estrés oxidativo”. Los oxidantes son productos normales del metabolismo anaeróbico pero pueden ser producidos en grandes cantidades bajo condiciones patofisiológicas. El estado de equilibrio se mantiene gracias a la acción de los antioxidantes. Éstos son capaces de adaptarse a las necesidades del cuerpo (Helmut, 1997).

En la definición del término, un antioxidante es “toda sustancia que cuando se presenta en bajas concentraciones en comparación con la de un sustrato oxidable retrasa o inhibe significativamente la oxidación de ese sustrato” (Helmut, 1997).

Estudios recientes indican que las especies reactivas de oxígeno (ROS) están involucradas en el dolor persistente. Bajo condiciones fisiológicas normales, la producción de ROS es equilibrada por varios mecanismos celulares antioxidantes (Lee y col., 2007).

Los radicales libres y los radicales derivados de ROS incluyendo peróxido de hidrógeno, superóxido, radicales hidroxilo y óxido nítrico están implicados en el daño a tejido y aumentan la respuesta nociceptiva. En general, la producción biológica y la reactividad de ROS se mantienen bajo un estricto control de la



actividad antioxidante endógena de las enzimas superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa. Sin embargo, cuando hay un aumento en la producción de radicales libres o una disminución de la defensa antioxidante, se produce el estrés oxidativo. Este estrés oxidativo puede dañar el tejido, proteínas, ADN, o los lípidos (Hacimuftuoglu y col., 2006).

1. 8. Evaluación de combinaciones mediante el método isobolográfico

Ciertos fármacos administrados en combinación pueden producir efectos que son mayores o menores que el efecto predicho por su potencia individual (Tallarida, 2006).

Uno de los métodos para evaluar la interacción entre dos fármacos es el análisis isobolográfico (Tallarida y col., 1989), el cual describe por medio de una gráfica el tipo de interacción que se presenta entre los fármacos evaluados (Schäfer, 2002, Grabovsky y Tallarida, 2004). El isobograma es una gráfica en un eje de coordenadas rectangulares de la combinación de fármacos (Fármaco a, Fármaco b) que producen el mismo nivel de efecto (por ejemplo, el 30, 50 o 75% de efecto, representado por su dosis efectiva 30, 50 o 75 - DE_{30} , DE_{50} , DE_{75} - , respectivamente). En cada uno de los ejes se representa la dosis equiefectiva de uno de los fármacos que se mezclan, es decir, la DE_{50} del fármaco A y DE_{50} del fármaco B (D_a y D_b). Estos dos puntos se unen mediante una línea (isobolo), la cual representa el valor de las dosis individuales de los fármacos (Figura 6).

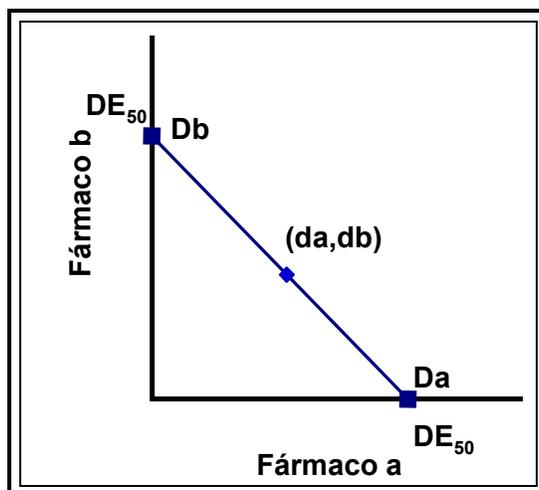


Figura 6. Isobolograma de la combinación de dos fármacos. D_b y D_a representan el efecto al 50% de manera individual y d_a, d_b representan el punto de interacción de ambos fármacos (Tallarida, 2006)

1.9. Prueba de la formalina

La prueba de la formalina en rata, es un modelo animal de dolor, que se induce por daño a un tejido (Abbott y col., 1999).

La prueba de la formalina consiste en administrar en una pata del animal formalina diluida y la observación del comportamiento posterior a la administración. El principal problema de esta prueba son los métodos de conteo pues requieren demasiada atención (Abbott y col., 1999)

Se sabe que la administración subcutánea de la formalina en una pata trasera de la rata provoca un comportamiento nociceptivo caracterizado por una breve fase inicial (Fase I) seguida por una fase prolongada (Fase II); cada una de ellas consiste en elevar, lamer, sacudir e incluso morder la pata que ha sido administrada (Pitcher y Henry, 2002).

La prueba de la formalina depende de la sensibilización en el asta de la espina dorsal y el cerebro. En particular, se ha demostrado que la respuesta en la



Fase II se debe en parte al impulso nociceptivo que llega al sistema nervioso central y que se genera de la Fase I (Yashpal y Coderre, 1998).

La prueba de la formalina es un modelo animal de dolor inducido por lesión aguda del tejido. De esta manera se diferencia de la mayoría de los análisis tradicionales de la nocicepción, que se basan en breve umbral de intensidad de estímulos (Tjølsen y col., 1992).

El comportamiento antinociceptivo inducido por formalina muestra dos fases: una primera fase (dolor agudo), que comienza inmediatamente después de la administración intraplantar de la formalina y dura aproximadamente 5 minutos, y una última fase que se inicia 15-20 minutos después de la administración de la formalina y tiene una duración de 20-40 minutos. Esta última fase llamada también tónico o fase crónica, depende de la inflamación local y/o de los cambios producidos en el SNC. Entre estas dos fases existe un período, la interfase, en el que los animales muestran apenas comportamientos relacionados con el dolor (Soares y col., 2006).

La primera fase parece ser causada principalmente por activación de las fibras C debido a los estímulos periféricos, mientras que la segunda fase, que parece ser dependiente de la combinación de una reacción inflamatoria en los tejidos periféricos y cambios funcionales en el asta dorsal de la médula espinal. Estos cambios funcionales son iniciados por la fibra C durante la primera fase. En ratones, la respuesta de comportamiento en la Fase II depende de la temperatura del ambiente. Se cree que la temperatura de los tejidos periféricos, así como otros factores que influyen en la inflamación periférica pueden afectar a la respuesta, posiblemente, creando una confusión de los resultados obtenidos con la prueba (Tjølsen y col., 1992).



2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Se sabe que las especies reactivas de oxígeno (ROS) contribuyen y/o mantienen las condiciones de dolor crónico. La producción biológica y la reactividad de ROS se mantienen bajo un estricto control de enzimas endógenas con actividad antioxidante. Sin embargo, cuando hay un aumento en la producción de radicales libres o una disminución de la defensa antioxidante, se produce el estrés oxidativo.

Desafortunadamente, aún no existen fármacos que puedan ayudar completamente a pacientes con dolor intenso (pacientes con cáncer y VIH), crónico (artritis reumatoide, dolor bajo de espalda), neuropático (neuropatía diabética) o funcional (migraña). La búsqueda de fármacos analgésicos continúa, así como la evaluación del efecto antinociceptivo de asociaciones entre los fármacos ya existentes, con el objetivo de disminuir los efectos adversos que estos fármacos presentan de manera individual.

El propósito del presente trabajo es evaluar el efecto antinociceptivo que presenta la combinación de gabapentina con piritinol, como una alternativa terapéutica para el tratamiento del dolor intenso. Se seleccionó a la gabapentina, debido a que ha mostrado tener gran utilidad terapéutica en el tratamiento del dolor. Por otra parte, el piritinol fue seleccionado debido a que posee propiedades antioxidantes, dado que las especies reactivas participan importantemente en el proceso nociceptivo, se seleccionó un agente antioxidante para demostrar su utilidad en combinación con un fármaco analgésico ya conocido.



3. HIPÓTESIS

La administración intraperitoneal de un agente antioxidante aumenta el efecto antinociceptivo de gabapentina en rata.

4. OBJETIVO

Comprobar el efecto antinociceptivo de la coadministración de piritinol y gabapentina en rata.

4.1. Objetivos específicos

1. Evaluar el efecto antinociceptivo del piritinol administrado vía intraperitoneal utilizando la prueba de la formalina en rata.
2. Determinar el efecto antinociceptivo de la combinación gabapentina con piritinol utilizando la prueba de la formalina en rata.
3. Realizar un análisis isoblográfico de la combinación gabapentina con piritinol.



5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Material biológico

Se utilizaron ratas *Wistar* machos con un peso de 180-200 g. Los animales tuvieron libre acceso al agua y alimento antes de iniciar el experimento. Todos los experimentos se realizaron con una temperatura ambiental 25-27°C entre 10:00 A.M. y 15:00 P.M, durante los meses de agosto de 2007 a enero de 2008. Los animales se utilizaron una vez y al término del experimento se sacrificaron. Todos los experimentos fueron realizados de acuerdo con las guías sobre aspectos éticos para la investigación del dolor experimental en animales (IASP, 1983, Covino y col., 1980).

5.1.1. Fármacos y reactivos

El formol se adquirió de J.T. Baker. La gabapentina, el diclofenaco y el piritinol fueron donados por Merck S.A de C.V. La formalina al 1% se preparó con formol en agua destilada, la gabapentina se disolvió en solución salina isotónica (SSI) al 0.9% y el piritinol se disolvió en carboximetilcelulosa (1%) disuelta en agua destilada. Como vehículo se consideró la carboximetilcelulosa al 1%.

