



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO



Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas

“Dr. Ignacio Chávez”

División de Estudios de Posgrado

Maestría en Ciencias de la Salud

Efecto de la combinación de metformina y melatonina en la
nocicepción aguda e hiperalgesia y alodinia secundarias

Tesis que presenta:

Médico Cirujano y Partero

Jenny Selene Martínez Guillen

Para obtener el grado de Maestra en Ciencias de la Salud

Director de tesis:

Luis Fernando Ortega Varela

Doctor en Ciencias

Co-Directora de tesis:

Marcia Yvette Gauthereau Torres

Doctora en Ciencias

El comité tutorial designado por la División de Estudios de Posgrado de la
Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas “Dr. Ignacio Chávez” de la
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

Aprobó la tesis presentada por:

Médica, Cirujana y Partera Jenny Selene Martínez Guillen

Doctor en Ciencias

Daniel Godínez Hernández

Doctor en Investigación en Medicina

Luis Fernando Ortega Varela

Doctora en Ciencias

Marcia Yvette Gauthereau Torres

Doctor en Ciencias

José Miguel Cervantes Alfaro

Doctor en Ciencias

Vinicio Granados Soto

Maestría en Ciencias de la Salud de la Universidad Michoacana de San
Nicolás de Hidalgo

Pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad del
CONAHCYT

La estudiante de la Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas “Dr. Ignacio
Chávez” de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo
agradece al CONAHCYT la beca que le fue otorgada durante la realización
de su tesis.

Número de becario CONAHCYT: 1105343

Dirección de tesis:

Doctor en Investigación en Medicina

Luis Fernando Ortega Varela

Adscrito a la Facultad de Salud Pública y Enfermería de la Universidad
Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

Co-Directora de Tesis:

Doctora en Ciencias en la Especialidad en Farmacología

Marcia Yvette Gauthereau Torres

Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

Agradecimientos

Agradezco a los D. en C. Luis Fernando Ortega Varela y Marcia Yvette Gauthereau Torres por permitirme ser su alumna de maestría, por todo el apoyo y paciencia brindados durante la realización del presente trabajo de investigación, gracias por confiar en mí.

A los D. en C. Daniel Godínez Hernández, José Miguel Cervantes Alfaro y Vinicio Granados Soto por ser mis sinodales, por las grandes aportaciones que enriquecieron el presente proyecto de investigación.

A mis compañeros y amigos del posgrado Lennin, Bety, Yuri, Paty, Ara, Quiroz, Pedro y muchos más por sus grandes consejos, tips y apoyo incondicional durante este tiempo de la maestría.

Dedicatorias

A mi esposo Juvencio Haro gracias por todo el amor, apoyo, comprensión que me das día con día, te amo.

A mis hijos Jamilah y Jossiel por apoyarme, comprenderme y estar a mi lado junto a los experimentos disfrutando la compañía de las ratas, gracias por todo los amo.

A mis padres José Martínez y Angela Guillen por su apoyo y amor incondicional que me han brindado a lo largo de todo este tiempo, que, aunque uno ya yace en el cielo, sé que siempre está a mi lado apoyando.

A mi hermana Alondra, mi abuelita, mi tío, y a mi familia en general por apoyarme en todo este trayecto en mi vida.

A mis amigos de toda la vida, Eunice, Fer y Hortensia por sus grandes palabras de aliento y su gran apoyo en este proceso.

A todas esas personas importantes en mi vida que me apoyaron con sus valiosos consejos y cariño.

A las ratas de laboratorio que sacrificaron su vida para brindarnos más conocimientos para mejorar nuestro bienestar.

Gracias.

Lista de abreviaturas

<i>IASP</i>	International Association for the Study of Pain (Asociación Internacional para el Estudio del Dolor)
<i>SNC</i>	Sistema Nervioso Central
<i>FRAP</i>	Fosfatasa ácida resistente a fluoruro
<i>CGRP</i>	Péptido Relacionado con el Gen de Calcitonina
<i>AMPA</i>	Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico
<i>NMDA</i>	<i>N</i> -metil <i>D</i> -aspartato
<i>SII</i>	Síndrome de intestino irritable
<i>POE</i>	Péptidos opioides endógenos
<i>OCT</i>	Receptores orgánicos de cationes
<i>LKB1</i>	Cinasa hepática B1
<i>CaMKK2</i>	Proteína cinasa cinasa 2 dependiente de Ca^{2+} / Calmodulina
<i>mTORC1</i>	Complejo de rapamicina 1
<i>p70S6K1</i>	Proteína p70 ribosomal S6 cinasa1
<i>PI3-K</i>	Fosfatidilinositol 3-quinasa / proteína quinasa B
<i>Atk</i>	Proteína cinasa B
<i>eIF4F</i>	Factor de iniciación de la traducción eucariota 4F
<i>TNFα</i>	Factor de necrosis tumoral alfa
<i>STAT3</i>	Transductor de señal y activador de la transcripción 3
<i>MT1</i>	Receptor de melatonina tipo 1a
<i>MT2</i>	Receptor de melatonina tipo 1b
<i>QR2</i>	Quinona reductasa 2
<i>5-HT</i>	5-hidroxitriptamina
<i>TTX</i>	Tetrodotoxina
<i>DE50</i>	Dosis efectiva 50
<i>DE50T</i>	Dosis efectiva 50 teórica
<i>DE50E</i>	Dosis efectiva 50 experimental

Índice

Resumen	14
Abstract	15
1. Introducción	16
1.1 Dolor	18
1.1.1 Definición del dolor	18
1.1.2 Clasificación del dolor	19
1.1.2.1 Dolor nociceptivo	20
1.1.2.2 Dolor inflamatorio	21
1.1.2.3 Dolor patológico (neuropático y disfuncional)	22
1.1.3 Mecanismos del dolor	24
1.1.3.1 Nocicepción	24
1.1.3.2 Nociceptores	26
1.1.4 Fisiopatología del dolor	28
1.1.4.1 Vías centrales del dolor	29
1.1.4.2 Vías ascendentes del dolor	30
1.1.4.3 Vías descendentes del dolor	33
1.1.5 Sensibilización	34
1.1.6 Alodinia e hiperalgesia	35
1.2 Tratamiento del dolor	36
1.2.1 Tratamiento del dolor inflamatorio	36
1.2.2 Tratamiento del dolor neuropático	38
1.2.3 Tratamientos combinados	39
1.2.3.1 Análisis isoblográfico	40
1.3 Fármacos antidiabéticos	41
1.3.1 Metformina	42
1.4 Melatonina	44
2. Justificación	47
3. Hipótesis	48
4. Objetivos	48
4.1 Objetivo general	48

4.1.1 Objetivos específicos	48
5. Materiales y métodos	49
5.1 Animales	49
5.2 Fármacos	50
5.3 Modelo de dolor inflamatorio	50
5.3.1 Nocicepción inflamatoria aguda inducida por formalina	50
5.3.2 Prueba de hiperalgesia y alodinia secundarias	52
5.4 Diseño del estudio	53
5.4.1 Tamaño de la muestra	53
5.5 Estrategia experimental	54
5.6 Hiperalgesia y alodinia secundarias	55
5.7 Efecto de la combinación en el dolor sostenido ya establecido	56
5.8 Mecanismo de acción	56
5.9 Evaluación de la actividad motora	58
6. Análisis de datos	59
7. Resultados	61
7.1 Efecto antinociceptivo de la administración oral de la metformina y la melatonina de manera individual	61
7.2 Efecto antinociceptivo de la combinación de metformina y melatonina vía oral	64
7.3 Interacción farmacológica por medio del isoblograma	66
7.4 Alodinia e hiperalgesia secundarias	67
7.5 Efecto de la metformina, la melatonina y la combinación DE50E sobre el mantenimiento de la hiperalgesia y alodinia secundarias de largo plazo	73
7.6 Mecanismo de acción	78
7.7 Perfil de seguridad: evaluación de la actividad motora	91
8. Discusión	92
8.1 Evaluación de la eficacia antinociceptiva de cada fármaco individualmente.	92
8.1.1 La eficacia antinociceptiva de la metformina	92
8.1.2 La eficacia antinociceptiva de la melatonina	93
8.2 Evaluación de la eficacia antinociceptiva de la combinación farmacológica.	94
8.3 Evaluación del efecto antihiperalgésico y antialodínico de cada fármaco y la combinación	96
8.3.1 Eficacia de la metformina	96
8.3.2 Eficacia de la melatonina	96
8.3.3 Eficacia de la combinación farmacológica	97
8.4 Evaluación de la eficacia farmacológica ante la hiperalgesia y la alodinia secundarias	97

8.5 Evaluación del mecanismo de acción de la combinación de metformina y melatonina	98
8.6 Perfil de seguridad de la combinación	99
9. Conclusiones	101
10. Referencias:	102

Índice de tablas

Tabla 1. Notas clave y etimología del dolor	18
Tabla 2. Tabla de distribución de dosis de metformina y melatonina	54
Tabla 3. Tabla de distribución y dosis del posible mecanismo de acción	57
Tabla 4. Tabla de distribución de dosis para la prueba del Rota-Rod	58
Tabla 5. Efecto máximo de la administración oral de los fármacos individuales y la combinación en la fase 1 de la prueba de formalina	62
Tabla 6. Concentraciones para los grupos de la combinación farmacológica para la curva experimental	64
Tabla 7. Parámetros del análisis isoblográfico para metformina y melatonina	66
Tabla 8. Tiempo obtenido en la prueba de Rota-Rod ratas	91

Índice de figuras

Figura 1. Dolor nociceptivo, estímulos nociceptivos	20
Figura 2. Dolor inflamatorio	22
Figura 3. Dolor patológico	24
Figura 4. Los procesos de la nocicepción	25
Figura 5. Tipos de receptores y su recorrido	28
Figura 6. Diagrama que ilustra los cambios en la sensación	36
Figura 7. Escala analgésica de la OMS	37
Figura 8. Escala analgésica para el dolor neuropático	38
Figura 9. Isoblograma	41
Figura 10. Prueba de formalina	51
Figura 11. Prueba de hiperalgesia y alodinia táctil	53
Figura 12. Diseño experimental de los pretratamientos	54
Figura 13. Esquema de los grupos experimentales	55
Figura 14. Diseño experimental del postratamiento	56
Figura 15. Esquema de la administración de la exploración del mecanismo de acción	57
Figura 16. Esquema de la evaluación motora	58

Figura 17. Curso temporal del efecto antinociceptivo de la metformina y la melatonina	62
Figura 18. El porcentaje antinociceptivo de la metformina y la melatonina	63
Figura 19. Curso temporal del efecto antinociceptivo de la combinación	65
Figura 20. Porcentaje antinociceptivo de la combinación	65
Figura 21. Isoblograma	66
Figura 22. Curso temporal de largo plazo del promedio de respuestas de retirada de pata	68
Figura 23. Curso temporal de largo plazo de la combinación	70
Figura 24. Área bajo la curva de las dosis individuales y la combinación para alodinia IL y CL	71
Figura 25. Área bajo la curva de las dosis individuales y la combinación para hiperalgesia IL y CL	72
Figura 26. Curso temporal de largo plazo del postratamiento farmacológico para alodinia IL y CL	74
Figura 27. Curso temporal de largo plazo del postratamiento farmacológico para hiperalgesia IL y CL	75
Figura 28. Área bajo la curva del postratamiento farmacológico para alodinia IL y CL	76
Figura 29. Área bajo la curva del postratamiento farmacológico para hiperalgesia IL y CL	77
Figura 30. Área bajo la curva de los efectos individuales de la administración del DMSO	79
Figura 31. Efecto de los antagonistas	82
Figura 32. Efecto del antagonista 4-P-PDOT para alodinia IL y CL	83
Figura 33. Efecto del antagonista 4-P-PDOT para hiperalgesia IL y CL	84
Figura 34. Efecto del antagonista luzindole para alodinia IL y CL	85
Figura 35. Efecto del antagonista luzindole para hiperalgesia IL y CL	86
Figura 36. Efecto del antagonista opioide naloxona para alodinia IL y CL	87
Figura 37. Efecto del antagonista opioide naloxona para hiperalgesia IL y CL	88
Figura 38. Efecto del inhibidor selectivo del AMPK para alodinia IL y CL	89

Figura 39. Efecto del inhibidor selectivo del AMPK par hiperalgesia IL y CL_____ 90

Resumen

El dolor constituye un problema de salud pública creciente a nivel mundial, esto ha llevado a un aumento de la demanda de terapia farmacológica para controlar dicho padecimiento. La combinación de medicamentos es altamente utilizada en la terapia contra el dolor, con el fin de mejorar los efectos analgésicos y disminuir sus efectos adversos, logrando así un mejor control del dolor a largo plazo. Los fármacos con efectos pleiotrópicos como la metformina (antidiabético), pueden ser útiles para el tratamiento del dolor inflamatorio y neuropático. La melatonina (regulador del sueño) tiene efecto antinociceptivo, neuroprotector y antiinflamatorio. **Objetivo general:** Determinar el efecto antinociceptivo de la metformina y la melatonina administradas de manera individual y en combinación en modelos preclínicos de dolor inflamatorio, hiperalgesia sostenida y alodinia secundaria. **Metodología:** Los experimentos se realizaron en ratas Wistar hembra, con un modelo de dolor inflamatorio (prueba de formalina), y un modelo de dolor sostenido para hiperalgesia y alodinia secundaria. Para evaluar el efecto antinociceptivo de los fármacos, se administraron por vía oral en dosis crecientes la metformina y la melatonina y la combinación en ambos 60 min, previos a la administración de formalina. La hiperalgesia y la alodinia secundarias se evaluaron 6 días después de la administración de formalina, utilizando filamentos de von Frey de 10 y 250 mN. Se determinó la dosis efectiva 50 (DE₅₀) de ambos fármacos, y posteriormente se realizó un análisis isoblográfico para examinar la naturaleza de cada interacción. Para la evaluación del perfil de seguridad de la combinación se empleó la prueba del Rota-Rod. Para evaluar el mecanismo de acción, se utilizó un antagonista del receptor para metformina (compuesto C o dorsomorfina), antagonistas de los receptores MT1 y MT2 de melatonina (4-P-PDOT, luzindole) y un antagonista opioide (naloxona). Los datos se representaron como la media \pm e.e. de cada grupo y las diferencias se establecieron por medio de un análisis de varianza con un valor de $p \leq 0.05$. **Resultados:** Se estableció el porcentaje de antinocicepción para cada dosis, se obtuvo una curva dosis-respuesta y se determinó la DE₅₀ para metformina (947.46 ± 242.60 mg/Kg) y melatonina (126.86 ± 37.98 mg/Kg). La dosis efectiva teórica (DE_{50T}) de la combinación fue de 537.15 ± 122.76 mg/Kg, con esos datos se realizó una CDR para la combinación y experimentalmente se obtuvo una dosis efectiva 50 para la combinación (DE_{50E}) de 360.83 ± 23.36 mg/Kg, que al ser menor que la teórica indica un efecto sinérgico en la combinación. Para el modelo de dolor sostenido, la combinación previno el desarrollo de hiperalgesia y alodinia secundarias en ambas patas. Para la prueba de evaluación motora se utilizó la DE_{50E} de la combinación vs control positivo, donde no se encontró alteración motora. Tras el pretratamiento con los antagonistas, los datos indican que la combinación de metformina y melatonina presenta una interacción sinérgica en la que participan al menos los receptores opioides, MT2 y la activación AMPK. La combinación oral reduce significativamente la nocicepción aguda, además de prevenir la aparición de los fenómenos del dolor sostenido y contrarrestarlos una vez que se han establecido, lo que sugiere que dicha combinación podría ser útil en el tratamiento del dolor.

Palabras clave: dolor, prueba de formalina y sinergismo farmacológico.

Abstract

Pain is a growing public health problem worldwide, which has led to an increase in the demand for pharmacological therapy to control this condition. The combination of drugs is widely used in pain therapy, in order to improve the analgesic effects and decrease its adverse effects, thus achieving a better long-term pain control. Drugs with pleiotropic effects, such as metformin (antidiabetic), can be useful for the treatment of inflammatory and neuropathic pain. Melatonin (sleep regulator) has antinociceptive, neuroprotective and anti-inflammatory effects. General objective: To determine the antinociceptive effect of metformin and melatonin administered individually and in combination in preclinical models of inflammatory pain, sustained hyperalgesia and secondary allodynia. Methodology: Experiments were performed in female Wistar rats, using an inflammatory pain model (formalin test), and a sustained pain model for hyperalgesia and secondary allodynia. In order to evaluate the antinociceptive effect of the drugs, metformin and melatonin were orally administered in increasing doses and the combination of both substances 60 minutes prior to formalin administration. Secondary hyperalgesia and allodynia were assessed 6 days after formalin administration, using 10 and 250 mN von Frey filaments. The effective doses 50 (ED₅₀) of both drugs was determined, and subsequently an isobolographic analysis was performed to examine the nature of each interaction. The Rota-Rod test was used to evaluate the safety profile of the combination. To evaluate the mechanism of action, receptor antagonist for metformin (compound C or dorsomorphin), MT1 and MT2 melatonin receptor antagonists (4-P-PDOT, luzindole) and opioid antagonist (naloxone) were used. Data were represented as mean ± e.e. for each group and differences were established by analysis of variance with a value of $p \leq 0.05$. Results: The percentage of antinociception was established for each dose, a dose-response curve was obtained and the DE₅₀ was determined for metformin (947.46 ± 242.60 mg/kg) and melatonin (126.86 ± 37.98 mg/kg). The theoretical effective dose (DE_{50T}) of the combination was 537.15 ± 122.76 mg/Kg; with these data a CDR was performed for the combination and experimentally an effective dose 50 for the combination (DE_{50E}) was obtained (360.83 ± 23.36 mg/Kg) which, being lower than the theoretical one, indicates a synergistic effect in the combination. For the sustained pain model, the combination prevented the development of secondary hyperalgesia and allodynia in both paws. For the motor evaluation test, the DE_{50E} of the combination vs positive control was used, where no motor alteration was found. After pretreatment with the antagonists, the data indicate that the combination of metformin and melatonin presents a synergistic interaction involving at least opioid receptors, MT2 and AMPK activation. The oral combination significantly reduces acute nociception, and prevents the onset of sustained pain phenomena and counteracts them once they have become established, suggesting that such a combination could be useful in the treatment of pain.

Key words: pain, formalin test and pharmacological synergism.

1. Introducción

El dolor constituye un problema de salud pública creciente a nivel mundial, siendo una de las principales causas de consulta médica. Las estimaciones sugieren que 1 de cada 5 adultos sufren de dolor y 1 de cada 10 es diagnosticado por algún tipo de dolor crónico cada año (Zúñiga-Romero et al., 2014). El dolor ha acompañado a la humanidad en toda su historia, siendo un fenómeno sensorial, de percepción, multidimensional y complejo, haciéndolo una experiencia subjetiva única en cada individuo (Cervantes-Duran et al., 2021). El dolor no distingue entre raza, sexo y edad, ya que todos pueden experimentar algún tipo de dolor, ya sea agudo, crónico-patológico o la combinación de todos a la vez, lo que hace del dolor un asunto complejo para su manejo médico y farmacológico (Arco, 2015).

Todo esto lleva a un aumento de la demanda de terapia farmacológica para controlar dicho padecimiento, ya que los medicamentos que se encuentran en el mercado presentan algunos efectos secundarios y no siempre es recomendable su uso a largo plazo, aunado a la falta de eficacia para tratar el dolor. Los tratamientos con mayor eficacia incluyen la terapia combinada, la cual nos da mejores resultados, ya que los efectos analgésicos se maximizan y los efectos secundarios adversos disminuyen, logrando así un mejor control del dolor a largo plazo (Zúñiga-Romero et al., 2014). De acuerdo con lo anterior, es importante optimizar el uso de los fármacos que actualmente se emplean, y una posibilidad es buscar aplicaciones fuera de las indicaciones terapéuticas, esto se basa en la probabilidad de que existan efectos pleiotrópicos, lo cual significa que el medicamento es capaz de presentar otros efectos farmacológicos, diferentes al de su mecanismo principal (Hybiak et al., 2020).

Diversos medicamentos, a través del tiempo, están revelándose como drogas pleiotrópicas. Un ejemplo es el ácido acetil salicílico (aspirina), que surgió como un antiinflamatorio, y al que hoy en día se le atribuyen efectos: antipirético, analgésico, antiplaquetario, anticancerígeno, entre otros. Por otra parte, revelar efectos pleiotrópicos en un fármaco, redundaría en reducir costos a favor del paciente, particularmente, en aquellos que usaran crónicamente el medicamento, como los pacientes con diabetes

mellitus, hipertensión arterial, enfermedades mentales, infección por VIH-SIDA, etc. (Sánchez-Gavidia et al., 2019).

Los medicamentos que se encuentran en el mercado para el uso de dolor crónico, presentan muchos efectos secundarios y adversos, aunado a la falta de eficacia para tratar el dolor, por lo que se busca dilucidar los efectos analgésicos de medicamentos ya existentes en el mercado, fármacos que sean capaces de presentar otros efectos farmacológicos diferentes al de su mecanismo principal (Zúñiga-Romero et al., 2014).

El dolor es, en principio, un mecanismo de defensa, cuya función es detectar y localizar los procesos que dañan las estructuras corporales, pero es también un fenómeno subjetivo que puede estar o no vinculado a una lesión o patología orgánica. Además, cuando esta vinculación existe, la intensidad del dolor no está necesariamente relacionada con la gravedad de la alteración que lo produce (Arco, 2015). El dolor crónico es un problema de salud pública que afecta de 25 a 29 por ciento de la población mundial. El dolor crónico presenta graves consecuencias en los pacientes que lo padecen, ya que en 1 de cada 3 personas llega ser tan fuerte que limita sus actividades. Las secuelas más graves son depresión, relaciones sociales interrumpidas, disminución de las capacidades físicas, alteraciones del sueño, en conclusión, una mala calidad de vida. Con base en lo anterior, el dolor crónico es la principal causa de ausencia laboral y discapacidad a nivel mundial, generando grandes costos para los servicios de salud (Hatch et al., 2018).

1.1 Dolor

El dolor es un síntoma observado frecuentemente a nivel mundial, considerándose un problema de salud pública. El dolor es la causa más común de discapacidad laboral a largo plazo. Los pacientes con síntomas de dolor crónico son atendidos por diferentes especialidades médicas y quirúrgicas, siendo el dolor la causa más frecuente de consultas médicas de atención primaria.

El dolor crónico llega a causar un deterioro funcional, trastornos psicológicos y alteraciones del sueño. El dolor interrumpe las actividades de la vida diaria y repercute negativamente en las relaciones personales, por lo tanto, el dolor crónico es un problema grave tanto médico como social (Hatch et al., 2018).

1.1.1 Definición del dolor

La Asociación Internacional del Estudio del Dolor, IASP por sus siglas en inglés, (fundada en 1974), establece que “el dolor es una experiencia sensorial y emocional desagradable asociada o similar a la asociada con un daño tisular real o potencial” (IASP, 2020).

Como se puede ver, esta definición enfatiza que es una experiencia compleja que incluye múltiples dimensiones. La IASP da seis notas clave y etimología del dolor para un mejor contexto (Tabla 1).

Tabla 1. Notas clave y etimología del dolor. Tomada y modificada de IASP, 2020

<ul style="list-style-type: none">• El dolor es siempre una experiencia personal que está influenciada en diversos grados por factores biológicos, psicológicos y sociales.
<ul style="list-style-type: none">• El dolor y la nocicepción son fenómenos diferentes. El dolor no puede inferirse únicamente de la actividad en las neuronas sensoriales.
<ul style="list-style-type: none">• A través de sus experiencias de vida las personas aprenden el concepto de dolor.
<ul style="list-style-type: none">• Debe respetarse el relato de una persona sobre una experiencia como dolor.
<ul style="list-style-type: none">• El dolor suele tener un papel adaptativo, puede tener efectos adversos sobre la función y el bienestar social y psicológico.
<ul style="list-style-type: none">• La descripción verbal es sólo uno de los varios comportamientos para expresar dolor; la incapacidad para comunicarse no niega la posibilidad de que un ser humano experimente dolor.

Se describirán unos términos que la organización IASP emplea para describir al dolor de una manera más adecuada:

Alodinia: Dolor ocasionado por un estímulo inocuo. Es importante reconocer que la alodinia implica un cambio en la calidad de una sensación, ya sea táctil, térmica o de cualquier otro tipo.

Hiperalgnesia: Respuesta exagerada a un estímulo doloroso, es decir, una disminución en el umbral de respuesta a un estímulo nocivo. La evidencia actual sugiere que es una consecuencia de la perturbación del sistema nociceptivo con sensibilización periférica o central o ambas.

Hiperalgnesia primaria: Respuesta exagerada el estímulo aplicado en el área del tejido dañado.

Hiperalgnesia secundaria: Respuesta exagerada al estímulo aplicado en áreas adyacentes o alejadas al tejido dañado.

Nocicepción: El proceso de codificación neural de los estímulos nocivos.

Nociceptores: Receptores de alto umbral sensorial del sistema somato-sensorial periférico nervioso que es capaz de transducir y codificar estímulos nocivos.

Umbral de dolor: La más mínima experiencia de dolor que un sujeto puede reconocer.

Analgesia: Ausencia de dolor en respuesta a la estimulación que normalmente sería dolorosa, en otras palabras, es un incremento en el umbral de respuesta a un estímulo nocivo.

1.1.2 Clasificación del dolor

A lo largo de la historia se han ido modificando las distintas teorías o modelos de dolor y su manejo. La incómoda sensación de dolor persiste a lo largo de la humanidad, lo que ha hecho que el hombre haya buscado una explicación. Existen diferentes clasificaciones para el dolor, las más utilizadas son por su temporalidad y lo dividen en dolor agudo y dolor crónico; para la investigación y el tratamiento del dolor se utiliza la clasificación establecida por Woolf, la cual plantea que existen 3 tipos de dolor, de acuerdo con el origen somático y el mecanismo fisiológico, que son el dolor nociceptivo, el dolor inflamatorio y el dolor patológico (neuropático y disfuncional) (Woolf, 2010).

1.1.2.1 Dolor nociceptivo

El dolor nociceptivo es un sistema protector fisiológico de alerta temprana, fundamental para detectar y minimizar el contacto con estímulos dañinos o nocivos, cuando hay una lesión por quemadura o un objeto punzante (Woolf, 2010). Se subdivide en dolor nociceptivo somático, el cual tiene su origen en estructuras como músculos, tendones, articulaciones, ligamentos y huesos; y nociceptivo visceral, cuyo origen son tanto las vísceras huecas como las sólidas (Sánchez et al., 2014), por lo tanto es una consecuencia de una lesión somática o visceral (Romera et al., 2000). Se genera por la activación de los nociceptores A- δ y C en respuesta a un estímulo nocivo sobre los tejidos corporales, siendo una respuesta fisiológica a una agresión. Una característica importante es que en este tipo de dolor existe una correlación entre la percepción del dolor y la intensidad del estímulo desencadenante. La definición de la IASP del dolor nociceptivo dice que es un “dolor que surge de un daño real o potencial al tejido no neural y se debe a la activación de los nociceptores de manera aguda superando el umbral” (Trouvin & Perrot, 2019) (Figura 1). La falta de dolor nociceptivo es un problema, como en la enfermedad genética que provoca insensibilidad congénita al dolor con anhidrosis (CIPA), ya que las personas terminan en automutilación, fracturas óseas y muerte temprana (Woolf, 2010).

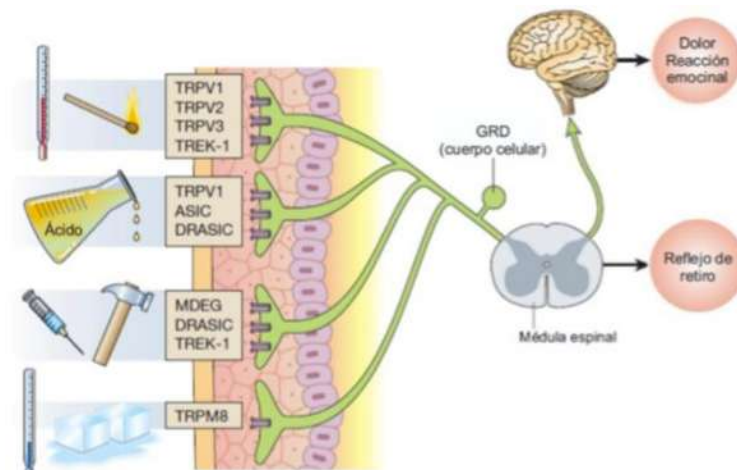


Figura 1. Los estímulos nocivos son transducidos en actividad eléctrica, en la terminal periférica de las fibras amielínicas C y de las fibras pobremente mielinizadas A δ a través de receptores específicos y canales sensibles a calor, estímulos mecánicos, protones y frío. Los estímulos viajan por la médula y posteriormente a vías centrales hacia la corteza, generando la sensación del dolor. Modificado de Costigan & Woolf, 2000.

1.1.2.2 Dolor inflamatorio

El dolor inflamatorio también es adaptativo y protector. Después de un daño tisular inevitable, este dolor ayuda a curar la parte lesionada al crear una situación que evita el contacto y el movimiento; esto reduce el daño adicional y promueve la recuperación. Es causado por la activación del sistema inmunológico (Woolf, 2010).

Ante una lesión, las células del sistema inmune y las células lesionadas liberan mediadores químicos, tales como histamina, serotonina (5-HT), bradicinina, prostaglandinas, ATP, H^+ , factor de necrosis tumoral alfa (TNF α), endotelinas, interleucinas y otros, que en conjunto forman la llamada sopa inflamatoria o cóctel inflamatorio (Costigan & Woolf, 2000). Las células dañadas liberan ATP e H^+ , las células cebadas liberan aminas, 5-HT e histamina, ácido araquidónico y prostaglandinas. Los macrófagos aportan citocinas: IL-1, IL-6 y TNF. La ciclo-oxigenasa 2 (COX-2) proviene del tejido inflamado (Woolf & Ma, 2007). Los potenciales de acción de alta frecuencia causan la liberación de neuropéptidos como la sustancia P, el factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF) y el glutamato. La sustancia P y el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP), favorecen el reclutamiento de células del sistema inmune en el tejido inflamado, contribuyendo a la sensibilización periférica (Woolf, 2010) (Figura 2).

Los receptores ligados a canales iónicos al ser activados permiten el paso de iones, dando lugar al proceso de despolarización y repolarización, y los receptores ligados a proteína cinasa ponen en marcha los mecanismos de señalización en la cascada intracelular. Los canales de Na^+ sensibles a tetrodotoxina (TTX) permiten la despolarización y participan en la generación de potenciales de acción. Los canales rectificadores tardíos de K^+ sirven para la hiperpolarización, el canal de Ca^{++} es el principal responsable de mantener la propagación de la señal en la sinapsis medular a nivel central, al permitir la liberación de glutamato, aspartato y sustancia P, estos mediadores interactúan con los receptores AMPA y NMDA de la terminal postsináptica y mantienen la cadena de transmisión del impulso. Como consecuencia de lo anterior, las señales sensoriales pueden ser percibidas como dolor. El dolor inflamatorio comienza de manera aguda por el fenómeno de sensibilización periférica; sin embargo, es capaz de

extenderse y desarrollar sensibilización central. Generando una amplificación de la señal neural dentro del sistema nervioso central desencadenando una hipersensibilidad al dolor (Basbaum et al., 2009).

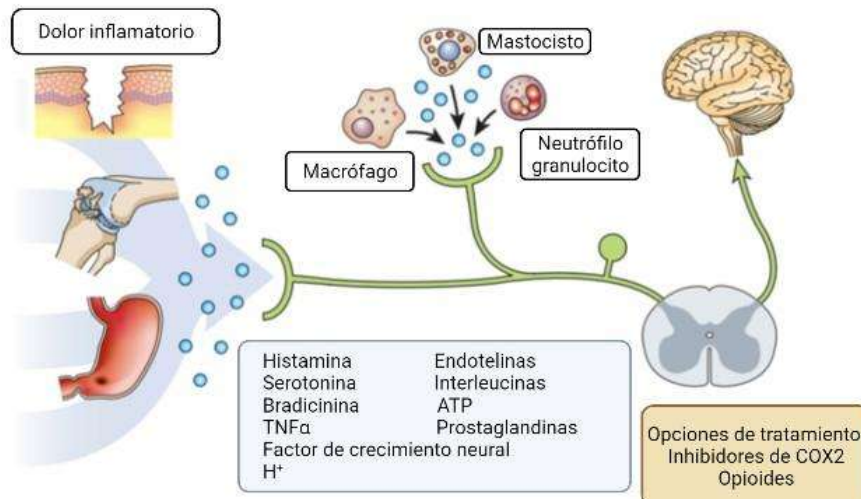


Figura 2. Dolor inflamatorio asociado a daño tisular, inflamación e infiltración de células inmunes que activan mediadores químicos creando el proceso inflamatorio, lo cual modifica las propiedades de las respuestas ante los estímulos de los nociceptores. Modificado de Scholz & Woolf, 2002.

