



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

Efecto de la agmatina local y espinal en el dolor producido por formalina

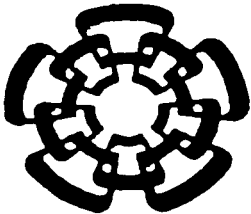
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO

P R E S E N T A :

HECTOR ISAAC ROCHA GONZALEZ



MEXICO, D.F.

EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUIMICA

2002



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

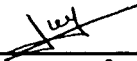
JURADO ASIGNADO:

Presidente Prof. GABRIEL DE LA ROSA VALGAÑÓN
Vocal Prof. ATONATIU EDMUNDO GÓMEZ MARTÍNEZ
Secretario Prof. VINICIO GRANADOS SOTO
1er. Suplente Prof. SOFIA MARGARITA RODRÍGUEZ ALVARADO
2do. Suplente Prof. HÉCTOR ANTONIO PONCE MONTER

La parte experimental de esta Tesis se realizó en el Departamento de Farmacobiología del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN, Sede Sur) bajo la dirección del Dr. Vinicio Granados Soto.

Dr. Vinicio Granados Soto

Héctor Isaac Rocha González



Asesor



Sustentante

AGRADECIMIENTOS

***Un agradecimiento especial al Dr. Vinicio Granados Soto por admitirme en su laboratorio, así como por su apoyo, sugerencias, comentarios y revisión en la realización del presente trabajo.**

***A la M. en C. Guadalupe C. Vidal Cantú por haber estado siempre al pendiente en el desarrollo de la tesis y por sus comentarios y sugerencias que enriquecieron mi visión en el campo de la analgesia.**

***A la Universidad Nacional Autónoma de México por haber sido parte importante en mi formación como estudiante y futuro profesionista.**

***Al Departamento de Farmacobiología del CINVESTAV-IPN (Sede Sur) por haber prestado sus instalaciones en la realización de esta tesis.**

***A todos mis maestros que de alguna u otra manera me motivaron siempre a esforzarme para alcanzar nuevos objetivos.**

***Al Lic. Héctor Vázquez Espinosa por su apoyo en la búsqueda de material bibliográfico.**

DEDICATORIAS

DEDICO ESTA TESIS:

* A Dios y a mi Señor Jesucristo, porque todo lo que soy, todo lo que tengo y he logrado se los debo.

*De manera especial al Ap. Samuel Joaquín Flores, por mostrarme con su ejemplo de vida, que un hombre feliz y exitoso es aquel que busca primeramente agradar a Dios, ya que lo demás llega por añadidura.

*Con cariño a mi Madre y a mi Abuela por su amor incondicional, así como por el enorme esfuerzo que llevaron a cabo para darme esta educación.

*A mi Hermano, mi Hermana y mi Cuñado que siempre me apoyaron y motivaron cuando lo necesite y por su cariño desinteresado.

* A Juan Carlos, Mayerlin, Nadia, Paco e Iván (donde quiera que se encuentre), por su amistad mostrada en los buenos y malos momentos a lo largo de mi vida cotidiana y académica.

*A mis familiares, amigos y a todas aquellas personas que influyeron en mi vida y que por cuestión de espacio no pueden nombrarse una por una.

Gracias.

ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	iv
FIGURAS Y TABLAS.....	vii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES.....	3
2.1 DOLOR.....	3
2.1.1 Generalidades.....	3
2.1.2 Nocicepción.....	6
2.1.2.1 Clasificación de Nociceptores.....	7
2.1.2.1.1 Nociceptores cutáneos.....	8
2.1.2.1.2 Nociceptores musculares.....	9
2.1.2.1.3 Nociceptores articulares.....	9
2.1.2.1.4 Nociceptores viscerales o silenciosos.....	9
2.1.2.1.5 Nociceptores óseos.....	10
2.1.2.1.6 Nociceptores dentales y de córnea.....	10
2.1.3 Fisiología del Dolor.....	10
2.1.3.1 Vías ascendentes.....	12
2.1.3.2 Tálamo y Corteza Sensorial.....	14
2.1.3.3 Vías de modulación del dolor.....	15
2.1.4 Neuroreguladores.....	17
2.1.4.1 Protones.....	18
2.1.4.2 Acetilcolina.....	19
2.1.4.3 Dopamina.....	19
2.1.4.4 Histamina.....	19
2.1.4.5 Serotonina.....	20
2.1.4.6 Sustancia P.....	20
2.1.4.7 Ácido γ -aminobutírico (GABA).....	21
2.1.4.8 Bradicinina.....	22
2.1.4.9 Factor de crecimiento neural.....	22
2.1.4.10 Encefalinas y β -endorfinas.....	23
2.1.4.11 Prostaglandinas.....	24
2.1.4.12 Noradrenalina.....	26
2.1.4.13 Glutamato.....	26
2.1.4.14 Óxido Nítrico.....	28
2.1.4.15 Agmatina.....	30
2.1.4.15.1 Estructura, nombre químico y propiedades físicas.....	30
2.1.4.15.2 Biosíntesis.....	30
2.1.4.15.3 Distribución.....	31
2.1.4.15.4 Liberación.....	32