5.1.1.1. Administración de fármacos

La gabapentina (3, 10, 30, 100, 300 mg/Kg), el piritinol (0.316, 0.56, 1, 3, 5.6, 7.18, 10, 30, 100 mg/Kg) y el diclofenaco (1.10, 30 y 56.2 mg/Kg) se administraron por vía intraperitoneal 15 minutos antes de la administración de formalina.



5.2. Métodos

5.2.1. Prueba de la formalina

El efecto nociceptivo se evaluó en la prueba de la formalina. Para lo cual se requiere un periodo de ambientación de las ratas, las cuales se colocan en un cilindro de acrílico de 30 cm de diámetro durante 1 h para que éstas se adecuen a las condiciones del medio y así disminuir el estrés. Los animales sólo se retiraron del cilindro para la administración de los fármacos y de la sustancia algésica (formalina al 1%), 15 minutos después de la administración de vehículo, diclofenaco, gabapentina y/o piritinol, a cada rata se le administraron 50 μ L de formalina diluida al 1% en la superficie dorsal de la pata derecha trasera. Posterior a la administración de la formalina, inmediatamente se observó el comportamiento nociceptivo, el cual se caracteriza por sacudidas de la pata administrada con formalina. Se colocaron espejos detrás de los cilindros para facilitar la observación de la respuesta nociceptiva (Figura 7).



Figura 7. Fotografía que muestra el período de ambientación en el modelo de la formalina.

La conducta nociceptiva se cuantificó como el número de sacudidas de la pata administrada durante 1 min en periodos de 5 min durante 1 h. El número de sacudidas de la pata se definió como un movimiento rápido y corto de la pata administrada. La conducta de las ratas en esta prueba es bifásica.



La fase inicial, conocida como Fase I se presenta en el intervalo de tiempo de 0-10 min y es seguida por una fase de respuesta prolongada conocida como Fase II, la cual se presenta de 15-60 min. Ambas fases fueron registradas para construir la gráfica del curso temporal del número de sacudidas de pata.

5.2.2. Construcción de isobogramas

Se utilizó un análisis isobolográfico para determinar la naturaleza de la interacción de la gabapentina con el piritinol. El isoblograma fue construido por la conexión de la DE_{50} del piritinol graficado en el eje de las abscisas con la DE_{50} de la gabapentina en el eje de las ordenadas para obtener la línea de aditividad. La dosis teórica aditiva (Z_{add}) para la combinación fue calculada con la siguiente ecuación: $Z_{add} = Z_1^* / (p_1 + R p_2)$. En esta ecuación, Z_1 es la DE_{50} de los fármacos a evaluar, p_1 y p_2 son las proporciones de cada una de los fármacos, respectivamente, en el total de la mezcla y R es la potencia relativa, es decir, la proporción de la DE_{50} de piritinol administrada sola y la DE_{50} de gabapentina solo.

La dosis aditiva teórica (Z_{add}) representa una dosis aditiva total de los fármacos, teóricamente, proporciona una reducción del 50% en el número de sacudidas de la pata administrada con respecto al grupo control. Para la comparación de Z_{add} con la DE_{50} experimental de la mezcla (Z_{exp}), son necesarios los límites de confianza. Estos límites son obtenidos de la varianza (V) de la dosis total. Los límites de confianza para Z_{add} se determinan directamente de la línea de regresión de la mezcla. La varianza individual de los fármacos en combinación fue calculada usando las siguientes ecuaciones:

$$V(Z_{add}) = (p_1 + R p_2)^{-2} [V(Z_1^*) + C Z_2^2 - 2 Z_2 V(Z_1^*) / Z_2^*]$$

$$\text{donde } C = V(Z_1^*) / (Z_2^* + (Z_1^*)^2 V(Z_2^*) / (Z_2^*)^4)$$

Las Varianzas de las cantidades individuales son:

$$V(Z_1) = p_1^2 V(Z_{add}) \text{ y } V(Z_2) = p_2^2 V(Z_{add})$$



5.3. Diseño experimental

A diferentes grupos de ratas se les administró gabapentina (3, 10, 30, 100 y 300 mg/Kg) y piritinol (0.316, 0.56, 1, 3, 5.6, 7.18, 10, 30 o 100 mg/Kg), ambos fármacos fueron administrados por vía intraperitoneal 15 min antes de iniciar la prueba de la formalina. Como vehículo se administró carboximetil celulosa (CMC) al 1% y con los datos obtenidos se construyeron las curvas dosis-respuesta de cada fármaco (Figura 8).

A partir de las curvas dosis-respuesta obtenidas se determinó la DE_{50} de cada uno de los fármacos. A partir de este parámetro se calcularon cuatro combinaciones experimentales en dos diferentes proporciones de gabapentina y piritinol (67:33 y 50:50) con la finalidad de construir dos isobogramas (Figura 8).

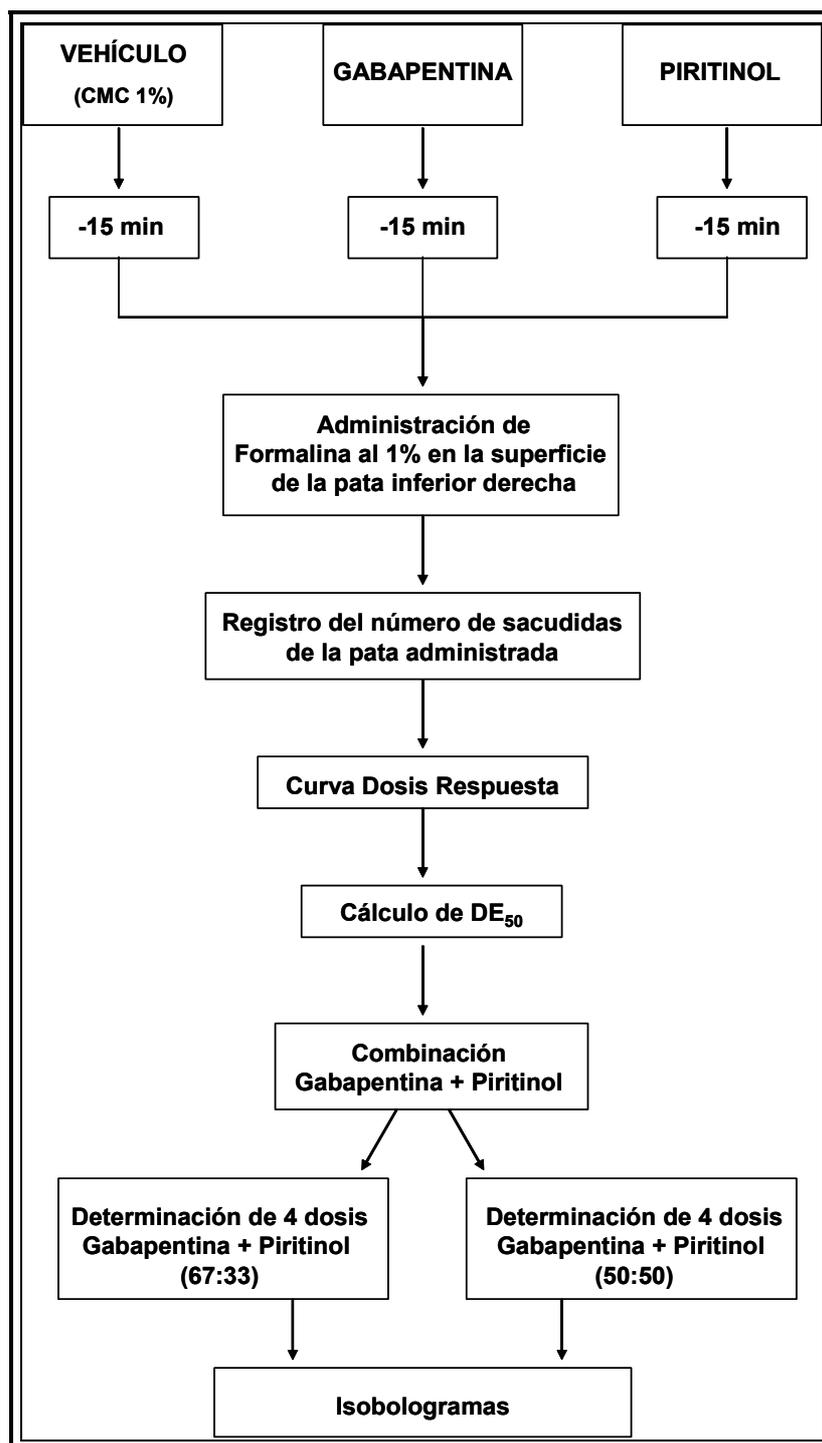


Figura 8. Diagrama del diseño experimental. El vehículo y los fármacos se administraron 15 min antes de iniciar la prueba de la formalina. El cálculo de la DE_{50} permitió determinar las dosis de las combinaciones de los fármacos para luego construir los isobogramas correspondientes.



6. ANÁLISIS DE DATOS Y ESTADÍSTICA

Los cursos temporales de ambos fármacos se construyeron graficando en el eje de las abscisas el tiempo de evaluación y en el eje de las ordenadas el número de sacudidas. De estos cursos temporales se obtuvo el área bajo la curva (ABC) utilizando la regla de los trapecoides, método que permite aproximar una integral definida (Tallarida y Murray, 1981).

La disminución del área bajo la curva representa el efecto antinociceptivo de los fármacos evaluados. Cada dato en las gráficas representa el promedio \pm error estándar (e.e.) de 6 animales para los grupos a los cuales se les administró gabapentina o piritinol y de 8 animales para los grupos combinaciones.