1.1.2.3 Dolor patológico (neuropático y disfuncional)

El dolor patológico no es protector, sino maladaptativo, debido a un funcionamiento anormal del sistema nervioso. No es un síntoma sino un estado de enfermedad del sistema nervioso, ya sea después de un daño en el sistema nervioso, como sucede con el dolor neuropático o el caso del dolor disfuncional, cuando no hay daño ni inflamación como la fibromialgia, la cefalea tensional, el síndrome de intestino irritable (SII) (Woolf, 2010). Por lo tanto, el dolor neuropático es el resultado de una lesión en el sistema somatosensorial, descrito como una sensación ardiente con paroxismos de dolor, asociado a cambios en la sensibilidad en forma de alodinia, hiperalgesia y/o parestesias. A lo largo del tiempo el desencadenamiento del dolor por estímulos nocivos indica un proceso de sumación central (Romera et al., 2000). Lo anterior se caracteriza por ya no requerir estímulos nocivos para generar dolor, ya que el dolor puede surgir espontáneamente en ausencia de cualquier estímulo. El sistema nociceptivo sufre

un cambio o plasticidad enorme cuando se expone a mediadores inflamatorios y factores del crecimiento en respuesta a la actividad de una lesión. La sumación central ocurre cuando hay cambios en los nociceptores, las terminaciones periféricas se sensibilizan durante la inflamación, los axones se vuelven hiperexcitables, generando así potenciales de acción espontáneos, los cuerpos celulares generan cambios dramáticos en la expresión y tráfico de proteínas, y las sinapsis, tanto en la médula espinal como en el cerebro pueden cambiar su reorganización estructural y todo esto facilita las respuestas a los estímulos periféricos (Woolf, 2010).

La primera definición mecanicista para el dolor neuropático fue establecida en 1994 por el consejo de la IASP como: "Dolor iniciado o causado por una lesión o disfunción primaria en el sistema nervioso". Esta definición se cambió por una nueva en 2005, cuando apareció la terminología nociceptiva. El dolor neuropático se definió como: "Dolor debido a una lesión o disfunción del sistema nervioso", actualmente el dolor neuropático es un "dolor causado por una lesión o enfermedad del sistema nervioso somatosensorial" (Trouvin & Perrot, 2019).

Los síndromes dolorosos son clasificados por la Asociación Internacional para el Estudio del Dolor como "síndrome de dolor con etiología disfuncional" o síndromes somáticos funcionales (Figura 3). Estos síndromes presentan el dolor como el principal síntoma de su enfermedad como la fibromialgia, síndrome de intestino irritable, migraña entre otros. Estos síndromes no presentan déficit neurológico o anomalía periférica. Por lo tanto, el dolor se debe a una mala respuesta del sistema nervioso, dando un aumento de la sensibilidad del aparato sensorial que amplifica los síntomas, muchos de estos mecanismos aún no están claros hasta la fecha. Es la situación en la que un estímulo nociceptivo produce más dolor del que se produciría normalmente, debido a un aumento de la sensibilidad dolorosa causado por un cambio plástico en las vías de conducción del dolor (Costigan et al., 2009). La hiperconexión sináptica parece predominar en la mayoría de los pacientes con dolor neuropático periférico y central. Esto contribuye tanto a la alodinia táctil y a la dinámica, como a la hiperalgesia secundaria (Campbell & Meyer, 2006).

El dolor patológico crónico es un problema de salud, del cual se tienen varios tipos de dolor como: el dolor lumbar, neuropático, postoperatorio, la osteoartritis, la

fibromialgia, entre otros más; pero éste puede inducir problemas de ansiedad y depresión en roedores y humanos, también se ha encontrado deterioro cognitivo (Zhou et al., 2019).

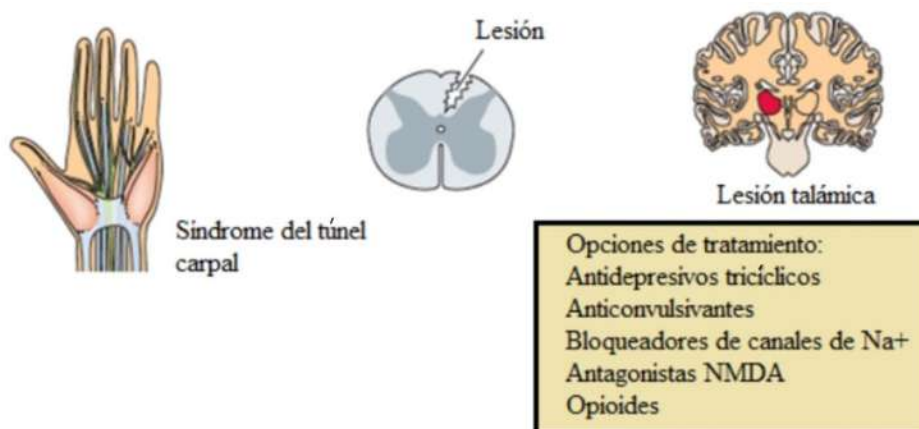


Figura 3. El dolor patológico es un estado de enfermedad causado por daño al tejido nervioso o por la función anormal de éste, afectando el sistema nervioso periférico (síndrome del túnel del carpo) o produciendo daño de la médula espinal. Modificado de Scholz & Woolf, 2002.

1.1.3 Mecanismos del dolor

Las señales de dolor inicialmente se interpretan, luego se transmiten y al final se establece la señal de dolor. Hay varios mecanismos que pueden producir dolor, como la nocicepción, la sensibilización periférica y la sensibilización central (Woolf & Ma, 2007). Para el tratamiento del dolor se necesitan los conocimientos de cómo las señales viajan hasta generar la sensación de dolor.

1.1.3.1 Nocicepción

La nocicepción se puede definir como un conjunto de respuestas neuronales mediante las cuales se codifican y procesan los estímulos potencialmente lesivos, ya sean estos reales o potenciales (Loeser & Treede, 2008). El término nocicepción fue acuñado por Charles Scott Sherrington para distinguir el proceso fisiológico (nervio) del dolor (subjetivo) (Burke, 2007). El término deriva del latín *nocere* que significa dañar, y se refiere a los mecanismos por los cuales el cuerpo detecta los estímulos nocivos. La

nocicepción tiene 4 fases fisiológicas, que son la transducción, la transmisión, la percepción y la modulación (Dubin & Patapoutian, 2010).

- I. La transducción es el proceso por el cual el estímulo nociceptivo se convierte en un potencial de acción en el receptor sensorial.
- II. La transmisión es la propagación del potencial de acción a lo largo del sistema nervioso, desde el receptor periférico hacia la médula y estructuras supra espinales.
- III. La percepción es el fenómeno por el cual la señal nociceptiva es procesada a nivel cortical y se transforma en la sensación del dolor.
- IV. La modulación es la respuesta elaborada por el sistema nervioso y permite una amplificación o disminución de la señal nociceptiva (dada por las endorfinas, dinorfinas) en función de las circunstancias concretas. La modulación en la médula espinal desconectada de los centros superiores, consiste en la realización de respuestas reflejas (Figura 4) (Arinello et al., 2002).

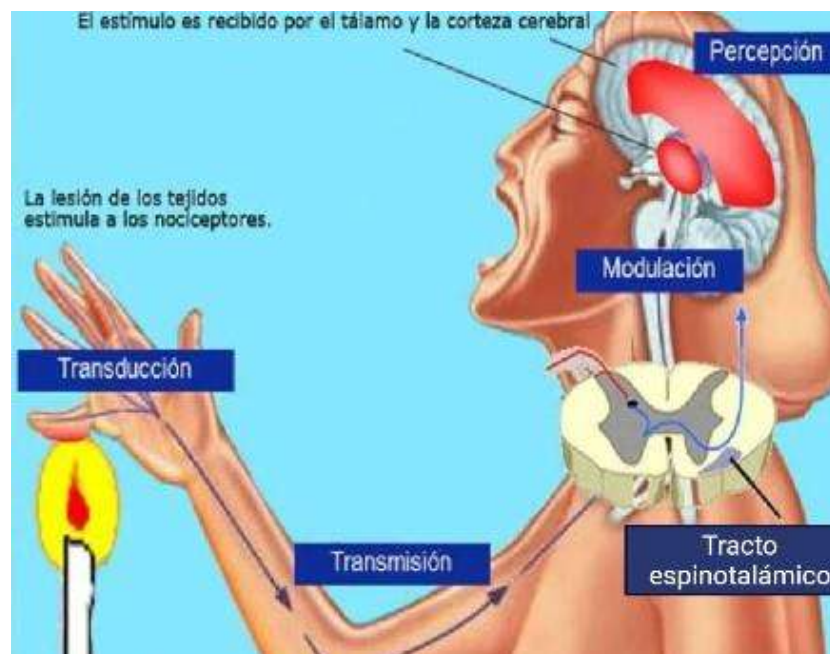


Figura 4. Los procesos de la nocicepción y sus cuatro fases fisiológicas: transducción, transmisión, modulación y percepción. Modificado de Arinello, 2002.

La nocicepción es una actividad aferente del sistema nervioso central y periférico, siendo producida por la estimulación de las terminaciones nerviosas libres especializadas llamadas nociceptores, generando una respuesta sólo por arriba del umbral del sistema, ya sea por estímulos químicos, mecánicos o térmicos. El primer dolor o rápido, se describe como lancinante, dado por las fibras mielinizadas. El segundo dolor o lento es más penetrante e incluye el ardor, pulsaciones, calambres y recluta componentes afectivos, dado por las fibras amielínicas. La intensidad de estas reacciones globales determinará la intensidad del dolor, dando la importancia de evitar situaciones dañinas para la supervivencia y la homeostasis (Dubin & Patapoutian, 2010).

1.1.3.2 Nociceptores

El dolor se transmite por la presencia de fibras nerviosas periféricas que se unen con las vías nociceptivas del sistema nervioso central (SNC). Estas neuronas son pseudounipolares caracterizadas por tener un axón común, del cual emanan las terminales centrales y periféricas. Este tipo de neurona permite la circulación de la información y sustancias que puedan viajar en ambas direcciones. Al despolarizarse una terminal periférica, se genera un potencial de acción gracias a la apertura de canales de Na^+ dependientes de voltaje, produciéndose una conducción ortodrómica del impulso hacia el terminal central, y otra antridrómica que da lugar a la liberación de sustancias químicas como mediadores (Woolf et al., 1998).

Los nociceptores son los receptores especializados en la detección de estímulos nocivos, por lo tanto, son terminaciones periféricas de fibras aferentes primarias sensoriales, también conocidos como neuronas de primer orden. Estos responden a estímulos específicos y representan la primera línea de defensa contra cualquier daño potencial del medio ambiente. La estimulación continua de los nociceptores produce una descarga repetitiva de potenciales de acción y puede conducir a la disminución del umbral de respuesta, es decir, a la sensibilización (Woolf & Ma, 2007).

El rasgo distintivo de un nociceptor es su capacidad para diferenciar entre estímulos inocuos y estímulos nocivos, los nociceptores son capaces de activarse frente a estímulos de intensidad baja, a diferencia de los receptores no nociceptivos, los

nociceptores no suelen adaptarse a un estímulo; al contrario tienden a sensibilizarse, en otros términos disminuyen el umbral a medida que el estímulo lesivo persiste, lo cual en parte explica el fenómeno de la hiperalgesia (Cervero et al., 2003).

Morfológicamente, los nociceptores son un grupo especial de receptores situados al final del axón de una neurona sensorial que se activan a diferentes estímulos. Existen dos tipos fundamentales de nociceptores en función de la velocidad de conducción de sus fibras aferentes, las fibras A δ (mielínicas) y el tipo C (amielínicas) que funcionan como transductores biológicos. Son receptores especializados en la transducción de un estímulo nocivo ya sea químico, mecánico o térmico en una señal bioeléctrica. Sus cuerpos celulares de origen se localizan en los ganglios de la raíz dorsal o en los ganglios sensoriales de los pares craneales correspondientes, y se conocen como neuronas de primer orden o aferentes primarios, de la vía nociceptiva (Stucky et al., 2001).

Las fibras A δ poseen un diámetro de 2 a 5 μm , y son axones ligeramente mielinizados que le dan una velocidad de conducción intermedia de 12 a 30 m/s. Presentan un campo receptivo pequeño y canales iónicos específicos de alto umbral que son activados por estímulos térmicos o mecánicos de alta intensidad. Estas fibras median el dolor pasajero y punzante (Millan, 1999). Las fibras A δ se subdividen en dos tipos (I y II). Las fibras A δ tipo I responden a temperaturas mayores a 52°C, que son detectadas a través de los receptores TRPV2; son sensibles a capsaicina y están presentes principalmente en piel sin pelo. Las fibras A δ tipo II responden a estímulos térmicos nocivos de 40 a 45°C, son sensibles a capsaicina y éstas se expresan los receptores TRPV1 (Basbaum et al., 2009). El incremento gradual de la temperatura provoca la sensibilización de estas fibras nerviosas.

Las fibras C tienen un diámetro de 0.4 a 1.2 μm , con una velocidad de conducción baja, de 0.5 a 2 m/s. Tienen un campo receptivo mayor al de las fibras A δ y expresan los receptores TRPV1. Estas fibras son polimodales y se activan por estímulos mecánicos, térmicos y químicos, por lo que transmiten el dolor quemante. Las sustancias químicas que estimulan las fibras C son las que se producen gracias al daño celular, de la cascada inflamatoria y mediadores inmunológicos. Estas fibras se activan en presencia de sustancias como la bradicinina, la histamina, la acetilcolina, la 5-HT, los iones hidrógeno,

etc. Corresponden a aproximadamente el 70% de todos los nociceptores (Stucky et al., 2001).

Cuando se produce una lesión superficial en la piel, se perciben dos clases de dolores: uno inicial, rápido, de corta duración, bien localizado, debido a la actividad de las fibras A δ , llamado dolor primario y, otro, de aparición más tardía, lento, persistente y difuso, debido a la actividad de las fibras C, llamado dolor secundario (Moreno & Prada, 2004). No todos los órganos internos tienen inervación nociceptiva, como el cerebro (Romera et al., 2000). Los nociceptores pueden clasificarse funcionalmente como: mecano-nociceptores, termo-nociceptores y polimodales (Figura 5) (Basbaum et al., 2009).

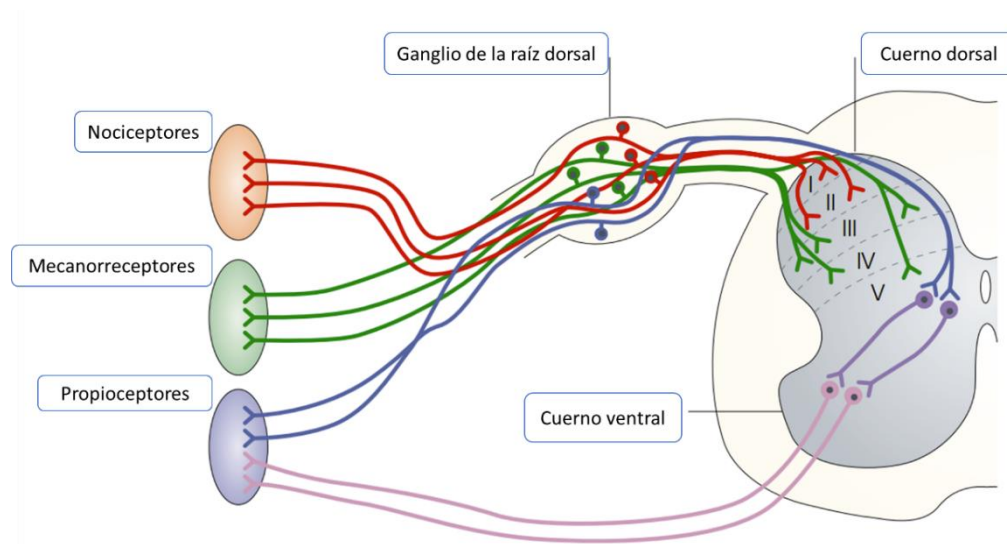


Figura 5. Tipos de receptores y su recorrido. El dolor y la temperatura son percibidos por los nociceptores A δ y C (rojo) se proyectan a las láminas I y II. El tacto es mediado por los mecanorreceptores A β (verde) se proyectan a las láminas III, IV y V. La propiocepción esta mediada por las neuronas sensoriales A α (azul) se proyectan a lamina V a VII y las motoneuronas también se conectan directamente al musculo en la periferia para impulsar movimiento (rosa). Modificado de Caspary & Anderson, 2003.

1.1.4 Fisiopatología del dolor

Desde el punto de vista neurofisiológico, la percepción del dolor precisa de la participación del sistema nervioso central (SNC) y del sistema nervioso periférico (SNP). El dolor desencadena una serie de reacciones en ambos sistemas que permite la percepción del mismo, con la finalidad de disminuir la causa y limitar las consecuencias.

Los mensajes nociceptivos son transmitidos, modulados e integrados en diferentes niveles del sistema nervioso; y van desde la periferia por vía medular a centros superiores (tálamo, córtex) (Romera et al., 2000).

1.1.4.1 Vías centrales del dolor

Los nociceptores utilizan dos vías para transmitir las señales hacia el sistema nervioso central. La vía del dolor rápido agudo y la vía del dolor lento crónico. Las señales del dolor rápido agudo nacen con los estímulos dolorosos de tipo mecánico o térmico. Su transmisión sigue los nervios periféricos hasta la médula espinal a través de las fibras tipo A δ . El dolor lento crónico se suscita a través de estímulos mecánicos o térmicos persistentes; este dolor llega a la médula espinal por medio de las fibras tipo C (Romera et al., 2000).

Gracias a este sistema de inervación para el dolor, donde un estímulo lesivo genera una sensación dolorosa, un dolor rápido agudo llega al cerebro, seguido más o menos 1 segundo después por un dolor lento. Así el dolor rápido agudo informa a gran velocidad sobre la lesión, para que la persona reaccione de inmediato, retirándose del estímulo. El dolor lento produce la sensación de dolor intolerable y obliga a buscar mitigar el dolor (Guyton & Hall, 2016).

Las aferencias primarias utilizan neurotransmisores y neuromoduladores, algunas ocasiones, se liberan conjuntamente para la primera sinapsis. Entre los neurotransmisores más conocidos están la sustancia P, la somatostatina, la colecistocinina (CCK), el péptido intestinal vasoactivo (VIP), la bombesina, la vasopresina, aminoácidos como el glutamato, el N-Metil-D-aspartato, monoaminas (serotonina y noradrenalina), la acetilcolina, y el ácido gamma-aminobutírico (GABA) (Romera et al., 2000). Las fibras aferentes hacen sinapsis en 3 tipos de neuronas: a) neuronas con proyección supraespinal, b) neuronas propioespinales, y c) interneuronas medulares inhibitorias o excitatorias (Goicoechea & Martín, 2006).

En las sinapsis del asta dorsal de la médula espinal, se liberan diferentes neurotransmisores que actúan sobre numerosos receptores. Los potenciales excitadores rápidos inducen la liberación de glutamato y trifosfato de adenosina (ATP) de la neurona

presináptica. Los potenciales de excitación lentos inducen la liberación de glutamato y sustancia P. Sobre este punto, la liberación de neurotransmisores se encuentra inhibida por:

- a. Las interneuronas GABAérgicas que actúan sobre receptores GABA_A y GABA_B. Esto permite la entrada de cloro hiperpolarizando la neurona.
- b. Neuronas descendentes que liberan opioides y 5HT, los cuales disminuyen las respuestas glutamatérgicas mediadas por receptores AMPA.
- c. Neuronas descendentes que producen noradrenalina y acetilcolina, potenciando la liberación de GABA (Moore et al., 1996)

1.1.4.2 Vías ascendentes del dolor

El neurocientífico sueco Bror Rexed en 1952 investigó la disposición de las neuronas en la sustancia gris de la médula espinal de gato. Determinó que ésta se agrupa en 10 láminas, que históricamente se conocen como Láminas de Rexed. Él las clasificó de tal manera que las láminas I, II, III y IV funcionaban formando una unidad funcional encargada de la sensibilidad al dolor, temperatura, tacto y presión. La zona más dorsal del asta, corresponde a las láminas V y VI que se relacionan con la sensibilidad propioceptiva, recibiendo la sensibilidad de estructuras derivadas del mesodermo (huesos, músculos, articulaciones y ligamentos), e información relacionada con posición, movimiento y equilibrio. La lamina VII corresponde a la base del asta dorsal, teniendo conexiones con el cerebelo y con el mesencéfalo. La zona intermedia de la sustancia gris está relacionada con el canal central de la médula, detectando la sensibilidad interoceptiva (proveniente de órganos internos). La lámina X se relaciona con la actividad motora (Wall, 1967).

Los estímulos nociceptivos se detectan por los nociceptores y se transmiten a través de las fibras A δ y C hacia la sustancia gelatinosa del asta dorsal en la médula espinal; las fibras A δ llegan a las láminas I y II, mientras que las fibras C llegan a las láminas II, III y V (D'Mello & Dickenson, 2008).

La primera sinapsis de la vía de la nocicepción se halla en el asta dorsal de la médula espinal o en los núcleos sensoriales de los pares craneanos correspondientes

(Moreno & Prada, 2004). El primer nivel de integración en el SNC y su modulación por las interneuronas espinales, dirige la información a través de las vías ascendentes y la elaboración de respuestas reflejas. A este nivel también se ejerce el control eferente a través de las vías descendentes. Desde el punto de vista neurofisiológico, dos grupos de neuronas son activadas en el asta dorsal por las mismas fibras, las neuronas específicas y las neuronas de rango amplio y dinámico o de convergencia (Romera et al., 2000).

Las neuronas nociceptivas de segundo orden (NNSO) se localizan en las láminas I y II. Hacen sinapsis con fibras A δ y C, se dividen en dos clases: las neuronas nociceptivas específicas que responden solamente a estímulos nocivos y las neuronas de rango amplio y dinámico (WDR) que pueden responder tanto a estímulos mecánicos nocivos como no nocivos. Las láminas III y IV contienen neuronas que responden a estímulos no nocivos, provenientes de fibras A β . Las neuronas de la lámina V son, básicamente, neuronas de rango amplio y dinámico que reciben información de fibras A β , A δ y C. Finalmente, las neuronas de la lámina VI reciben impulsos mecánicos no nocivos provenientes de músculos y articulaciones (Moreno & Prada, 2004).

La información sobre una lesión tisular se transmite de la médula espinal al encéfalo a través de cinco vías ascendentes principales: espinotalámica, espinoreticular, espinomesencefálica, cervicotálamica y espinohipotálamica. La mayor parte de las vías ascendentes contiene axones de neuronas nociceptivas (Wall, 1967).

La mayoría de las proyecciones neuronales cruzan la línea media por la comisura gris anterior y van al cuadrante antero-lateral y contralateral, el fascículo ascendente cruzado de Dejerine. Los axones de las neuronas del asta dorsal forman las vías ascendentes:

a) Fascículo espino-talámico: es la vía nociceptiva ascendente más destacada de la médula espinal. Éste sale del cuadrante antero-lateral contra-lateral que recoge los estímulos nociceptivos hacia el tálamo. Comprende los axones de las neuronas específicas de la nocicepción y de amplio rango dinámico de las láminas I y V-VII del asta dorsal posterior. Estos axones se proyectan al lado contralateral de la médula espinal y ascienden a la sustancia blanca anteroexterna hasta llegar al tálamo. La estimulación eléctrica del haz espinotalámico provoca dolor, mientras que la lesión de

éste induce reducción de la sensibilidad dolorosa en el lado opuesto al de la lesión medular.

b) Fascículo espino-reticular: está formado por los axones de las neuronas de las láminas VII y VIII. Emerge del cuadrante antero-lateral y homo-lateral; los mensajes nociceptivos se proyectan sobre la formación reticular del tronco cerebral como el tálamo. En contraste con el haz espinotalámico, muchos de sus axones no cruzan la línea media.

c) Fascículo espino-ponto mesencefálico: comprende los axones de las neuronas de las láminas I y V. Se proyectan los mensajes en las estructuras del tronco cerebral (la sustancia gris periacueductal) en la región dorso-lateral del puente.

d) Fascículo cervicotálamico: surge de neuronas del núcleo cervical externo, localizado en la sustancia blanca externa de los dos segmentos cervicales superiores de la médula espinal. El núcleo cervical externo recibe señales de las neuronas nociceptivas de las láminas III y IV.

e) Fascículo espinohipotálamico: comprende los axones de las neuronas de las láminas I, V y VIII. Se dirige directamente a los centros de control autónomo supraespinal y se piensa que activa respuestas neuroendocrinas y cardiovasculares complejas en la integración de la respuesta en los centros superiores (Schultz, 2001).

Los centros superiores implicados en la nocicepción están formados por la formación de retículo bulbar, la formación retículo mesencefálica, las estructuras talámicas y el córtex cerebral. La zona reticular bulbar es el lugar de control e interacción de diversos sistemas que integran la vigilancia, respiración, función cardiovascular, motricidad y nocicepción. El retículo mesencefálico es la interfase entre los mecanismos del dolor y los relacionados con la amígdala y el hipotálamo, que se involucran con las reacciones emocionales, comportamentales y neuroendocrinas. Las estructuras talámicas donde convergen numerosas vías, como la vía ventro-postero-lateral, participan en la transmisión de información y análisis de estímulos relacionados con la intensidad, duración y localización. El córtex cerebral depende de la discriminación de las diferentes señales (Romera et al., 2000).

1.1.4.3 Vías descendentes del dolor

En la teoría de la compuerta de Wall y Melzack se propone la existencia de un sistema capaz de modular el dolor. Hoy se sabe que los centros supraespinales influyen en el procesamiento nociceptivo del asta dorsal a través de vías descendentes (Millan, 2002). Una parte importante es la sustancia gris periacudeductual, de ahí emergen y llegan proyecciones del hipotálamo, núcleo parabraquial, núcleo del tracto solitario y estructuras cortico límbicas incluyendo la corteza frontal, la amígdala y el tálamo. De la sustancia gris se proyectan neuronas hacia la parte baja del tallo cerebral en la médula rostral ventromedial, y al núcleo del *magnus raphé* que transmite el impulso por las fibras del cordón dorsolateral de la médula espinal; formando así conexiones sinápticas interneuronales del asta dorsal, las cuales también inhiben la descarga de las neuronas espinotalámicas (Vanderah, 2007).

Control descendente por las vías encéfalo-espinales

El asta posterior es el gran modulador, encontrando fibras periféricas y centrales que, proyectándose a las neuronas de conducción, modifican su actividad. El GABA inhibe la excitación neuronal. La estimulación serotoninérgica puede producir dolor. Las catecolaminas producen analgesia. Los péptidos opioides endógenos (POE), como las betaendorfinas, actúan como neuromoduladores. El dolor sólo aparece tras la modulación de la nocicepción a nivel periférico, medular, supraespinal y los mecanismos moduladores tienen un papel de filtro y de amplificación.

Las neuronas nociceptivas de segundo orden (NNSO) pueden sufrir cambios funcionales duraderos. Después de una estimulación repetida y persistente, las neuronas pueden aumentar progresivamente su respuesta. La hiperexcitabilidad de las neuronas nociceptivas de segundo orden, se denomina sensibilización central (Moreno, 2004). En ocasiones, al cesar el estímulo nociceptivo, persisten fenómenos de reducción del umbral del dolor, lo cual se llama alodinia, y el aumento a la respuesta a estímulos nociceptivos se llamará hiperalgesia (Pedrajas, 2008).

1.1.5 Sensibilización

En un proceso de daño en el tejido periférico incrementa la intensidad del dolor en respuesta a un estímulo lesivo (hiperalgesia) e induce dolor después de estímulos inocuos (alodinia) (Sasaki et al., 2006). Existen 2 tipos de hiperalgesia: la que se presenta en el sitio de lesión, llamada hiperalgesia primaria y la secundaria, que se presenta en los sitios adyacentes o alejados del área lesionada, involucrando mecanismos periféricos y centrales. La hiperalgesia primaria puede ser provocada por estímulos tanto térmicos como mecánicos, generando sensibilización de las fibras aferentes primarias (Cervero et al., 2003; Treede et al., 1992). La hiperalgesia secundaria es provocada por estímulos mecánicos alterando los procesos aumentando la excitabilidad en la médula espinal y el cerebro (sensibilización central) (Costigan & Woolf, 2000; Sasaki et al., 2006; Woolf & Ma, 2007).

La sensibilización periférica representa una forma de plasticidad de las fibras aferentes primarias. La sopa inflamatoria provoca una reducción del umbral de activación de las fibras aferentes primarias y aumentan su capacidad de respuesta, los estímulos de baja intensidad pueden acceder a la vía nociceptiva y producen dolor (Woolf & Ma, 2007).

La sensibilización central es otra forma de plasticidad cerebral en el sistema somatosensorial donde algunas lesiones tisulares accionan un aumento de la excitabilidad de las neuronas de la médula espinal, esto es originado por acumulación de potenciales sinápticos subumbrales, estimulando receptores NMDA. Esta plasticidad modifica la sensibilización del SNC, alterando las funciones químicas, electrofisiológicas y farmacológicas, generando una percepción exagerada de los estímulos (hiperalgesia o alodinia). El cerebro se encuentra en un estado de alerta permanente y reacciona de forma exagerada a los estímulos, incluso no dolorosos, magnificando así la información sensorial que llega del medio externo (Graven-Nielsen & Arendt-Nielsen, 2002; Winkelstein, 2004; Woolf, 1983; Woolf & Ma, 2007).

1.1.6 Alodinia e hiperalgesia

En situaciones patológicas, la activación de nociceptores llevará a dos tipos de estados de dolor: alodinia e hiperalgesia. La alodinia es una percepción anormal del dolor, debido a un estímulo que normalmente no provoca dolor. Viene del griego *Allo* que significa “otro” y *Odynia* con significado similar a la raíz griega -algia: Un estímulo que conduce a una respuesta inesperadamente dolorosa (IASP, 2021). En la alodinia hay una pérdida de la especificidad de la modalidad sensitiva. Hay alodinia mecánica y alodinia térmica, según el estímulo utilizado. La alodinia mecánica se divide a su vez en estática, si se aplica un solo estímulo, como la presión manual leve que causa un dolor sordo pesado y dinámica, por la aplicación repetida de estímulos suaves o por el paso suave sobre la piel de un cepillo, gasa o algodón, que origina un dolor agudo superficial (Figura 6). La alodinia térmica puede ser al frío o al calor. Se desencadena un dolor urente, que se puede comparar con otra región de piel no afectada y puede persistir más allá de la aplicación del estímulo (Loeser & Treede, 2008).

La hiperalgesia significa una respuesta exagerada a un estímulo doloroso, es decir, una hipersensibilidad al dolor. Esto se puede lograr por varios mecanismos, como la aplicación repetida de estímulos nocivos, donde los nociceptores cercanos que no responden previamente a los estímulos acaban por hacerlo, lo cual lleva a una sensibilización. La sensibilización de los nociceptores tras una lesión o inflamación libera diversas sustancias químicas de las células y tejido dañado, como la bradicinina, la sustancia P, la serotonina, la histamina, las prostaglandinas, los leucotrienos, el ATP y la acetilcolina (Romera et al., 2000). Las posibles causas de este fenómeno son las siguientes:

- Una sensibilidad excesiva de los receptores del dolor en el sitio de la lesión, lo que se conoce como hiperalgesia primaria.
- La facilidad de transmisión sensitiva en sitios adyacentes o lejanos, lo que se llama hiperalgesia secundaria.

El claro ejemplo de hiperalgesia primaria se da en la quemadura por el sol en la piel, donde se da una sensibilización de las terminaciones cutáneas al dolor, por las sustancias liberadas por la quemadura como la histamina, las prostaglandinas y otras.

La hiperalgesia secundaria se debe a lesiones en la médula espinal o en el tálamo. Los impulsos generados en los nociceptores en la zona lesionada o inflamada evocan cambios centrales que, a su vez, producen una hiperalgesia secundaria (Torebjörk et al., 1992).

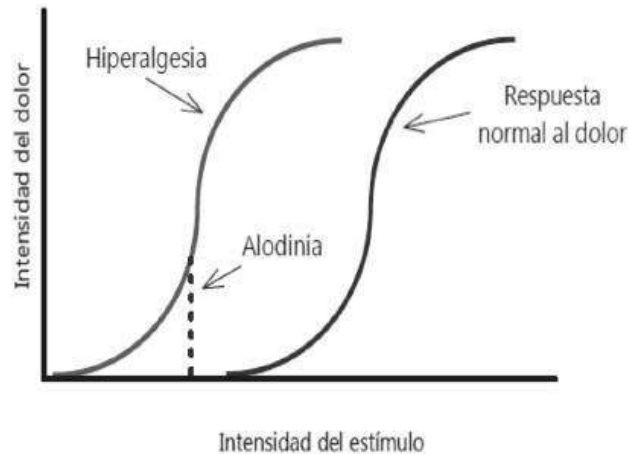


Figura 6. Diagrama que ilustra los cambios en la sensación de dolor inducida por una lesión. Modificado de Cervero & Laird, 1996.

Los cambios están disparados por los impulsos que llegan desde los nociceptores que inervan la zona lesionada y se mantienen debido a la mayor actividad de los nociceptores a causa de su sensibilización. Este proceso es llamado sensibilización central, por analogía a la sensibilización periférica, que se mantiene en el lugar donde ocurrió la lesión, e implica un aumento en la capacidad de excitación de las neuronas de segundo orden en la médula espinal y en las zonas supraespinales, aunado a un cambio radical en la activación sensorial de las fibras aferentes de bajo umbral que va desde el tacto al dolor. Algunos datos experimentales han demostrado que la actividad intensa o persistente en los nociceptores periféricos conduce a una mayor capacidad de respuesta de las neuronas del asta dorsal de la médula espinal (Cervero & Laird, 1996).