	2.1.4.15.5	Inactivación.....	32
	2.1.4.15.6	Acciones farmacológicas.....	33
2.2	ANALGÉSICOS.....		35
2.2.1	Analgésicos opioides.....		35
2.2.2	Analgésicos anti-inflamatorios no esteroideos (AAINE's).....		36
2.2.3	Analgésicos antiartrómaticos que modifican la enfermedad (DMARD's).....		37
2.2.4	Analgésicos no anti-inflamatorios no opioides.....		38
2.2.5	Analgésicos antigotosos.....		38
2.3	MODELOS DE NOCICEPCIÓN EN ANIMALES.....		39
2.3.1	Modelos de dolor con estímulos de corta duración (Dolor fásico).....		40
2.3.1.1	Pruebas basadas en un estímulo térmico.....		40
2.3.1.1.1	Prueba "Tail-Flick".....		40
2.3.1.1.2	Prueba "Paw Withdrawal".....		41
2.3.1.1.3	Prueba "Hot Plate".....		41
2.3.1.1.4	Prueba "Cold Plate".....		41
2.3.1.2	Pruebas basadas en un estímulo mecánico.....		41
2.3.1.3	Pruebas basadas en un estímulo eléctrico.....		42
2.3.1.3.1	Pruebas que utilizan largas descargas eléctricas.....		42
2.3.1.3.2	Pruebas que utilizan choques eléctricos o descargas eléctricas cortas.....		42
2.3.2	Modelos de dolor con estímulos de larga duración (Dolor tónico).....		43
2.3.2.1	Estimulación a órganos.....		43
2.3.2.2	Inyección intraperitoneal o "Writhing Test".....		43
2.3.2.3	Inyección intradérmica.....		44
2.3.2.3.1	Prueba de la Formalina.....		44
2.4	CANULACIÓN INTRATECAL.....		45
2.5	ANTECEDENTES PARTICULARES.....		46
3.	OBJETIVOS.....		48
3.1	OBJETIVO GENERAL.....		48
3.2	OBJETIVOS PARTICULARES.....		48
4.	HIPÓTESIS.....		49
5.	MATERIAL Y MÉTODOS.....		50
5.1	ANIMALES.....		50



5.2 FÁRMACOS.....	50
5.3 METODOLOGÍA.....	51
5.3.1 Canulación intratecal.....	51
5.3.2 Prueba de la Formalina.....	51
5.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	52
5.5 DISEÑO EXPERIMENTAL.....	52
6. RESULTADOS.....	54
7. DISCUSIÓN.....	63
8. CONCLUSIONES.....	68
9. BIBLIOGRAFÍA.....	69



ABREVIATURAS

5-HPETE	Ácido hidroperoxitetraenoico
5-HT	5-Hidroxitriptamina
AAE	Aminoácidos excitatorios
AAINE's	Analgésicos antiinflamatorios
ABC	Área bajo la curva
ADC	Arginina descarboxilasa
AGM	Agmatina
ALF	Fascículo anterolateral ascendente
AMPA	Ácido α -amino-metil-isoxazolpropiónico
AMPc	Adenosin monofosfato cíclico
ANOVA	Análisis de varianza
ANTI-TNF- α	Anticuerpo contra el factor de necrosis tumoral α
CaM-Kinase II	Calcio-calmodulina cinasa
CDR	Curva dosis respuesta
CGRP	Péptido relacionado al gen de la calcitonina
CL	Contralateral
COX	Ciclooxigenasa
CYP2C	Citocromo de la familia 2C
CYP3A	Citocromo de la familia 3A
DAG	Diacilglicerol
DMARD's	Analgésicos antirreumáticos que modifican la enfermedad
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilendiaminetetraacético
GABA	Ácido γ -aminobutírico
GD	Glutamato descarboxilasa
GC	Guanilato ciclasa



GMPc	Guanosin monofosfato cíclico
GTP	Guanosin trifosfato
HPLC	Cromatografía de líquidos de alta eficiencia
IASP	Asociación internacional para el estudio del dolor
IL	Ipsilateral
iNOS	Óxido nítrico sintasa inducible
IP ₃	Inositol trifosfato
L-NAME	Éster metílico de L-nitroarginina
MDH	Asta dorsal de la médula
MRF	Retículo de formación mesencefálico
NGC	Núcleo gigantocelular
NGF	Factor de crecimiento neural
NMC	Núcleo magnocelular
NMDA	N-metil-D-aspartato
nNOS	Óxido nítrico sintasa neuronal
NRD	Núcleo raquí dorsal
NRM	Núcleo raquí magno
ON	Óxido nítrico
PAG	Sustancia gris periaqueductal
PE-10	Poliétileno número 10
PG	Prostaglandina
PKA	Proteínasa A
PKC	Proteínasa C
PLA ₂	Fosfolipasa A ₂
PLC	Fosfolipasa C
PONS	Núcleo <i>locus coeruleus</i>
RNA	Ácido ribonucleico
s.c.	Subcutánea