Para el análisis de los datos se realizó una comparación múltiple de los diferentes grupos contra el grupo que solo recibió vehículo. Se utilizó un análisis de varianza de una vía (ANOVA) y seguida de una prueba post-hoc de Dunnet para comparaciones múltiples versus el vehículo. Cuando la comparación fue entre varios grupos se utilizó la prueba de Tukey. Los resultados con una $P < 0.05$ se consideraron significativos (*).

Para la evaluación de la interacción entre los fármacos que se combinaron, se construyó un isoblograma, donde se utilizaron los valores de la DE_{50} (50% del efecto máximo posible) obtenidas cuando los fármacos fueron administrados solos o en combinación. Los valores de la DE_{50} (\pm e.e.) del piritinol con la gabapentina fueron graficados en el eje de las abscisas y el eje de las ordenadas, respectivamente; el punto de las dosis aditivas teóricas fue calculado como describe Tallarida y col. (1992). De la curva dosis-respuesta de la combinación de los fármacos se calcula el valor de la DE_{50} .

La diferencia significativa entre el punto de las dosis aditivas teóricas y la dosis experimental derivada del valor de DE_{50} fue evaluada utilizando una



prueba de *t de Student*. Una DE_{50} experimental significativamente menor a la DE_{50} teórica ($P < 0.05$) se considera como indicativo de una interacción de potenciación entre los fármacos utilizados, considerando también los límites de confianza para la comparación.



7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1. Efecto de la administración de formalina (1%) en rata.

La administración de formalina (1%) por vía subcutánea en la superficie de la pata derecha de la rata induce una conducta nociceptiva caracterizada por un incremento en sacudidas en la pata administrada. En esta prueba nociceptiva se han caracterizado dos fases; en la Fase I se observa un rápido incremento en el número de sacudidas, inmediatamente después de que se ha administrado la formalina, esta conducta disminuyó en aproximadamente 10 minutos, la Fase II se presenta a los 10 minutos y se observó un incremento gradual en el número de sacudidas, obteniéndose un máximo entre 25 y 30 minutos, posteriormente el estímulo nociceptivo va disminuyendo. En la Figura 9 se muestra el comportamiento nociceptivo al administrar formalina a ratas que solo recibieron vehículo (carboximetilcelulosa 1%). Las sacudidas se contaron cada cinco min hasta completar 60 min de evaluación. El ABC de la fase I y la fase II (ABC-1 y ABC-2) representa el efecto nociceptivo total generado por la administración de formalina al 1%.

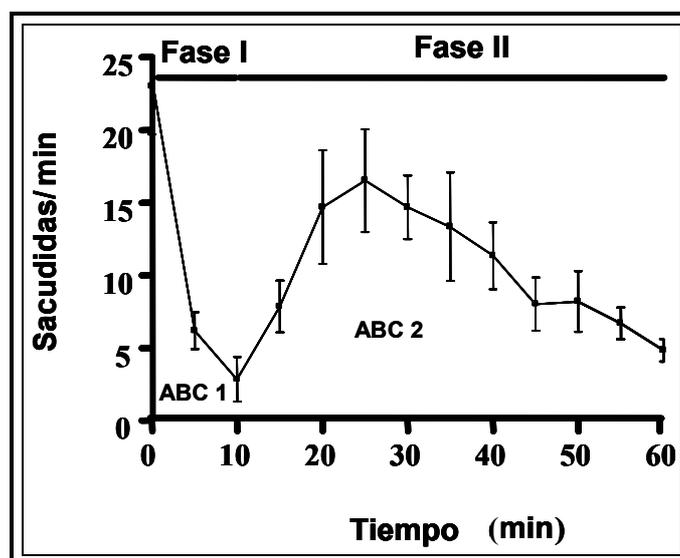


Figura 9. Efecto nociceptivo en la prueba de la formalina. La administración de formalina (en la superficie de la pata inferior derecha, al 1%) en ratas que recibieron vehículo (carboximetilcelulosa) generó una conducta nociceptiva caracterizada por sacudidas de la pata administrada. El curso temporal corresponde al promedio de 6 animales \pm e.e. La suma del ABC-1 (0-10 min) y ABC-2 (10-60 min) representa el efecto nociceptivo total.



Con la finalidad de determinar que la prueba de la formalina era útil para evaluar el efecto antinociceptivo de gabapentina y piritinol, se utilizó como fármaco de referencia al diclofenaco, el cual se sabe ampliamente que tiene efecto antinociceptivo en esta prueba de nocicepción, dado que es un AINE, este tiene como mecanismo de acción la inhibición de prostaglandinas, particularmente la prueba de la formalina es útil para la evaluación de analgésicos antiinflamatorios dados los mediadores liberados tanto en la Fase I como en la Fase II. En la Figura 10 se observa el efecto de la administración i.p. de diclofenaco (1, 10, 30, 56.2 mg/Kg) en la prueba de la formalina.

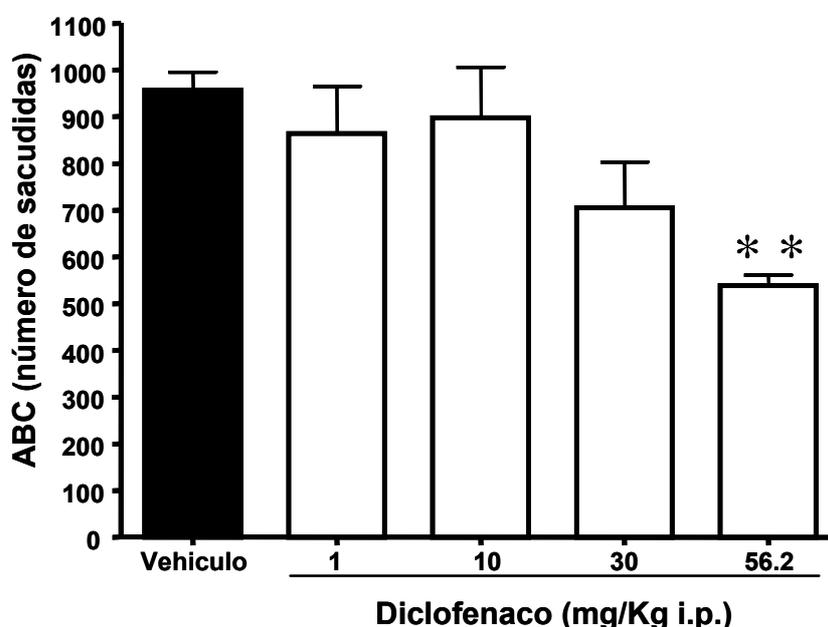


Figura 10. Efecto antinociceptivo del diclofenaco en la prueba de la formalina. La administración intraperitoneal de diclofenaco 15 min antes de la administración de formalina (1% en la superficie dorsal de la pata inferior derecha), ocasiona una disminución del número de sacudidas de la pata administrada. Cada barra representa el número de sacudidas expresados como ABC (de la fase I y fase II) y como un promedio de 6 animales \pm e.e., evaluado durante un periodo de 60 min. La diferencia estadística es con respecto al vehículo, ** ($P < 0.01$), determinada por un análisis de varianza de una vía, seguida de una prueba de Dunnet.



7.2. Evaluación del efecto antinociceptivo de Gabapentina

La gabapentina es un fármaco adyuvante en el tratamiento de dolor. Para determinar su efecto antinociceptivo se utilizó la prueba de la formalina. En la Figura 11 se muestra la curva dosis-respuesta de la administración de gabapentina (3, 10, 30, 100, 300 mg/Kg i.p.), en donde se observa el efecto antinociceptivo dependiente de la dosis.