1.2 Tratamiento del dolor

1.2.1 Tratamiento del dolor inflamatorio

La disminución de la sensación de dolor se conoce como analgesia. Para que la analgesia se presente se deben activar ciertos sistemas endógenos, que ayudarán a que estos procesos dolorosos no interfieran con las funciones corporales normales. Los

fármacos utilizados para poder alcanzar este objetivo se conocen como analgésicos (Lipp, 1991).

El objetivo fundamental de la terapia analgésica es aliviar el dolor en reposo y durante el movimiento con la menor cantidad posible de efectos colaterales, pero mantener a la persona lúcida y consciente durante el día, sin afectar su ciclo circadiano.

Evidentemente, la búsqueda de nuevos fármacos con actividad analgésica sigue en aumento, esto se logra a través de las dilucidaciones de los mecanismos del dolor, teniendo como objetivo final encontrar fármacos más eficaces que ayuden a mejorar la calidad de vida de aquellos que sufren de dolor.

La escalera analgésica de la Organización Mundial de la Salud (OMS), o escalera terapéutica del dolor, fue establecida desde 1984 en la Convención en Ginebra. Ellos encontraron un modelo de cómo manejar el dolor por pasos o escalones, que se irán subiendo de acuerdo a la severidad del dolor y la etiología del mismo. En el escalón número 1 se encuentra el manejo para el dolor leve, el tratamiento de elección son los anti-inflamatorios no esteroideos (AINEs), se puede agregar adyuvantes como la cafeína. Para el dolor leve a moderado en el escalón 2, se manejan los AINEs ± adyuvantes y se pueden incluir opioides leves como codeína. En el escalón 3, con el dolor severo, su manejo es con opioides potentes como la morfina (Figura 7) (WHO, 1990).

Escala analgésica de la O.M.S.			
			Escalón IV
Escalón I	Escalón II	Escalón III	
Analgésicos no opioides ± Coanalgésicos	Opioides débiles ± Coanalgésicos ± Escalón I	Opioides potentes ± Coanalgésicos ± Escalón I	Métodos Invasivos ± Coanalgésicos
-----	-----	-----	
Paracetamol AINE Metamizol	- Codeína Tramadol	-- Morfina Oxicodona Fentanilo Metadona Buprenorfina	

Figura 7. Escala analgésica de la OMS (modificada 2005).

1.2.2 Tratamiento del dolor neuropático

El tratamiento del dolor neuropático es multidisciplinario considerando la comorbilidad asociada, la edad avanzada en algunos pacientes, y la presencia de crisis de ansiedad y depresión. Los analgésicos convencionales, como los AINEs y los opioides, ofrecen un efecto terapéutico limitado. Por lo tanto, se ha propuesto el uso de otro tipo de fármacos, como antidepresivos y anticonvulsivantes, con un éxito relativo, por la presencia de efectos adversos intolerables para los pacientes (Rey, 2013). El algoritmo de atención básica para el dolor neuropático abarca 4 grupos de fármacos clasificados de acuerdo a su sitio y mecanismo de acción. En el primer escalón se encuentran los antiepilépticos (carbamazepina, topiramato) y se puede agregar al tratamiento los antidepresivos (sertralina, duloxetina), en caso de haber dolor mixto se agregan AINEs. En el segundo escalón se usa lo anteriormente mencionado, adicionando opioides débiles como el tramadol. En el tercer escalón se encuentra lo anteriormente mencionado, solo cambiando opioides débiles por opioides potentes como la morfina. En el cuarto escalón se encuentran las técnicas analgésicas para el dolor refractario a tratamiento como el bloqueo neural (Figura 8) (Rey, 2013).

1 ^{er} Escalón	2 ^o Escalón	3 ^{er} Escalón	4 ^o Escalón
Antiepilépticos +/- Antidepresivos	Antiepilépticos +/- Antidepresivos +/- Opioides débiles (tramadol)	Antiepilépticos +/- Antidepresivos +/- Opioides potentes (morfina, buprenorfina)	Técnica analgésicas (terapia neuro modulación, bloqueo neural, cordotomía...)
AINE si hay dolor mixto	AINE si hay dolor mixto	AINE si hay dolor mixto	

Figura 8. Escala analgésica para dolor neuropático. Modificado de Rey, 2013.

1.2.3 Tratamientos combinados

En busca de una solución para el problema de salud del dolor en la población, se desarrollan fuentes terapéuticas efectivas y nuevas combinaciones tanto para el manejo del dolor nociceptivo como del dolor neuropático.

La combinación de analgésicos ofrece varios beneficios potenciales, comparado con un solo fármaco. La combinación de analgésicos en una sola presentación farmacéutica, podría facilitar la prescripción por el médico y lograr un buen apego al tratamiento por el paciente, ya que reduce la cantidad de medicamentos para tratar el dolor. Combinar fármacos con diferentes mecanismos de acción, ampliaría la cobertura de diferentes tipos de dolor, al mismo tiempo se podría potencializar el efecto farmacológico.

La coadministración de fármacos, los cuales pueden tener o no diferentes mecanismos de acción, proporciona cobertura multimodal de un amplio espectro de dolor, permitiendo que los agentes individuales interactúen, obteniendo 3 tipos de interacción farmacodinámica:

- a. Aditiva: esta situación se obtiene después de la coadministración de fármacos y el resultado es la simple suma algebraica de los efectos individuales de cada uno de los fármacos combinados.
- b. Subaditiva o antagónica: en este caso, la acción resultante de la coadministración de los fármacos es menor a la suma de cada uno de los agentes individualmente.
- c. Sinérgica, supraaditiva o superaditiva: el efecto obtenido es significativamente mayor a la suma de los efectos por separado de cada droga combinada. En este tipo de combinación se logran reducir las dosis de los fármacos y así disminuir los efectos adversos que estos poseen, manteniendo la eficacia (Brunton et al., 2007).

El efecto sinérgico de la combinación de los fármacos favorece el uso de dosis más pequeñas, se puede obtener una mejor respuesta y al mismo tiempo disminuir la incidencia de efectos adversos individuales, mejorando los perfiles de seguridad (Ortega-Varela, 2014).

La OMS y otras organizaciones médicas recomiendan ampliamente el uso de terapias combinadas para el manejo del dolor. Si dos fármacos actúan juntos, producen un efecto combinado que es consistente con sus potencias individuales, logrando un efecto aditivo, es decir, las dosis menores de cada componente de la combinación mantienen el efecto pero disminuyen los riesgos (Tallarida, 2016). En las combinaciones de fármacos donde uno de ellos carece de eficacia analgésica como agente individual, al combinarse se pueden potenciar los efectos analgésicos del otro fármaco (Suarez-Mendez et al., 2017). La presencia de sinergismo ha quedado demostrada con varios trabajos experimentales, donde se combinan analgésicos diferentes (Granados-Soto et al., 2005), como la combinación de metamizol-gabapentina (Ortega-Varela et al., 2009), o la combinación de ketorolaco-trometamina (Cervantes-Durán, et al., 2021).

1.2.3.1 Análisis isoblográfico

El estudio de la interacción entre dos sustancias activas se ha realizado utilizando el análisis isoblográfico, una estrategia utilizada en farmacología que ha dado lugar a la combinación óptima de fármacos de uso clínico. Este método ofrece una evaluación rigurosa de la interacción entre dos sustancias activas, ya que permite definir una simple adición de los efectos individuales (efecto aditivo), una atenuación (efecto subaditivo) o un sinergismo (efecto superaditivo) entre ellas. Lo anterior se realiza mediante la construcción de un isoblograma, que es una gráfica en coordenadas rectangulares de pares de dosis o concentraciones (A y B) de las sustancias respectivas que producen un nivel determinado de efecto (por ejemplo 50 % del efecto) cuando se aplican en forma conjunta. Se seleccionan las dosis del fármaco A y el fármaco B (cada uno por sí solo) que dan este efecto y se trazan como puntos axiales en un gráfico cartesiano (Figura 9) (las dosis se indican con letras que corresponden a los respectivos fármacos). La línea recta que une A y B es el lugar de los puntos (pares de dosis) que producirán este efecto en una combinación simplemente aditiva. Esta línea de aditividad permite una comparación con el par de dosis real que produce este nivel de efecto experimentalmente. Cabe destacar que algunas combinaciones de dosis pueden ser subaditivas (R), mientras que otras son superaditivas (Q) o aditivas (P) (Tallarida, 2001).

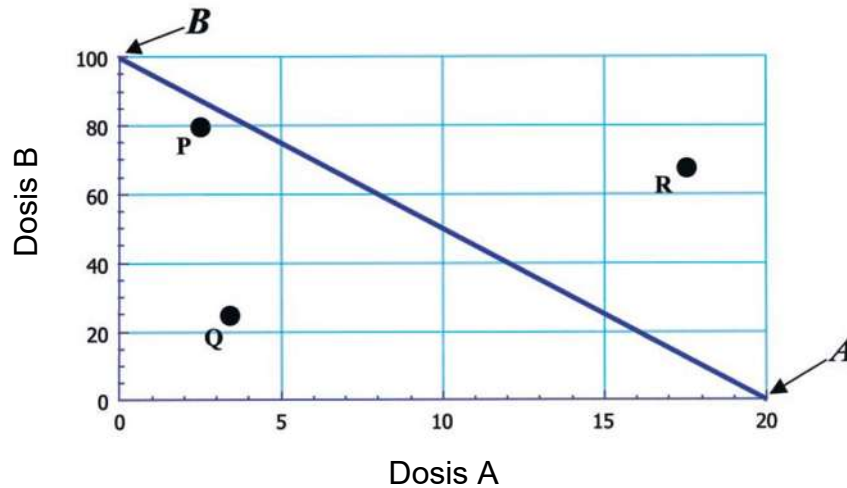


Figura 9. Isoblograma para algún efecto particular (por ejemplo, 50% del máximo) en el que la dosis del fármaco A solo es 20 y el fármaco B solo es 100. La línea recta que conecta estos puntos de intersección (línea de aditividad) es el lugar de todos los pares de dosis que, basándose en estas potencias, deberían dar el mismo efecto. Un par de dosis real como el punto Q alcanza este efecto con cantidades menores y es superaditivo (sinérgico), mientras que el par de dosis denotado por el punto R significa que se requieren mayores cantidades y, por lo tanto, es subaditivo. Un punto como el P que aparece por debajo de la línea probablemente sea simplemente aditivo. Se requiere un análisis estadístico adecuado para demostrar la naturaleza de la interacción. Tomado y modificado de Tallarida, 2001.

1.3 Fármacos antidiabéticos

La Federación Internacional de la Diabetes (FID) estima que en el 2019 había 463 millones de personas con diabetes mellitus (DM) y que esta cifra puede aumentar a 578 millones para el 2030. La neuropatía ocurre en el 50-70% de los pacientes y el dolor se manifiesta en más del 35 % de los pacientes diabéticos (Di Lorenzi et al., 2020; INEGI, 2021).

El dolor neuropático periférico diabético es de difícil manejo, ya que los tratamientos existentes son ineficientes. Por lo tanto, se necesitan nuevos tratamientos eficientes, seguros y dirigidos a las moléculas específicas en la patología nerviosa periférica, y a proteínas involucradas en dolor. A la metformina, un fármaco antidiabético, que tiene un mecanismo de acción sobre la activación de la proteína cinasa activada por monofosfato de adenosina (AMPK), se le han atribuido efectos benéficos sobre la reducción de la obesidad, en la protección cardíaca y en procesos inflamatorios en modelos de dolor agudo y crónico (Zhou et al., 2001; Hundal & Inzuchi, 2003).

1.3.1 Metformina

La metformina forma parte de la familia de las biguanidas, que proceden de la guanidina, un derivado de la *Galega officinalis*, planta que se ha usado desde la época medieval para el tratamiento de la diabetes. Se introdujo a finales de la década de 1950, por más de 60 años este fármaco ha sido el antidiabético oral más prescrito del mundo, siendo el medicamento de primera elección y en la primera línea de esquema de tratamiento (Rodulfo et al., 2017), ya que disminuye la gluconeogénesis y aumenta la recaptación de glucosa en el músculo. Además, se le han encontrado o atribuido más beneficios a su uso, por ejemplo en 1998 se realizaron varios estudios sobre los diversos efectos de la metformina, en pacientes con sobrepeso y obesidad, hígado graso, cardiovascular y cáncer (Augusto et al., 2019).

Propiedades y acciones de la metformina: La metformina es una molécula hidrofílica básica, cuya difusión pasiva a través de la membrana celular es muy limitada. Su absorción ocurre por el intestino delgado a través de los receptores de monoaminas de la membrana plasmática y se excreta sin cambios en la orina. Su paso al espacio intracelular es dado por los transportadores de cationes orgánicos (OCT), que están divididos en 5 subtipos; el OCT1 y el OCT3 están implicados en la función antidiabética porque están localizados principalmente en los hepatocitos (Rodulfo et al., 2017).

En el 2001, Zhou y colaboradores reportaron que la activación de la proteína cinasa activada por adenosín monofosfato (AMPK) estaba asociada con los efectos pleiotrópicos de la metformina. La AMPK es una enzima serina / treonina heterotrimérica compuesta por una subunidad α catalítica y dos subunidades reguladoras (β , γ). Hay doce combinaciones posibles del complejo $\alpha\beta\gamma$ AMPK heterotrimérico. Actualmente, dos cinasas explican la activación fisiológica de AMPK: la cinasa hepática B1 (LKB1) y la proteína cinasa 2 dependiente de Ca^{++} / CaM (CaMKK2). La AMPK se activa por fosforilación en la treonina 172 en la subunidad α -catalítica por LKB1 (Baeza-Flores et al., 2020). La AMPK actúa como medidor del estado de energía celular sistémica y participa en la protección de las funciones celulares en condiciones de bajo valor energético. Es activada por el incremento en la proporción AMP-ATP (adenosín monofosfato - adenosín trifosfato), que cambia cuando hay desequilibrio en la producción

y el consumo de ATP. Cuando el AMP se une a una de las subunidades de la AMPK se genera un cambio conformacional molecular que inhibe la desfosforilación en el sitio de activación de la subunidad alfa de esta molécula. Las vías catabólicas que aumentan la cantidad de ATP (ejemplo: consumo de glucosa y glucólisis) se activan por la enzima AMPK, mientras que las vías anabólicas consumidoras de ATP y otros procesos no esenciales (ejemplo: síntesis de proteínas, gluconeogénesis) se desactivan (Rodulfo et al., 2017). Los principales efectos metabólicos de la metformina son: hipoglucemiante, protector antidiabético, antiobesidad, antilipidémico, hepatoprotector y cardioprotector (Rodulfo et al., 2017; Zhou et al., 2001).

Estudios iniciales han sugerido la activación de la proteína cinasa activada por AMP (AMPK) como un mecanismo importante que media los efectos inducidos por la metformina, otros estudios han demostrado que la metformina actúa a través de mecanismos tanto dependientes de AMPK como independientes de AMPK. La investigación que tiene como objetivo el reposicionamiento de la metformina como fármaco analgésico se ve estimulada por la observación de que también se ha demostrado que la AMPK desempeña un papel en el procesamiento nociceptivo. La activación de esta enzima regula negativamente muchos eventos de señalización a través de la fosforilación de moléculas clave involucradas en el procesamiento nociceptivo tanto en el sistema nervioso central como en el periférico. También se ha demostrado que la respuesta nociceptiva en algunos modelos de dolor es inhibida por los activadores de AMPK, incluida la metformina (Augusto et al., 2019).

En varios estudios anteriores (Ge et al., 2018; Inyang et al., 2019; Russe et al., 2013; Zhou, G., Myers et al., 2001) se evaluó el efecto de la metformina en varias rutas de la activación de AMPK, donde al activarse la AMPK se inhibe el complejo de rapamicina 1 (mTORC1) dependiente de la fosforilación de la proteína p70 ribosomal S6 quinasa1 (p70S6K1) y fosfatidilinositol 3-quinasa / proteína quinasa B (PI3-K) / vía de señalización Akt. La metformina inhibió la formación del factor de iniciación de la traducción eucariota 4F (eIF4F), y produjo reducción de los niveles elevados de citocinas (interleucina-1 β y TNF- α), suprimiendo la expresión del transductor de señal y activador de la transcripción 3 (p - STAT3) (Baeza-Flores et al., 2020). De esta forma explicando

su efecto antinociceptivo, tanto para la nocicepción aguda como para la hiperalgesia secundaria.

Entre los efectos secundarios por el uso de metformina en pacientes se han encontrado trastornos digestivos, como diarrea, también su consumo se asocia a deficiencia de vitamina B12 (Rodulfo et al., 2017; Ahmed et al., 2016).

1.4 Melatonina

La melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) es una hormona sintetizada y secretada por la glándula pineal. La función principal de la melatonina secretada por la glándula pineal es transmitir la información de los ciclos diarios de luz y oscuridad al organismo, dado por el patrón de secreción durante la oscuridad, mandando así la información de la duración de la noche, desempeñando un papel en la regulación del ciclo de sueño-vigilia. Esto es útil para los organismos que responden a cambios en el fotoperiodo, como los ritmos circadianos o estacionales (Cardinali & Pévet, 1998).

Esta hormona se encuentra en todas las especies animales, incluyendo al hombre, se sintetiza a partir del aminoácido triptófano, que es tomado de la circulación y convertido en serotonina, la actividad secuencial de las enzimas: serotonina-acetiltransferasa y de la hidroxiindol-O-metiltransferasa convierten a la serotonina en melatonina (Reyes-Prieto et al., 2009). Ya formada ésta se difunde por los capilares sanguíneos y el líquido cefalorraquídeo, llegando al tercer ventrículo y después a los ventrículos laterales. Gracias a la facilidad de la melatonina de atravesar las membranas biológicas, en el sistema nervioso central alcanzará concentraciones más altas que en otros tejidos del organismo. Las concentraciones de melatonina en el líquido cefalorraquídeo son 10 veces más altas que la concentración sanguínea de melatonina de manera simultánea (Reiter & Tan, 2002; Tricoire et al., 2002).

La melatonina está involucrada en una amplia variedad de funciones como la regulación circadiana y estacional, el ciclo del sueño, en el sistema inmune estimulando la producción y actividad de las células T y las células natural killer (NK), así como regulando los factores de señalización de la respuesta inmunitaria, la inhibición del crecimiento tumoral, regula la temperatura corporal, la regulación de la presión arterial y atrapamiento de radicales libres (Tricoire et al., 2002); encontrando efectos

antinociceptivos, antidepresivos, ansiolíticos, antineófbos, reguladores de la actividad locomotora, neuroprotectores, efectos antiinflamatorios, retinianos, vasculares, antitumorales y antioxidantes (Ambriz-Tututi et al., 2009).

La melatonina participa en muchas de estas acciones a través de mecanismos mediados por receptores de membrana acoplados a proteínas Gi y receptores nucleares específicos de la familia RZR/ROR. Los receptores asociados con la melatonina son los siguientes: 1) Receptor de melatonina tipo 1a: MT1 (en la membrana celular), 2) Receptor de melatonina tipo 1b: MT2 (en la membrana celular) 3) MT3 o quinona reductasa 2 (Emet et al., 2016). La familia de los receptores MT desarrollan diversos mecanismos de transducción de señales que finalizan en respuestas fisiológicas específicas. La melatonina actúa directamente en las células sin la participación de los receptores a través de su unión a calmodulina o a través de la activación de la proteína cinasa C. En la acción antioxidante no participa ninguno de los receptores mencionados (Reiter y Tan, 2002).

La melatonina tiene la propiedad de ser una molécula anfipática, que le permite atravesar las membranas celulares con facilidad y puede concentrarse dentro de organelos subcelulares como la mitocondria, donde interactúa con los complejos de la cadena de transporte de electrones y como un intermediario oxidado. Otro efecto antioxidante indirecto de la melatonina es el aumento de la concentración de glutatión reducido y la disminución de la concentración de glutatión oxidado, y la disminución de hidroperóxidos (Martín et al., 2000).

Receptor de melatonina tipo 1a (MT1): Está codificado en el cromosoma humano nº 4 y consta de 351 aminoácidos. El receptor MT1 produce la inhibición de la adenilato ciclasa al unirse a proteínas G. Los receptores MT1 se encuentran comúnmente en la piel humana (Emet et al., 2016).

Receptor de melatonina tipo 1b (MT2): Está codificado en el cromosoma humano 11 y consta de 363 aminoácidos. El receptor MT2 produce la inhibición de la adenilato ciclasa al unirse a proteínas G. Además, inhibe la vía soluble de la guanilil ciclasa. A través de la activación del receptor de melatonina, se produce la inhibición de la adenilato ciclasa y se reduce la producción de AMP cíclico (AMPc). Los receptores MT2 están implicados en la actividad antidepresiva. Los receptores MT2 contribuyen a la

fisiopatología y farmacología de los trastornos del sueño, la ansiedad, la depresión, la enfermedad de Alzheimer y el dolor (Emet et al., 2016).

El receptor MT3 es una quinona reductasa 2 (QR2), que puede explicar parte del efecto de la melatonina en contra del estrés oxidativo, ya que esta enzima, al ser una reductasa, es capaz de recibir y donar electrones, puede llegar a transferir de 1 a 4 electrones dependiendo de la naturaleza del sustrato (Emet et al., 2016).

En un estudio se encontró la relación entre la melatonina y la percepción del dolor, donde en los pacientes con dolor crónico y fibromialgia se observaron concentraciones de melatonina (triptófano y serotonina) significativamente más bajas en orina y suero en comparación con voluntarios sanos. También se mostró que el tratamiento con melatonina fue capaz de mejorar los síntomas de dolor observados en la fibromialgia (Mantovani et al., 2006). La melatonina produce antinocicepción periférica y central. La melatonina puede aumentar los efectos de la beta endorfina y la antinocicepción inducida por agonistas del receptor opioide delta (Mantovani et al., 2006). La gamma-endorfina aumenta el nivel plasmático de melatonina, la morfina induce la liberación de melatonina de la glándula pineal y la melatonina puede inducir la liberación de beta-endorfina (Posa et al., 2017).

Es bien sabido que las vías serotoninérgicas (5-HT) están fuertemente involucradas en la modulación del dolor. Entre los receptores 5-HT que potencialmente contribuyen a la modulación de la transmisión nociceptiva, el receptor 5-HT₂ tiene un papel importante, ya que su activación en la médula espinal produce antinocicepción en presencia de la formalina. Particularmente, los receptores 5-HT_{2A} participan en el efecto antinociceptivo de la melatonina. Esta afirmación está respaldada por la demostración de que el pretratamiento de ratones con ketanserina (un antagonista del receptor 5-HT_{2A}) pudo prevenir el efecto antinociceptivo provocado por melatonina o DOI (un agonista del receptor 5-HT_{2A}, utilizado como control positivo) (Mantovani et al., 2006).

2. Justificación

El dolor es un problema de salud pública a nivel mundial, siendo la principal causa de consulta en las áreas de atención de primer nivel. Aproximadamente un tercio de la población mundial sufre de algún tipo de dolor. Los países se gastan grandes cantidades de su recurso económico en asuntos relativos al dolor. El mal manejo del dolor, tanto nociceptivo como patológico, nos lleva a un problema muy grande de salud a nivel mundial, ya que, si no es correctamente manejado, el dolor agudo se transformará con el paso del tiempo en dolor crónico. El dolor patológico afecta la calidad de vida de las personas, generando deterioro funcional y trastornos psicológicos.

Actualmente existen muchas alternativas terapéuticas, pero con demasiados efectos adversos y con pobres resultados, por lo tanto, con bajo apego al tratamiento. Se estima que sólo un 10% de los pacientes con dolor crónico se ve beneficiado con algún tipo de estos tratamientos.

La combinación de fármacos es una práctica muy utilizada y aprobada por la OMS, bien conocida y estudiada ampliamente, en busca de un sinergismo farmacológico para el manejo del dolor, tanto agudo como crónico, dando un balance entre efectividad y seguridad de los fármacos, buscando la dosis mínima eficaz de los fármacos, produciendo así un mínimo de efectos secundarios. A algunos medicamentos con el paso de los años se les encontraron efectos pleiotrópicos, como la aspirina, como un AINE y ahora su efecto como antiagregante plaquetario. El efecto pleiotrópico lo podemos encontrar en otros medicamentos ya conocidos. Los fármacos como la metformina y melatonina tienen efectos pleiotrópicos ya reportados. Por lo que el presente trabajo pretende analizar el efecto antinociceptivo de la metformina y la melatonina por separado y la interacción farmacológica de su combinación, buscando los efectos de la combinación anteriormente mencionados y así poder abarcar varios tipos de dolor.

3. Hipótesis

La combinación de metformina y melatonina presenta una interacción supra aditiva, en modelos preclínicos para la nocicepción aguda, la hiperalgesia secundaria y la alodinia en la prueba de formalina en ratas.

4. Objetivos

4.1 Objetivo general:

Determinar el efecto antinociceptivo de la metformina y la melatonina administradas de manera individual y en combinación en modelos preclínicos de dolor inflamatorio, hiperalgesia sostenida y alodinia secundaria.

4.1.1 Objetivos específicos:

- 1.- Evaluar la eficacia anti-nociceptiva de la metformina y la melatonina individualmente.
- 2.- Evaluar la eficacia anti-nociceptiva de los fármacos de la combinación de metformina y melatonina.
- 3.- Establecer el tipo de interacción de la metformina y la melatonina por medio del isoblograma.
- 4.- Explorar el potencial mecanismo de acción de la combinación de metformina y melatonina.
- 5.- Determinar el perfil de seguridad de la combinación estudiada.

5. Materiales y métodos

El tipo de estudio es exploratorio, analítico y experimental, se realizó en el laboratorio de Analgesia y Mecanismos del Dolor de la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas “Dr. Ignacio Chávez” de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, durante el periodo de septiembre 2021 a febrero del 2023.

5.1 Animales

Se utilizaron ratas hembras de la cepa Wistar, cuyos pesos oscilaron entre 170 – 250 gramos. Una parte de los animales se adquirió en la empresa privada Círculo ADN, otra del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas y otra más se obtuvo gracias a la producción propia en el laboratorio de Farmacodependencia, Analgesia y Mecanismos del Dolor de la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas “Dr. Ignacio Chávez” de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Los animales se mantuvieron en un ciclo de 12 horas de luz y oscuridad, estos tuvieron acceso a agua y alimento *ad libitum*. Todos los experimentos siguieron las pautas sobre estándares éticos para la investigación del dolor experimental en animales (Zimmermann, 1983) y la regulación mexicana (NOM-062 ZOO-1999) para el uso y cuidado de los animales de laboratorio. De manera adicional, el protocolo se encuentra en revisión por el Comité de Bioseguridad y Bioética del IIQB. Al terminar todos los experimentos las ratas fueron sacrificadas en una cámara de CO₂. Éste es un procedimiento para inducir la muerte de forma indolora, ya que el gas CO₂ es más pesado que el aire, la cámara de gas debe de estar precargada hasta el 70% de CO₂ antes de colocar a los animales dentro. Este procedimiento es seguro y relativamente económico (Smith & Harrap, 2016).

5.2 Fármacos

Metformina $\geq 98\%$ (marca SIGMA Registro: PHR1084-500 mg). Melatonina $\geq 98\%$ de 1 g (marca SIGMA). Compound C (dorsomorfina), un inhibidor selectivo de AMPK de 5 mg (marca SIGMA). El 4-P-PDOT, un antagonista selectivo de los receptores MT2 de melatonina, 5 mg de marca SIGMA. El luzindole, un antagonista de los receptores MT1 y MT2 de la melatonina, de 5 mg marca SIGMA. La naloxona, antagonista de los receptores opioides, 10 mg (marca SIGMA). Carboximetilcelulosa de 250 g (marca MEYER). Dimetilsulfoxido (DMSO), registro: D5879-500 ml de la marca SIGMA. Formaldehído, registro: 1405-500 ml (marca MEYER) en solución al 5%, con el que se preparó con solución salina la formalina al 1%. Se prepararon además soluciones de metformina y melatonina con carboximetilcelulosa al 1% como vehículo. El compuesto C, el 4P-PDOT, el luzindole y la naloxona se disolvieron en DMSO.

5.3 Modelo de dolor inflamatorio

5.3.1 Nocicepción inflamatoria aguda inducida por formalina

La nocicepción inflamatoria aguda se evaluó mediante la prueba de formalina descrita por Dubuisson y Dennis (1977), con algunas modificaciones (Wheeler-Aceto et al., 1990; Rocha-González et al., 2005). Se trata de un modelo de dolor inflamatorio ampliamente usado para evaluar las conductas nociceptivas inducidas por un estímulo químico nocivo. La formalina subcutánea al 1% produce un comportamiento nociceptivo agudo a lo largo de una hora que consta de dos fases, que se caracterizan por la aparición de conductas, como lamida y sacudida de la extremidad. La fase 1 va del minuto 0 a los 10 minutos posteriores a la inyección subcutánea, sabiendo que esto resulta de la activación directa de fibras nociceptivas aferentes primarias (Rocha-González et al. 2005; Wheeler-Aceto et al., 1990). La fase 2 va del minuto 11 al minuto 60, está se presenta por la liberación de mediadores inflamatorios a nivel periférico y central, que ocasionan sensibilización en ambas regiones (Costigan & Woolf, 2000; Woolf & Ma, 2007).

El modelo se llevó a cabo con un grupo experimental a la vez, para lo cual se colocaron las ratas de manera individual en contenedores de observación de acrílico transparente con espejos adheridos a sus paredes con el fin de facilitar la observación, donde permanecieron 40 minutos con el propósito de permitirles acostumbrarse al entorno. Una vez transcurridos los 40 minutos, las ratas fueron removidas para la inyección subcutánea de 50 μ l de formalina (solución diluida de formaldehído al 1%). Las ratas fueron sujetadas suavemente con una toalla, y la inyección se realizó en la región dorsal de la pata trasera derecha, empleando una aguja de calibre 31, induciendo de esta forma el estímulo doloroso. Después de la inyección de formalina, las ratas fueron colocadas nuevamente al interior de los contenedores, manifestándose en ellas una conducta nociceptiva inmediatamente después de la inyección de formalina. El comportamiento nociceptivo se caracterizó por una retirada rápida y breve de la pata, o por una flexión de la pata trasera derecha, acompañada de lamidas. Para la evaluación se contó el número de sacudidas de pata trasera inyectada durante periodos de 1 minuto, cada 5 minutos, hasta cumplir 60 minutos (Figura 10). La conducta dolorosa en este modelo es bifásica: la primera fase, la fase aguda inicial (0-10 min), que fue seguida por la segunda fase de reposo relativamente corto, a la que le siguió una respuesta tónica prolongada (11-60 min) después de la inyección del irritante químico (Tjølsen et al., 1992). En este modelo, la disminución en el número de sacudidas se interpreta como un efecto antinociceptivo.

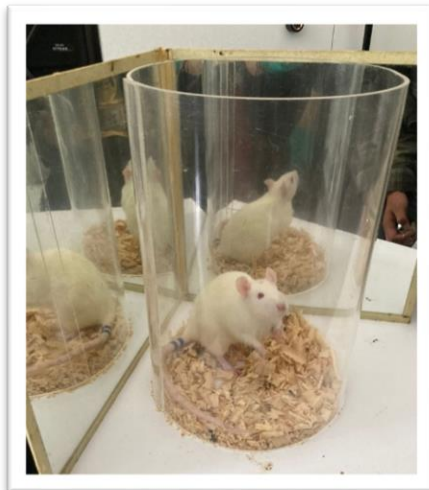


Figura 10. Prueba de formalina al 1 %. La rata se colocó dentro de un cilindro de acrílico transparente, para su observación de 360°; se inyectaron 50 μ l de formalina al 1 % en el dorso de la pata trasera derecha, se contó la cantidad de sacudidas por 1 minuto, cada 5 minutos, por 60 minutos en total.

Los fármacos se administraron 60 minutos previos a la inyección de formalina, por vía oral, con cánula rígida, en dosis crecientes: Metformina (30, 100, 300 y 1000 mg/Kg) y melatonina (10, 30, 75 y 150 mg/Kg). Se obtuvieron las curvas dosis respuesta individuales y se determinaron las DE₅₀ de cada fármaco; por medio del isoblograma se determinó la dosis efectiva 50 teórica de la combinación (DE₅₀ T). Este valor teórico se comparó luego con el valor experimental de la DE₅₀ para determinar si hay una diferencia estadísticamente significativa. Los valores teóricos y experimentales de las dosis efectivas de las combinaciones estudiadas se contrastaron calculando el índice de interacción (γ). El índice de interacción indica qué proporción de la DE₅₀ de los medicamentos individuales representa la DE₅₀ correspondiente a la combinación, es decir, los valores cercanos a 1 corresponden a una interacción aditiva, valores por arriba de 1 implican una interacción antagonista y los valores por debajo de 1 indican una interacción sinérgica (Ortega-Varela et al., 2007).

