

Colaboraciones Especiales Grupo ABC

Efecto analgésico de los antagonistas del receptor histamínico H en el modelo de dolor inducido por formalina en ratas.

Analgesic effect of histamine H2 receptor antagonists on formalin-induced pain model in rats. Publicado en la Revista Dor, São Paulo, 2011 Jul-set;12(3):240-4.



HAZEM ADEL ASHMAWI, MD
ANESTESIÓLOGO

AUTORES:

**FERNANDA DEUTSCH¹; HAZEM ADEL ASHMAWI²;
CLÁUDIA CARNEIRO DE ARAÚJO PALMEIRA³;
IRIMAR DE PAULA POSSO⁴**

¹ Médico Asistente, Laboratorio de Anestesiología Experimental LIM-08, Facultad de Medicina Universidad de San Pablo SP, Brasil.

² Profesor Asistente de Anestesiología y Médico del grupo de control del Dolor Laboratorio de Anestesiología Experimental LIM-08, Facultad de Medicina Universidad de San Pablo SP, Brasil.

³ Anestesiólogo del Hospitale Pérola Byington, Centro de referencia de Salud femenina. San Pablo, SP, Brasil.

⁴ Profesor Asociado del departamento de Cirugía, Facultad de Medicina Universidad de San Pablo SP, Brasil. Responsable del grupo de control del Dolor. Laboratorio de Anestesiología Experimental LIM-08. Facultad de Medicina Universidad de San Pablo SP, Brasil.

*Recibido desde el Laboratorio de Anestesiología Experimental LIM-08, Facultad de Medicina Universidad de San Pablo SP – Brasil.

E-mail: hazem@hcnet.usp.br

Resumen

Racional y Objetivos: Los Antagonistas de los receptores de histamina presentan efectos sobre el dolor. Los Antagonistas del receptor de histamina H presentan efecto analgésico local, y el papel de los antagonistas del receptor H sobre el dolor en el sistema nervoso periférico todavía no está aclarado. Este estudio tiene por objetivo evaluar los efectos de diferentes antagonistas H sobre el dolor inducido por la administración de formalina en extremidades de ratas.

Método: se estudiaron ratas machos divididos en grupos a los que se inyectó formalina en una extremidad y paralelamente diferentes antagonistas del receptor ranitidina, cimetidina y loxitidina, en diferentes concentraciones (0,05 µmol, 0,25 µmol ou 1 µmol). Fue evaluado el número de elevaciones de la extremidad inyectada durante un período de 45 minutos.

Resultados: La loxitidina inhibió el número de elevaciones de la extremidad inyectada en las dos fases del test a partir de las tres concentraciones utilizadas, la ranitidina disminuyó el número de elevaciones de la pata a partir de la concentración de 0,25 µmol en la fase II. La cimetidina no inhibió ese comportamiento doloroso.

Conclusión: De acuerdo con los resultados de este estudio, algunos antagonistas del receptor H presentan un efecto analgésico local, que parece ser fármaco específico y no de clase farmacológica específica.

Palabras Clave: cimetidina; dolor; formalina; loxitidina; ranitidina; ratas.

Abstract.

Background and Objectives: Histamine receptor antagonists affect pain perception. H receptor antagonists present local analgesic effect, but the role of H receptor antagonists on pain in the peripheral nervous system is not clear yet. This study aimed at evaluating the effects of different H receptor antagonists on pain induced by formalin injected in the paw of rats.

Method: Male rats were studied and divided into groups that received formalin and different H receptor antagonists - ranitidine, cimetidine 2 and loxidine, injected in the paw at different concentrations (0.05 μmol , 0.25 μmol or 1 μmol). The number of flinches was evaluated during 45 minutes.

Results: Loxidine inhibited the number of flinches in both phases of the test with the three different concentrations. Ranitidine decreased the number of flinches in phase II as from 0.25 μmol . Cimetidine did not affect pain behavior.