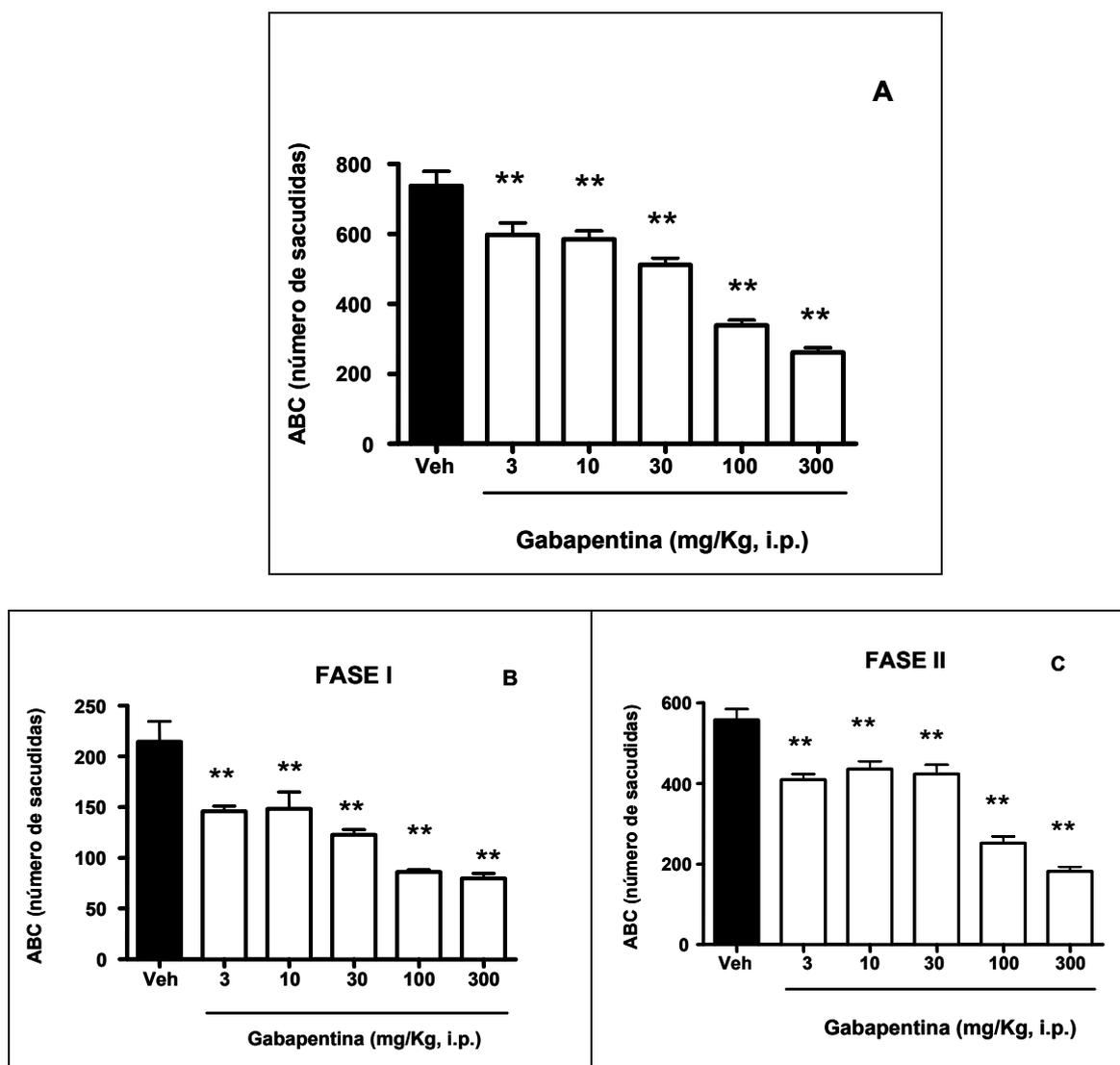


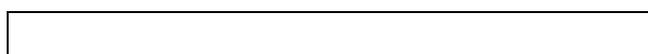
Figura 11. . Efecto antinociceptivo de la administración de gabapentina en la prueba de la formalina. Los datos se expresan como el ABC en ambas fases (panel A), en la Fase I (panel B) y en la Fase II (panel C) y como un promedio de 6 animales \pm e.e, evaluado durante un periodo de 60 min. La diferencia estadística es con respecto al vehículo, ** ($P < 0.01$), determinada por un análisis de varianza de una vía, seguida de una prueba de Dunnet.



7.3. Evaluación del efecto del piritinol en la prueba de la formalina

Hasta nuestro conocimiento, esta es la primera vez que se evalúa el efecto antinociceptivo del piritinol. Este fármaco ha sido evaluado principalmente con un efecto nootrópico, para mejorar la memoria. El piritinol fue administrado intraperitonealmente 15 min antes de la administración de la sustancia algésica (la formalina). En la Figura 12 se muestra el efecto antinociceptivo global expresado como ABC de la Fase I y la Fase II en la prueba de la formalina, se observa que hay un efecto dependiente de la dosis en el intervalo de 0.316 y 5.6 mg/Kg. Desafortunadamente, al incrementar la dosis desde 7.18 mg/Kg a 100 mg/Kg, el efecto antinociceptivo se revierte. Así, el piritinol administrado por vía intraperitoneal genera un efecto dual; por una parte, a dosis bajas genera antinocicepción y a dosis altas genera un efecto pronociceptivo.

Es interesante notar que el piritinol tiene un efecto antinociceptivo a nivel periférico en el límite de dosis evaluado (0.316-100 mg/Kg) debido a que en la Fase I (Figura 12) la administración de todas las dosis disminuyó el número de sacudidas y se sabe que en esta fase la formalina genera irritación y liberación de mediadores inflamatorios que actúan principalmente a nivel local (Tjølsen y col., 1992). Por otra parte, el piritinol tiene su efecto pronociceptivo a nivel central, la administración de dosis mayores a 5.6 mg/Kg ocasionan un aumento en el número de sacudidas con respecto a esta dosis. Dado que este efecto se observa en la Fase II (Figura 12) se puede atribuir un efecto central. Ya se ha demostrado que la administración de formalina ocasiona que la activación de los nociceptores periféricos envíen su potencial de acción hacia la médula espinal liberándose en esta fase los mediadores centrales que contribuyen al proceso nociceptivo central (Yashpal y Coderre, 1998).



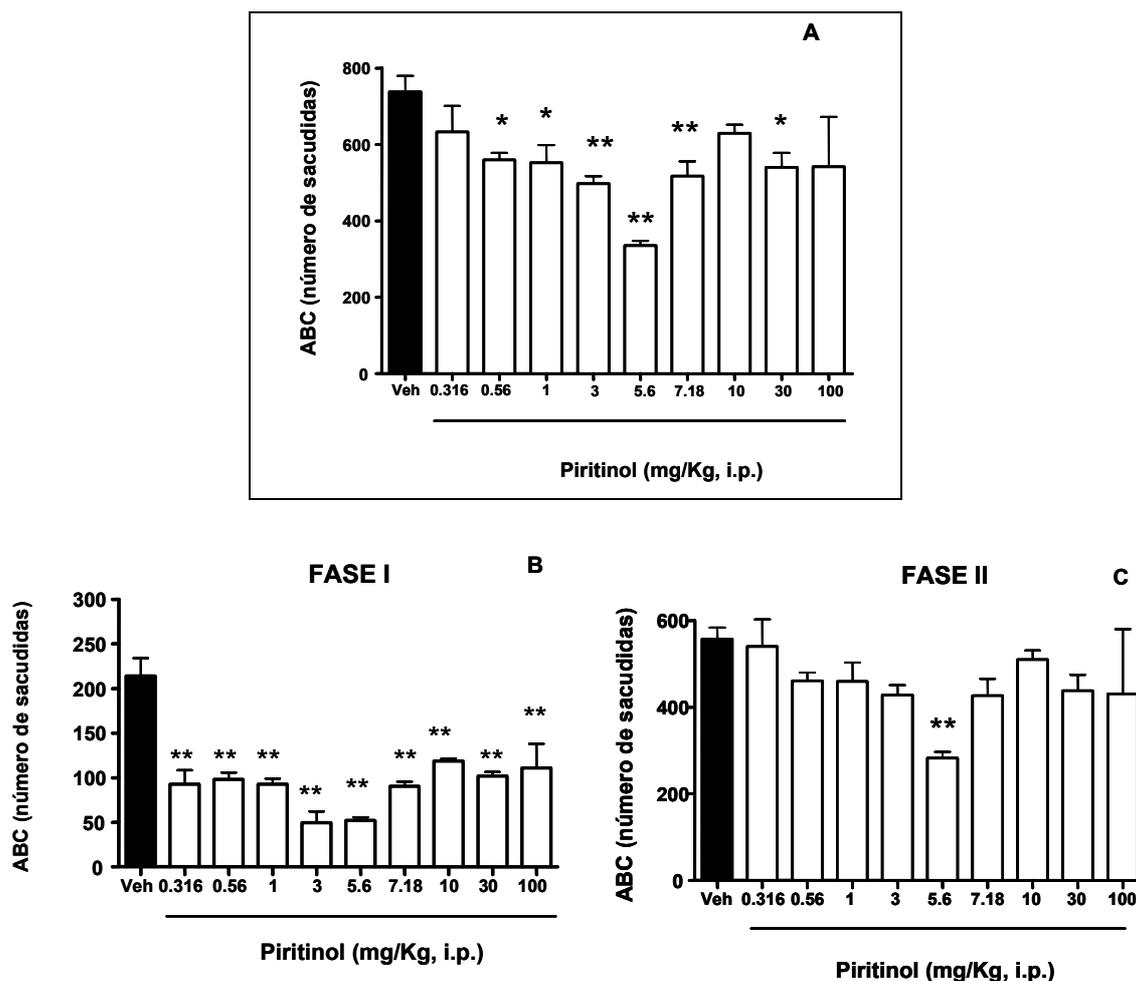


Figura 12. Efecto antinociceptivo del piritinol en la prueba de la formalina. Los datos se expresan como el ABC en ambas fases (panel A), en la Fase I (panel B) y en la Fase II (panel C) y como un promedio de 6 animales \pm e.e, evaluado durante un periodo de 60 min. La diferencia estadística es con respecto al vehículo, ** ($P < 0.01$), determinada por un análisis de varianza de una vía, seguida de una prueba de Dunnet.



7.4. Evaluación del efecto antinociceptivo de la combinación de gabapentina con piritinol

En la tabla 3 y 4 se muestra el efecto antinociceptivo de la administración de gabapentina y piritinol, expresado en porcentaje. Con estos datos se determinó que el piritinol ($DE_{50} = 6.34 \pm 2.0$ mg/Kg) es un fármaco más potente que la gabapentina ($DE_{50} = 91.96 \pm 16.71$) de acuerdo a su DE_{50} .

Tabla 3. Efecto antinociceptivo de gabapentina en la prueba de la formalina

Dosis	ABC	% Efecto antinociceptivo
vehículo	741.2	0
3	597.1	19.4
10	584.2	21.2
30	510.8	31.1
100	337.8	54.4
300	261.3	64.8

El ABC se expresa como el efecto antinociceptivo de la Fase I y la Fase II en la prueba de la formalina y corresponde al promedio de 6 animales.