SI	Corteza somatosensorial primaria
SII	Corteza somatosensorial secundaria
SMT	Tracto espinomesencefálico
SNC	Sistema nervioso central
SRT	Tracto espinoreticular
STT	Tracto espinotalámico
TXA ₂	Tromboxano A ₂



FIGURAS Y TABLAS

FIGURAS

Figura 1	Fibra mielinizada, fibra poco mielinizada y fibra no mielinizada.....	8
Figura 2	Esquema de la inervación cutánea, muscular y visceral por fibras aferentes nociceptivas, su rolevó en la médula espinal y origen del sistema ascendente anterolateral.....	10
Figura 3	Clasificación de la sustancia gris de la médula espinal a nivel de la quinta vértebra lumbar.....	11
Figura 4	Representación del sistema ascendente anterolateral.....	13
Figura 5	Sistemas de modulación nociceptiva.....	16
Figura 6	Vía catabólica del ácido araquidónico.....	25
Figura 7	Estructura química de la agmatina.....	30
Figura 8	Vía metabólica de la agmatina y compuestos relacionados.	32
Figura 9	Esquema de los mecanismos de acción de la agmatina.....	34
Figura 10	Diagrama de flujo del diseño experimental.....	53
Figura 11	Gráfica que muestra el curso temporal del dolor producido en el modelo de formalina.....	55
Figura 12	Efecto analgésico del pretratamiento (-5 min) local con agmatina ipsilateral y contralateral durante la fase 2 en la prueba de formalina.....	56
Figura 13	Efecto analgésico del pretratamiento (-5 min) espinal con agmatina durante la fase 2 en la prueba de formalina.....	57
Figura 14	Efecto analgésico del post-tratamiento (+10 min) local con agmatina ipsilateral y contralateral durante la fase 2 en la prueba de formalina.....	58
Figura 15	Efecto analgésico del post-tratamiento (+10 min) espinal con agmatina ipsilateral y contralateral durante la fase 2 en la prueba de formalina.....	59
Figura 16	Comparación del efecto analgésico producido por agmatina entre el pretratamiento y post-tratamiento local.	60
Figura 17	Comparación del efecto analgésico producido por agmatina entre el pretratamiento y post-tratamiento espinal.	61



TABLAS

Tabla 1	Nervios Periféricos. Características principales.....	8
Tabla 2	Clasificación y características de los nociceptores cutáneos.....	9
Tabla 3	Principales neuroreguladores implicados en la respuesta del dolor.....	18
Tabla 4	Áreas bajo la curva de la fase 2 obtenidas por el método de trapezoides en la prueba de formalina después de haber administrado diferentes dosis de agmatina en cada tratamiento.....	62



1. INTRODUCCIÓN

Los esfuerzos en la investigación durante los últimos decenios han dado por resultado grandes adelantos en el conocimiento de los mecanismos farmacológicos de la nocicepción (Sorkin, 1997). Los estudios demuestran que es posible aplicar con efectividad nuevos fármacos para suprimir reacciones fisiológicas y obtener beneficios en el tratamiento del dolor (D'Amours y Ferrante, 1997).

La agmatina es un neurotransmisor recientemente descubierto (Reis y Regunathan, 2000), que se sintetiza en el cerebro a partir de L-arginina por la enzima arginina descarboxilasa (Wu y Morris, 1998). Es inactivado por mecanismos de recaptura (Sastre y cols., 1997) y degradación enzimática (Sastre y cols., 1998). Se encuentra distribuido en el sistema nervioso, principalmente en el hipotálamo, cerebro medio, núcleo dorsal, PAG, locus coeruleus y núcleo raté dorsal (Otake y cols., 1998). Su distribución se concentra en sitios relacionados con el control endócrino y visceral, así como en el procesamiento de emociones, percepción del dolor y razonamiento (Reis y Regunathan, 2000).

Se une con alta afinidad a receptores NMDA (Reis y cols., 1995), α_2 -adrenérgicos (Piletz y cols., 1995) y a otros receptores acoplados a canales catiónicos (Loring, 1990; Reis, 1998). Así también la agmatina modula la producción de óxido nítrico inhibiendo todas las isoformas inducibles de la óxido nítrico sintasa (Auguet y cols., 1995).