Conclusion: According to the results of this study, some H₂ receptor antagonists have local analgesic effects, which seem to be drug-specific and not pharmacological class-specific.

Key words: Cimetidine; Formalin; Loxidine; Pain; Ranitidine; Rats.

Introducción.

La Histamina, presente en la mayoría de las células, es un conocido mediador del dolor desde el comienzo del último siglo. Esta sustancia activa nociceptores polimodales e induce dolor al inyectarse en la piel. La sustancia es liberada en la piel lastimada y produce dolor, vasodilatación y edema local (1). La acción de la Histamina es mediada por al menos cuatro receptores farmacológicos diferentes ligados a la proteína G.

El receptor H₁ se expresa en las células endoteliales, del cerebro y del músculo liso. Sus acciones principales son la contracción del músculo liso y el incremento de la potencia vascular (2). El receptor la secreción ácida gástrica y los antagonistas del receptor H son extensamente usados para tratar úlceras gastrointestinales (3). Los receptores H₂ la secreción ácida gástrica y los antagonistas del receptor H son extensamente usados para tratar úlceras gastrointestinales (3). Los receptores H₂ están localizados en las terminaciones nerviosas y cuerpos celulares de las

neuronas histaminérgicas presentes en los núcleos hipotalámicos tuberomamillares (4). Este receptor actúa inhibiendo la Conductancia al Ca²⁺, disminuyendo la despolarización neuronal la liberación de Histamina.

El receptor H₄ es muy similar al H₃, pero está expresado en células hematopoyéticas, especialmente eosinófilos, basófilos y células mastocitos (5). Su rol biológico es aún poco conocido y parece jugar un rol en la inflamación dado que está limitado a las células hematopoyéticas (6).

La Histamina tiene una acción diferente en el Sistema Nervioso central (SNC) y Periférico (SNP). En el SNC la histamina posee acciones pro y anti-nociceptivas, y cuando aumenta el umbral del dolor (6,7) parece que el receptor H₂ está en juego, mientras que es el receptor H₁ el que está relacionado con su acción pronociceptiva (8-10). Los antagonistas del receptor H₁ tienen acción supraespal, localizada en los núcleos dorsales del rafe o alrededor de la sustancia gris pericueductal (11) y actúa a través de los receptores pre-sinápticos (8). Los antagonistas del receptor H₂, tales como famotidine y lupitidine han demostrado tener acciones antinociceptivas al ser administradas de forma sistémica (12).

Aunque está ampliamente expresado en el SNC el receptor H₃ no parece estar relacionado en la modulación del dolor (13). La Histamina periférica está relacionada con la estimulación de las fibras nociceptivas y sus antagonistas tienen efecto antinociceptivo y su estudio ha sido omitido.

La Pirilamina y la Cimetidina, las cuales son antagonistas del receptor H₁, han demostrado tener efectos analgésicos luego de la inyección de formalina en la pata de ratas (14,15).

Un trabajo previo ha demostrado efectos analgésicos periféricos en diferentes antagonistas del receptor H₁, con posibles efectos antiinflamatorios y anestésicos locales (16).

Los efectos analgésicos periféricos de los antagonistas del receptor H₂ necesitan más estudios comprobatorios. El presente trabajo tuvo por objetivo evaluar los efectos analgésicos de tres antagonistas del receptor H₂: Ranitidina, Loxtidina y Cimetidina, sobre el número de tuteos inducidos por inyección de formalina en la extremidad de ratas.

Materiales y Métodos.

Luego de la aprobación del Comité de ética para el Análisis de Proyectos de Investigación (CAPPesq), del Hospital de Clínicas de la Facultad de Medicina, Universidad de San Pablo (Expediente N 938/01), este estudio fue llevado a cabo con las guías para investigación experimental del Dolor en animales, de acuerdo al establecido la Asociación Internacional para el Estudio del Dolor (IASP) (17).