El % de efecto antinociceptivo es con respecto al vehículo.

Tabla 4. Efecto antinociceptivo de piritinol en la prueba de la formalina

Dosis	ABC	% Efecto antinociceptivo
vehículo	741.25	0
0.56	559.1	24.5
1	545.4	26.4
3	497.0	32.9
5.6	334.5	54.9

El ABC se expresa como el efecto antinociceptivo de la Fase I y la Fase II en la prueba de la formalina y corresponde al promedio de 6 animales.

El % de efecto antinociceptivo es con respecto al vehículo.

Una vez determinada la DE_{50} y siguiendo el método de Tallarida, se calcularon cuatro combinaciones experimentales con una proporción 0.67:0.33 y cuatro combinaciones en una proporción 0.5:0.5 de gabapentina y piritinol respectivamente. En la Tabla 5 y 6 se muestran las combinaciones



experimentales evaluadas, así como el efecto antinociceptivo experimental determinado en cada una de ellas.

Tabla 5. Dosis de la combinación de gabapentina con piritinol (0.67:0.33) para la construcción del isoblograma.

Gabapentina (mg/Kg)	Piritinol (mg/Kg)	Dosis total (mg/Kg)	% Efecto antinociceptivo
56.0	1.6	57.6	33.6
28.0	0.8	28.8	49.4
14.7	0.4	15.1	33.4
7.0	0.2	7.2	20.7

C1=7.2; C2=15.1; C3=28.8; C4=57.6 (mg/Kg, i.p.)

Tabla 6. Dosis de la combinación de gabapentina con piritinol (0.5:0.5) para la construcción del isoblograma.

Gabapentina (mg/Kg)	Piritinol (mg/Kg)	Dosis total (mg/Kg)	% Efecto antinociceptivo
56.0	3.3	59.3	47
28.0	1.6	29.6	28.5
14.7	0.8	15.5	29.5
7.0	0.4	7.4	28.8

C1= 7.4; C2=15.5; C3= 29.6; C4=59.3 (mg/Kg, i.p.)

En la Figura 13 se muestra que el efecto antinociceptivo generado por la combinación de gabapentina con piritinol en una proporción 0.67:0.33 respectivamente. Se observa un efecto antinociceptivo dependiente de la dosis tanto en Fase I como en Fase II de la prueba de la formalina. Sin embargo, en la última combinación el efecto se revierte, esto se debe al aumento de la dosis tanto de gabapentina como de piritinol.



Cuando se evaluó el efecto antinociceptivo individual del piritinol se encontró que al aumentar la dosis se generaba un efecto pronociceptivo, esto mismo podría estar pasando cuando se combina una dosis alta de piritinol con gabapentina. Aún cuando la dosis de piritinol en la combinación es baja (1.6 mg/Kg) con respecto a la máxima dosis evaluada de manera individual del piritinol (5.6 mg/Kg) debe existir una interacción entre ambos fármacos para que el efecto se revierta. Probablemente, el efecto sea farmacodinámico debido a que ambos fármacos actúan en el sistema gabaérgico.

Por otra parte, cuando se combina gabapentina con piritinol en proporción 0.5:0.5 se observa una disminución del efecto nociceptivo en las combinaciones evaluadas. Sin embargo, este efecto no es dependiente de la dosis (Figura 14). Con esta proporción de combinación se determinó que la disminución del efecto antinociceptivo podría atribuirse solo a un efecto local y/o periférico, ya que en la Fase I de la prueba de la formalina es en donde se presenta el efecto antinociceptivo y no en la Fase II como se observa en la Figura 14. En este caso la combinación en proporción 0.5:0.5 no es adecuada, esto probablemente porque se está utilizando una cantidad mayor de piritinol con respecto a la proporción 0.67:0.33, en donde la cantidad de piritinol es menor.

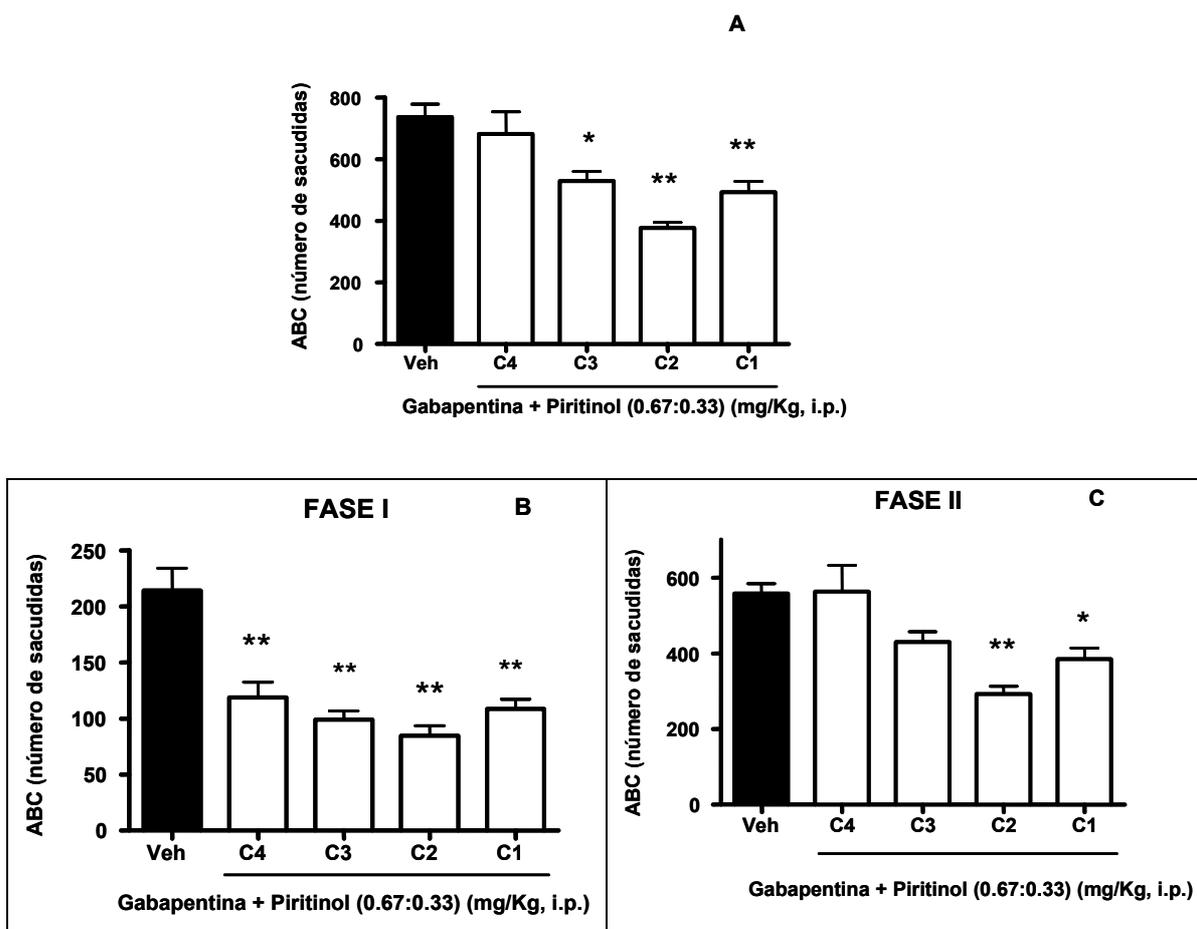


Figura 13. Efecto antinociceptivo de la combinación de gabapentina con piritinol (0.67:0.33) en la prueba de la formalina. Los datos se expresan como el ABC en ambas fases (panel A), en la Fase I (panel B) y en la Fase II (panel C) y como un promedio de 6 animales \pm e.e, evaluado durante un periodo de 60 min. La diferencia estadística es con respecto al vehículo, ** ($P < 0.01$), determinada por un análisis de varianza de una vía, seguida de una prueba de Dunnet.