5.3.2 Prueba de hiperalgesia y alodinia secundarias

Para la inducción de hiperalgesia y alodinia secundarias, las ratas fueron cuidadosamente inmovilizadas para tener acceso a sus extremidades posteriores. Después se les administraron 50 μ l de formalina al 1% por vía subcutánea en la superficie dorsal de la pata posterior derecha. La sensibilización inducida por la inyección de formalina se evaluó los días 1, 3, 6, 9 y 12. Sin embargo, se eligió el día 6 para evaluar los comportamientos nociceptivos, ya que se considera que es el día en que se estableció la hipersensibilidad (Cervantes-Durán, et al., 2017; Castañeda-Corral et al., 2009). Para la evaluación de la hiperalgesia y la alodinia secundaria se colocaron a las ratas en jaulas de prueba con un fondo de malla de alambre y se dejaron aclimatar durante un periodo de tiempo de 40 minutos. Se utilizaron 2 filamentos de Von Frey (Stoelting Co., Wood Dale, IL) con fuerzas de flexión de 10 mN (1 g) y 250 mN (26 g), los cuales se aplicaron 10 veces en cada grupo experimental en la superficie plantar de ambas patas, tanto para la evaluación basal como para la evaluación de dolor sostenido. Se realizaron tres ensayos para poder obtener un promedio del número de respuestas de retiro de la pata. En condiciones normales, una fuerza de 10 mN no activa los nociceptores cutáneos, ni

provoca la retirada de la pata en animales normales. Por consiguiente, la aparición de respuestas al filamento de 10 mN es indicativa de alodinia. Por otro lado, una fuerza de 250 mN o más se considera un estímulo nocivo y la hiperalgesia se produce cuando hay una mayor respuesta al filamento de 250 mN. La alodinia y la hiperalgesia se consideraron secundarias, ya que la estimulación con los filamentos de von Frey se aplicó en otro sitio diferente al de la inyección de formalina (Figura 11) (Castañeda-Corral et al., 2009; Godínez-Chaparro et al., 2011; Ambriz-Tututi, et al., 2009).



Figura 11. Prueba de hiperalgesia y alodinia táctil. Evaluación de la respuesta de retiro a los filamentos de von Frey. Los filamentos están graduados logarítmicamente en gramos de presión. El retiro de la pata se considera una respuesta positiva y puede indicar hiperalgesia o alodinia.

5.4 Diseño del estudio

5.4.1 Tamaño de la muestra

Se usaron 186 ratas hembra Wistar, las cuales fueron divididas en 28 grupos experimentales.

Para evaluar el posible efecto analgésico y antiinflamatorio agudo de la metformina y de la melatonina, se utilizó el modelo de la prueba de formalina. Para los grupos experimentales se realizó una curva de dosis respuesta en 4 dosis distintas de manera creciente, para cada uno de los grupos (Tabla 2). Las dosis de la combinación metformina-melatonina fueron determinadas mediante el análisis isoblográfico.

Tabla 2. Tabla de distribución de dosis de metformina y melatonina vía oral.				
Grupo experimental n=6 por dosis				
Fármacos por vía oral				
Metformina	30 mg/Kg	100 mg/Kg	300 mg/Kg	1000 mg/Kg
Melatonina	10 mg/Kg	30 mg/Kg	75 mg/Kg	150 mg/Kg
Grupos control n=6				
Solución salina		Solución salina 1 ml/Kg		
Vehículo		Carboximetilcelulosa al 1%		

5.5 Estrategia experimental

Para descartar que el vehículo (carboximetilcelulosa al 1 %) pudiera tener algún efecto analgésico, se realizó un grupo control con solución salina, y otro tratado con carboximetilcelulosa al 1 %. Al grupo de solución salina se le inyectaron 50 µl de formalina al 1% en el dorso de la pata trasera derecha por vía subcutánea y por vía oral se le administró solución salina y al grupo vehículo se le administró carboximetilcelulosa por vía oral. Al grupo de metformina se le administró metformina en 4 dosis crecientes de 30, 100, 300 y 1000 mg/kg en solución de carboximetilcelulosa al 1%, por vía oral, con ayuda de una cánula rígida (Montes, 2012), 60 min previos a la aplicación de la formalina al 1%. La melatonina se disolvió en carboximetilcelulosa al 1 %, se administraron 4 dosis de manera creciente de 10, 30, 75 y 150 mg/kg, se les dio por vía oral con ayuda de una cánula rígida 60 minutos antes de la inyección de formalina (Figura 12 y 13) (Arreola-Espino et al., 2007).

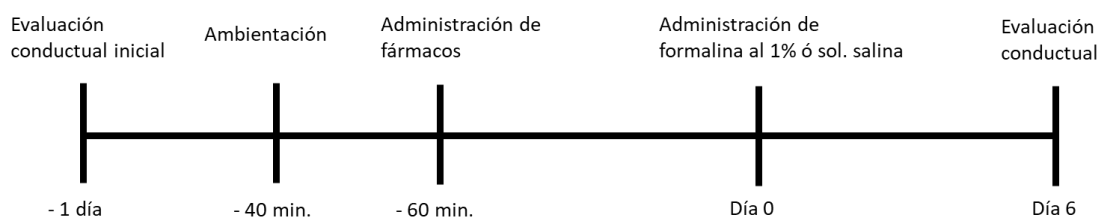


Figura 12. Diseño experimental de los pre-tratamientos.

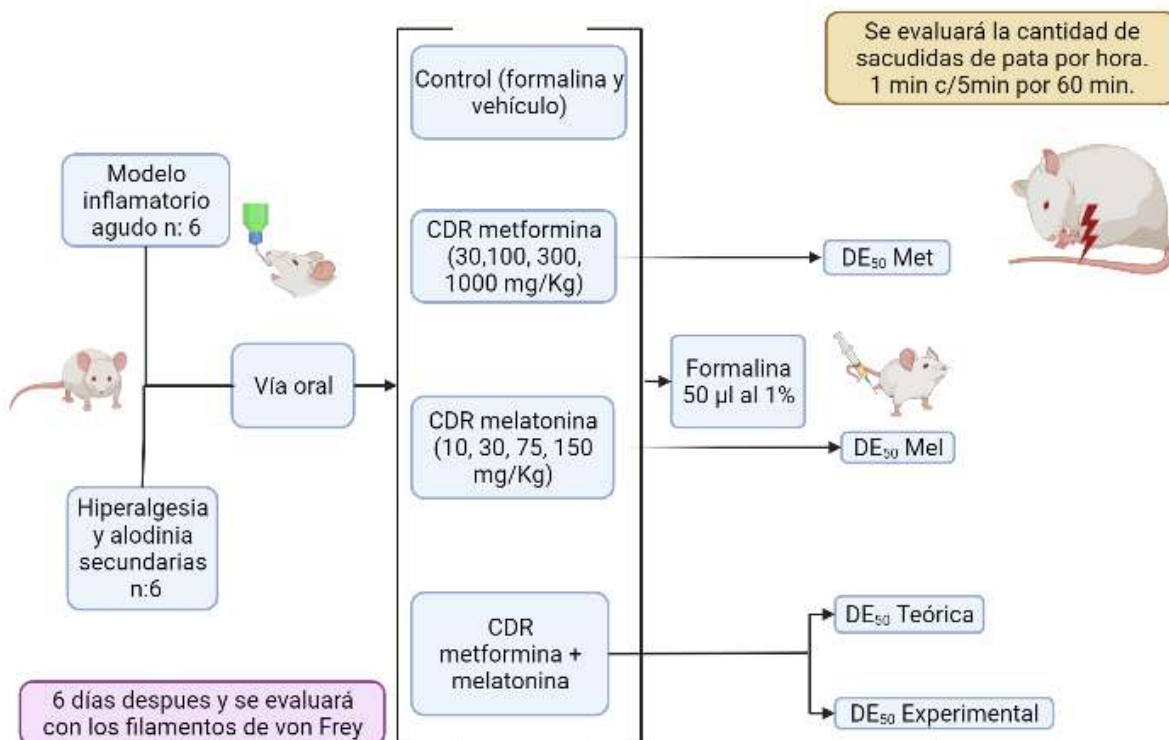


Figura 13. El esquema de los grupos experimentales empleados en el modelo de dolor inflamatorio agudo y de dolor neuropático, se realizaron las curvas dosis-respuesta (CDR) de los fármacos administrados de manera individual y en combinación. Cada grupo con un número de 6 ratas cada uno.

5.6 Hiperalgesia y alodinia secundarias

La hiperalgesia y la alodinia secundarias se establecieron a los 6 días después de la inyección de formalina. Por lo tanto, para evaluar la hiperalgesia y la alodinia secundarias se utilizaron los filamentos finos de polietileno de von Frey con las fuerzas de presión de 10 y 250 mN, se colocaron a las ratas en jaulas de prueba con un fondo de malla de alambre para observar el retiro de la extremidad ipsilateral y contralateral. Los filamentos se aplicaron 10 veces en cada grupo experimental en la superficie plantar, considerándose respuestas positivas si se presentan más de 3 retiros para alodinia y más de 4 para la hiperalgesia (Ambriz-Tututi et al., 2009; 2011).

5.7 Efecto de la combinación en el dolor sostenido ya establecido

Para evaluar el efecto analgésico de la DE₅₀ de cada fármaco en dosis individual y la DE_{50E} de la combinación en el dolor sostenido con presencia de hiperalgesia y alodinia secundarias establecidas, se inyectó formalina al 1 % en la pata trasera derecha de cada rata, el día 6 se evaluó la presencia de hiperalgesia y alodinia en cada grupo para verificar la presencia de dolor sostenido. Se administró por vía oral la DE₅₀ individual de metformina, melatonina y la DE_{50E} de la combinación 60 minutos previos a la nueva evaluación con los filamentos de von Frey (Martínez-Rojas et al., 2014). El día 9 se repitió otra nueva administración de las mismas dosis para comparar la respuesta con la anterior. El día 12 se evaluó nuevamente para corroborar la presencia de hiperalgesia y alodinia en todos los grupos experimentales (Figura 14).



Figura 14. Diseño experimental del post-tratamiento.

5.8 Mecanismo de acción

Con el fin de obtener información acerca del posible mecanismo de acción de la combinación farmacológica de metformina-melatonina, se recurrió al empleo de algunos inhibidores o antagonistas de las vías analgésicas estudiadas (Figura 15) (Tabla 3). De esta manera, la DE₅₀ se obtuvo de manera experimental para la combinación. Primeramente, se aplicó una inyección de 50 μ l con la solución del antagonista o inhibidor correspondiente, 10 minutos previos de la administración oral de la combinación, transcurridos 60 minutos se inyectaron 50 μ l de la formalina al 1% en la pata trasera de la rata. Los inhibidores fueron: 4-P-PDOT (antagonista selectivo del receptor MT₂ de melatonina, dosis de 1 mg/Kg), luzindole (antagonista competitivo de los receptor MT₁ y

MT2 de melatonina, dosis 1 mg/Kg), Compuesto C/Dorsomorfina (un inhibidor selectivo de la AMPK, dosis de 3 mg/Kg), y naloxona (un antagonista de los receptores opioides, dosis de 1 mg/Kg), las dosis se escogieron basándose en estudios anteriores (Arreola-Espino et al., 2007; Liu et al., 2014; Kuthati et al., 2019).

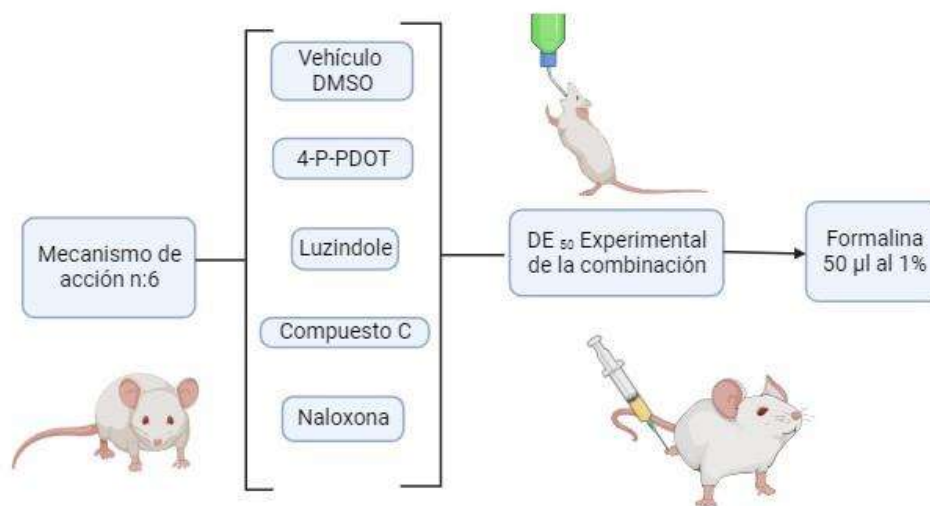


Figura 15. Esquema de administración de la exploración del mecanismo de acción en la combinación, se administró un pretratamiento con los antagonistas (4-P-PDOT, luzindole y naloxona) e inhibidor de AMPK (dorsomorfina), se administró una dosis de la DE₅₀ de la combinación para evaluar su capacidad de revertir el efecto antinociceptivo de la combinación. DE₅₀, dosis necesaria para producir un 50 % del efecto máximo posible.

Tabla 3. Fármacos y dosis para evaluar el posible mecanismo de acción de la metformina y la melatonina	
n=6	
Antagonistas	Dosis
4-P-PDOT	1 mg/kg s.c.
Luzindole	1 mg/Kg s.c.
Naloxona	1 mg/Kg s.c.
Dorsomorfina	3 mg/Kg s.c.
Grupo control n=6	
DMSO	50 µl s.c.
Grupo de la combinación n=6	
Combinación DE ₅₀ E	360.83 mg/Kg

5.9 Evaluación de la actividad motora

El Rota-Rod, también conocido como prueba de varilla giratoria, se utiliza como una herramienta de evaluación básica para la coordinación y el equilibrio en roedores y proporciona una medida de la capacidad locomotora, para evaluar posibles efectos secundarios motores por la presencia de los medicamentos que serán estudiados. En su forma más básica, la varilla giratoria se compone de un cilindro giratorio sobre el que se coloca un animal. A medida que el cilindro gira, el animal debe moverse hacia adelante para evitar caerse del cilindro (Tabla 4) (Gómez & Tortorice, 2009).

Tabla 4. Tabla de distribución de dosis para la prueba del Rota-Rod		
Prueba de Rota-Rod n=6		
Combinación vía oral	Metformina	Melatonina
	473.72 mg/Kg	63.42 mg/Kg
Control positivo Rota-Rod vía oral n=6		
Diazepam 10 mg/Kg		
Control negativo Rota-Rod n=6		
Carboximetilcelulosa 1 %		

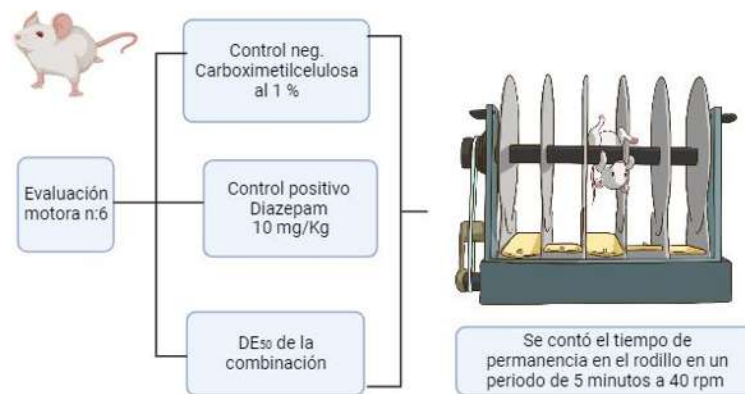


Figura 16. Esquema de la evaluación motora en la prueba de Rota-Rod, se usó un control positivo (diazepam) y un control negativo (carboximetilcelulosa al 1%) vs la DE₅₀ de la combinación de metformina y melatonina.

Se entrenó a las ratas por 2 días. Se les enseñó la tarea, es decir, permanecer en la barra hasta que se detenga. El cuerpo de la rata se colocó perpendicular al eje de rotación, con la cabeza mirando hacia la dirección de rotación; por lo tanto, el animal debe moverse hacia adelante para permanecer en la barra. Por lo general, el entrenamiento debe realizarse a la velocidad de rotación más baja (4 r.p.m.), después ira subiendo la velocidad hasta alcanzar 40 r.p.m., en 5 minutos. Los animales entrenados recibieron una dosis oral de carboximetilcelulosa al 1%, diazepam 10 mg/kg, o la combinación de metformina y melatonina en la dosis efectiva 50 experimental, 60 minutos antes de la prueba (Figura 16). Se utilizó diazepam (10 mg/kg) como control positivo, ya que éste produce efectos secundarios de alteración motora. El rendimiento motor se considera como la latencia de caída de la varilla giratoria a partir del tiempo medio en tres ensayos por cada rata en cada evaluación (Zúñiga-Romero et al., 2014).

6. Análisis de datos

Los resultados obtenidos se expresaron en gráficas como el promedio \pm el error estándar de los 6 animales por grupo. En la prueba de formalina, las gráficas se trazaron con base en el número de sacudidas por minuto, el área bajo la curva (ABC) de cada tratamiento comparado con el control sirvió para determinar un porcentaje de antinocicepción. Para la hiperalgesia o alodinia secundarias, se obtuvo por el número de retiros de pata por el filamento correspondiente. Las diferencias obtenidas entre cada grupo se analizaron por medio del análisis de varianza (ANOVA), de una o dos vías, seguido de una prueba de Tukey o Student-Newman-Keuls, con una diferencia estadística con un valor de $p < 0.05$.

Se realizó un análisis isoblográfico para poder determinar la naturaleza de las interacciones farmacológicas entre la metformina y la melatonina. Con este análisis asumimos que la combinación de los fármacos representa dosis equivalentes de los fármacos individuales. Por lo tanto, a partir de las curvas dosis respuesta de cada fármaco, se obtuvo una dosis efectiva 50 teórica (DE_{50T}) de la combinación de metformina y melatonina. A partir de la DE_{50T} estimada, se tomaron 4 fracciones con la misma proporción para realizar una curva dosis respuesta de la combinación y obtener

una dosis efectiva 50 experimental (DE_{50E}), que fue comparada con la DE_{50T} para establecer la naturaleza de la interacción farmacológica (Arreola-Espino et al., 2007; Zúñiga-Romero et al., 2014).

Las diferencias entre la DE_{50} teórica y la experimental se establecieron por medio de la prueba de t Student, con un valor de $p < 0.05$; un índice de interacción (γ) menor a uno nos indica un efecto sinérgico.

Para el posible mecanismo de acción, los datos se expresaron como el promedio \pm el error estándar de 6 animales. El área bajo la curva de cada grupo comparado con el control sirvió para determinar el efecto del pretratamiento periférico local ipsilateral de los antagonistas. Las diferencias obtenidas entre cada grupo se analizaron por medio del análisis de varianza de una vía.

7. Resultados

7.1 Efecto antinociceptivo de la administración oral de la metformina y la melatonina de manera individual

La inyección de formalina al 1% en la superficie dorsal de la pata posterior derecha de la rata produjo un patrón de conducta nociceptiva caracterizada por sacudidas de la pata, siguiendo un patrón bifásico en un tiempo de 60 minutos. La primera fase (0-10 minutos) inició inmediatamente después de la administración de formalina, donde se muestra primeramente la respuesta nociceptiva y al final de esta fase se observa la disminución en el número de sacudidas de la pata inyectada con formalina. En la segunda fase (11-60 minutos) se observó de manera gradual un aumento y un descenso de las sacudidas de la pata trasera derecha inyectada. La administración por vía oral de metformina y melatonina produjo una reducción del comportamiento nociceptivo en ratas administradas con formalina al 1% (Figura 17), el efecto del vehículo utilizado (carboximetilcelulosa al 1%) no fue significativamente diferente a la curva obtenida por la formalina al 1% + solución salina al 0.9%, lo que asegura que el vehículo no generó un efecto antinociceptivo por sí solo.

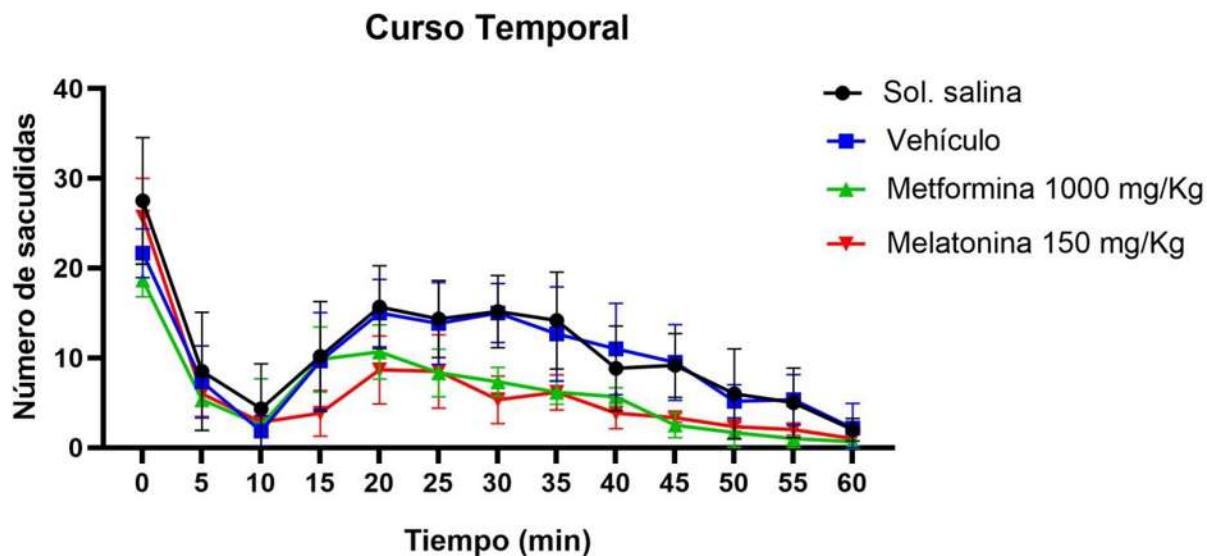
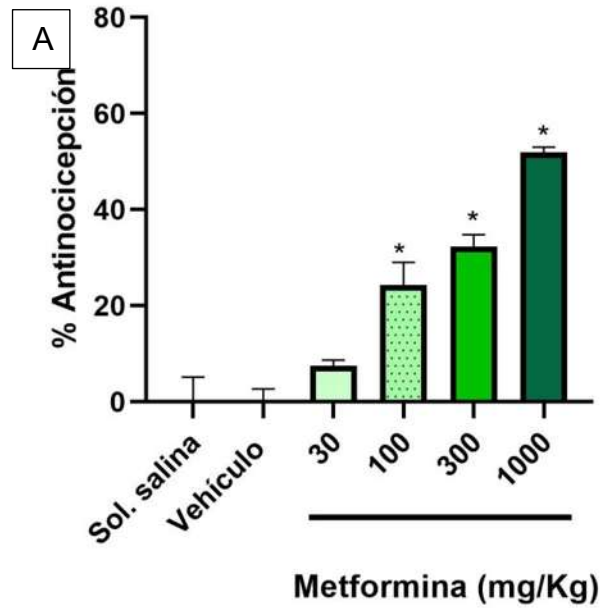


Figura 17. Curso temporal del efecto antinociceptivo de la metformina y la melatonina en ratas sometidas a la inyección subcutánea de formalina al 1 % (50 μ l) en la región dorsal de la pata posterior derecha de la rata, después de la administración oral (-1 h) de los fármacos. Los datos se expresaron como la media del número de sacudidas \pm e.e. de 6 animales evaluados con las dosis más altas de los fármacos. Se observaron diferencias significativas en el tratamiento solamente en la fase 2 (11-60 min) de acuerdo al análisis por ANOVA de dos vías seguido de una prueba de Tukey.

Al analizar el área bajo la curva (ABC), se observa el efecto de las dosis individuales de metformina y melatonina administrados por vía oral; en la fase 1 de la prueba no se ven efectos dependientes de la dosis (Tabla 5). En la fase 2 se encontraron efectos analgésicos estadísticamente significativos dependientes de la dosis, siendo las dosis más altas donde se observa un aumento del porcentaje antinociceptivo (Figura 18).

Tratamiento	% Efecto máximo antinociceptivo en la fase 1
Formalina (50 μ l/pata y carboximetilcelulosa al 1%)	0.0 \pm 2.6
Metformina (1000 mg/Kg)	22.7 \pm 10.2
Melatonina (150 mg/Kg)	0.4 \pm 7.3
Combinación metformina (473.72 mg/Kg) y melatonina (63.42 mg/Kg)	24.5 \pm 2.3

Efecto de la metformina vía oral (ABC-2)



Efecto de la melatonina via oral (ABC-2)

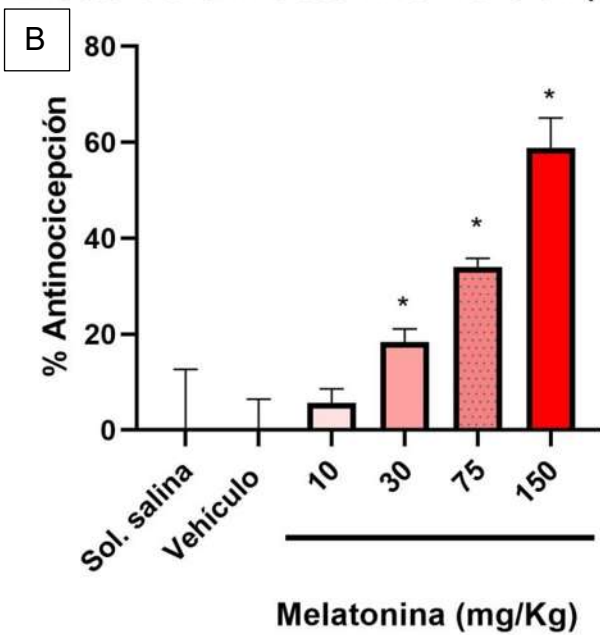


Figura 18. Porcentaje antinociceptivo que se observa tras la administración oral de la metformina (A) y la melatonina (B), durante la fase 2 de la prueba de formalina al 1%. Los datos se expresan como el porcentaje de antinocicepción. Las barras representan la media \pm e.e. de 6 animales. Se encontraron valores significativamente diferentes al grupo control y vehiculo * $p < 0.05$, por una prueba de ANOVA de una vía seguido por una prueba de Tukey.

7.2 Efecto antinociceptivo de la combinación de metformina y melatonina vía oral

La DE₅₀ se calculó a partir de la curva dosis respuesta, los valores se sometieron a un análisis isoblográfico, este análisis nos proporciona la base para poder evaluar si la respuesta inducida por la combinación de los fármacos es menor, igual o mayor de lo teóricamente esperado. La DE₅₀ de la metformina fue de 947.46 ± 242.58 mg/Kg y de la melatonina de 126.85 ± 37.97 mg/Kg. La dosis efectiva teórica (DE_{50T}) de la combinación metformina-melatonina se calculó de 537.15 ± 122.76 mg/Kg. A partir del valor obtenido de la combinación anterior, se obtuvieron las primeras 4 dosis de la combinación metformina-melatonina, para obtener la curva experimental (Tabla 6). Se realizó la prueba de formalina para las 4 primeras dosis de la combinación, donde se observa una disminución de las sacudidas de la pata inyectada (Figura 19). Las 4 dosis de la combinación administradas por vía oral mostraron efectos analgésicos estadísticamente significativos dependientes de la dosis (Figura 20).

Combinación	Metformina (mg/Kg)	Melatonina (mg/Kg)
1	59.21	7.92
2	118.43	15.85
3	236.86	31.71
4	473.72	63.42

Curva de curso temporal de la combinación

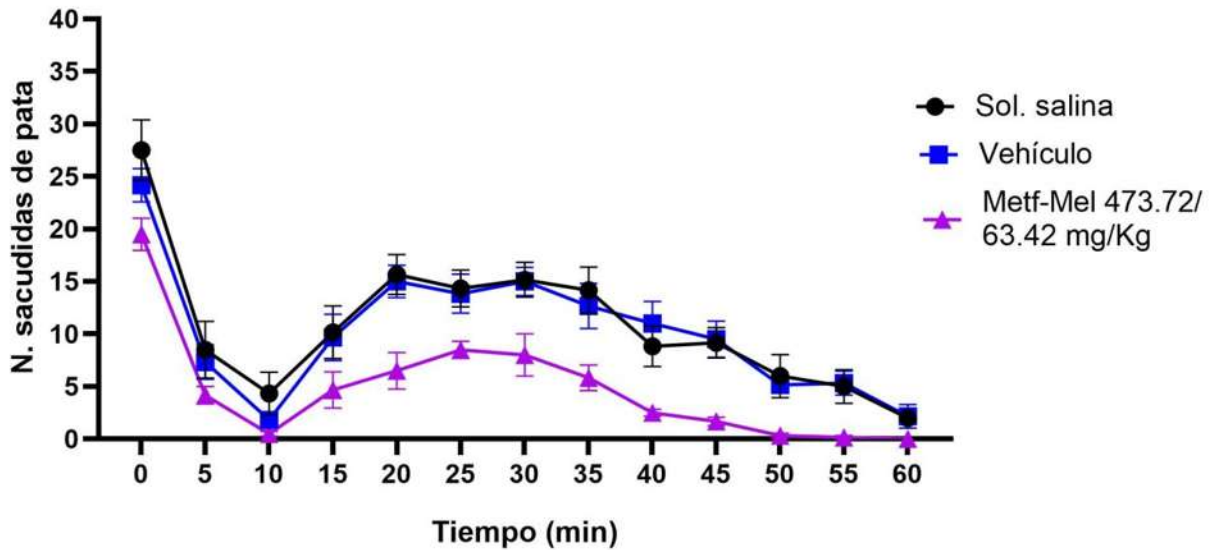


Figura 19. Curso temporal del efecto antinociceptivo de la dosis más alta de la combinación, en ratas sometidas la inyección subcutánea de formalina al 1% (50 µl) en la región dorsal de la pata posterior derecha de la rata, después de la administración oral (-1 h) de los fármacos. Los datos se expresan como la media del número de sacudidas de la pata ± e.e. de 6 animales evaluados con la dosis más alta de los fármacos de la combinación. Se observaron diferencias significativas en el tratamiento con la combinación metformina-melatonina con un valor de $p < 0.05$, de acuerdo a un ANOVA de dos vías seguido de una prueba de Tukey.

Efecto de la combinación (ABC-2)

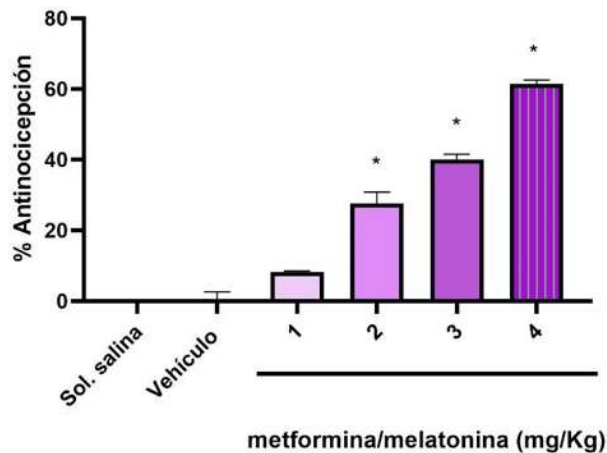


Figura 20. Porcentaje antinociceptivo que se observa tras la administración oral de las diferentes dosis de la combinación farmacológica de metformina y melatonina, durante la fase 2 de la prueba de formalina al 1%. Los datos se expresan como el porcentaje de antinocicepción del máximo efecto posible. Las barras representan la media del número de sacudidas de la pata ± e.e. de 6 animales. Se encontraron valores significativamente diferentes al grupo control y vehículo * $p < 0.05$, por una prueba de ANOVA de una vía seguido por una prueba de Tukey.

7.3 Interacción farmacológica por medio del isoblograma

Con los resultados del efecto de la combinación se obtuvo experimentalmente el valor de 360.83 ± 23.36 mg/Kg, correspondiente a la dosis efectiva 50 experimental (DE_{50E}). Se comparó la DE_{50T} y la DE_{50E}, siendo menor la DE_{50E}, al obtenerse el índice de interacción (γ) resultó de 0.672, que es menor a 1, lo que indica que se produjo un sinergismo (Tabla 7). La comparación entre ambas dosis tuvo una diferencia estadísticamente significativa de acuerdo con la prueba de t realizada. Además, eso se puede observar de manera gráfica en el isoblograma (Figura 21).

Fármacos administrados vía oral				
DE ₅₀ ± e.e. Metformina (mg/Kg)	DE ₅₀ ± e.e. Melatonina (mg/Kg)	DE ₅₀ ± e.e. Teórica (mg/Kg)	DE ₅₀ ± e.e. Experimental (mg/Kg)	Índice de Interacción (γ) ± e.e.
947.46 ± 242.58	126.85 ± 37.97	537.15 ± 122.76	360.83 ± 23.36	0.672 ± 0.1596
e.e. = Error estándar DE ₅₀ = Dosis efectiva 50				

Isoblograma oral

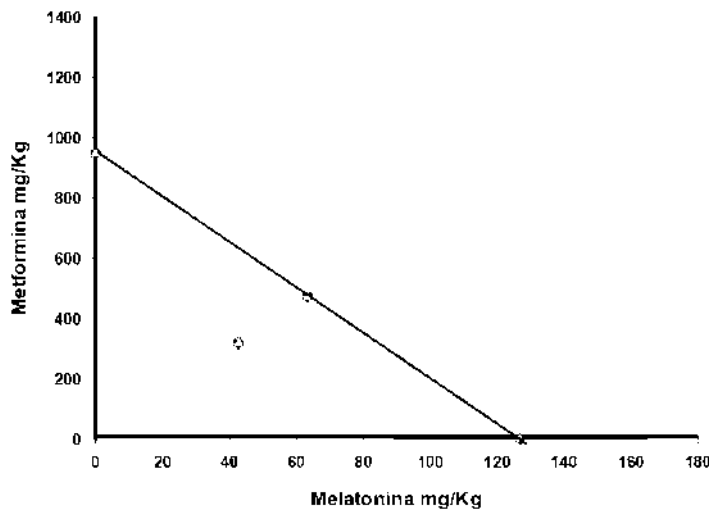


Figura 21. Isoblograma que muestra la interacción sinérgica oral de la metformina y la melatonina en la prueba de formalina al 1 %. Las barras horizontales y verticales indican el e.e. La línea oblicua entre el eje x y el eje y, es la línea aditiva teórica. El punto en el medio es el punto aditivo teórico calculado a partir de los valores de las DE₅₀ por separado. El punto experimental se encuentra por debajo de la línea aditiva, por lo tanto, muestra una sinergia significativa.