La muestra fue de 50 ratas Wistar machos, pesando entre 280 y 350 g, entregadas por el Bioterio Central de la Facultad de Medicina de la Universidad de San Pablo.

Los animales fueron divididos en grupos de cinco: control (50 μ L al 1% de formalina inyectada en la región dorsal de la pata trasera derecha); tres diferentes dosis fueron usadas para cada droga, siempre administrada junto a formalina al 1%, in a l volumen total de 50 μ L en la pata del animal. Las dosis fueron: 0.05 μ mol (ran-0.05, lox-0.05, cim-0.05), 0.25 μ mol (ran-0.25, lox-0.25, cim-0.25) y 1 μ mol (ran-1, lox-1, cim-1).

El hydrocloridrato de Ranitidina fue suministrado por el Laboratorio GlaxoSmithKline de Brasil, el hydrocloridrato de loxidina fue donado por Solvay Pharmaceuticals, San Pablo, SP, Brasil, y el hydrocloridrato de cimetidina fue suministrado por el Laboratorio Teuto Brasileiro, Anápolis, GO, Brasil.

Los animales tuvieron libre acceso a comida y agua y fueron sometidos a un ciclo de luz y oscuridad de 12 horas cada uno. Todos los experimentos fueron realizados entre las 9.00 y las 15.00 Hs.

El dolor fue inducido por inyección de formalina al 1% (50 μ L) en la pata trasera izquierda del animal. Antes de la inyección los animales fueron colocados en una cámara de observación de vidrios transparentes para adaptarse al ambiente durante 45 minutos.

Los titubeos fueron contados cada cinco minutos. Todos los movimientos no asociados a locomoción fueron considerados titubeos, los cuales desde leves observados como contracción del muslo, o más vigorosos movimientos de la extremidad estudiada. Los titubeos son fáciles de observar y cuantificar (14-19,20).

Los datos fueron analizados por Análisis de Varianza (ANOVA), comparando el número de titubeos de los grupos experimentales con el grupo control. Las comparaciones

fueron realizadas en las dos fases del estudio. Cuando hubo diferencias significativas se usó el procedimiento de comparaciones múltiples de Bonferroni.

Las comparaciones fueron hechas entre grupos que recibieron la misma dosis. El nivel de significación se estableció a 5% ($p < 0.05$).

Resultados.

La evolución del número de titubeos después de la inyección de formalina en diferentes grupos se muestra en las figuras 1, 2 y 3. La formalina produjo una respuesta bifásica en fase I (primeros 10 minutos), en la fase intermedia y en la fase II (desde 15-20 minutos hasta finalizar el test).

En la fase I, la loxidina inhibió los titubeos a last res dosis, la ranitidine y la cimetidin no cambiaron el test a las diferentes dosis (Figura 4) En la fase II, la loxidina ha demostrado el mismo patrón de inhibición, disminuyendo el número de titubeos a last res dosis (0.05 μ mol, 0.25 μ mol y 1 μ mol), la ranitidina disminuyó el número de titubeos a la mayor dosis (1 μ mol) y l cimetidina no modificó el comportamiento doloroso en la fase II (Figura 5).

Discusión.

Hemos evaluado los efectos analgésicos de tres antagonistas del receptor H en el modelo de dolor inducido por formalina en ratas. La Formalina induce un comportamiento doloroso bifásico: la fase I, el cual es fásico y rápido y directamente estimula los nociceptores, y el fase II, el cuales es tónico, más prolongado y donde la estimulación dolorosa es inflamatoria (14-22).

Se utilizó el número de titubeos, o una variante del test de formalina.

El número de titubeos se usó para cuantificar el comportamiento doloroso inducido por formalina debido a que tiene una importante correlación con el test clásico de Formalina y con cambios cardiovasculares en respuesta al dolor inducido por Formalina en la pata. Este tipo de evaluación muestra correlate confinable sobre el dolor en animales conscientes no sometidos a restricciones físicas. Entre los diferentes comportamientos estereotipados inducidos por formalina, la frecuencia de titubeo ha sido ampliamente utilizada (14-16,9,20,23-25).