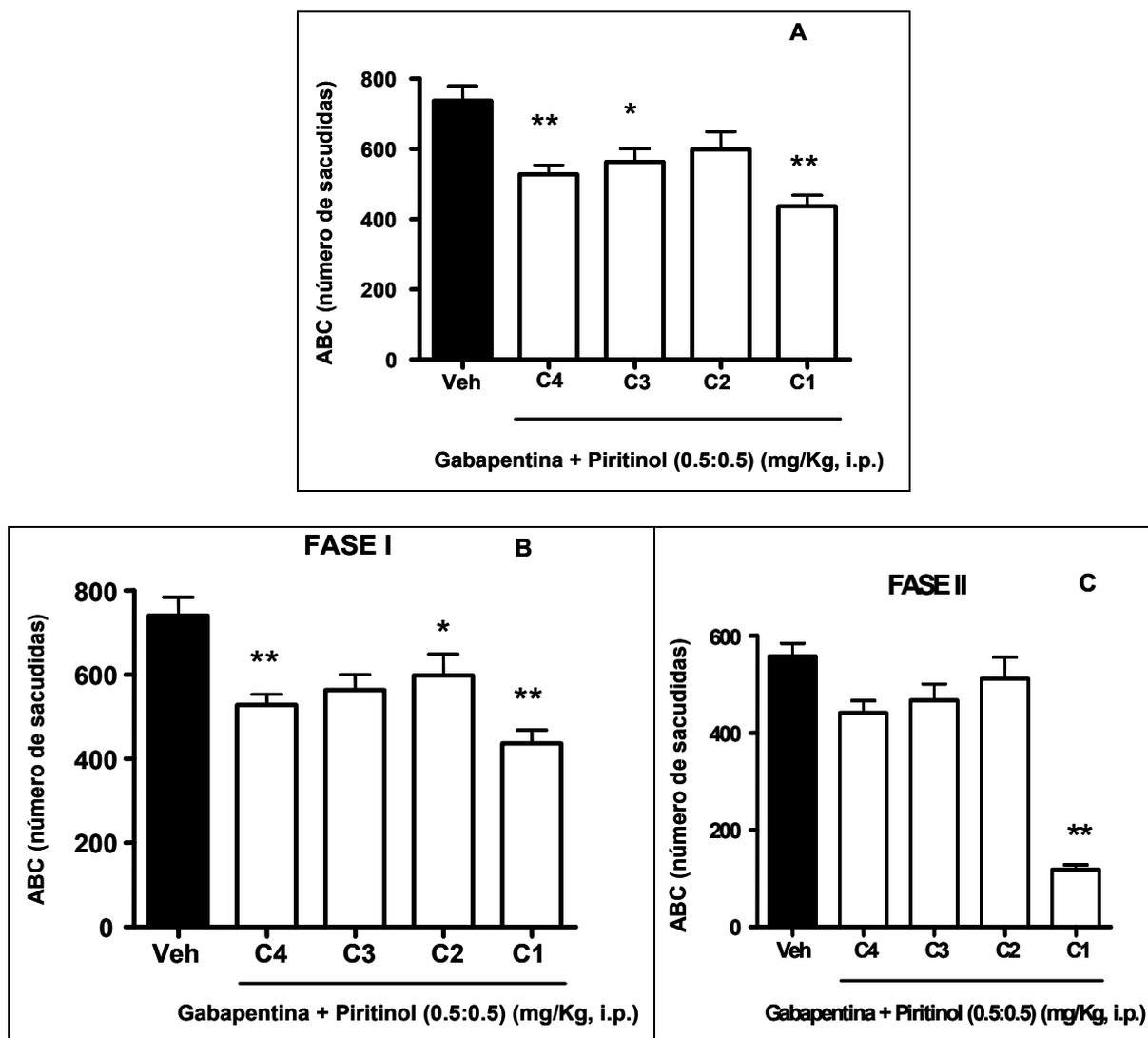


Figura 14. Efecto antinociceptivo de la combinación de gabapentina con piritinol (0.5:0.5) en la prueba de la formalina. Los datos se expresan como el ABC en ambas fases (panel A), en la Fase I (panel B) y en la Fase II (panel C) y como un promedio de 6 animales \pm e.e, evaluado durante un periodo de 60 min. La diferencia estadística es con respecto al vehículo, ** ($P < 0.01$), determinada por un análisis de varianza de una vía, seguida de una prueba de Dunnet.

Considerando las DE_{50} se construyeron dos isobogramas (Figura 15 y 16) de la combinación de gabapentina con piritinol en una proporción 0.67:0.33 ($DE_{50}=85.87\pm 43.81$ mg/kg, i.p.) y 0.5:0.5 ($DE_{50}=13.23\pm 1.27$ mg/kg i.p.). Mediante una prueba de t de *Student* se determinó que no existe diferencia estadística entre la DE_{50} de la combinación de gabapentina y piritinol en proporción 0.5:0.5 con respecto al valor teórico de Zadd (34.59 ± 5.67 mg/kg), por lo que no existe interacción entre ambos fármacos. En el caso de la



combinación de gabapentina con piritinol en proporción 0.67:0.33 se presenta un efecto de antagonismo.

Los isobogramas obtenidos en el presente trabajo permiten establecer que la combinación de gabapentina con piritinol no es adecuada para el tratamiento del dolor. Aún cuando algunas combinaciones mostraron un efecto de potenciación a bajas dosis de piritinol, al realizar el análisis en conjunto se determinó que la interacción entre ambos fármacos no sería una alternativa terapéutica útil para mejorar el efecto antinociceptivo que tiene gabapentina.

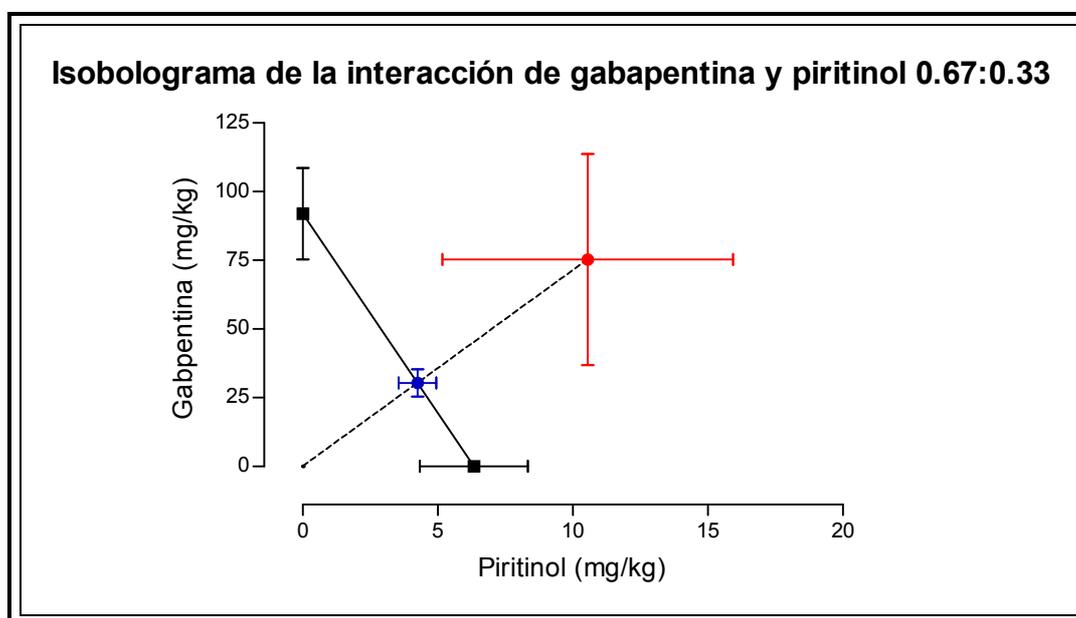


Figura 15. Isoblograma de la combinación de gabapentina y piritinol en proporción 0.67:0.33.

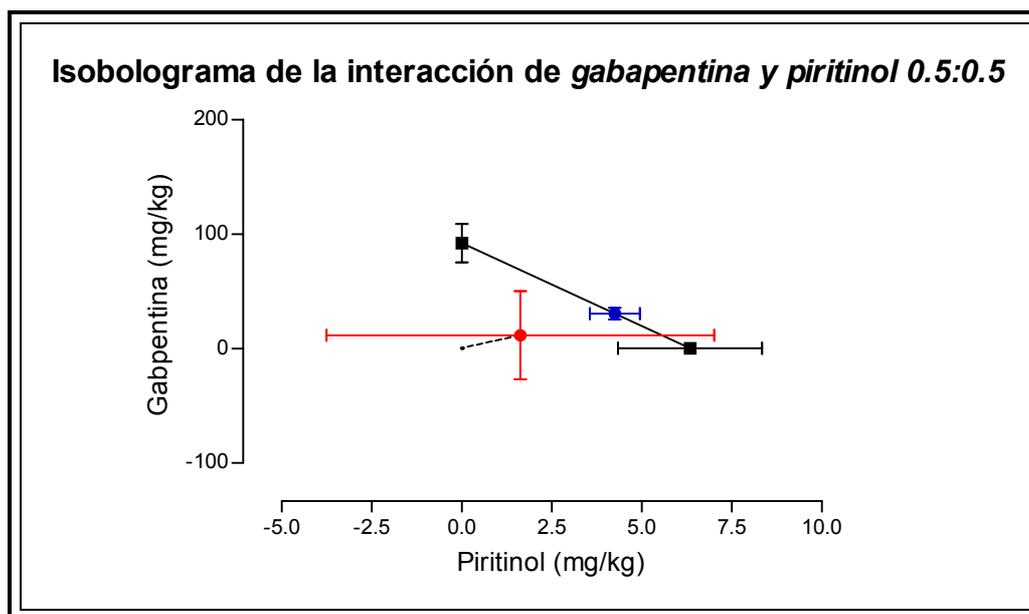


Figura 16. Isoblograma de la combinación de gabapentina y piritinol en proporción 0.5:0.5.

Se realizó una comparación de los efectos antinociceptivos individuales de gabapentina y piritinol con respecto a la combinación de ambos fármacos. En la Figura 15 se observa que cuando se combina gabapentina (1 mg/Kg) con piritinol (10 mg/Kg) a dosis que no tienen efecto antinociceptivo, se observa que ambos pueden generar antinocicepción (Figura 17). Lo mismo ocurre cuando se combina una dosis de gabapentina de 10 mg/Kg con 1 mg/Kg de piritinol, en donde en ambos casos existe un efecto pobre de antinocicepción, el efecto antinociceptivo resultante de la combinación se incrementa (Figura 17).