7.4 Alodinia e hiperalgesia secundarias

Como se mencionó anteriormente, la hiperalgesia y la alodinia secundarias se establecieron a los 6 días después de la inyección de formalina. Por lo tanto, evaluamos la hipersensibilidad con los filamentos de von Frey con dos fuerzas de flexión (10 y 250 mN), en los días 0, 1, 3, 6, 9, 12, tanto en la pata trasera ipsilateral como en la contralateral, donde se observó que la aplicación del filamento de 10 mN en ésta provocó un promedio de 2 retiros tanto de la pata administrada con formalina como de la contralateral, considerándolo como una respuesta de alodinia. Por otro lado, con el filamento de 250 mN se observó un promedio de 5 retiros en ambas patas traseras, a esta respuesta se le consideró hiperalgesia. Se encontró una diferencia estadísticamente significativa con los grupos vehículo y basal, en contra de los grupos de los fármacos metformina y melatonina en sus dosis más altas por vía oral (Figura 22).

● Vehículo ■ Basal ▲ Metformina 1 g/Kg ▼ Melatonina 150 mg/Kg

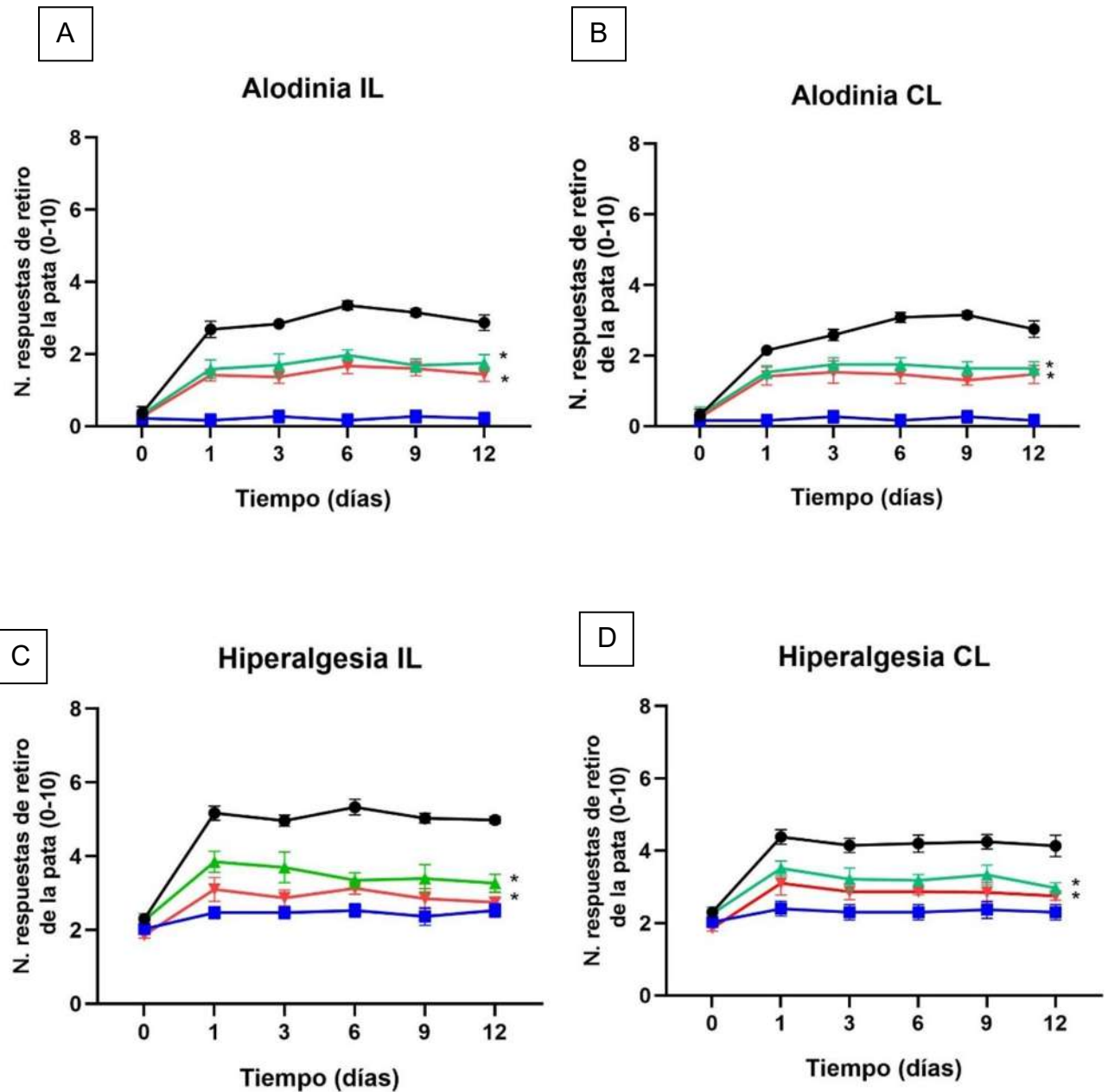


Figura 22. Curso temporal a largo plazo del promedio de respuestas de retirada de la pata provocado por los filamentos de von Frey aplicados a la superficie plantar de las patas traseras de las ratas, los días 0, 1, 3, 6, 9 y 12. Se observa el promedio \pm e.e. de 10 aplicaciones con 2 distintos filamentos de von Frey, 10 mN para alodinia (A y B) y 250 mN para hiperalgnesia (C y D), tanto para la pata trasera ipsilateral (IL) como contralateral (CL), después de la administración de formalina al 1%, comparado con los valores basales y los fármacos (metformina y melatonina) en las dosis más altas administradas por vía oral. Se encontró una diferencia significativa con una * $p < 0.05$ vs vehículo, por una ANOVA de dos vías seguido por una prueba de Student-Newman-Keuls.

Se evaluó la hipersensibilidad para la combinación farmacológica en su dosis más alta, con los filamentos de von Frey con las dos fuerzas de flexión tanto para la alodinia como hiperalgesia, en los días 0, 1, 3, 6, 9 y 12, tanto para la pata trasera ipsilateral como para la contralateral. Para la aplicación del filamento de 10 mN se encontró una diferencia significativa vs vehículo para el grupo ipsilateral como contralateral. Con el filamento de 250 mN se encontró una diferencia significativa en ambos grupos (Figura 23). Los valores obtenidos para el área bajo la curva (ABC) de cada grupo comparado con el control sirvieron para determinar el porcentaje antihiperalgésico y antialodínico para cada grupo experimental (Figuras 24 y 25).

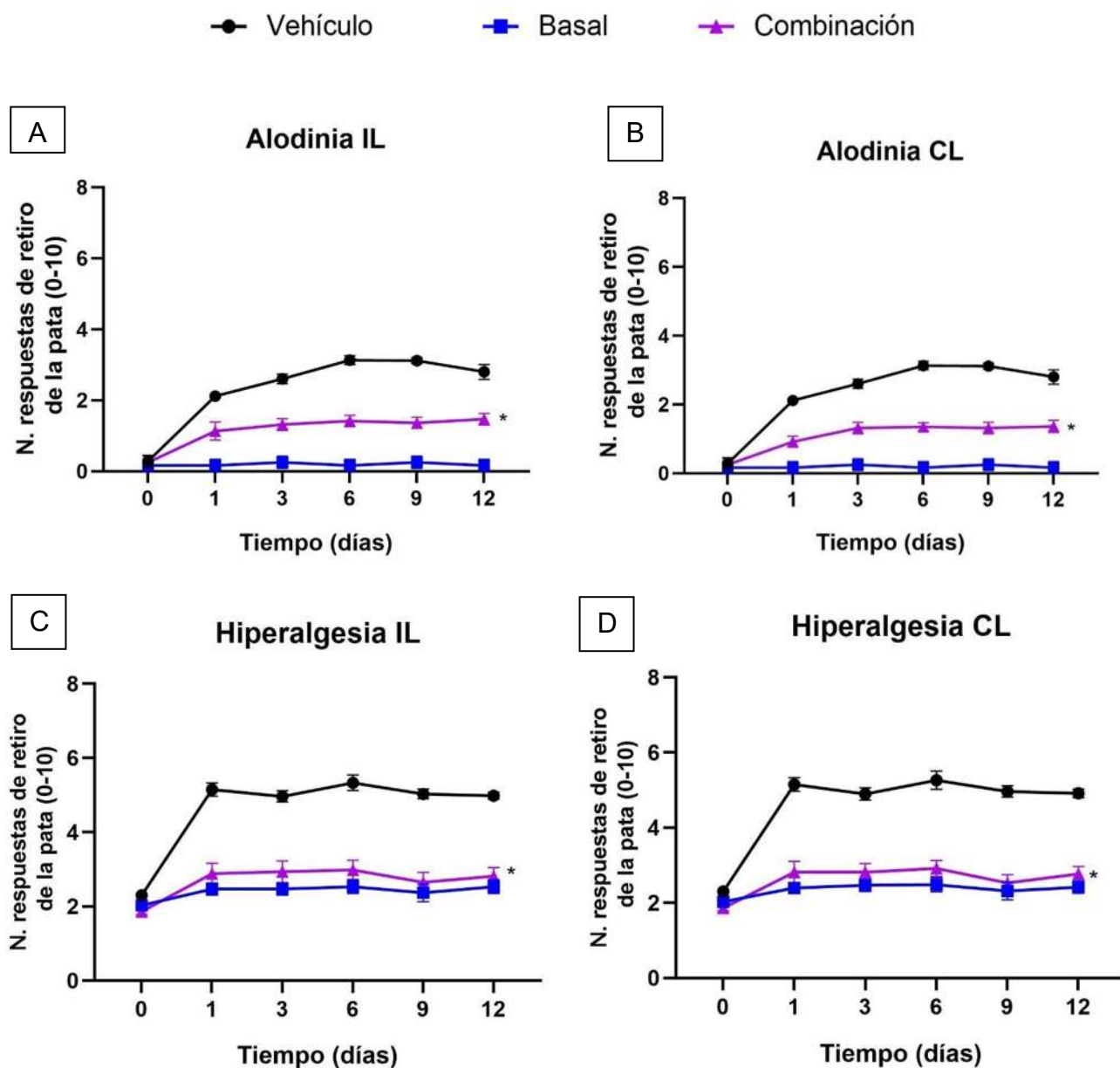


Figura 23. Curso temporal a largo plazo de la combinación farmacológica de metformina y melatonina, del promedio de respuestas de retirada de la pata provocada por los filamentos de von Frey aplicados a la superficie plantar de la pata trasera de las ratas, los días 0, 1, 3, 6, 9 y 12, se muestra el promedio \pm e.e. de 10 aplicaciones con 2 distintos filamentos de von Frey, 10 mN para alodinia (A y B) y 250 mN para hiperalgnesia (C y D), tanto para la pata trasera ipsilateral (IL) como contralateral (CL), después de la administración de formalina al 1%, comparado con los valores basales y la combinación en las dosis más altas administradas por vía oral. Se encontraron diferencias significativas con una * $p < 0.05$ vs vehículo, por una ANOVA de dos vías seguido por una prueba de Student-Newman-Keuls.

■ Basal ■ Vehículo ■ Metformina 1 g ■ Melatonina 150 mg ■ Combinación

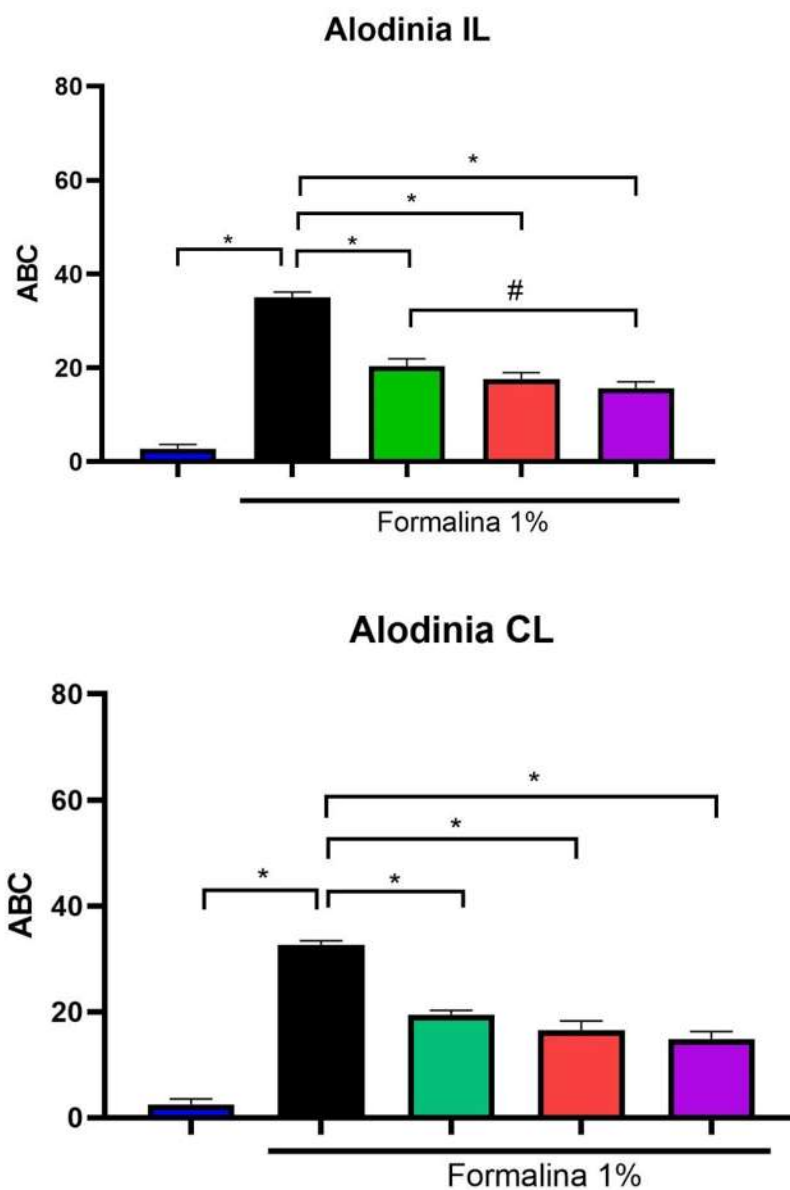


Figura 24. Área bajo la curva de las dosis individuales de metformina, melatonina y la combinación farmacológica, del número medio de retiradas de la pata trasera ipsilateral (IL) y contralateral (CL) con los filamentos de von Frey de 10 mN para alodinia. Se muestra el promedio \pm el e.e. de 6 animales por grupo. Se encontraron diferencias significativas $*p < 0.05$ vs vehículo y $\#p < 0.05$ metformina vs combinación, por una ANOVA de una vía seguido por la prueba de Student-Newman-Keuls.

■ Basal
 ■ Vehículo
 ■ Metformina 1 g
 ■ Melatonina 150 mg
 ■ Combinación

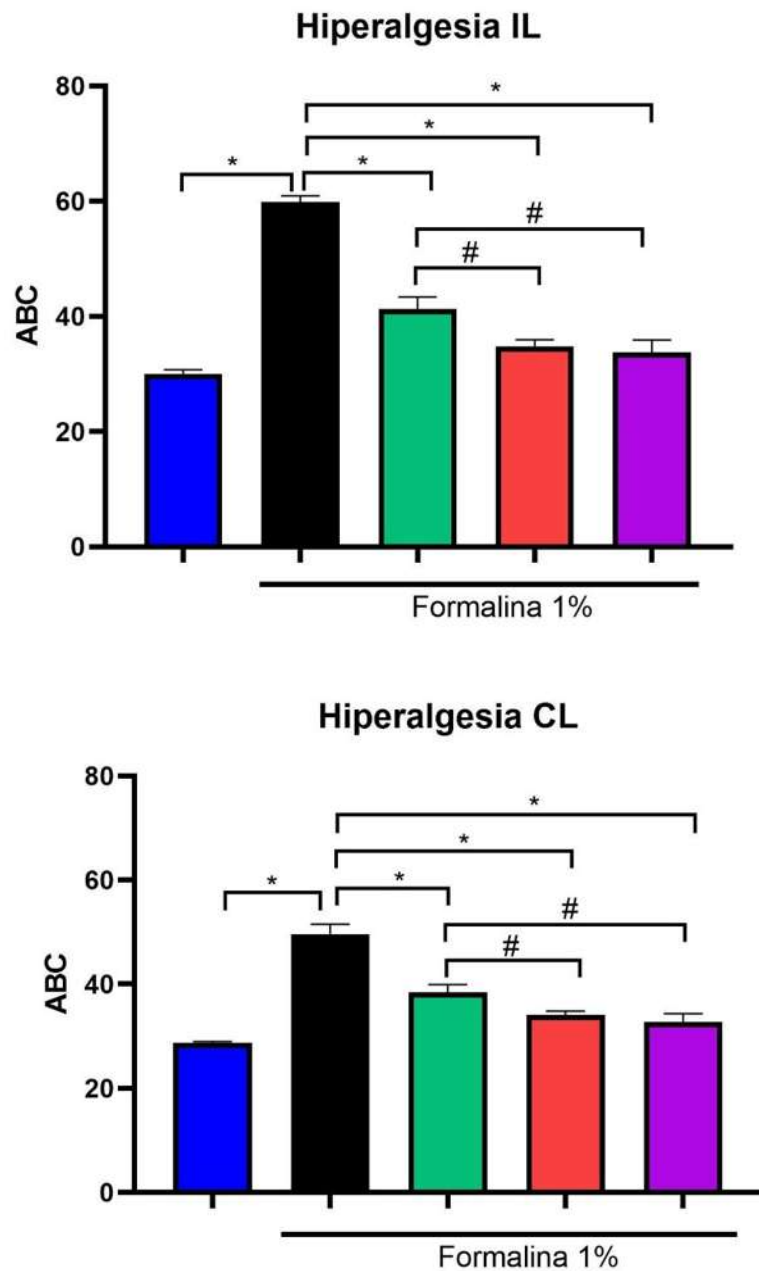


Figura 25. Área bajo la curva de las dosis individuales de metformina, melatonina y la combinación farmacológica, del número medio de retiradas de la pata trasera ipsilateral (IL) y contralateral (CL) con los filamentos de von Frey de 250 mN para hiperalgnesia. Se muestra el promedio ± e.e. de 6 animales por grupo. Se encontraron diferencias significativas * $p < 0.05$ vs vehículo y # $p < 0.05$ vs metformina, por una ANOVA de una vía seguido por la prueba de Student-Newman-Keuls.

7.5 Efecto de la metformina, la melatonina y la combinación DE50E sobre el mantenimiento de la hiperalgesia y alodinia secundarias de largo plazo

El postratamiento vía oral con la metformina, la melatonina y la DE50E de la combinación fue capaz de revertir significativamente ($p < 0.05$) la hiperalgesia y la alodinia secundarias de larga duración inducidas por la formalina, tanto en la pata administrada como en la contralateral. Se administró la formalina el día 1, donde se hizo evaluación con los filamentos de von Frey, tanto para alodinia como para hiperalgesia, así como el día 6, donde ya se ha establecido el dolor sostenido, como lo menciona Arreola-Espino et al. (2007), a ese tiempo se administró por vía oral la DE50 de metformina, de melatonina de manera individual o la combinación, después de 60 minutos de la administración se evaluó nuevamente la retirada ante la estimulación con los filamentos de von Frey, encontrando una diferencia significativa vs vehículo para los filamentos de 10 mN y 250 mN, para la evaluación de alodinia e hiperalgesia, respectivamente. El día 9 de la evaluación se repitió el mismo procedimiento ya antes mencionado, reportando una respuesta similar a la del día 6 (Figuras 26 y 27). En el área bajo la curva del efecto de los diferentes tratamientos administrados por vía oral, se observan efectos analgésicos estadísticamente significativos dependientes de la presentación farmacológica, siendo la más efectiva la DE50E de la combinación (Figura 28 y 29).

● Vehículo ■ Basal ▲ Metformina DE50 ▼ Melatonina DE50 ◆ Combinación DE50E

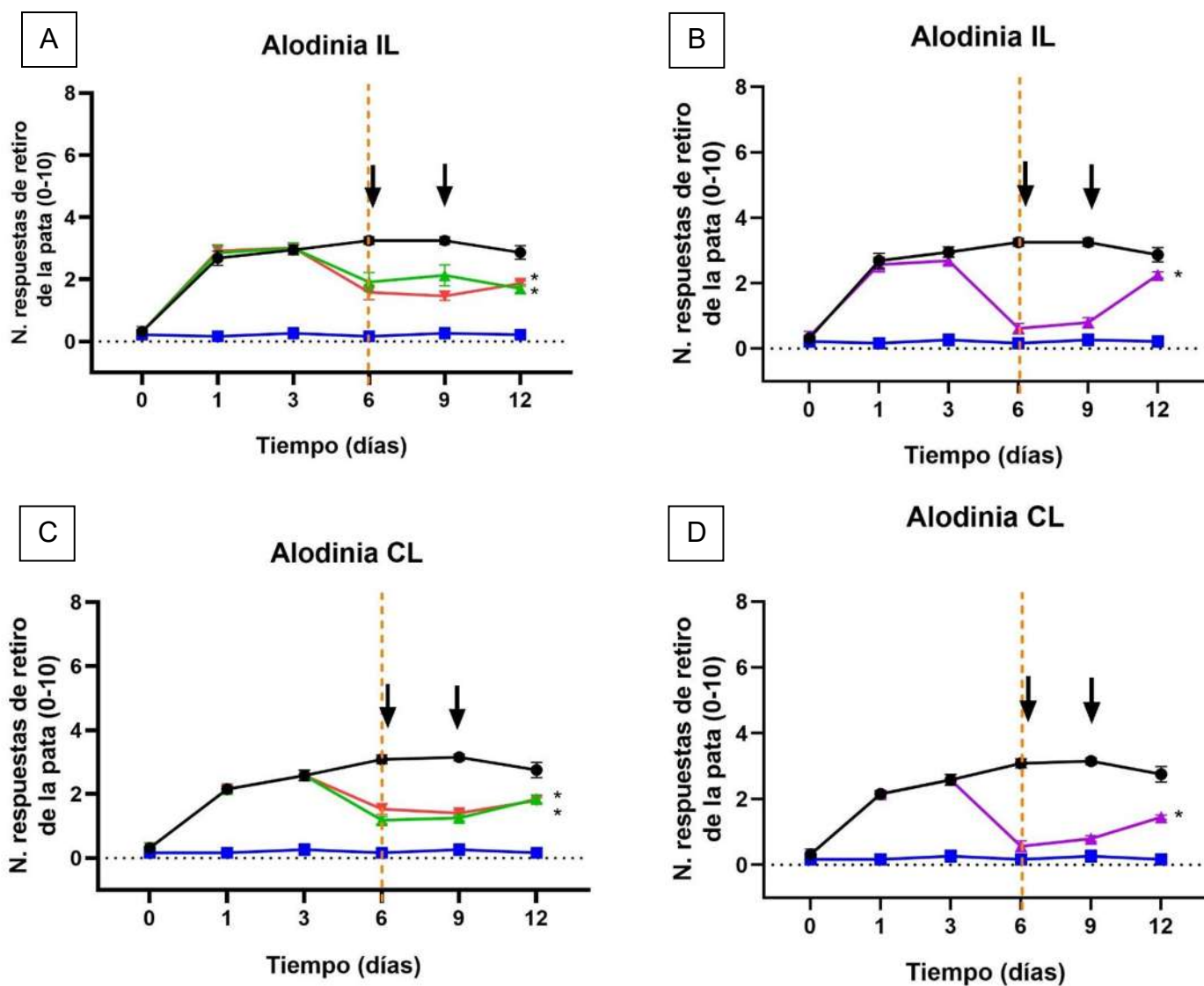


Figura 26. Curso temporal a largo plazo del postratamiento farmacológico de la metformina, la melatonina y la combinación, obteniendo el promedio de respuestas de retirada de la pata provocadas por los filamentos de von Frey (10 mN) aplicados a la superficie plantar de la pata trasera de las ratas, los días 0, 1, 3, 6, 9 y 12. Se muestra el promedio de 10 aplicaciones. Se evaluó la presencia de alodinia tanto para la pata trasera ipsilateral (A y B) como contralateral (C y D) después de la administración de formalina al 1%. La línea punteada indica el inicio de la administración oral de la DE50 de la metformina o melatonina y la DE50E de la combinación, se evaluó una hora después de su administración, repitiendo el mismo procedimiento el día 9. Se encontraron diferencias significativas con una * $p < 0.05$ vs vehículo, por una ANOVA de dos vías seguido por una prueba de Student-Newman-Keuls.

● Vehículo ■ Basal ▲ Metformina DE50 ▼ Melatonina DE50 ▲ Combinación DE50E

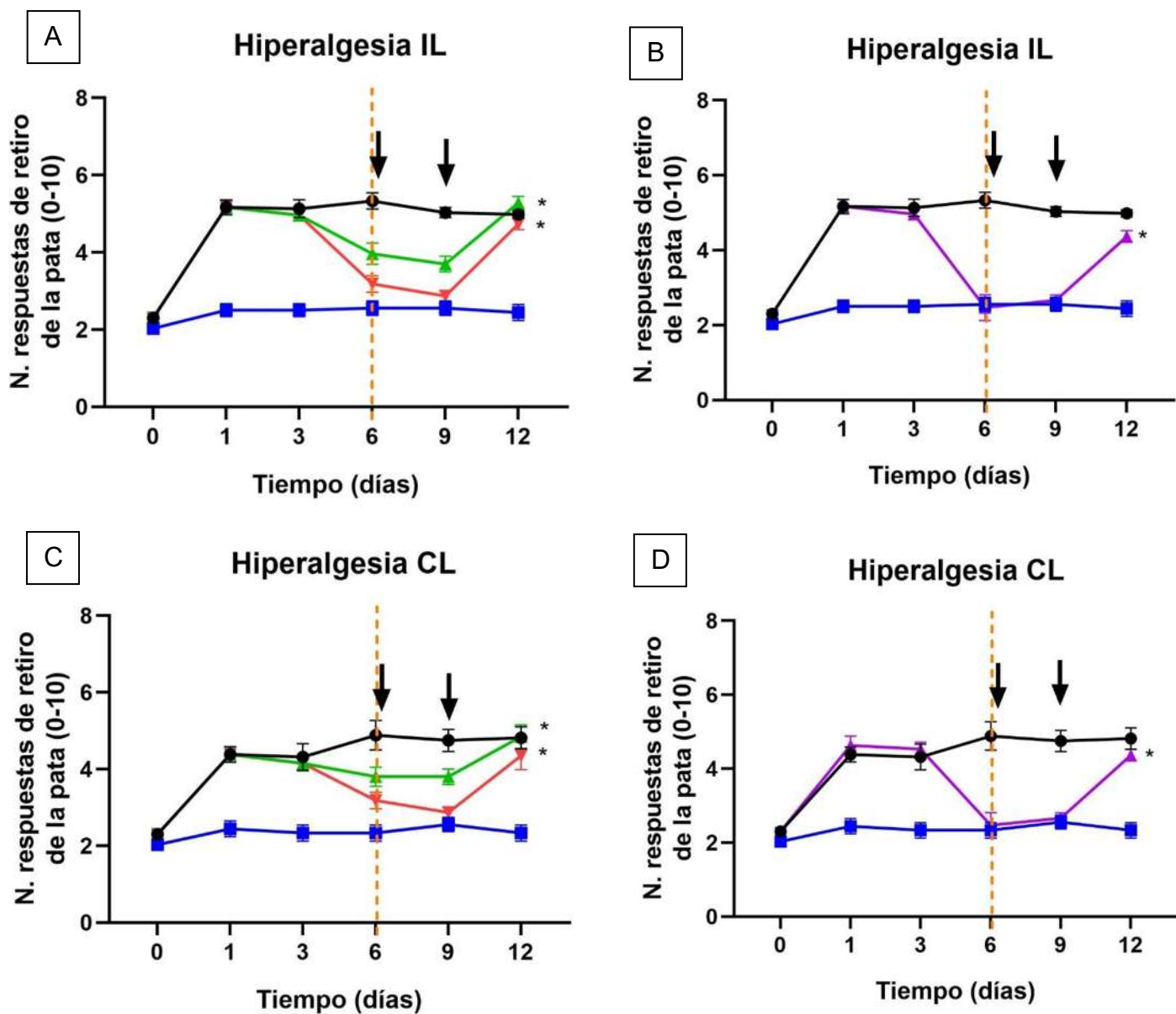


Figura 27. Curso temporal a largo plazo del postratamiento farmacológico de la metformina, la melatonina y la combinación, obteniendo el promedio de respuestas de retirada de la pata provocadas por los filamentos de von Frey (250 mN) aplicados a la superficie plantar de la pata trasera de las ratas, los días 0, 1, 3, 6, 9 y 12, se muestra el promedio de 10 aplicaciones. Se evaluó la presencia de hiperalgnesia tanto para la pata trasera ipsilateral (A y B) como contralateral (C y D) después de la administración de formalina al 1%. La línea punteada indica el inicio de la administración oral de la DE50 de la metformina o melatonina y la DE50E de la combinación, se evaluó una hora después de su administración, repitiendo el mismo procedimiento el día 9. Se encontraron diferencias significativas con una *p < 0.05 vs vehículo, por una ANOVA de dos vías seguido por una prueba de Student-Newman-Keuls.

■ Basal
 ■ Vehículo
 ■ Metformina DE50
 ■ Melatonina DE50
 ■ Combinación DE50E

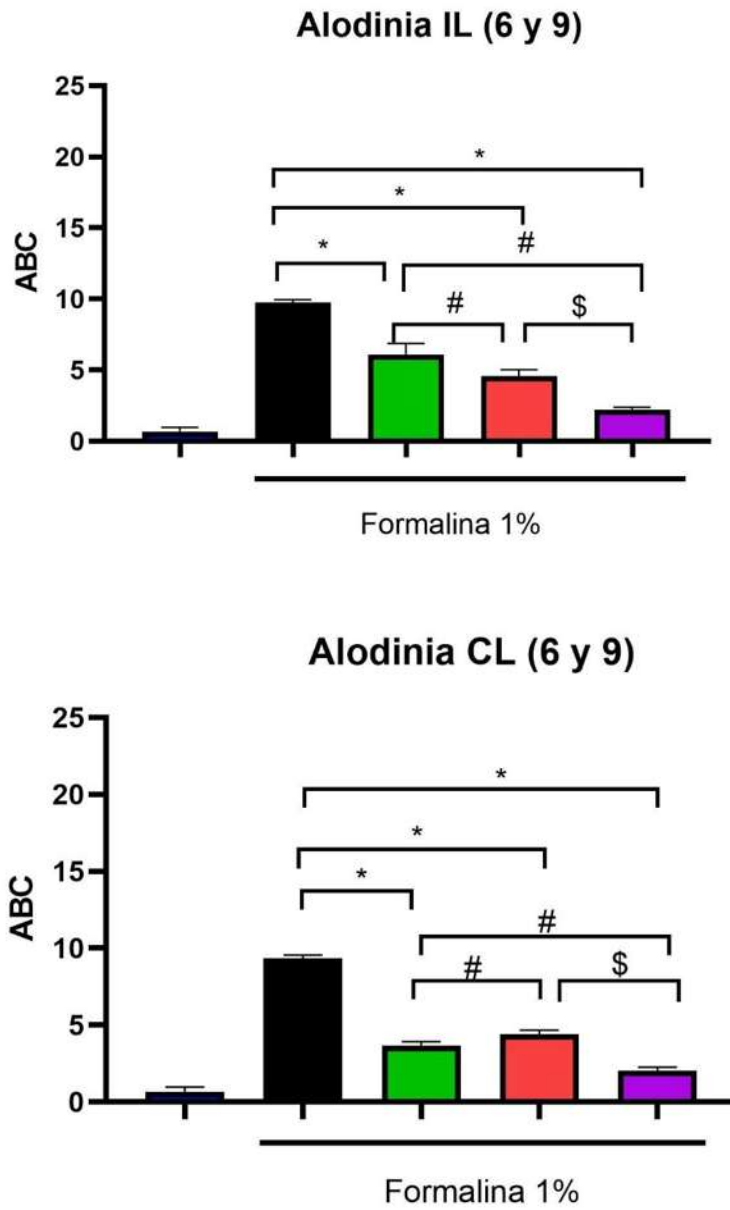


Figura 28. Área bajo la curva del postratamiento farmacológico, obteniendo el promedio de respuestas de retiradas de la pata provocadas por los filamentos de von Frey (10 mN) aplicados a la superficie plantar de la pata trasera de la rata, tanto para la pata trasera IL como CL, inducidas por la administración de formalina al 1%, comparando los valores de vehículo de cada fármaco individual y la combinación administradas vía oral el día 6 y 9. Se encontraron diferencias significativas con una * $p < 0.05$ vs vehículo, # $p < 0.05$ vs metformina, \$ $p < 0.05$ vs melatonina, por una ANOVA de una vía seguido por una prueba de Student-Newman-Keuls.