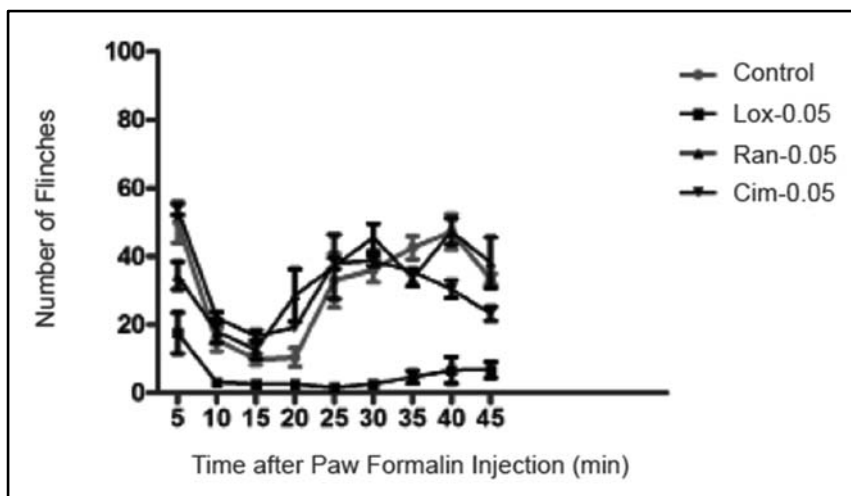


Figura 1. Efectos de 0.05 μmol de antagonistas del receptor H en el número de titubeos. Datos en Media \pm DS

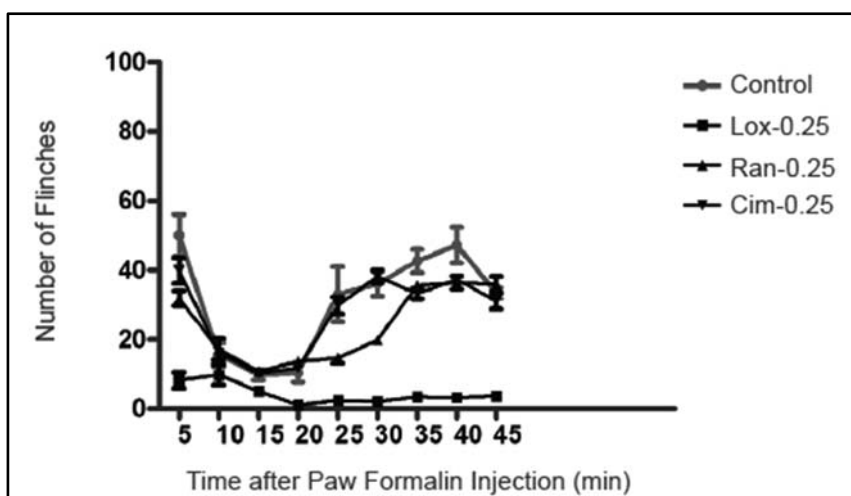


Figura 2. Efectos de 0.25 μmol de antagonistas del receptor H en el número de titubeos. Datos en Media \pm DS