Siguiendo con la comparación; en la Figura 17 y 18 se observa que una dosis alta de gabapentina (10 mg/Kg) con una dosis baja de piritinol (1 mg/Kg) tiene mejor efecto antinociceptivo que si se invierte la combinación y ahora la dosis más alta es para piritinol (10 mg/Kg) y la más baja para gabapentina (1 mg/Kg). Estos datos sugieren que efectivamente el piritinol tiene una interacción muy interesante con los receptores gabaérgicos para disminuir el efecto antinociceptivo de la gabapentina. Estos resultados también sugieren que el empleo de dosis muy bajas de piritinol pueden incrementar el efecto antinociceptivo de la gabapentina (Figura 18).

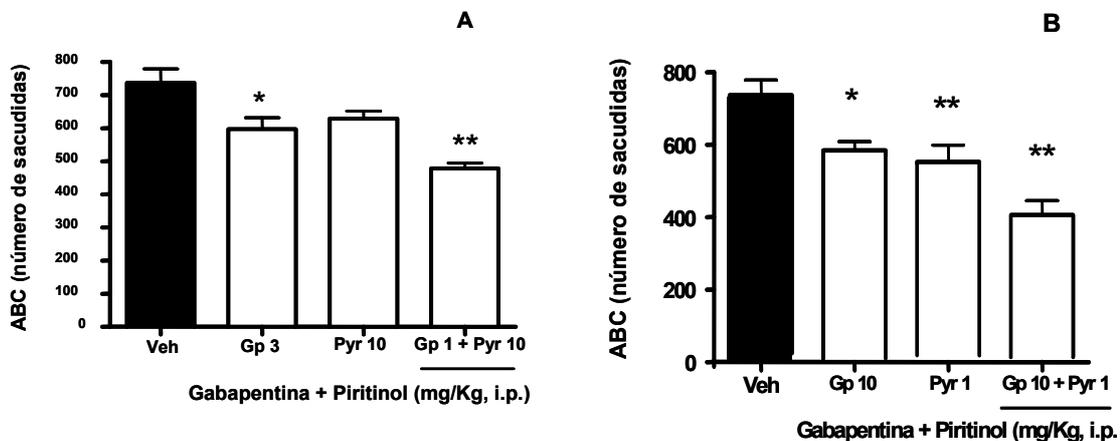


Figura 17. Efecto antinociceptivo de la combinación de gabapentina (10 y 1 mg/Kg) con piritinol (1 y 10 mg/Kg) en la prueba de la formalina. Los datos se expresan como el ABC en ambas fases y como un promedio de 6 animales \pm e.e, evaluado durante un periodo de 60 min. La diferencia estadística es con respecto al vehículo, ** ($P < 0.01$), determinada por un análisis de varianza de una vía, seguida de una prueba de Dunnet. En el panel A se muestra el efecto antinociceptivo de la combinación gabapentina (1m/Kg) con piritinol (10 mg/Kg). El panel B representa la combinación de gabapentina (10 mg/Kg) con piritinol (1 mg/Kg).

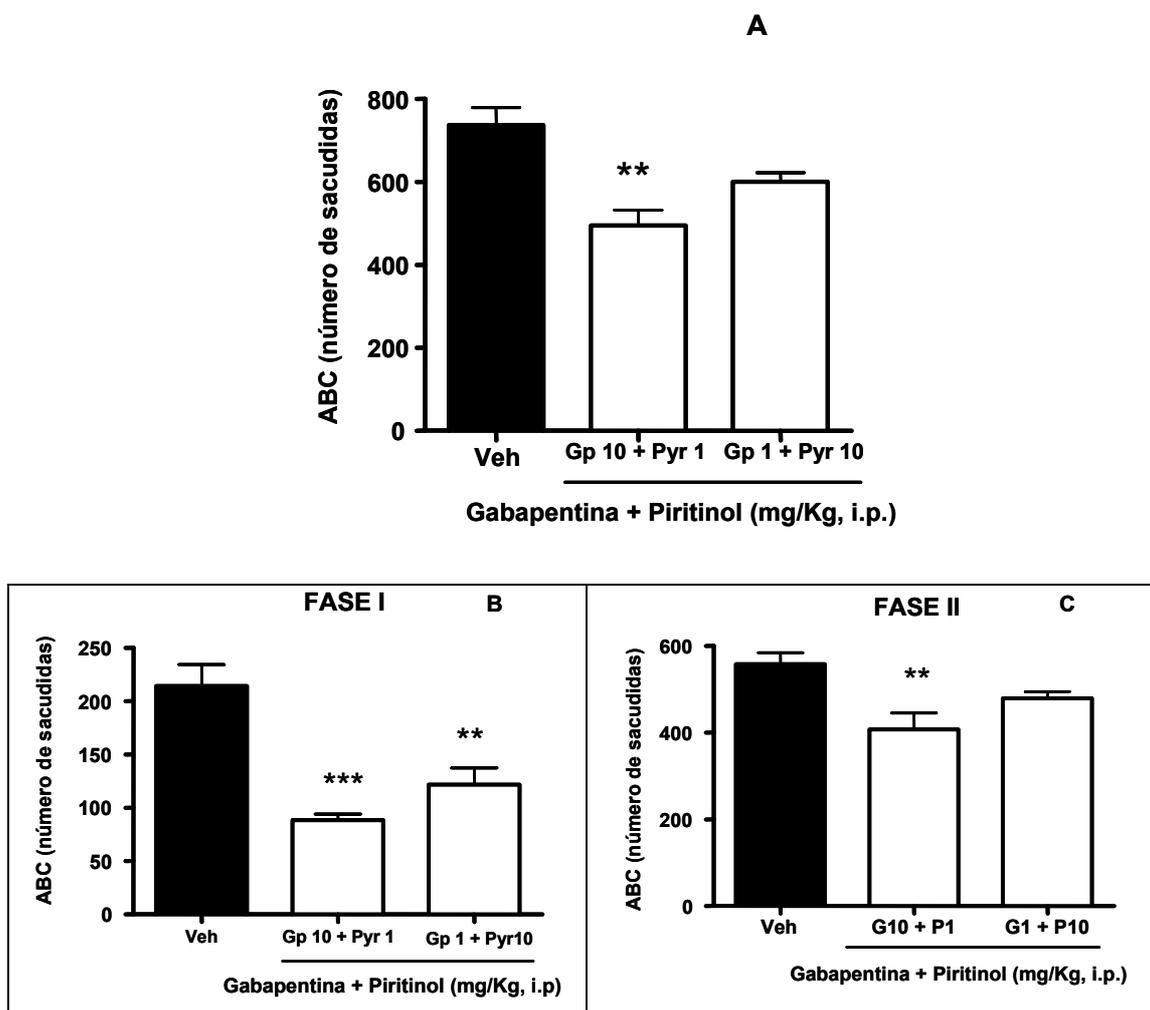


Figura 18. Efecto antinociceptivo de la combinación de gabapentina (10 y 1 mg/Kg) con piritinol (1 y 10 mg/Kg), respectivamente, en la prueba de la formalina. Los datos se expresan como el ABC en ambas fases (panel A), en la Fase I (panel B) y en la Fase II (panel C) y como un promedio de 6 animales \pm e.e, evaluado durante un periodo de 60 min. La diferencia estadística es con respecto al vehículo, ** ($P < 0.01$), determinada por un análisis de varianza de una vía, seguida de una prueba de Tukey.



8. CONCLUSIONES

1.- En el presente estudio se determinó que el piritinol tiene un efecto dual en la prueba de la formalina, con dosis menores a 5.6 mg/Kg tiene un efecto antinociceptivo y a dosis mayores de 7.1mg/Kg genera un efecto pronociceptivo.

2.- Mediante un análisis isoblográfico se determinó que la combinación de piritinol con gabapentina genera un efecto de antagonismo cuando se combinan en proporción 0.67:0.33 y no existe interacción cuando se combinan en proporción 0.5:0.5.

3.- Se determinó que la no interacción y/o antagonismo se debe al efecto del piritinol a dosis altas.



9. PERSPECTIVAS

1.- El piritinol generó un efecto antinociceptivo en la prueba de la formalina, sin embargo su ventana de actividad biológica es muy pequeña. Por lo que sería adecuado cambiar la prueba experimental nociceptiva para determinar si se repite esta actividad o depende del tipo de dolor que se está estableciendo. Para lo cual, se podría evaluar su efecto en la prueba de estiramiento abdominal en donde también se genera un dolor de tipo inflamatorio pero éste es más localizado y no tiene componentes centrales como la fase II de la prueba de la formalina.

2.- Debido a que esta es la primera vez que se determina que el piritinol tiene efecto antinociceptivo y que hasta el momento no se tiene ningún reporte al respecto, se sugiere que se determine un posible mecanismo de acción para el efecto antinociceptivo. Particularmente, sería conveniente iniciar la búsqueda a través del sistema gabaérgico.

3.- La combinación de gabapentina con piritinol no generó un efecto de potenciación como se esperaba. Sin embargo, el estudio reveló que las dosis bajas de piritinol pueden incrementar el efecto antinociceptivo. Por lo que sería conveniente realizar otro análisis isobolográfico en donde se empleen proporciones en donde el piritinol se encuentre en menor cantidad.



10. BIBLIOGRAFÍA

Abbott F.V., Ocvirka R., Najafee R., Franklin K.BJ. 1999. Improving the efficiency of the formalin test. *Pain* 83, 561-569.

Backonja M.M. 1994. Local anesthetics as adjuvant analgesics. *J Pain Symptom Manage*; 9(8):491-9.