■ Basal
 ■ Vehículo
 ■ Metformina DE50
 ■ Melatonina DE50
 ■ Combinación DE50E

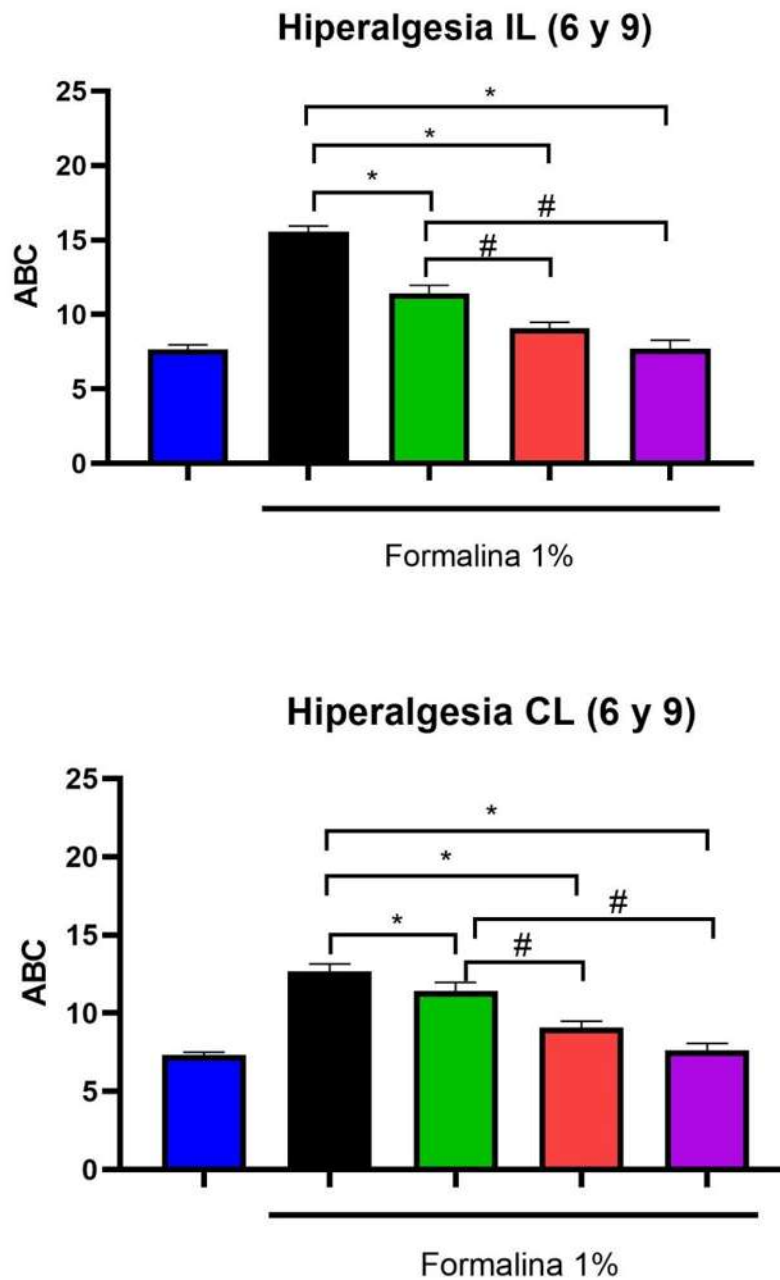


Figura 29. Área bajo la curva del postratamiento farmacológico, obteniendo el promedio de respuestas de retiradas de la pata provocadas por los filamentos de von Frey (259 mN) aplicados a la superficie plantar de la pata trasera de la rata, tanto para la pata trasera IL como CL, inducidas por la administración de formalina al 1%, comparando los valores de vehículo de cada fármaco individual y la combinación administradas vía oral los días 6 y 9. Se encontraron diferencias significativas con una * $p < 0.05$ vs vehículo, # $p < 0.05$ vs metformina, por una ANOVA de una vía seguido por una prueba de Student-Newman-Keuls.

7.6 Mecanismo de acción

Para evaluar el posible mecanismo de acción de la metformina y de la melatonina, se usó un inhibidor selectivo del AMPK y antagonistas de los receptores de melatonina. El inhibidor y los antagonistas por sus propiedades fisicoquímicas se disolvieron en dimetilsulfóxido (DMSO). Para descartar que el vehículo (DMSO) pudiera tener algún efecto analgésico, se realizó un grupo control con 50 μ l de solución salina y otro con 50 μ l de DMSO administrado por vía local 15 min antes de la prueba de formalina, para de esta manera poder valorar si el vehículo es inerte o pudiera modificar el efecto de la formalina. Los efectos inducidos por la administración subcutánea de sol. salina o DMSO en la prueba de formalina no mostraron diferencias significativas ($p=0.8$). Por lo tanto, el DMSO se puede usar como vehículo, ya que no modifica el efecto de la formalina (Figura 30).

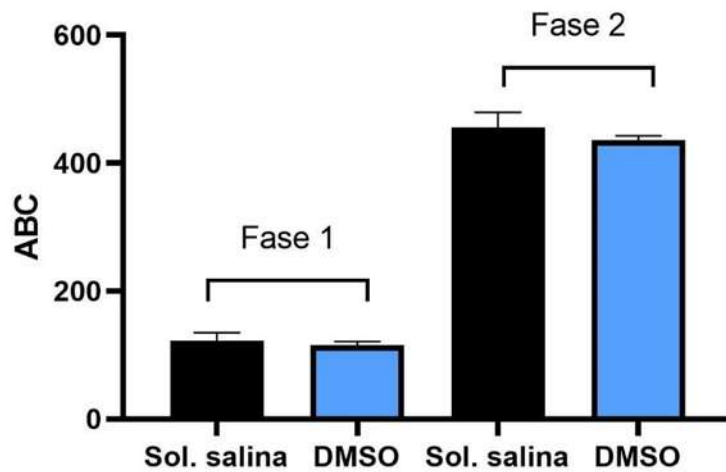
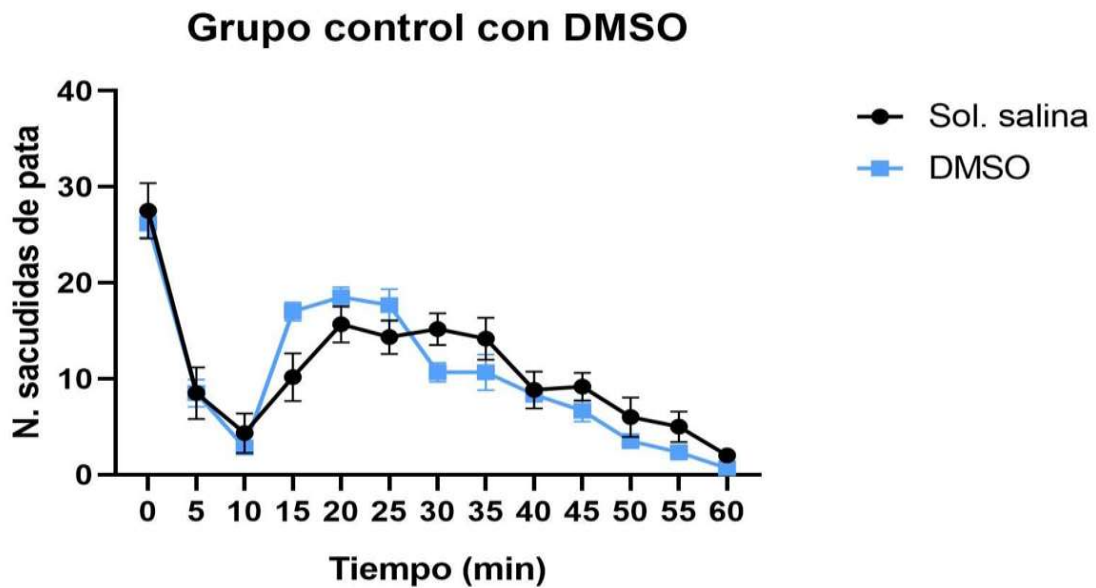


Figura 30. Efectos inducidos por la administración s.c. del DMSO y sol. salina en la prueba de formalina. (A) Curso temporal del número de sacudidas de la pata trasera derecha observados después de la inyección de formalina al 1%, en animales a los que se les administró el vehículo (sol. salina o DMSO). (B) Área bajo la curva de retiros de la pata observados después de la inyección de formalina al 1% en ratas a las que se les administró el vehículo (sol. salina o DMSO). Los datos están expresados como el promedio \pm el e.e. de 6 animales por grupo. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos ($p=0.8$), prueba t-Student para muestras independientes.

Se realizó el pretratamiento periférico local ipsilateral con el antagonista selectivo del receptor MT2 de melatonina, el 4-P-PDOT (1 mg/Kg s.c.), administrado 15 min antes de la DE_{50E} de la combinación por vía oral, una vez transcurridos 60 min se inyectaron 50 µl de formalina en la pata trasera derecha de la rata, reduciendo ($p < 0.05$) el efecto antinociceptivo de la combinación de metformina y melatonina en la fase 2 en la prueba de formalina (Figura 31). La dosis probada con el 4-P-PDOT redujo el efecto antinociceptivo de la DE_{50E} de la combinación para la alodinia mecánica secundaria inducida por formalina al 1 % y en la hiperalgesia no redujo el efecto antinociceptivo de la DE_{50E} de la combinación, evaluado a los 6 días a la prueba de la formalina (Figura 32 y 33). Estos datos sugieren que los receptores MT2 participan activamente en el efecto antinociceptivo de la melatonina en la fase 2 de la prueba de formalina, también encontrándose relacionados en la participación del mantenimiento de la alodinia secundaria, pero no para la hiperalgesia.

El pretratamiento periférico local ipsilateral con el antagonista no selectivo de los receptores MT1 y MT2 de melatonina, el luzindole (1 mg/Kg, s.c.) fue administrado 15 min previos a la DE_{50E} de la combinación, 60 minutos después se inyectaron 50 µl de formalina al 1%, y se observó que no bloqueó el efecto antinociceptivo de la combinación en la fase 2 de la prueba de formalina (Figura 31). La dosis probada de luzindole no redujo el efecto antinociceptivo de la DE_{50E} de la combinación, tanto para la alodinia (IL y CL) como para la hiperalgesia (IL y CL), siendo evaluado a los 6 días después de la prueba de formalina (Figura 34 y 35). Estos hallazgos sugieren que los receptores MT1 están menos involucrados en el efecto antinociceptivo de la melatonina, por lo tanto, no se bloquearon los efectos antialodínico y antihiperalgésico de la combinación, evitando así la aparición de la alodinia e hiperalgesia secundarias de larga duración.

El pretratamiento periférico local ipsilateral con naloxona (1 mg/Kg, s.c.) fue administrado 15 min previos de la DE_{50E} de la combinación, a los 60 min se inyectaron 50 µl de formalina en la pata trasera derecha, reduciendo ($p < 0.05$) el efecto antinociceptivo de la combinación en la fase 2 en la prueba de formalina (Figura 31). La dosis probada de naloxona redujo el efecto antinociceptivo de la DE_{50E} de la combinación tanto para la alodinia (IL y CL) como para la hiperalgesia (IL y CL), siendo evaluadas a los 6 días después de la prueba de formalina (figura 36 y 37). Estos

hallazgos sugieren que los receptores opioides están involucrados en el efecto antinociceptivo de la combinación en la fase 2 de la prueba de formalina, encontrándose relacionados estos receptores en la participación del mantenimiento de la alodinia y la hiperalgesia tanto ipsilateral como contralateral.

El pretratamiento periférico local ipsilateral con dorsomorfina o compuesto C (3 mg/Kg, s.c.) fue administrado 15 min previos de la DE50E de la combinación, 60 después se inyectaron 50 μ l de formalina en la pata trasera derecha, reduciendo ($p < 0.05$) el efecto antinociceptivo de la combinación en la fase 2 de la prueba (Figura 31). La dosis probada de dorsomorfina redujo el efecto antinociceptivo de la DE50E de la combinación para la hiperalgesia ipsilateral únicamente, siendo evaluada a los 6 días después de la prueba de formalina (figura 38 y 39). Estos hallazgos sugieren que el complejo enzimático AMPK se encuentra involucrado en el efecto antinociceptivo de la metformina en la fase 2 de la prueba de formalina, encontrándose relacionado en la participación del mantenimiento de la hiperalgesia ipsilateral, pero no en la contralateral ni en la alodinia.

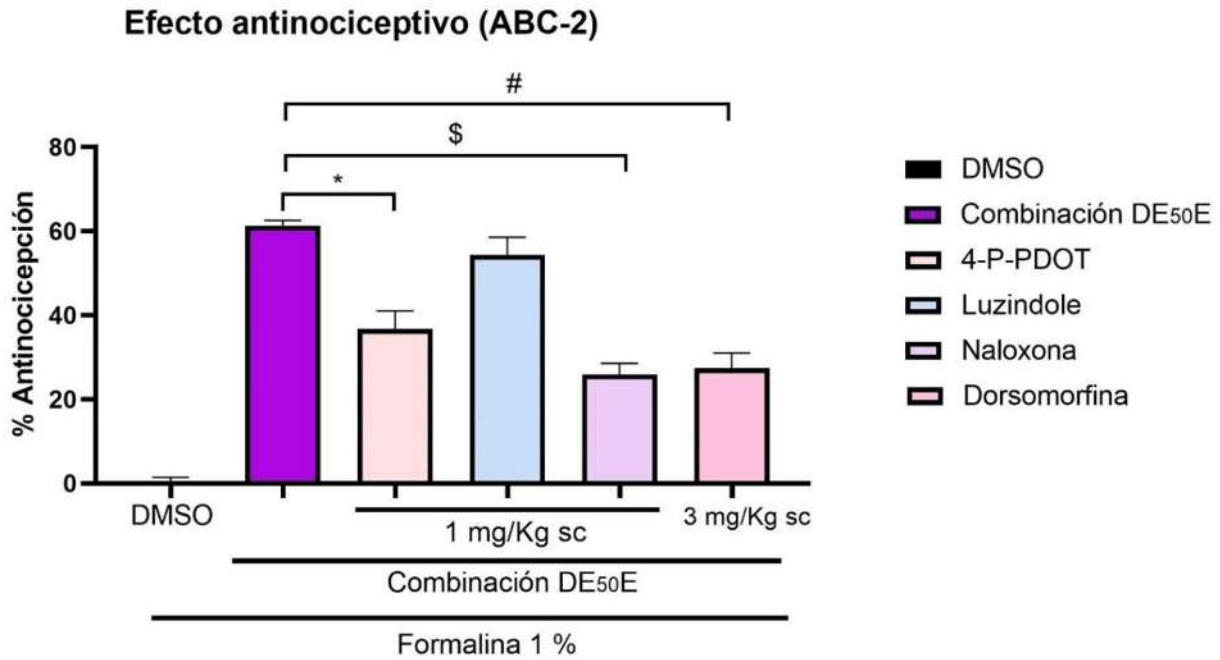


Figura 31. Efecto del antagonista de los receptores MT1-MT2 selectivo de melatonina (4-P-PDOT) y no selectivo (luzindole), del antagonista de los receptores opioides (naloxona) y del bloqueador del AMPK (dorsomorfinina), en el efecto antinociceptivo agudo inducido por la combinación de la DE₅₀E de metformina y melatonina en ratas en la fase 2 de la prueba de formalina. Los datos se expresan como el porcentaje de antinocicepción del máximo efecto posible. Las barras representan la media \pm e.e. de 6 animales. Se encontraron valores significativamente diferentes al grupo de la DE₅₀E de la combinación ($p < 0.05$), * $p < 0.05$ DE₅₀E C. + F 1 % vs. 4-P-PDOT + DE₅₀E C. + F 1 %; \$ $p < 0.05$ DE₅₀E combinación + F 1 % vs naloxona + C. DE₅₀E + F 1 %, # $p < 0.05$ DE₅₀E combinación + F 1 % vs dorsomorfinina + DE₅₀E c. + F 1 %; por una prueba de ANOVA de una vía seguido por una prueba de Tukey.

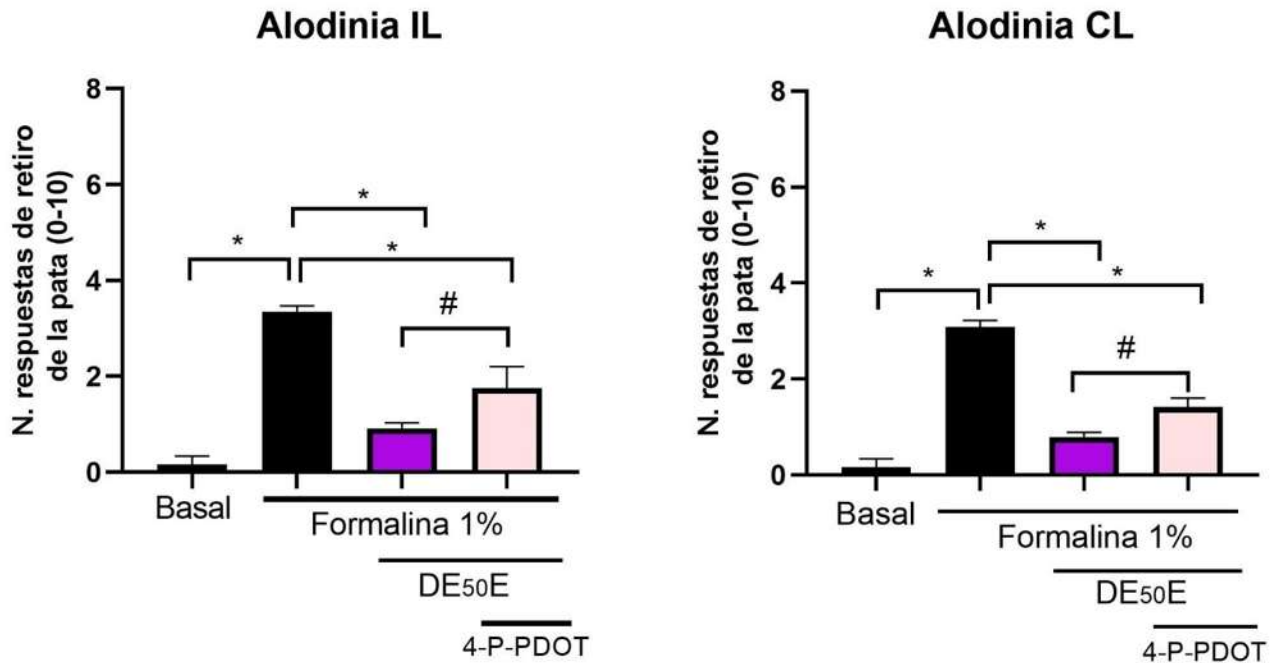


Figura 32. Efecto del antagonista selectivo del receptor MT₂, el 4-P-PDOT (1 mg/Kg, s.c.) en la alodinia secundaria en ratas. Los datos se expresan como el promedio \pm e.e. de las respuestas de retirada de la pata ante la aplicación de los filamentos de von Frey (10 mN) a la superficie plantar de la pata de la rata (grupo basal y formalina 1 % (DMSO)). La alodinia ipsilateral (IL) y contralateral (CL) se evaluaron a los 6 días posterior a la prueba de la formalina. * $p < 0.05$ grupo basal vs grupo DMSO; * $p < 0.05$ grupo DMSO vs C. DE₅₀E; * $p < 0.05$ DMSO vs grupo 4-P-PDOT; # $p < 0.05$ C. DE₅₀E vs 4-P-PDOT, por ANOVA de una vía seguido por la prueba de Student-Newman-Keuls.

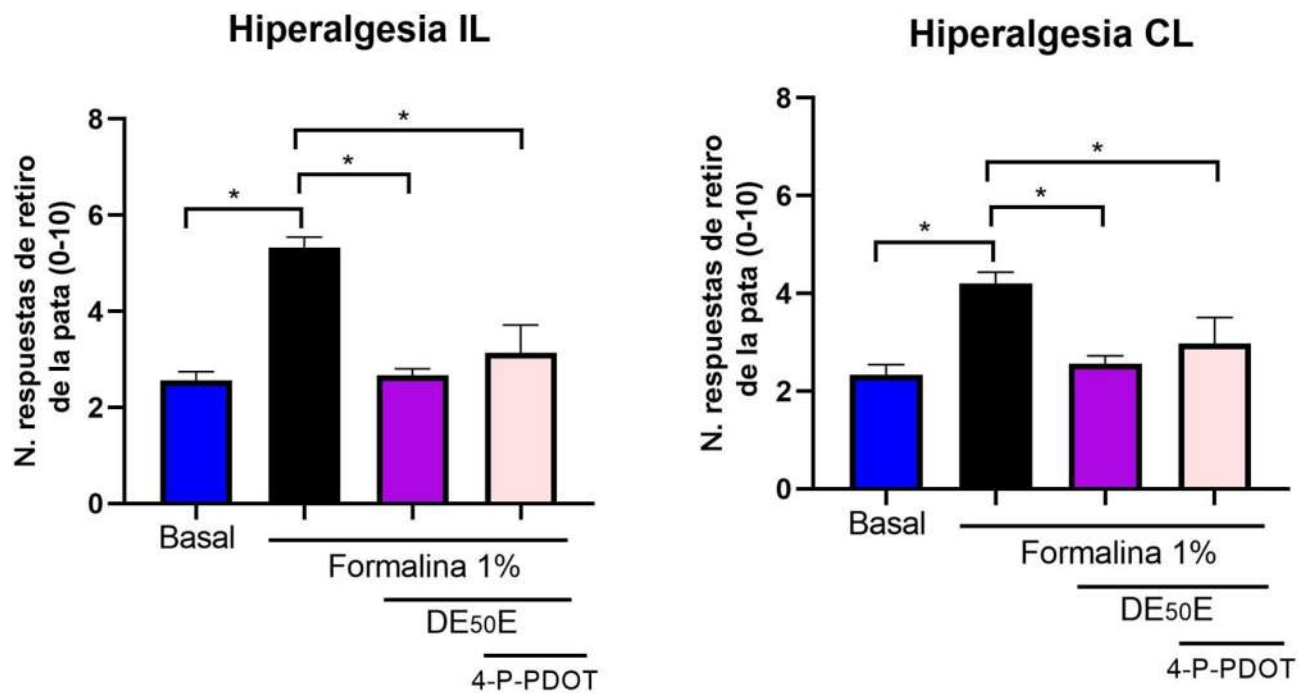


Figura 33. Efecto del antagonista selectivo del receptor MT2, 4-P-PDOT (1 mg/Kg, s.c.) en la hiperalgesia secundaria en ratas. Los datos se expresan como el promedio \pm e.e. de las respuestas de retirada de la pata ante la aplicación de los filamentos de von Frey (250 mN) a la superficie plantar de la pata de la rata, grupos basal y formalina 1% (DMSO). La hiperalgesia ipsilateral (IL) y contralateral (CL) se evaluaron a los 6 días posterior a la prueba de la formalina. * $p < 0.05$ grupo basal vs grupo DMSO; * $p < 0.05$ grupo DMSO vs C. DE50E; * $p < 0.05$ DMSO vs grupo 4-P-PDOT, por ANOVA de una vía seguido por la prueba de Student-Newman-Keuls.

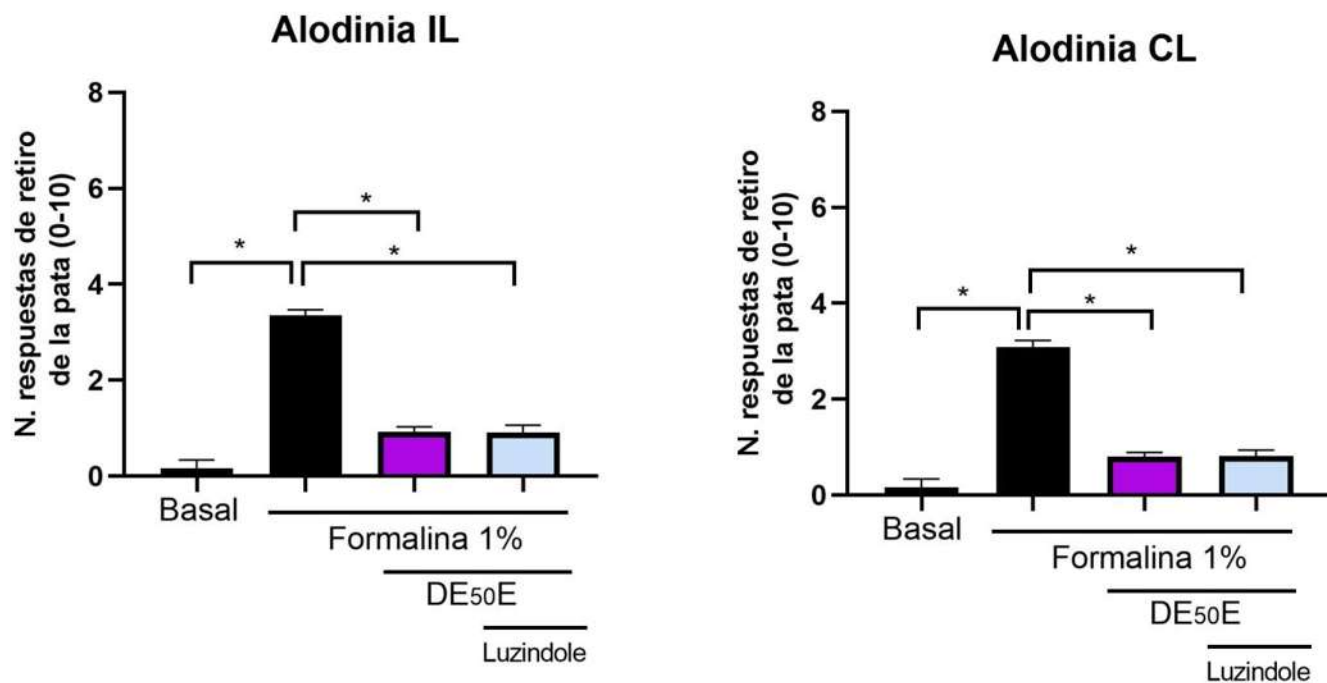


Figura 34. Efecto del antagonista no selectivo de los receptores MT1 y MT2, luzindole (1 mg/Kg, s.c.) en la alodinia secundaria en ratas. Los datos se expresan como el promedio \pm e.e. de las respuestas de retirada de la pata ante la aplicación de los filamentos de von Frey (10 mN) a la superficie plantar de la pata de la rata, grupos basal y formalina 1% (DMSO). La alodinia ipsilateral (IL) y contralateral (CL) se evaluaron a los 6 días posteriores a la prueba de la formalina. * $p < 0.05$ grupo basal vs grupo DMSO; * $p < 0.05$ grupo DMSO vs C. DE50E; * $p < 0.05$ DMSO vs luzindole, por ANOVA de una vía seguido por la prueba de Student-Newman-Keuls.

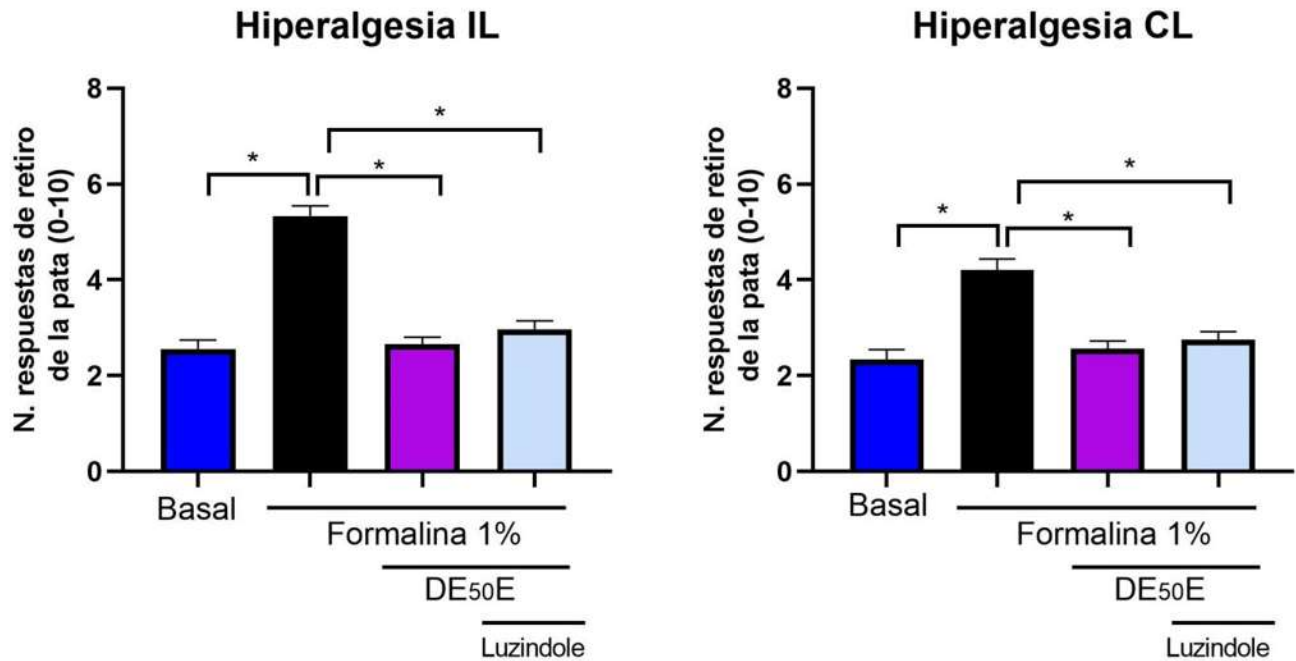


Figura 35. Efecto del antagonista no selectivo de los receptores MT1 y MT2, luzindole (1 mg/Kg, s.c.) en la hiperalgnesia secundaria en ratas. Los datos se expresan como el promedio \pm e.e. de las respuestas de retirada de la pata ante la aplicaci3n de los filamentos de von Frey (250 mN) a la superficie plantar de la pata de la rata, grupos basal y formalina 1% (DMSO). La hiperalgnesia ipsilateral (IL) y contralateral (CL) se evaluaron a los 6 d3as posteriores a la prueba de la formalina. * $p < 0.05$ grupo basal vs grupo DMSO; * $p < 0.05$ grupo DMSO vs C. DE₅₀E; * $p < 0.05$ DMSO vs grupo luzindole, por ANOVA de una v3a seguido por la prueba de Student-Newman-Keuls.

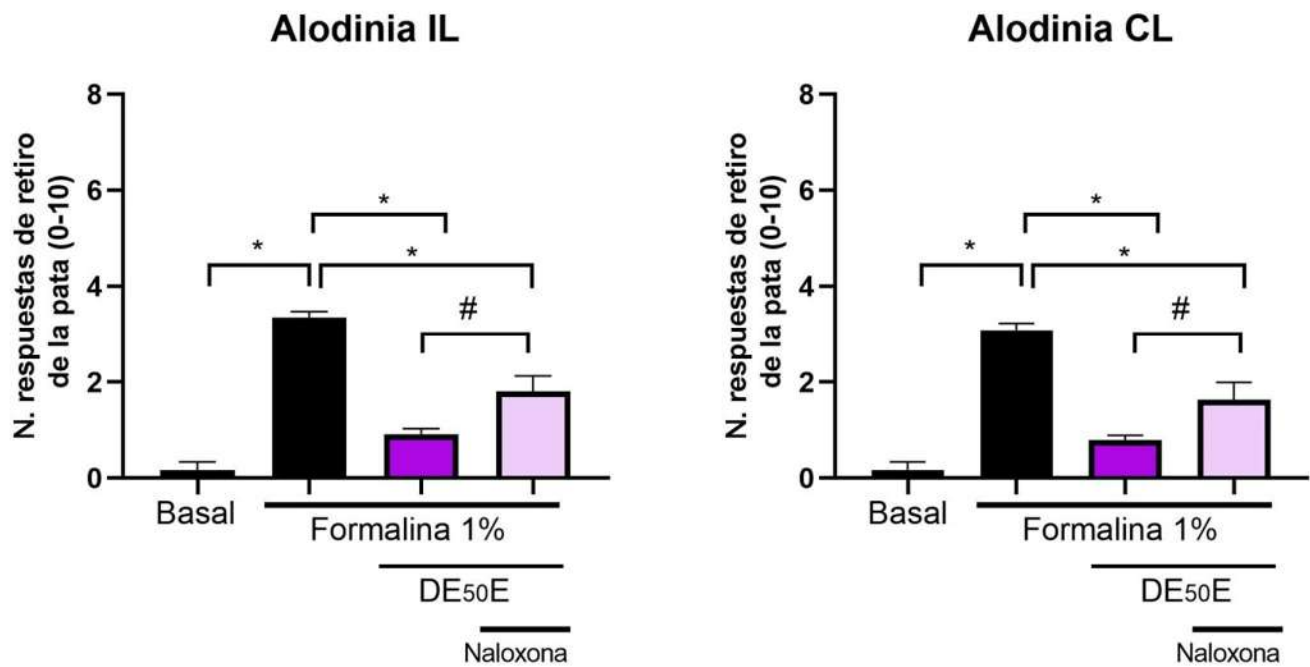


Figura 36. Efecto del antagonista de los receptores opioides, naloxona (1 mg/Kg, s.c.) en la alodinia secundaria en ratas. Los datos se expresan como el promedio \pm e.e. de las respuestas de retirada de la pata ante la aplicación de los filamentos de von Frey (10 mN) a la superficie plantar de la pata de la rata, grupos basal y formalina 1% (DMSO). La alodinia ipsilateral (IL) y contralateral (CL) se evaluaron a los 6 días posteriores a la prueba de la formalina. * $p < 0.05$ grupo basal vs grupo DMSO; * $p < 0.05$ grupo DMSO vs C. DE50E; * $p < 0.05$ DMSO vs naloxona, # $p < 0.05$ C. DE50E vs naloxona, por ANOVA de una vía seguido por la prueba de Student-Newman-Keuls.