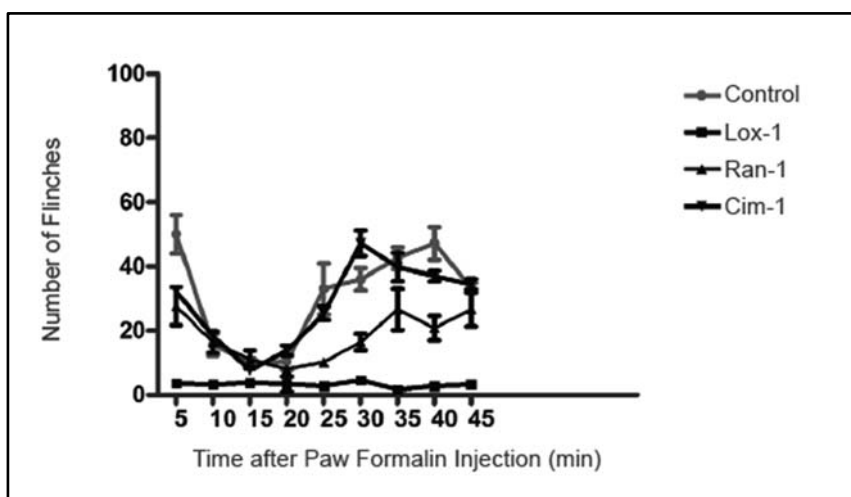


Figura 3. Efectos de 1 μmol de antagonistas del receptor H en el número de titubeos. Datos en Media \pm DS

La mayoría de los estudios sobre los efectos analgésicos de los antagonistas de los receptores de histamina se han enfocado en los efectos centrales (8,12,26-28).

En un estudio de los efectos sistémicos de diferentes antagonistas de los receptores de histamina, la lupitidina y la famotidina demostraron tener efectos analgésicos, mientras la ranitidina no obtuvo efecto analgésicos en dolor visceral o somático (12).

Nuestros datos han demostrado que luego de su administración local, la loxitidina tuvo mayores efectos analgésicos mientras que la ranitidina sólo promovió una analgesia a dosis más altas.

Se han realizado estudios más focalizados en los efectos analgésicos de los antihistamínicos y hallaron una mayor acción analgésica local de los antagonistas de los receptores H1 y menos importantes de los H2 (14,15,18).

La loxitidina y en menor grado la ranitidina, presentaron efectos antinociceptivos. El efecto observado en la segunda fase del test fue el esperado, desde el momento en que el mecanismo generador del dolor fue la acción inflamatoria local de la formalina (16,22,29).

La histamina es un mediador local liberado durante la inflamación, con acción pronociceptiva de este modo, la acción antiinflamatoria de las sustancias antihistamínicas es esperada en esta fase.

Al contrario, el bloqueo en la fase I observado después de la administración de la loxitidina y, en dosis más altas, luego de la ranitidina, no sería de esperar por acción directa del receptor H2, porque se cree que la fase I es resultado de la activación directa de nociceptores por la formalina (30,31). Sin embargo, algunos autores creen que esta fase es también inflamatoria, similarmente a la fase II, la cual podría sostener la acción directa del receptor H2 (14).

Pese a ello, no se cree que la fase I sea inflamatoria, desde que el bloqueo producido por la loxitidina fue muy temprano y causado por un mecanismo diferente. Algunos antagonistas del receptor H1 tienen un efectos anestésico local (18,32), el cual sin embargo no es clase-específico sino más bien fármaco específico (18).

Conclusión.

Nuestros resultados evidenciaron los efectos analgésicos locales de la loxitidina y, en menor grado, de la ranitidina, la cual es fármaco-específico y no clase-específico.

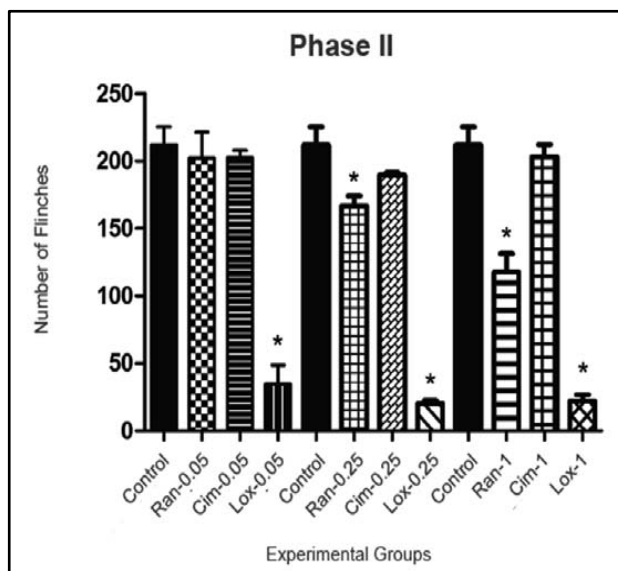


Figura 4. Efectos de los antagonistas del receptor H2 en el número de titubeos en la fase I. La loxitidina inhibió el titubeo a las tres dosis; la ranitidina y la cimetidina no cambiaron el test en la fase I. Datos en Media DS* p < 0.05.