Buvanendran A., Kroin J.S. 2007. Useful adjuvants for postoperative pain management. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol*; 21(1):31-49.

Calixto J., Beirith A., Ferreira J., Santos A., Filho V., Yunes R. 2000. Naturally occurring antinociceptive substances from plants. *Phytother. Res.* 14, 401–418.

Caram-Salas N.L., Reyes-García G., Medina-Santillán R., Granados-Soto V. 2006. Thiamine and cyanocobalamin relieve neuropathic pain in rats: synergy with dexamethasone. *Pharmacology*; 77(2):53-62.

Caviedes B.E., Herranz J.L. 2002. Advances in physiopathology and the treatment of neuropathic pain. *Rev Neurol*;35(11):1037-48.

Cheng J., Chiou L. 2006. Mechanisms of the antinociceptive action of gabapentina. *J Pharmacol Sci* 100, 471 – 486.

Covino BG, Dubner R, Gybels J, Kosterlitz HW, Liebeskind JC, Sternbach RA, Vyclicky L, Yamamura H, Zimmermann M. 1980. Ethical standards for investigations of experimental pain in animals. *Pain*; 9: 141-143.

Curry W.J., Kulling D.L. 1998. Newer antiepileptic drugs: gabapentin, lamotrigine, felbamate, topiramate and fosphenytoin. *Am Fam Physician.* 1;57(3):513-20.



Field M.J., Oles R.J., Lewis A.S., McCleary S., Hughes J., Singh L. 1997. Gabapentin (neurontin) and S-(+)-3-isobutylgaba represent a novel class of selective antihyperalgesic agents. *British Journal of Pharmacology*; 121, 1513 – 1522.

Franca D.S., Souza A.L., Almeida K.R., Dolabella S.S., Martinelli C., Coelho M.M. 2001. B vitamins induce an antinociceptive effect in the acetic acid and formaldehyde models of nociception in mice. *European Journal Pharmacology*, 421 (3): 157-164.

Grabovsky Y., Tallarida R.J. 2004. Isobolographic analysis for combinations of a full and partial agonist: curved isoboles. *J. Pharmacol Exp Ther*, 310 (3): 981-986.

Granados-Soto V., Sánchez-Ramírez G., Rosas de la Torre M., Caram-Salas N.L., Medina-Santillán R., Reyes-García G. 2004. Effect of diclofenac on the antiallodynic activity of vitamin B₁₂ in a neuropathic pain model in the rat. *Proc West Pharmacol Soc*, 47: 92-94.

Guindon J., Walczak J.S., Beaulieu P. 2007. Recent advances in the pharmacological management of pain. *Drugs*; 67 (15): 2121-2133.

Hacimuftuoglu A., Handya C.R., Goettl V.M., Lin C.G., Danea R.L., Stephens Jr. 2006. Antioxidants attenuate multiple phases of formalin-induced nociceptive response in mice. *Behavioural Brain Research*, 173: 211–216.

Helmut S. 1997. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Experimental Physiology*, 82: 291-295.

Hindmarch I., Coleston D., Kerr J. 1990. Psychopharmacological effects of pyritinol in normal volunteers. *Neuropsychobiology* 24 (3): 159-64.



Julius D., Basbaum A. 2001. Molecular mechanisms of nociception. *Nature*, 413: 203-210.

Jurna I. 1998. Analgesic and analgesia-potentiating action of B vitamins. *Schmerz*, 12 (2): 136-141.

Knotkova H., Pappagallo M. 2007. Adjuvant analgesics. *Anesthesiol Clin.*; 25(4):775-86.

Kong V.K.F., Irwin M.G. 2007. Gabapentin: a multimodal perioperative drug?. *British Journal of Anaesthesia* 99 (6): 775–86.

Lee I., Jeong Y. 2002. Effects of different concentrations of formalin on paw edema and pain behaviors in rats. *J Korean Med Sci*; 17: 81-5

López-Muñoz F.J., Granados V. 1998. Emplear o no fármacos para el alivio del dolor. *Avance y perspectiva*. 219-225.

Lussier D., Huskey A.G., Portenoy R.K. 2004. Adjuvant analgesics in cancer pain management. *Oncologist*;9(5):571-91.

Medina-Santillán R., Reyes-García G., Rocha-González H.I., Granados-Soto V. 2004. B vitamins increase the analgesic effect of ketorolac in the formalin test in the rat. *Proc West Pharmacol Soc*, 47: 95-99.

Millan M.J. 2002. Descending control of pain. *Prog Neurobiol*, 66: 355-474.

Miranda H.F., Puig M.M., Prieto J.C., Pinardi G. 2006. Synergism between paracetamol and nonsteroidal anti-inflammatory drugs in experimental acute pain. *Pain* 121 (2006) 22–28.



- Onal S.A. 2006. Adjuvant analgesics in pain management. *Agri*;18(4):10-23.
- Onghena P., Van-Houdenhove B. 1992. Antidepressant-induced analgesia in chronic non-malignant pain: a meta-analysis of 39 placebo-controlled studies. *Pain*, 49: 205-219.
- Ortiz M.I., Medina-Tato D.A., Sarmiento-Heredia D., Palma-Martínez J., Granados-Soto V. 2006. Possible activation of the NO–cyclic GMP–protein kinase G–K⁺ channels pathway by gabapentin on the formalin test. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 83, 420–427.
- Pitcher G.M., Henry J.L. 2002. Second phase of formalin-induced excitation of spinal dorsal horn neurons in spinalized rats is reversed by sciatic nerve block. *Eur J Neurosci.*; 15(9):1509-15.
- Portenoy R.K. 2000. Current pharmacotherapy of chronic pain. *J Pain Symptom Manage*; 19(1 Suppl):S16-20.
- Pozos-Guillén A.J., Aguirre-Bañuelos P., Arellano-Guerrero A., Castañeda-Hernández G., Hoyo-Vadillo C., Pérez-Urizar J. 2006. Isobolographic analysis of the dual-site synergism in the antinociceptive response of tramadol in the formalin test in rats. *Life Sci* 10;79(24):2275-82.
- Puebla-Díaz F. 2005. Tipos de dolor y escala terapéutica de la O.M.S. Dolor iatrogénico. *Oncología*, 28(3): 139-143.
- Reyes-García G., Medina-Santillán R., Terán-Rosales F., Castillo-Henkel C., Rodríguez-Silverio J., Torres-López J.E., Ochoa-Cetina L., Medina-Tato D.A., Granados-Soto V. 2001. Analgesic effect of B vitamins in formalin-induced inflammatory pain. *Proc West Pharmacol Soc*, 44: 139-140.



Reyes-García G., Medina-Santillán R., Terán-Rosales F., Mateos-García E., Castillo-Henkel C. 1999. Characterization of the potentiation of the antinociceptive effect of diclofenac by vitamin B complex in the rat. *J Pharmacol Toxicol Methods*, 42 (2): 73-77.

Rocha-González H.I., Terán-Rosales F., Reyes-García G., Medina-Santillán R., Granados-Soto V. 2004. B vitamins increase the analgesic effect of diclofenac in the rat. *Proc West Pharmacol Soc*, 47: 84-87.

Schäfer M. 2002. Opioid / non-opioid drug combinations. *IASP*, 39: 395-399.

Soares Potes C., Lourença Neto F., Castro Lopes J.M., 2006. Inhibition of pain behavior by GABA_B receptors in the thalamic ventrobasal complex: Effect on normal rats subjected to the formalin test of nociception. *Brain Research* 1115 (1): 37-47.

Tallarida R.J. 1992. Statistical analysis of drug combinations for synergism. *Pain*, 49(1): 93-97.

Tallarida R.J. 2006. An overview of drug combination analysis with isobolograms. *Journal of pharmacology and experimental therapeutics*; 319 (1):1-7.

Tallarida R.J., Murray R.B. 1981. *Manual of pharmacologic calculations with computer programs*. Springer-Verlag, New York; Heidelberg, Berlin.

Tallarida R.J., Porreca F., Cowan A. 1989. Statical analysis of drug and site-site interactions with isobolograms. *Life Sci*, 45 (11): 947-961.

Tjølsen A., Berge O.G, Hunskaar S., Roslan J.H. 1992. The formalin test: an evaluation of the method. *Pain*, 51(1): 5-17.



Turský T. 1988. Pyritinol and the enzymes of gamma-aminobutyric acid (GABA) synthesis and degradation. *Physiol Bohemoslov*;37(2):135-43.

Turský T. 1988. Pyritinol inhibition of the GABA and benzodiazepine receptor. *Physiol Bohemoslov*; 37(5):417-26.

Velasco Martin, Alfonso. *Farmacología*. Ed. Interamericana McGraw Hill, 1993. Pp 97-101.

Watson C.P. 2000. The treatment of neuropathic pain: antidepressants and opioids. *Clin J Pain*, 16 (suppl. 2):S49-S55.

Woolf C.J. 2004. Pain: moving from symptom control toward mechanism-specific pharmacologic management. *Ann Intern Med*, 140 (6):441-451.

Yashpal K., Coderre T.J., 1998. Influence of formalin concentration on the antinociceptive effects of anti-inflammatory drugs in the formalin test in rats: separate mechanisms underlying the nociceptive effects of low- and high-concentration formalin. *Eur J Pain*; 2(1):63-68.

Zhang W. 2001. A benefit-risk assessment of caffeine as an analgesic adjuvant. *Drug Safety*; 24 (15): 1127-1142.