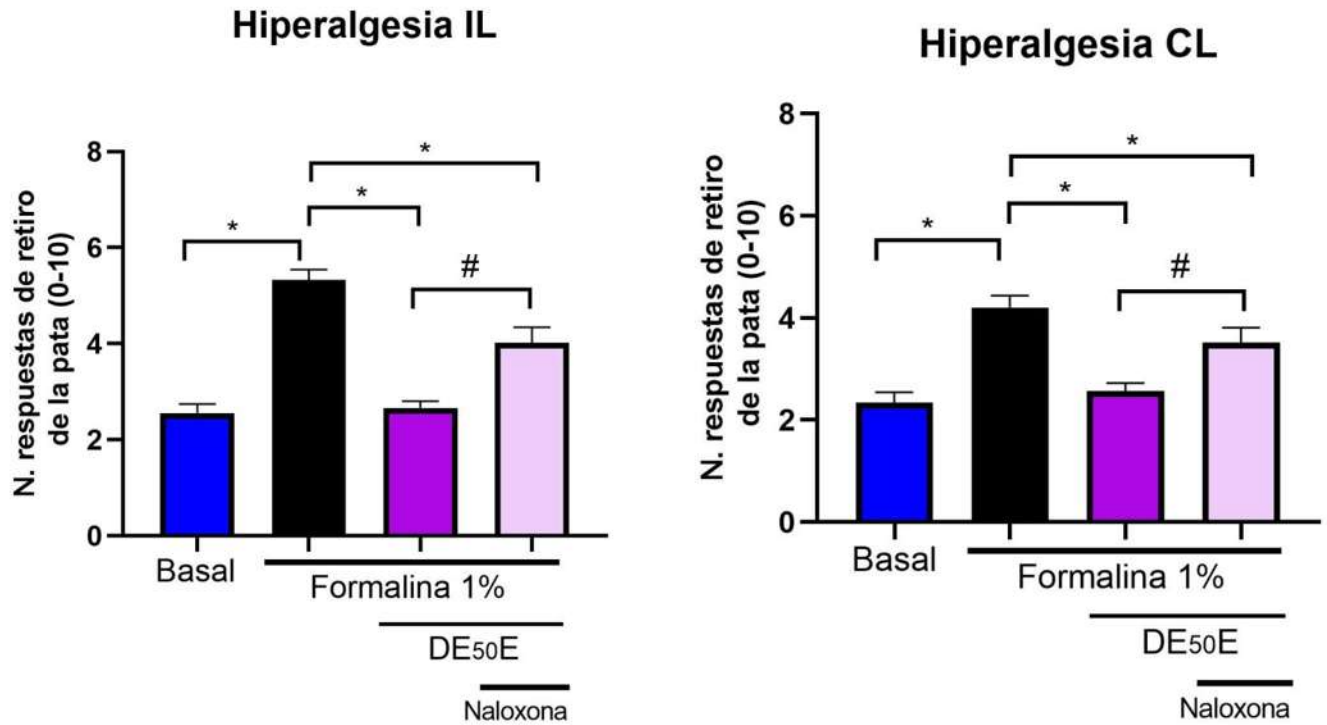


Figura 37. Efecto del antagonista de los receptores opioides, naloxona (1 mg/Kg, s.c.) en la hiperalgnesia secundaria en ratas. Los datos se expresan como el promedio \pm e.e. de las respuestas de retirada de la pata ante la aplicaci3n de los filamentos de von Frey (250 mN) a la superficie plantar de la pata de la rata, grupos basal y formalina 1% (DMSO). La hiperalgnesia ipsilateral (IL) y contralateral (CL) se evaluaron a los 6 d3as posteriores a la prueba de la formalina. * $p < 0.05$ grupo basal vs grupo DMSO; * $p < 0.05$ grupo DMSO vs C. DE50E; * $p < 0.05$ DMSO vs grupo naloxona, # $p < 0.05$ C. DE50E vs naloxona, por ANOVA de una v3a seguido por la prueba de Student-Newman-Keuls.

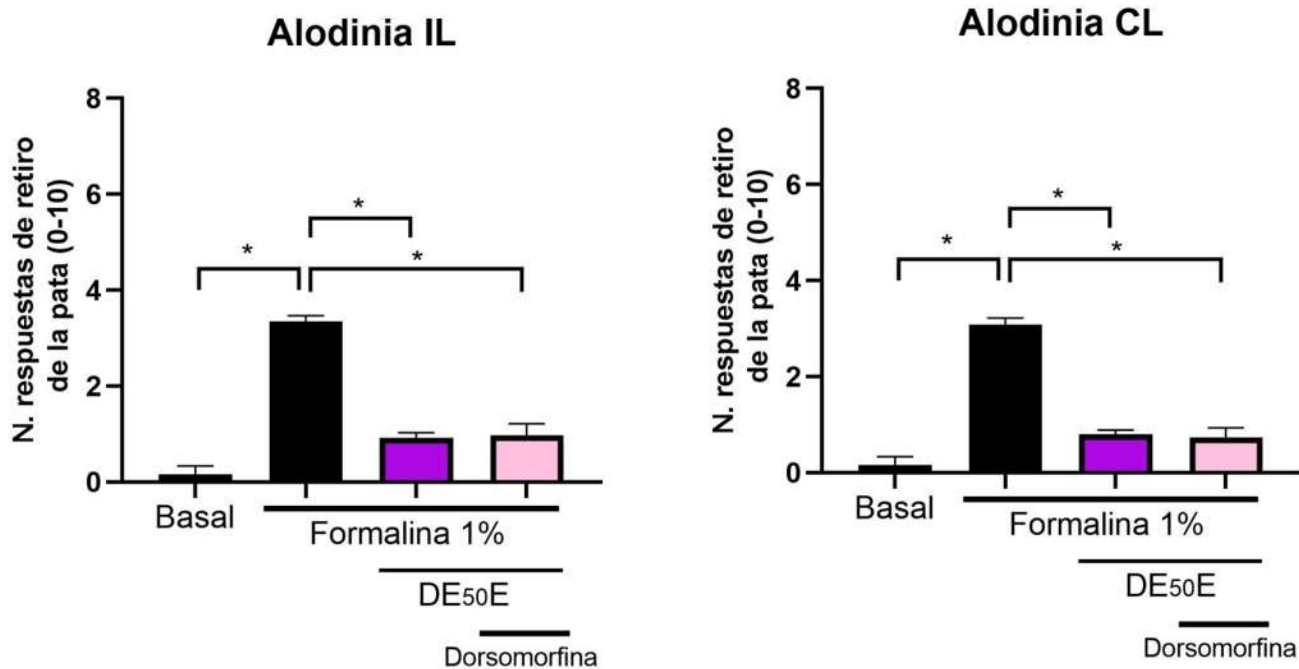


Figura 38. Efecto del inhibidor selectivo del AMPK (dorsomorfina) (3 mg/Kg, s.c.) en la alodinia secundaria en ratas. Los datos se expresan como el promedio \pm e.e. de las respuestas de retirada de la pata ante la aplicación de los filamentos de von Frey (10 mN) a la superficie plantar de la pata de la rata, grupos basal y formalina 1% (DMSO). La alodinia ipsilateral (IL) y contralateral (CL) se evaluaron a los 6 días posteriores a la prueba de la formalina. * $p < 0.05$ grupo basal vs grupo DMSO; * $p < 0.05$ grupo DMSO vs C. DE50E; * $p < 0.05$ DMSO vs dorsomorfina, por ANOVA de una vía seguido por la prueba de Student-Newman-Keuls.

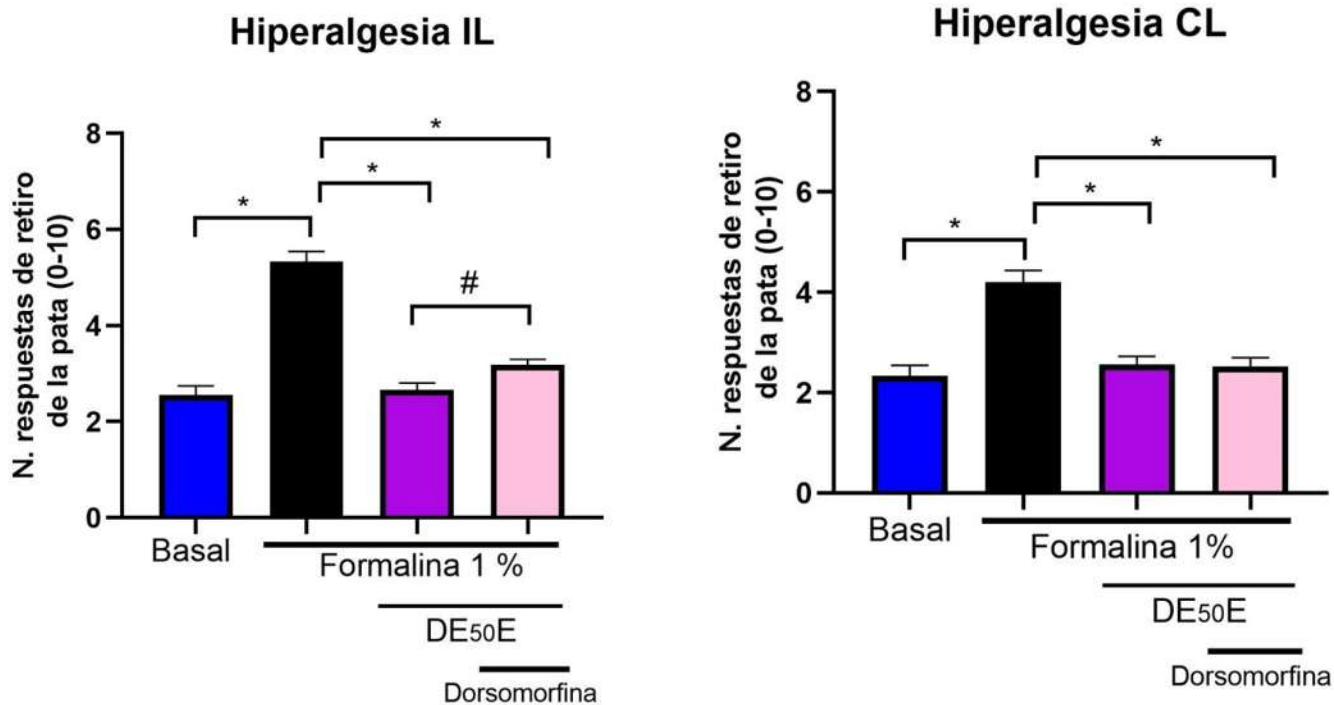


Figura 39. Efecto del inhibidor selectivo del AMPK (dorsomorfina) (1 mg/Kg, s.c.) en la hiperalgnesia secundaria en ratas. Los datos se expresan como el promedio \pm e.e. de las respuestas de retirada de la pata ante la aplicaci3n de los filamentos de von Frey (250 mN) a la superficie plantar de la pata de la rata, grupos basal y formalina 1% (DMSO). La hiperalgnesia ipsilateral (IL) y contralateral (CL) se evaluaron a los 6 d3as posteriores a la prueba de la formalina. * $p < 0.05$ grupo basal vs grupo DMSO; * $p < 0.05$ grupo DMSO vs C. DE50E; # $p < 0.05$ DMSO vs dorsomorfina, por ANOVA de una v3a seguido por la prueba de Student-Newman-Keuls.

7.7 Perfil de seguridad: evaluación de la actividad motora

En lo que respecta a la prueba para evaluación de la actividad motora, se utilizó la dosis efectiva 50 experimental de la combinación metformina-melatonina, y se observó que no presentó ninguna influencia significativa sobre el tiempo de mantenimiento sobre la varilla giratoria en el Rota-Rod, comparado con el control positivo (diazepam 10 mg/Kg) (Tabla 8).

Tabla 8. Tiempo (s) obtenido en la prueba de Rota-Rod en ratas control negativo (vehículo carboximetilcelulosa al 1%), la combinación metformina-melatonina y el control positivo con diazepam, administrados por vía oral.

Grupo	Tiempo	e.e.
Control	295.7	10.53
Diazepam	140.6	75.71
Metformina-melatonina	276.5*	19.44

La respuesta motora o sedación se registró a los 60 minutos después de la administración de la combinación metformina-melatonina, con un tiempo de corte de 300 s. * $p < 0.05$ vs diazepam.

8. Discusión

8.1 Evaluación de la eficacia antinociceptiva de cada fármaco individualmente.

8.1.1 La eficacia antinociceptiva de la metformina

Estos experimentos se realizaron con ratas hembras, ya que estudios anteriores de este tipo no han demostrado diferencias entre ratas macho y hembra de esta cepa en la prueba de formalina (Cervantes-Durán et al., 2016).

En la prueba de formalina, la administración oral de metformina produjo una disminución de la conducta nociceptiva en la fase 2, siendo ésta proporcional al nivel de la dosis administrada; la disminución en el número de sacudidas se puede traducir como un aumento del efecto antinociceptivo. La metformina es un activador de AMPK, que es un complejo enzimático involucrado en múltiples funciones celulares. La activación del AMPK regula negativamente muchos eventos de señalización a través de la fosforilación de moléculas clave involucradas en el procesamiento nociceptivo, tanto en el sistema nervioso central como en el periférico (Augusto et al., 2019; Inyang et al., 2019; Russe et al., 2013).

Se ha demostrado que la metformina tiene propiedades antinociceptivas en varios tipos de dolor, como el dolor inflamatorio y el dolor sostenido. Este fármaco regula a la baja la secreción de TNF- α , reduciendo la producción de óxido nítrico, prostaglandinas y citocinas proinflamatorias (IL-1, IL-6) por la disminución de la producción de NF- κ B por los macrófagos; por otro lado, la metformina aumenta las citocinas antiinflamatorias IL-4 e IL-10 (Baeza-Flores et al., 2020; Hyun et al., 2013; Saisho, 2015). También se ha descrito que la metformina tiene efecto analgésico en humanos (Song et al., 2022; Taylor et al., 2013). Estos resultados son comparables con otros hallazgos que demostraron que la metformina es capaz de reducir la nocicepción inflamatoria y prevenir el dolor neuropático originado en el modelo de la placa caliente, por la lesión de los cordones medulares o el inducido por estreptozotocina en ratas (Augusto et al., 2019; Ma et al., 2015; Taylor et al., 2013).

La metformina podría tener un valor clínico importante en el dolor inflamatorio, el dolor neuropático y otras formas de dolor patológico. Existen estudios que indican que la metformina muestra una eficacia comparable a la de otros analgésicos no esteroideos probados para reducir la hiperalgesia inflamatoria y es más potente que la aspirina (Guzmán-Priego et al., 2017; Pecikoza et al., 2017).

Las dosis de metformina empleadas en este estudio fueron de 30 a 1000 mg/Kg, el efecto máximo observado fue de 51.8%, correspondiente a la vía oral, lo cual ha sido reportado en estudios previos (Augusto et al., 2019). La metformina no presentó una eficacia elevada ni tampoco dependiente de la dosis en la fase 1 de la prueba de formalina, lo que podría indicar que el efecto del fármaco no es directamente sobre la actividad de los nociceptores, sino que su efecto principal es disminuir la respuesta inflamatoria ante una lesión, como se ha descrito anteriormente (Hyun et al., 2013; Melemedjian et al., 2011; Price & Dussor, 2013; Saisho, 2015). En contraste a los resultados obtenidos, otros estudios no atribuyen acción analgésica significativa a la metformina (Inyang et al., 2019; Ortiz, 2011).

8.1.2 La eficacia antinociceptiva de la melatonina

La melatonina administrada por vía oral produjo una antinocicepción relacionada con la dosis, en la fase 2 en la prueba de formalina al 1 % en ratas. Dicha conducta nociceptiva se traduce en la disminución en el número de sacudidas de la pata trasera derecha donde se aplicó la formalina. De acuerdo con algunos autores, la acción antinociceptiva de la melatonina se debe a que actúa a través de mecanismos mediados por receptores de membrana MT1 y MT2 acoplados a la proteína Gi y por receptores nucleares (Emet et al., 2016; Scarabelot et al., 2016; Srinivasan et al., 2012).

Se ha demostrado en otros estudios que la melatonina juega un papel importante en el efecto antinociceptivo, tanto para el dolor inflamatorio como para el dolor patológico. La melatonina inhibe a la adenilato ciclasa, disminuyendo el AMPc intracelular, reduciendo la expresión elevada del factor nuclear kappa B, y disminuyendo las citocinas proinflamatorias como la IL-6 y FNT- α . Este efecto podría ser dado por la disminución de la liberación de prostaglandinas y la NO-sintasa en el sitio de la lesión, para el dolor

inflamatorio. También deprime las descargas nociceptivas de las neuronas del asta dorsal espinal, regulando el dolor neuropático (Arreola-Espino et al., 2007; Chaudhry et al., 2021; Mantovani et al., 2006; Xie et al., 2020).

Para este fármaco, el efecto máximo observado por vía oral en la fase 1 de la prueba de formalina fue de 22.7 % y en la fase 2 de 58.2 % ; este efecto ha sido reportado por otros autores (Arreola-Espino et al., 2007).

8.2 Evaluación de la eficacia antinociceptiva de la combinación farmacológica.

La combinación farmacológica es una buena estrategia empleada con el fin de obtener beneficios, tal como mejorar la eficacia sin el aumento de los efectos adversos o disminuir efectos colaterales y potenciar su eficacia. El presente estudio analizó la naturaleza de la interacción entre la metformina y la melatonina en varias dosis. Conceptualmente, un efecto aditivo se refiere a la interacción entre dos fármacos de tal manera que, cuando se coadministra, el resultado se aproxima al efecto máximo o a la suma de los efectos de los dos fármacos administrados individualmente. El efecto sinérgico se refiere a la interacción entre dos medicamentos, de tal modo que, cuando se administran simultáneamente, la eficacia o potencia resultante respalda una interacción mayor que aditiva o multiplicativa en comparación con cada medicamento administrado individualmente (Grabovsky & Tallarida, 2004; Tallarida, 2001). El análisis isobolográfico demostró un efecto sinérgico significativo entre la metformina y la melatonina a nivel sistémico. La interacción de estos medicamentos no se ha probado previamente; sin embargo, la metformina ha sido probada en combinaciones analgésicas con tramadol (Pecikoza et al., 2017), ketorolaco, indometacina y metamizol (Guzmán-Priego et al., 2017), curcumina (Dasuni-Wasana et al., 2022) y vitaminas, como la vitamina B12 (Pecikoza et al., 2022) en varios modelos de dolor, produciendo un efecto sinérgico. Además, la melatonina ha sido probada en combinaciones analgésicas con dexametasona (Genovese et al., 2007), antidepresivos, como la amitriptilina (Zanette et al., 2014), naproxeno (Mohammadyahya et al., 2020) y morfina (Hemati et al., 2020) en varios modelos de dolor, produciendo un efecto sinérgico.

Los efectos de la combinación por vía oral en la fase 1 no tuvieron diferencias significativas con el grupo control. En la fase 2 de la prueba el efecto máximo obtenido fue de 61.3 %. Una vez efectuado el correspondiente análisis isoblográfico, donde el índice de interacción obtenido indicó la presencia de sinergismo, el valor de γ para la vía oral fue de 0.672, lo que implica que la dosis efectiva 50 experimental (DE_{50E}) fue menor a lo teóricamente calculado.

El mecanismo del sinergismo podría deberse a los diferentes sitios de acción de cada fármaco. Los sitios de acción y los mecanismos por los que actúan ambos medicamentos podrían ser complementarios, ya que ambos fármacos actúan sobre los mecanismos locales y neurales de transmisión para generar la modulación de varios tipos de dolor (Ortega-Varela et al., 2007). La metformina en las células neurales actúa como un regulador negativo de la proteína cinasa activada por AMP (AMPK), que a su vez disminuye la vía de señalización de mTORC1, reduciendo la hipersensibilidad neural, también suprime las vías de transducción aberrantes inducidas por las lesiones nerviosas, inhibiendo el dolor. De manera adicional, disminuye la activación de la vía de la proteína cinasa regulada por señales extracelulares (ERK) en las neuronas sensoriales, disminuyendo así la hiperexcitabilidad de los nociceptores en el sistema nervioso periférico y logrando disminuir la expresión de citocinas proinflamatorias, como IL-1 β , TNF- α y STAT-3 en las neuronas de la microglía, astrocitos y en la médula espinal, revirtiendo varios tipos de dolor (Augusto et al., 2019; Inyang et al., 2019; Melemedjian et al., 2011); por su parte, la melatonina actúa en sus propios receptores MT1 y MT2, siendo el receptor MT2 el más involucrado en la modulación del dolor, estos receptores se encuentran a nivel medular y cerebral, modulando las respuestas de dolor; la melatonina también actúa en los receptores nucleares RZR/ROR, bloqueando la formación de ciclooxigenasa-2 y lipoxigenasa-5, disminuyendo la formación de citocinas proinflamatorias, además de su gran efecto antioxidante, disminuyendo las especies reactivas de oxígeno (Lopez-Canul et al., 2015; Mantovani et al., 2006; Posa et al., 2017).

En la realización de los presentes estudios experimentales se observaron efectos significativos en la nocicepción. Tanto la metformina como la melatonina actuaron en la inhibición de los efectos nociceptivos provocados por la formalina, donde ambos fármacos de manera individual lograron disminuir la nocicepción, pero se mostró un

efecto mayor con la combinación; aunque la presentación oral presenta desventajas en la absorción y el tiempo de efectividad, se sugiere que esta combinación podría ser útil para tratar el dolor inflamatorio en los humanos (Kuthati et al., 2019; Posa et al., 2017).

8.3 Evaluación del efecto antihiperalgésico y antialodínico de cada fármaco y la combinación

8.3.1 Eficacia de la metformina

La administración de metformina disminuyó la hiperalgesia y la alodinia inducidas por la formalina al 1%. Los resultados de este trabajo mostraron que el efecto de la administración oral es dependiente de la dosis; la metformina indujo un efecto antihiperalgésico y antialodínico, tanto en la pata trasera ipsilateral como contralateral en el modelo de dolor en las ratas; en este sentido, en varios reportes de la literatura indican un efecto similar en varios modelos de dolor neuropático (Alcántara Montero et al., 2022; Augusto et al., 2019; Ma et al., 2015; Pecikoza et al., 2017; Sánchez-Gavidia et al., 2019).

Lo anterior sugiere que hay una participación importante de la metformina en el efecto antihiperalgésico y antialodínico en el proceso de consolidación de la sensación dolorosa a largo plazo.

8.3.2 Eficacia de la melatonina

La administración oral de la melatonina mostró un efecto antihiperalgésico y antialodínico en un modelo de dolor inducido por formalina al 1%. En el presente trabajo se observó una disminución de la hiperalgesia y la alodinia secundarias en la pata trasera, tanto ipsilateral como contralateral, en las ratas administradas con melatonina por vía oral, de una manera dependiente de la dosis. Esto concuerda en términos generales con otros estudios previos donde se observó este efecto (Ambriz-Tututi & Granados-Soto, 2007; Arreola-Espino et al., 2007; Galley et al., 2017; Wheeler-Aceto et al., 1990b), sugiriendo una acción antinociceptiva de largo plazo.

8.3.3 Eficacia de la combinación farmacológica

El efecto antihiperalgésico y antialodínico de la combinación en el presente estudio logró un efecto sinérgico, bloqueando el desarrollo de hiperalgnesia y alodinia. El pretratamiento con la combinación farmacológica logró bloquear el efecto pronociceptivo de la formalina al 1%. Este efecto de combinación sinérgica de ambos fármacos se ha observado con la metformina en otros estudios, como en el de Pecikozza et al. (2022), donde se demostró el efecto antihiperalgésico dependiente de la dosis de metformina, combinada con duloxetina y vitamina B12, obteniéndose un efecto sinérgico de la combinación, en un modelo de dolor neuropático inducido por estreptozotocina. Por otro lado, en el caso de la melatonina, en el estudio de Song et al. (2015) usaron 10 mg/Kg de melatonina intraperitoneal y 10 mg/kg de morfina subcutánea, evitando la aparición de hiperalgnesia y potenciando la acción analgésica. Sus mecanismos de acción analgésicos individuales al combinarse atenúan la nocicepción mediante la modulación de los neurotransmisores relacionados con el dolor, la supresión de la respuesta inmune y el bloqueo de la señalización neural.

8.4 Evaluación de la eficacia farmacológica ante la hiperalgnesia y la alodinia secundarias

Está descrito que la formalina al 1% induce hiperalgnesia y alodinia mecánicas secundarias de larga duración hasta los 12 días, lo cual es un modelo confiable y reproducible (Bravo-Hernández et al., 2012), que nos permite evaluar la eficacia de la metformina, la melatonina y la DE50E de la combinación en la presencia de dolor sostenido. El postratamiento farmacológico individual y la combinación fue capaz de revertir de forma significativa la hiperalgnesia y la alodinia secundarias inducida por la formalina al 1%, tanto en la pata trasera administrada como en la contralateral de la rata. Esto sugiere que la metformina y la melatonina se encuentran involucradas en el efecto antinociceptivo, tanto inflamatorio como en el dolor sostenido. Este fenómeno se ha observado en estudios previos, como en el de Pecikozza et al. (2022), donde se mostró el efecto antihiperalgésico individual de la metformina y la combinación farmacológica

con duloxetina y vitamina B12 en un modelo de dolor neuropático en ratones, inducido por la estreptozotocina; y en el de Zanette et al. (2014), donde se observó el efecto analgésico de la melatonina en la fibromialgia en pacientes en un estudio de fase II, apreciándose que al combinarse con amitriptilina mejoró su efecto analgésico en la escala de EVA y produjo una disminución de los síntomas en los umbrales de dolor por presión.

Este es el primer estudio sobre la combinación de metformina y melatonina por vía oral, por lo que los resultados encontrados con la combinación justifican la realización de estudios clínicos con el fin de demostrar su utilidad en el tratamiento del dolor neuropático en humanos.

8.5 Evaluación del mecanismo de acción de la combinación de metformina y melatonina

El efecto de la combinación oral de la metformina y la melatonina produjo una interacción sinérgica significativa, lo cual fue analizado en el presente proyecto. El efecto antinociceptivo de la combinación de metformina y melatonina se redujo significativamente después de la administración del pretratamiento oral de 4-P-PDOT, naloxona y dorsomorfina. El 4-P-PDOT es un antagonista selectivo del receptor MT2 de melatonina y el luzindole es un antagonista no selectivo los receptores MT1 y MT2 de melatonina (Ambriz-Tututi & Granados-Soto, 2007). El 4-P-PDOT bloqueó parcialmente el efecto de la combinación farmacológica, sugiriendo que hay un involucramiento mayor de los receptores MT2 que de los receptores MT1 en el efecto antinociceptivo de la combinación.

El pretratamiento con naloxona logró atenuar el efecto antinociceptivo de la combinación farmacológica, sugiriendo la participación de los receptores opioides. Se podría sugerir que ambos fármacos están involucrados con los receptores opioides, ya que en estudios previos se ha observado que la metformina aumenta a nivel plasmático la β -endorfina y también favorece la unión al receptor opioide μ , previniendo la neurotoxicidad por glutamato e interactuando con los nociceptores, disminuyendo la hiperexcitabilidad neuronal (Augusto et al., 2019; Cheng et al., 2006; Fatemi et al., 2018).

En otros estudios se ha observado la relación de la melatonina con los receptores opioides, favoreciendo su efecto antinociceptivo tanto agudo como a largo plazo (antialodínico y antihiperalgésico), ya que la melatonina induce la liberación de beta-endorfinas, y la morfina aumenta la liberación de melatonina en la glándula pineal. Los receptores de melatonina se distribuyen en varias regiones del cuerpo, tanto en el SNC como en el SNP (en la médula espinal en el asta dorsal y en el núcleo de varios nervios); por lo tanto, hay una gran interacción con los sistemas opioides (Hemati et al., 2020; Mantovani et al., 2006; Srinivasan et al., 2012).

El efecto de la combinación farmacológica oral se redujo significativamente después de la administración con el pretratamiento subcutáneo de la dorsomorfina. Estos resultados sugieren la participación de la proteína cinasa activada por AMP (AMPK) y confirman lo descrito por Inyang et al. (2019), Ma et al. (2015) y Russe et al. (2013), donde se demuestra la relación de la proteína AMPK con el efecto antinociceptivo de la metformina. Nuestros datos mostraron que la dorsomorfina bloqueó parcialmente el efecto antinociceptivo de la metformina en la prueba de formalina, y estos hallazgos también son congruentes en otros estudios (Cao et al., 2021; Hasanvand et al., 2016).

Este es el primer reporte del efecto antinociceptivo, antihiperalgésico y antialodínico de la combinación de metformina y melatonina, así como de su bloqueo por los inhibidores antes mencionados. La interacción sinérgica posiblemente tuvo su origen en múltiples acciones sobre los sitios de acción de ambos fármacos, y aparentemente los sitios de acción podrían ser complementarios, por ejemplo la unión de la melatonina al receptor MT2 de las membranas celulares y la activación del AMPK, combinado con la activación de los receptores opioides.

8.6 Perfil de seguridad de la combinación

El tratamiento con la dosis más alta de la combinación metformina-melatonina no afectó significativamente la coordinación muscular del animal en la prueba del Rota-Rod, lo que significa que los efectos antinociceptivos observados no están relacionados con el deterioro motor de las ratas; esto se ha observado en la literatura para la metformina (Augusto et al., 2019) y para la melatonina (M. Ambriz-Tututi & Granados-Soto, 2007).

En nuestros experimentos no se observaron efectos secundarios durante los experimentos, lo que sugiere que esta combinación tiene un perfil seguro de efectos secundarios.

9. Conclusiones

La administración oral de la metformina y la melatonina redujeron de manera significativa y dependiente de la dosis la nocicepción en la fase 2 de la prueba de formalina. La combinación de la metformina y la melatonina por vía oral presentó una eficacia altamente significativa, el índice de interacción indica un efecto sinérgico.

La combinación metformina-melatonina disminuye significativamente la hiperalgesia y la alodinia secundarias de manera dependiente de la dosis. Además, puede prevenir la aparición de los fenómenos de dolor sostenido y contrarrestarlos una vez que han sido instalados.

El mecanismo de acción de la combinación metformina-melatonina es multifactorial, ya que incluye al menos la participación de los receptores opioides, el receptor MT2 y la activación de AMPK. Todos estos hallazgos sugieren que el empleo de la combinación de metformina y melatonina podría ser útil en el tratamiento de dolor inflamatorio y dolor neuropático.