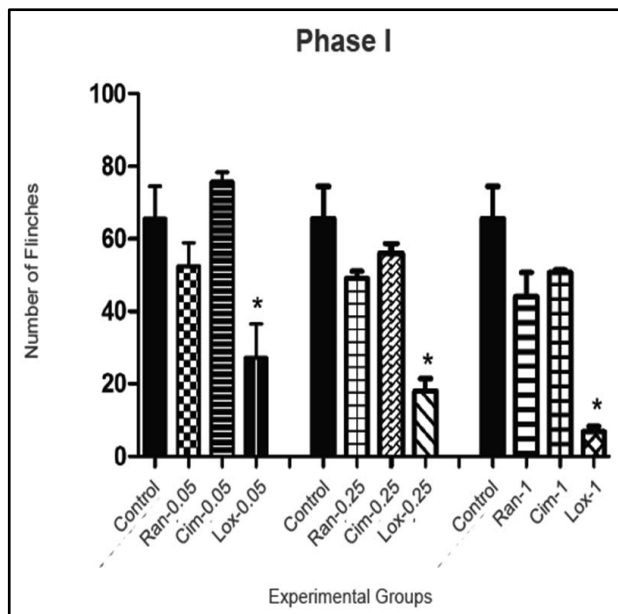


Figura 5. Efectos de los antagonistas del receptor H2 en el número de titubeos en la fase II. La loxitidina inhibió el titubeo a las tres dosis; la ranitidina disminuyó el número de titubeos a la dosis de 1 µmol y la cimetidina no cambió el test en la fase II. Datos en Media DS* p < 0.05.

Referencias.

1. Raffa RB. Antihistamines as analgesics. *J Clin Pharm Ther* 2001;26(1):81-5.
2. Ash AS, Schild HO. Receptors mediating some actions of histamine. *Br J Pharmacol Chemother* 1966;27(2):427-39.