10.Referencias:

- Ahmed, M. A., Muntingh, G., & Rheeder, P. (2016). Vitamin B12 deficiency in metformin-treated type-2 diabetes patients, prevalence and association with peripheral neuropathy. *BMC Pharmacology & Toxicology*, 17(1). <https://doi.org/10.1186/S40360-016-0088-3>
- Alcántara Montero, A., Goicoechea García, C., Pacheco de Vasconcelos, S. R., & Alvarado, P. M. H. (2022). Potential benefits of metformin in the treatment of chronic pain. *Neurology Perspectives*, 2(2), 107–109. <https://doi.org/10.1016/J.NEUROP.2022.01.003>
- Ambriz-Tututi, M., & Granados-Soto, V. (2007). Oral and spinal melatonin reduces tactile allodynia in rats via activation of MT 2 and opioid receptors. *PAIN®*, 132, 273–280. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2007.01.025>
- Ambriz-Tututi, Mónica, Cruz, S. L., Urquiza-Marín, H., & Granados-Soto, V. (2011). Formalin-induced long-term secondary allodynia and hyperalgesia are maintained by descending facilitation. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 98, 417–424. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2011.02.012>
- Ambriz-Tututi, Mónica, Rocha-González, H. I., Cruz, S. L., & Granados-Soto, V. (2009). Melatonin: A hormone that modulates pain. *Life Sciences*, 84(15–16), 489–498. <https://doi.org/10.1016/J.LFS.2009.01.024>
- Arco, J. de. (2015). *Curso básico sobre dolor. Tema 1. Fisiopatología, clasificación y tratamiento farmacológico | Farmacia Profesional*. Farmacia Comunitaria. <https://www.elsevier.es/es-revista-farmacia-profesional-3-articulo-curso-basico-sobre-dolor-tema-X0213932415727485>
- Arinello, L., McComb, M., & Carey, J. (2002). Brain Facts: a primer on the brain and nervous system. In *Washington. society for Neurosciences*. *Brainfacts.org*. <https://doi.org/10.3747/co.23.3191>
- Arreola-Espino, R., Urquiza-Marín, H., Ambriz-Tututi, M., Araiza-Saldaña, C., Caram-Salas, N., Rocha-González, H., Mixcoatl-Zecuatl, T., & Granados-Soto, V. (2007). Melatonin reduces formalin-induced nociception and tactile allodynia in diabetic rats. *European Journal of Pharmacology*, 577(1–3), 203–210. <https://doi.org/10.1016/J.EJPHAR.2007.09.006>
- Augusto, P. S. A., Braga, A. V., Rodrigues, F. F., Morais, M. I., Dutra, M. M. G. B., Batista, C. R. A., Melo, I. S. F., Costa, S. O. A. M., Goulart, F. A., Coelho, M. M., & Machado, R. R. (2019). Metformin antinociceptive effect in models of nociceptive and neuropathic pain is partially mediated by activation of opioidergic mechanisms. *European Journal of Pharmacology*, 858, 172497. <https://doi.org/10.1016/J.EJPHAR.2019.172497>
- Baeza-Flores, G. D. C., Guzmán-Priego, C. G., Parra-Flores, L. I., Murbartián, J., Torres-López, J. E., & Granados-Soto, V. (2020). Metformin: A Prospective Alternative for the Treatment of Chronic Pain. *Frontiers in Pharmacology*, 11. <https://doi.org/10.3389/FPHAR.2020.558474>
- Basbaum, A. I., Bautista, D. M., Scherrer, G., & Julius, D. (2009). Cellular and Molecular Mechanisms of Pain. *Cell*, 139(2), 267–284. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2009.09.028>
- Bravo-Hernández, M., Cervantes-Durán, C., Pineda-Farias, J. B., Barragán-Iglesias, P.,

- López-Sánchez, P., & Granados-Soto, V. (2012). Role of peripheral and spinal 5-HT₃ receptors in development and maintenance of formalin-induced long-term secondary allodynia and hyperalgesia. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, *101*(2), 246–257. <https://doi.org/10.1016/J.PBB.2012.01.013>
- Brunton, L. L., Lazo, J. S., & Parker, K. L. (2007). *Las bases farmacológicas de la terapéutica*. Mc Graw Hill Interamericana. <http://repositorio.uasb.edu.bo:8080/handle/54000/1212>
- Burke, R. E. (2007). Sir Charles Sherrington's The integrative action of the nervous system: a centenary appreciation. *Brain*, *130*(4), 887–894. <https://doi.org/10.1093/BRAIN/AWM022>
- Campbell, J. N., & Meyer, R. A. (2006). Mechanisms of Neuropathic Pain. *Neuron*, *52*(1), 77–92. <https://doi.org/10.1016/J.NEURON.2006.09.021>
- Cao, X. J., Wu, R., Qian, H. Y., Chen, X., Zhu, H. Y., Xu, G. Y., Sun, Y. Z., & Zhang, P. A. (2021). Metformin attenuates diabetic neuropathic pain via AMPK/NF-κB signaling pathway in dorsal root ganglion of diabetic rats. *Brain Research*, *1772*, 147663. <https://doi.org/10.1016/J.BRAINRES.2021.147663>
- Cardinali, D. P., & Pévet, P. (1998). Basic aspects of melatonin action. *Sleep Medicine Reviews*, *2*(3), 175–190. [https://doi.org/10.1016/S1087-0792\(98\)90020-X](https://doi.org/10.1016/S1087-0792(98)90020-X)
- Casparly, T., & Anderson, K. V. (2003). Patterning cell types in the dorsal spinal cord: what the mouse mutants say. *Nature Reviews| Neurociencia*, *4*, 9. <https://doi.org/10.1038/nrn1073>
- Castañeda-Corral, G., Rocha-gonzález, H. I., Araiza-Saldaña, C. I., Ambriz-Tututi, M., Vidal-Cantú, G. C., & Granados-Soto, V. (2009). Role of peripheral and spinal 5-HT₆ receptors according to the rat formalin test. *NSC*, *162*, 444–452. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2009.04.072>
- Cervantes-Durán, C., Sánchez-Serrano, E., Gauthereau-Torres, M. Y., & Ortega-Varela, L. F. (2021). Evaluation of antinociceptive effect of the Ketorolac-Topiramate combination in the rat formalin test. *Bull. Pharm. Sci., Assiut University*, *44*(1), 253–263.
- Cervantes-Durán, C., Vidal-Cantú, G. C., Godínez-Chaparro, B., & Granados-Soto, V. (2016). Role of spinal 5-HT₂ receptors subtypes in formalin-induced long-lasting hypersensitivity. *Pharmacological Reports*, *68*(2), 434–442. <https://doi.org/10.1016/J.PHAREP.2015.11.009>
- Cervero, F., & Laird, J. M. A. (1996). From acute to chronic pain: mechanisms and hypotheses. *Progress in Brain Research*, *11*, 0.
- Cervero, F., Laird, J. M. A., & García-Nicas, E. (2003). Secondary hyperalgesia and presynaptic inhibition: an update. *European Journal of Pain*, *7*(4), 345–351. [https://doi.org/10.1016/S1090-3801\(03\)00047-8](https://doi.org/10.1016/S1090-3801(03)00047-8)
- Chaudhry, S. R., Stadlbauer, A., Buchfelder, M., & Kinfe, T. M. (2021). Melatonin Moderates the Triangle of Chronic Pain, Sleep Architecture and Immunometabolic Traffic. *Biomedicines*, *9*(8). <https://doi.org/10.3390/BIOMEDICINES9080984>
- Cheng, J. T., Huang, C. C., Liu, I. M., Tzeng, T. F., & Chih, J. C. (2006). Novel Mechanism for Plasma Glucose-Lowering Action of Metformin in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Diabetes*, *55*(3), 819–825. <https://doi.org/10.2337/DIABETES.55.03.06.DB05-0934>
- Costigan, M., Scholz, J., & Woolf, C. J. (2009). Neuropathic Pain: A Maladaptive

- Response of the Nervous System to Damage. *Annual Review of Neuroscience*, 32, 1. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.NEURO.051508.135531>
- Costigan, M., & Woolf, C. J. (2000). Pain: Molecular mechanisms. *Journal of Pain*, 1(3 SUPPL.), 35–44. <https://doi.org/10.1054/jpai.2000.9818>
- D’Mello, R., & Dickenson, A. H. (2008). Spinal cord mechanisms of pain. *BJA: British Journal of Anaesthesia*, 101(1), 8–16. <https://doi.org/10.1093/BJA/AEN088>
- Dasuni Wasana, P. W., Hasriadi, Muangnoi, C., Vajragupta, O., Rojsitthisak, P., Rojsitthisak, P., & Towiwat, P. (2022). Curcumin and metformin synergistically modulate peripheral and central immune mechanisms of pain. *Scientific Reports* 2022 12:1, 12(1), 1–19. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-13647-7>
- de Zanette, S. A. zeverd., Vercelino, R., Laste, G., Rozisky, J. R. ipol., Schwertner, A., Machado, C. B. uzzatt., Xavier, F., de Souza, I. C. ristin. C., Deitos, A., Torres, I. L. S., & Caumo, W. (2014). Melatonin analgesia is associated with improvement of the descending endogenous pain-modulating system in fibromyalgia: a phase II, randomized, double-dummy, controlled trial. *BMC Pharmacology & Toxicology*, 15(1), 40. <https://doi.org/10.1186/2050-6511-15-40/FIGURES/4>
- Di Lorenzi, R., Bruno, L., Garau, M., Javiel, G., Diaz, M. E. R., Di Lorenzi, R., Bruno, L., Garau, M., Javiel, G., & Diaz, M. E. R. (2020). Prevalencia de Neuropatía Periférica en una Unidad de Diabetes. *Revista Uruguaya de Medicina Interna*, 5(2), 17–27. <https://doi.org/10.26445/05.02.3>
- Dubin, A. E., & Patapoutian, A. (2010). Nociceptors: the sensors of the pain pathway. *The Journal of Clinical Investigation*, 120(11), 3760–3772. <https://doi.org/10.1172/JCI42843>
- Emet, M., Ozcan, H., Ozel, L., Yayla, M., Halici, Z., & Hacimuftuoglu, A. (2016). A Review of Melatonin, Its Receptors and Drugs. *The Eurasian Journal of Medicine*, 48(2), 135. <https://doi.org/10.5152/EURASIANJMED.2015.0267>
- Fatemi, I., Amirteimoury, M., Shamsizadeh, A., & Kaeidi, A. (2018). The effect of metformin on morphine analgesic tolerance and dependence in rats. *Research in Pharmaceutical Sciences*, 13(4), 316. <https://doi.org/10.4103/1735-5362.235158>
- Galley, H. F., McCormick, B., Wilson, K. L., Lowes, D. A., Colvin, L., & Torsney, C. (2017). Melatonin limits paclitaxel-induced mitochondrial dysfunction in vitro and protects against paclitaxel-induced neuropathic pain in the rat. *Journal of Pineal Research*, 63(4), e12444. <https://doi.org/10.1111/JPI.12444>
- Ge, A., Wang, S., Miao, B., & Yan, M. (2018). Effects of metformin on the expression of AMPK and STAT3 in the spinal dorsal horn of rats with neuropathic pain. *Molecular Medicine Reports*, 17(4), 5229. <https://doi.org/10.3892/MMR.2018.8541>
- Genovese, T., Mazzon, E., Crisafulli, C., Esposito, E., Di Paola, R., Muià, C., Di Bella, P., Bramanti, P., & Cuzzocrea, S. (2007). Effects of combination of melatonin and dexamethasone on secondary injury in an experimental mice model of spinal cord trauma. *Journal of Pineal Research*, 43(2), 140–153. <https://doi.org/10.1111/J.1600-079X.2007.00454.X>
- Godínez-Chaparro, B., Barragán-Iglesias, P., Castañeda-Corral, G., Rocha-González, H. I., & Granados-Soto, V. (2011). Role of peripheral 5-HT₄, 5-HT₆, and 5-HT₇ receptors in development and maintenance of secondary mechanical allodynia and hyperalgesia. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2010.12.020>
- Goicoechea, C., & Martín, M. I. (2006). Mecanismos periféricos y centrales del dolor.

- Reumatología Clínica*, 2(SPEC. ISS. 1), S5–S9. [https://doi.org/10.1016/S1699-258X\(06\)73075-3](https://doi.org/10.1016/S1699-258X(06)73075-3)
- Gómez, J. V., & Tortorice, V. (2009). *Mecanismos del dolor neuropático: Del laboratorio a la clínica*. Archivos Venesolanos de Farmacología y Terapéutica. http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0798-02642009000100002
- Grabovsky, Y., & Tallarida, R. J. (2004). Isobolographic analysis for combinations of a full and partial agonist: curved isoboles. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 310(3), 981–986. <https://doi.org/10.1124/JPET.104.067264>
- Granados-Soto, V., Arguelles, C. F., & Álvarez-Leefmans, F. J. (2005). Peripheral and central antinociceptive action of Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter blockers on formalin-induced nociception in rats. *Pain*, 114(1–2), 231–238. <https://doi.org/10.1016/J.PAIN.2004.12.023>
- Graven-Nielsen, T., & Arendt-Nielsen, L. (2002). Peripheral and central sensitization in musculoskeletal pain disorders: an experimental approach. *Current Rheumatology Reports*, 4(4), 313–321. <https://doi.org/10.1007/S11926-002-0040-Y/METRICS>
- Guyton, A. C., & Hall, J. E. (2016). *Tratado de fisiología médica* (13 ed). Elsevier. <http://www.fmvz.uat.edu.mx/Libros digitales/Fisiología médica - John E. Hall.pdf>
- Guzmán-Priego, C. G., Méndez-Mena, R., Baños-González, M. A., Araiza-Saldaña, C. I., Castañeda-Corral, G., & Torres-López, J. E. (2017). Antihyperalgesic Effects of Indomethacin, Ketorolac, and Metamizole in Rats: Effects of Metformin. *Drug Development Research*, 78(2), 98–104. <https://doi.org/10.1002/DDR.21379>
- Hasanvand, A., Amini-khoei, H., Hadian, M. R., Abdollahi, A., Tavangar, S. M., Dehpour, A. R., Semiei, E., & Mehr, S. E. (2016). Anti-inflammatory effect of AMPK signaling pathway in rat model of diabetic neuropathy. *Inflammopharmacology*, 24(5), 207–219. <https://doi.org/10.1007/S10787-016-0275-2/METRICS>
- Hatch, M., Cushing, T., & Carlson, GD.Chang, E. (2018). Neuropathic pain and SCI: Identification and treatment strategies in the 21st century. *Journal of the Neurological Sciences*, 384, 75–83. <https://doi.org/10.1016/J.JNS.2017.11.018>
- Hemati, K., Amini Kadijani, A., Sayehmiri, F., Mehrzadi, S., Zabihyeganeh, M., Hosseinzadeh, A., & Mirzaei, A. (2020). Melatonin in the treatment of fibromyalgia symptoms: A systematic review. *Complementary Therapies in Clinical Practice*, 38, 101072. <https://doi.org/10.1016/J.CTCP.2019.101072>
- Hybiak, J., Broniarek, I., Kiryczyński, G., Los, L. D., Rosik, J., Machaj, F., Sławiński, H., Jankowska, K., & Uraśińska, E. (2020). Aspirin and its pleiotropic application. *European Journal of Pharmacology*, 866, 172762. <https://doi.org/10.1016/J.EJPHAR.2019.172762>
- Hyun, B., Shin, S., Lee, A., Lee, S., Song, Y., Ha, N.-J., Cho, K.-H., & Kim, K. (2013). Metformin Down-regulates TNF- α Secretion via Suppression of Scavenger Receptors in Macrophages. *Immune Network*, 13(4), 123. <https://doi.org/10.4110/IN.2013.13.4.123>
- IASP. (2021). *International association for the study of pain*. Pain. [https://doi.org/10.1016/0304-3959\(89\)90017-1](https://doi.org/10.1016/0304-3959(89)90017-1)
- INEGI. (2021). Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Información. *INEGI*, 465/21, 1–5. <https://www.paho.org/es/campanas/dia-mundial-diabetes-2020>
- Inyang, K. E., Szabo-Pardi, T., Wentworth, E., McDougal, T. A., Dussor, G., Burton, M. D., & Price, T. J. (2019). The antidiabetic drug metformin prevents and reverses

- neuropathic pain and spinal cord microglial activation in male but not female mice. *Pharmacological Research*, 139, 1–16. <https://doi.org/10.1016/J.PHRS.2018.10.027>
- Kuthati, Y., Lin, S. H., Chen, I. J., & Wong, C. S. (2019). Melatonin and their analogs as a potential use in the management of Neuropathic pain. *Journal of the Formosan Medical Association*, 118(8), 1177–1186. <https://doi.org/10.1016/J.JFMA.2018.09.017>
- Lipp., J. (1991). Possible Mechanisms of Morphine Analgesia. *Neuropharmacology*, 14, 131–147. https://journals.lww.com/clinicalneuropharm/Abstract/1991/04000/Possible_Mechanisms_of_Morphine_Analgesia.3.aspx
- Liu, X., Chhipa, R. R., Nakano, I., & Dasgupta, B. (2014). The AMPK Inhibitor Compound C Is a Potent AMPK-Independent Antiglioma Agent. *Molecular Cancer Therapeutics*, 13(3), 596–605. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-13-0579>
- Loeser, J. D., & Treede, R. D. (2008). The Kyoto protocol of IASP Basic Pain Terminology. *Pain*, 137(3), 473–477. <https://doi.org/10.1016/J.PAIN.2008.04.025>
- Lopez-Canul, M., Palazzo, E., Dominguez-Lopez, S., Luongo, L., Lacoste, B., Comai, S., Angeloni, D., Frascini, F., Boccella, S., Spadoni, G., Bedini, A., Tarzia, G., Maione, S., Granados-Soto, V., & Gobbi, G. (2015). Selective melatonin MT2 receptor ligands relieve neuropathic pain through modulation of brainstem descending antinociceptive pathways. *Pain*, 156(2), 305–317. <https://doi.org/10.1097/01.J.PAIN.0000460311.71572.5F>
- Ma, J., Yu, H., Liu, J., Chen, Y., Wang, Q., & Xiang, L. (2015). Metformin attenuates hyperalgesia and allodynia in rats with painful diabetic neuropathy induced by streptozotocin. *European Journal of Pharmacology*, 764, 599–606. <https://doi.org/10.1016/J.EJPHAR.2015.06.010>
- Mantovani, M., Kaster, M. P., Pertile, R., Calixto, J. B., Rodrigues, A. L. S., & Santos, A. R. S. (2006). Mechanisms involved in the antinociception caused by melatonin in mice. *Journal of Pineal Research*, 41(4), 382–389. <https://doi.org/10.1111/J.1600-079X.2006.00380.X>
- Martín, M., Macías, M., Escames, G., Reiter, R. J., Agapito, M. T., Ortiz, G. G., et al. (2000). Melatonin-induced increased activity of the respiratory chain complexes I and IV can prevent mitochondrial damage induced by ruthenium red in vivo. *Journal of Pineal Research*, 28(4), 242–248. <https://sci-hub.se/https://doi.org/10.1034/j.1600-079X.2000.280407.x>
- Martínez-Rojas, V. A., Barragán-Iglesias, P., Rocha-González, H. I., Murbartián, J., & Granados-Soto, V. (2014). Role of TRPV1 and ASIC3 in formalin-induced secondary allodynia and hyperalgesia. *Pharmacological Reports*, 66(6), 964–971. <https://doi.org/10.1016/J.PHAREP.2014.06.011/METRICS>
- Melemedjian, O. K., Asiedu, M. N., Tillu, D. V., Sanoja, R., Yan, J., Lark, A., Khoutorsky, A., Johnson, J., Peebles, K. A., Lepow, T., Sonenberg, N., Dussor, G., & Price, T. J. (2011). Targeting adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK) in preclinical models reveals a potential mechanism for the treatment of neuropathic pain. *Molecular Pain*, 7, 70. <https://doi.org/10.1186/1744-8069-7-70>
- Millan, M. J. (1999). The induction of pain: an integrative review. *Progress in Neurobiology*, 57(1), 1–164. [https://doi.org/10.1016/S0301-0082\(98\)00048-3](https://doi.org/10.1016/S0301-0082(98)00048-3)
- Millan, M. J. (2002). Descending control of pain. *Progress in Neurobiology*, 66(6), 355–

474. [https://doi.org/10.1016/S0301-0082\(02\)00009-6](https://doi.org/10.1016/S0301-0082(02)00009-6)
- Mohammadyahya, E., Sarraf, P., Javadian, N., Shariat, M., Bitarafan, S., & Tafakhori, A. (2020). Melatonin as a Potential Prophylactic Therapy for Menstrual-Related Migraine Headache: A Randomized Clinical Trial. *Archives of Neuroscience 2020* 7:4, 7(4), 94375. <https://doi.org/10.5812/ANS.94375>
- Montes, P. (2012). *Horizonte Médico Universidad de San Martín de Porres*. 12(2), 37–42. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=371637125007>
- Moore, J. K., Osen, K. K., Storm-Mathisen, J., & Ottersen, O. P. (1996). γ -aminobutyric acid and glycine in the baboon cochlear nuclei: An immunocytochemical colocalization study with reference to interspecies differences in inhibitory systems. *The Journal of Comparative Neurology*, 369(4), 497–519. <https://onlinelibrary.wiley.com/action/showCitFormats?doi=10.1002%2F%28SIC1%291096-9861%2819960610%29369%3A4%3C497%3A%3AAID-CNE2%3E3.0.CO%3B2-%23>
- Moreno, C., & Prada, D. M. (2004). Fisiopatología del dolor clínico 2. *Asociación Colombiana de Neurología*, 9–21.
- Ortega-Varela, L. F. (2014). ¡Ay dolor, ya me volviste a dar! ¿Ya Te Enteraste? *Investigacion Científica 1, December*, 61–73. <https://doi.org/10.13140/2.1.4677.0247>
- Ortega-Varela, L. F., Herrera, J. E., Caram-Salas, N. L., Rocha-González, H. I., & Granados-Soto, V. (2007). Isobolographic Analyses of the Gabapentin-Metamizol Combination after Local Peripheral, Intrathecal and Oral Administration in the Rat. *Pharmacology*, 79(4), 214–222. <https://doi.org/10.1159/000101390>
- Ortega-Varela, L. F., Herrera, J. E., Caram-Salas, N. L., Rocha-Gonzalez, H. I., Torres-López, J. E., & Granados-Soto, V. (2009). Synergistic antiallodynic interaction of the metamizol-gabapentin combination. *Drug Development Research*, 70(5), 386–394. <https://doi.org/10.1002/DDR.20315>
- Ortiz, M. I. (2011). Blockade of the antinociception induced by diclofenac, but not of indomethacin, by sulfonyleureas and biguanides. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 99(1), 1–6. <https://doi.org/10.1016/J.PBB.2011.03.008>
- Pecikoza, U. B., Tomić, M. A., Micov, A. M., & Stepanović-Petrović, R. M. (2017). Metformin Synergizes With Conventional and Adjuvant Analgesic Drugs to Reduce Inflammatory Hyperalgesia in Rats. *Anesthesia and Analgesia*, 124(4), 1317–1329. <https://doi.org/10.1213/ANE.0000000000001561>
- Pecikoza, U., Tomić, M., Nastić, K., Micov, A., & Stepanović-Petrović, R. (2022). Synergism between metformin and analgesics/vitamin B12 in a model of painful diabetic neuropathy. *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie*, 153. <https://doi.org/10.1016/J.BIOPHA.2022.113441>
- Pedrajas Navas, José Ma. Molino Gonzalez, A. M. (2008). *Bases neuromédicas del dolor*. Clínica y Salud. https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1130-52742008000300002
- Posa, L., De Gregorio, D., Gobbi, G., & Comai, S. (2017). Targeting Melatonin MT2 Receptors: A Novel Pharmacological Avenue for Inflammatory and Neuropathic Pain. *Current Medicinal Chemistry*, 25(32), 3866–3882. <https://doi.org/10.2174/0929867324666170209104926>
- Price, T. J., & Dussor, G. (2013). AMPK: An emerging target for modification of injury-induced pain plasticity. *Neuroscience Letters*, 557 Pt A(0 0), 9–18.

- <https://doi.org/10.1016/J.NEULET.2013.06.060>
- Reiter, R.J., Tan, D. (2002). *Role of CSF in the transport of melatonin*. Journal of Pineal Research. <https://sci-hub.se/10.1034/j.1600-079x.2002.2e001.x>
- Rey, R. (2013). Tratamiento del dolor neuropático. Revisión de las últimas guías y recomendaciones. *Neurología Argentina*, 5(SUPPL.1), 1–7. <https://doi.org/10.1016/J.NEUARG.2011.11.004>
- Reyes-Prieto, B. M., Velázquez-Paniagua, M., & Prieto-Gómez, B. (2009). Melatonina y neuropatologías. *Revista de La Facultad de Medicina UNAM*, 52(3), 105–109. www.medigraphic.com
- Rocha-González, H. I., Meneses, A., Carlton, S. M., & Granados-Soto, V. (2005). Pronociceptive role of peripheral and spinal 5-HT 7 receptors in the formalin test. *Pain*, 117(1–2), 182–192. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2005.06.011>
- Rodulfo, J. I. A., Blanco, T. M. N., Aure, G., & Palacios, A. (2017). Metformina, el fármaco paradigma del siglo XXI. *Medicina Interna*, 33(1), 4–18. <https://www.svmi.web.ve/ojs/index.php/medint/article/view/409>
- Romera, E., Perena, M., & Perena, M. (2000). Neurophysiology of pain. *Rev Soc Esp Dolor*, 11, 11–17.
- Russe, O. Q., Möser, C. V., Kynast, K. L., King, T. S., Stephan, H., Geisslinger, G., & Niederberger, E. (2013). Activation of the AMP-Activated Protein Kinase Reduces Inflammatory Nociception. *The Journal of Pain*, 14(11), 1330–1340. <https://doi.org/10.1016/J.JPAIN.2013.05.012>
- Saisho, Y. (2015). Metformin and Inflammation: Its Potential Beyond Glucose-lowering Effect. *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders Drug Targets*, 15(3), 196–205. <https://doi.org/10.2174/1871530315666150316124019>
- Sánchez-Gavidia, J., Pante-Medina, C., Lujan-Carpio, E., & Salazar-Granara, A. (2019). Efecto antinociceptivo y antiinflamatorio de la metformina en modelos experimentales en ratón. *Horizonte Médico (Lima)*, 19(3), 49–57. <https://doi.org/10.24265/HORIZMED.2019.V19N3.08>
- Sánchez, B., Santiago, J., & Guillermo, S. (2014). Epidemiología del dolor crónico Epidemiology of Chronic Pain Correspondencia. *Archivos En Artículo de Revisión*, 16(4).
- Sasaki, M., Obata, H., Kawahara, K., Saito, S., & Goto, F. (2006). Peripheral 5-HT_{2A} receptor antagonism attenuates primary thermal hyperalgesia and secondary mechanical allodynia after thermal injury in rats. *PAIN®*, 122(1–2), 130–136. <https://doi.org/10.1016/J.PAIN.2006.01.021>
- Scarabelot, V. L., Medeiros, L. F., de Oliveira, C., Adachi, L. N. S., de Macedo, I. C., Cioato, S. G., de Freitas, J. S., de Souza, A., Quevedo, A., Caumo, W., & Torres, I. L. da S. (2016). Melatonin Alters the Mechanical and Thermal Hyperalgesia Induced by Orofacial Pain Model in Rats. *Inflammation*, 39(5), 1649–1659. <https://doi.org/10.1007/S10753-016-0399-Y/METRICS>
- Scholz, J., & Woolf, C. J. (2002). Can we conquer pain? *Nature Neuroscience*, 5(11s), 1062–1067. <https://doi.org/10.1038/nn942>
- Schultz, S. K. (2001). Principles of Neural Science, 4th ed. <https://doi.org/10.1176/Appi.Ajp.158.4.662>, 158(4), 662–662. <https://doi.org/10.1176/APPI.AJP.158.4.662>
- Smith, W., & Harrap, S. B. (2016). Behavioural and cardiovascular responses of rats to

- euthanasia using carbon dioxide gas:
[Http://Dx.Doi.Org/10.1258/002367797780596130](http://Dx.Doi.Org/10.1258/002367797780596130), 31(4), 337–346.
<https://doi.org/10.1258/002367797780596130>
- Song, Y., Wu, Z., & Zhao, P. (2022). The effects of metformin in the treatment of osteoarthritis: Current perspectives. *Frontiers in Pharmacology*, 13. <https://doi.org/10.3389/FPHAR.2022.952560>
- Srinivasan, V., C. Lauterbach, E., Yu Ho, K., Acuna-Castroviejo, D., Zakaria, R., & Brzezinski, A. (2012). Melatonin in antinociception: its therapeutic applications. *Current Neuropharmacology*, 10(2), 167–178. <https://doi.org/10.2174/157015912800604489>
- Stucky, C. L., Gold, M. S., & Zhang, X. (2001). Mechanisms of pain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(21), 11845–11846. <https://doi.org/10.1073/PNAS.211373398>
- Suarez-Mendez, S., Tovilla-Zarate, C. A., Ortega-Varela, L. F., Bermudez-Ocaña, D. Y., Blé-Castillo, J. L., González-Castro, T. B., Zetina-Esquivel, A. M., Diaz-Zagoya, J. C., & Esther Juárez-Rojop, I. (2017). Isobolographic Analyses of Proglumide–Celecoxib Interaction in Rats with Painful Diabetic Neuropathy. *Drug Development Research*, 78(2), 116–123. <https://doi.org/10.1002/DDR.21382>
- Tallarida, R. J. (2001). Drug Synergism: Its Detection and Applications. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 298(3).
- Tallarida, R. J. (2016). Drug Combinations: Tests and Analysis with Isoboles. *Current Protocols in Pharmacology*, 72, 9.19.1-9.19.19. <https://doi.org/10.1002/0471141755.PH0919S72>
- Taylor, A., Westveld, A. H., Szkudlinska, M., Guruguri, P., Annabi, E., Patwardhan, A., Price, T. J., & Yassine, H. N. (2013). The use of metformin is associated with decreased lumbar radiculopathy pain. *Journal of Pain Research*, 6, 755. <https://doi.org/10.2147/JPR.S52205>
- Tjølsen, A., Berge, O., Hunskaar, S., Rosland, J., & Hole, K. (1992). The formalin test: an evaluation of the method. *Pain*, 51(1), 5–17. <https://docero.com.br/doc/ec808c5>
- Torebjörk, H. E., Lundberg, L. E., & LaMotte, R. H. (1992). Central changes in processing of mechanoreceptive input in capsaicin-induced secondary hyperalgesia in humans. *The Journal of Physiology*, 448(1), 765–780. <https://doi.org/10.1113/JPHYSIOL.1992.SP019069>
- Treede, R. D., Meyer, R. A., Raja, S. N., & Campbell, J. N. (1992). Peripheral and central mechanisms of cutaneous hyperalgesia. *Progress in Neurobiology*, 38(4), 397–421. [https://doi.org/10.1016/0301-0082\(92\)90027-C](https://doi.org/10.1016/0301-0082(92)90027-C)
- Tricoire, H., Locatelli, A., Chemineau, P., & Malpoux, B. (2002). Melatonin Enters the Cerebrospinal Fluid through the Pineal Recess. *Endocrinology*, 143(1), 84–90. <https://doi.org/10.1210/ENDO.143.1.8585>
- Trouvin, A. P., & Perrot, S. (2019). New concepts of pain. *Best Practice & Research Clinical Rheumatology*, 33(3), 101415. <https://doi.org/10.1016/J.BERH.2019.04.007>
- Vanderah, T. W. (2007). Fisiopatología del dolor. *SAUNDERS Med Clin N Am*, 91, 1–12. <http://zl.elsevier.esel15/12/2014.Copiaparausopersonal,seprohíbelatransmisióndee stedocumentoporcuualquiermediooformato>.
- Wall, P. D. (1967). The laminar organization of dorsal horn and effects of descending impulses. *The Journal of Physiology*, 188(3), 403–423.

- <https://doi.org/10.1113/JPHYSIOL.1967.SP008146>
- Wheeler-Aceto, H., Porreca, F., & Cowan, A. (1990). The rat paw formalin test: comparison of noxious agents. *Pain*, *40*(2), 229–238. [https://doi.org/10.1016/0304-3959\(90\)90073-M](https://doi.org/10.1016/0304-3959(90)90073-M)
- Winkelstein, B. A. (2004). Mechanisms of central sensitization, neuroimmunology & injury biomechanics in persistent pain: implications for musculoskeletal disorders. *Journal of Electromyography and Kinesiology*, *14*(1), 87–93. <https://doi.org/10.1016/J.JELEKIN.2003.09.017>
- Woolf, C. J. (1983). Evidence for a central component of post-injury pain hypersensitivity. *Nature* *1983* *306*:5944, *306*(5944), 686–688. <https://doi.org/10.1038/306686a0>
- Woolf, C. J. (2010). What is this thing called pain? *Journal of Clinical Investigation*, *120*(11), 3742–3744. <https://doi.org/10.1172/JCI45178>
- Woolf, C. J., Doherty, M., Dubner, R., & Lipton, R. (1998). *Towards a mechanism-based classification of pain? Pain Osteoarthritis and pain mechanisms View project A clinical assessment tool to improve the use of pain relieving treatments in Knee Osteoarthritis (OA) View project*. [https://doi.org/10.1016/S0304-3959\(98\)00099-2](https://doi.org/10.1016/S0304-3959(98)00099-2)
- Woolf, C. J., & Ma, Q. (2007). Nociceptors—Noxious Stimulus Detectors. *Neuron*, *55*(3), 353–364. <https://doi.org/10.1016/J.NEURON.2007.07.016>
- World Health Organization. (1990). Cancer pain relief and palliative care: report of a WHO expert committee [meeting held in Geneva from 3 to 10 July 1989]. In *WHO, Technical Report Series*. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/39524>
- Xie, S., Fan, W., He, H., & Huang, F. (2020). Role of melatonin in the regulation of pain. *Journal of Pain Research*, *13*, 331–343. <https://doi.org/10.2147/JPR.S228577>
- Zhou, G., Myers, R., Li, Y., Chen, Y., Shen, X., Fenyk-Melody, J., Wu, M., Ventre, J., Doebber, T., Fujii, N., Musi, N., Hirshman, M. F., Goodyear, L. J., & Moller, D. E. (2001). Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *The Journal of Clinical Investigation*, *108*(8), 1167–1174. <https://doi.org/10.1172/JCI13505>
- Zhou, W., Jin, Y., Meng, Q., Zhu, X., Bai, T., Tian, Y., Mao, Y., Wang, L., Xie, W., Zhong, H., Zhang, N., Luo, M., Tao, W., Wang, H., Li, J., Li, J., Qiu, B., Zhou, J., Li, X., ... Zhang, Z. (2019). A neural circuit for comorbid depressive symptoms in chronic pain. *Nature Neuroscience* *2019* *22*:10, *22*(10), 1649–1658. <https://doi.org/10.1038/s41593-019-0468-2>
- Zimmermann, M. (1983). Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain*, *16*(2), 109–110. [https://doi.org/10.1016/0304-3959\(83\)90201-4](https://doi.org/10.1016/0304-3959(83)90201-4)
- Zúñiga-Romero, A., Ponce-Chávez, M. K., Gauthereau-Torres, M. Y., & Ortega-Varela, L. F. (2014). Combination of Diacerhein and Antiepileptic Drugs After Local Peripheral, and Oral Administration in the Rat Formalin Test. *Drug Development Research*, *75*(8), 510–520. <https://doi.org/10.1002/DDR.21232>