3. Soll AH, Walsh JH. Regulation of gastric acid secretion. *Annu Rev Physiol* 1979;41(1):35-53.
4. Schwartz JC, Arrang JM, Garbarg M, et al. Histaminergic transmission in the mammalian brain. *Physiol Rev* 1991;71(1):1-51.
5. Oda T, Morikawa N, Saito Y, et al. Molecular cloning and characterization of a novel type of histamine receptor preferentially expressed in leukocytes. *J Biol Chem* 2000;275(47):36781-6.
6. Hofstra CL, Desai PJ, Thurmond RL, et al. Histamine H receptor mediates chemotaxis and calcium mobilization of mast cells. *J Pharmacol Exp Ther* 2003;305(3):1212-21.
7. Chung YH, Miyake H, Kamei C, et al. Analgesic effect of histamine induced by intracerebral injection into mice. *Agents Actions* 1984;15(3-4):137-42.
8. Malmberg-Aiello P, Lamberti C, Ghelardini C, et al. Role of histamine in rodent antinociception. *Br J Pharmacol* 1994;111(4):1269-79.
9. Brown RE, Stevens DR, Haas HL. The physiology of brain histamine. *Progr Neurobiol* 2001;63(6):637-72.
10. Galeotti N, Malmberg-Aiello P, Bartolini A, et al. H1-receptor stimulation induces hyperalgesia through activation of the phospholipase C-PKC pathway. *Neuro-pharmacology* 2004;47(2):295-303.
11. Thoburn KK, Hough LB, Nalwalk JW, et al. Histamine-induced modulation of nociceptive responses. *Pain* 1994;58(1):29-37.
12. Abacioglu N, Bediz A, Çakici I, et al. Antinociceptive effects of H1- and H2- antihistaminics in mice. *Gen Pharmacol* 1993;24(5):1173-6.
13. Passani MB, Lin JS, Hancock A, et al. The histamine H receptor as a novel therapeutic target for cognitive and sleep disorders. *Trends Pharmacol Sci* 2004;25(12):618-25.
14. Parada CA, Tambeli CH, Cunha FQ, et al. The major role of peripheral release of histamine and 5-hydroxytryptamine in formalin-induced nociception. *Neuroscience* 2001;102(4):937-44.
15. Ashmawi HA, Chambergo FS, Araújo Palmeira CC, et al. Effects of pyrilamine and cimetidine on mRNA c-fos expression and nociceptive finching behavior in rats. *Anesth Analg* 2003;97(2):541-6.
16. Shibata M, Ohkubo T, Takahashi H, et al. Modified formalin test: characteristic biphasic pain response. *Pain* 1989;38(3):347-52.
17. Zimmermann M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain* 1983;16(2):109-10.
18. Ashmawi HA, Braun LM, Sousa AM, et al. Analgesic effects of H1 receptor antagonists in the rat model of formalin-induced pain. *Rev Bras Anesthesiol* 2009;59(4):461-70.
19. Wheeler-Aceto H, Cowan A. Standardization of the rat paw formalin test for the evaluation of analgesics. *Psychopharmacology* 1991;104(1):35-44.
20. Doak GJ, Sawynok J. Formalin-induced nociceptive behavior and edema: involvement of multiple peripheral 5-hydroxytryptamine receptor subtypes. *Neuroscience* 1997;80(3):939-49.
21. Dubuisson D, Dennis SG. The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats. *Pain* 1977;4(2):161-74.
22. Tjølsen A, Berge OG, Hunskaar S, et al. The formalin test: an evaluation of the method. *Pain* 1992;51(1):5-17.
23. Sousa AM, Franco PA, Ashmawi HA, et al. Local effect of tramadol on formalin evoked flinching behavior in rats. *Rev Bras Anesthesiol* 2008;58(4):371-9.
24. Taylor BK, Peterson MA, Basbaum AI. Persistent cardiovascular and behavioral nociceptive responses to subcutaneous formalin require peripheral nerve input. *J Neurosci* 1995;15(11):7575-84.
25. Teng CJ, Abbott FV. The formalin test: a dose-response analysis at three developmental stages. *Pain* 1998;76(3):337-47.
26. Malmberg-Aiello P, Lamberti C, Ipponi A, et al. Evidence of hypernociception induction following histamine H1 receptor activation in rodents. *Life Sci* 1998;63(6):463-76.
27. Thurmond RL, Desai PJ, Dunford PJ, et al. A potent and selective histamine H receptor antagonists with anti-inflammatory properties. *J Pharmacol Exp Ther* 2004;309(1):404-13.
28. Sakurada S, Watanabe H, Mizoguchi H, et al. Involvement of the histaminergic system in the nociceptin-induced pain-related behaviors in the mouse spinal cord. *Pain* 2004;112(1-2):171-82.
- 29.Coderre TJ, Vaccarino AL, Melzack R. Central nervous system plasticity in the tonic pain response to subcutaneous formalin injection. *Brain Res* 1990;535(1):155-8.
30. Hunskaar S, Hole K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. *Pain* 1987;30(1):103-14.
31. Puig S, Sorkin LS. Formalin-evoked activity in identified primary afferent fibers: systemic lidocaine suppresses phase-2 activity. *Pain* 1996;64(2):345-55.
32. Rumore MM, Schlichting DA. Analgesic effects of antihistaminics. *Life Sci* 1985;36(5):403-16.