Numerosos estudios sugieren que la unión a receptores NMDA e inhibición de las iNOS le permiten a la agmatina antagonizar algunos estados de hiperalgesia (Horváth y cols., 1999), dolor persistente (Önal y Soykan, 2001), inflamación, neuropatía y daño a la médula espinal (Fairbanks y cols., 2000). La agmatina también presenta sinergismo analgésico al administrarse junto con morfina y previene cambios en la función neuronal, incluyendo la tolerancia a opioides (Trujillo y Akil, 1991). Por lo que se ha sugerido que la agmatina pudiera ser un candidato ideal para ser fármaco analgésico.

Hasta la fecha se ha estudiado el efecto analgésico de la agmatina por administración intratecal (Horváth y cols., 1999; Fairbanks y cols., 2000), intraperitoneal (Önal y Soykan, 2001) y en cultivos celulares (Yang y Reis, 1999; Abe y cols., 2000) pero no existe evidencia de la actividad analgésica de la agmatina después de una administración periférica local, por lo que el objetivo del presente trabajo fue evaluar el posible efecto analgésico que produce la agmatina como pretratamiento y post-tratamiento a nivel local y espinal en un modelo de dolor inflamatorio en ratas.



2.1 DOLOR

2.1.1 Generalidades

La Organización Internacional para el Estudio del Dolor (IASP, *International Association for the Study of Pain*) ha propuesto en la actualidad la delinción de dolor más adecuada, al cual define como una experiencia sensorial y emocional desagradable asociada a un daño tisular real o potencial que puede describirse en términos de la magnitud del daño (Merskey, 1979).

Melzack y Casey (1968) dividen en dos componentes la experiencia del dolor:

1. Un componente localizante y discriminativo, que informa al paciente sobre la naturaleza, intensidad, duración y localización del dolor y;
2. Un componente afectivo y de alerta, que demanda atención del individuo provocando una sensación desagradable que motiva al aprendizaje de la percepción dolorosa.

El dolor es un mecanismo de defensa cuya función es la de salvaguardar la integridad del organismo ante factores que pudieran ser destructivos, sin embargo, cuando existe un funcionamiento anormal en las estructuras de dicho mecanismo, el dolor sobrepasa su función y se vuelve patológico (Bowman y Rand, 1984).

Existen muchos tipos de dolor, debido a la gran cantidad de factores que influyen al presentarse la percepción dolorosa, entre los que se encuentran: el



estado emocional, estrés, sexo, edad, raza, experiencias previas, factores culturales, personalidad, condicionamiento del individuo, etc. (Forth y cols., 1995); Los cuales pueden agruparse en factores anatómicos, fisiológicos y psicológicos (Turk y Okifuji, 1999).

La existencia de muchas clases de dolor se puede entender mediante la identificación de los cuatro componentes que acompañan al proceso del dolor (Loeser y Melzack, 1999):

1. Nocicepción: La palabra nocicepción se deriva de la raíz latina *nocere* que significa daño o lesión y se define como la respuesta desencadenada por el sistema nervioso ante un estímulo nocivo (García y Herrero, 1998) .

2. Percepción del dolor: Se genera frecuentemente por lesión o enfermedad, así como por daños en el sistema nervioso central y periférico. En el dolor agudo la percepción del dolor se asocia a reflejos autonómicos y somáticos, pero estos desaparecen en el dolor crónico.

3. Sufrimiento: Es un estado desagradable que se presenta cuando la integridad física o psicológica del individuo es amenazada (Cassell,1982).

4. Conductas del dolor: Son el resultado del dolor y el sufrimiento que experimenta la persona, y se atribuyen al daño en el tejido. Ejemplos de estas conductas son el cojear, el hacer muecas, el decir "ouch", entre otras.

La clasificación de los tipos de dolor es un tema de debate entre investigadores y clínicos, los cuales suelen clasificar al dolor de acuerdo a su origen anatómico y características clínicas o etiológicas (Bonica,1990).

Bjorkman (1995) clasifica el dolor de acuerdo a la región anatómica donde se produce en: somatosensorial (originado en la piel o tejido conectivo, hueso,



músculo y membranas sinovial y articular), visceral (dolor procedente de las distintas vísceras abdominales o torácicas) y neurogénico (se refiere al dolor que se produce debido al daño o irritación en el sistema nervioso).

Por su parte, Loeser y Melzack (1999) proponen una clasificación de dolor, basada principalmente en la duración y características fisiopatológicas que lo producen, en:

1. Dolor transitorio: Se activa por nociceptores cutáneos u otros tejidos del cuerpo en ausencia de daño tisular, su función es la de proteger al individuo de un posible daño físico provocado por el medio ambiente o estrés excesivo sobre el tejido.

2. Dolor agudo: El dolor agudo funciona como señal de alarma del tejido lesionado, por lo que posee una función biológica protectora. Las secuelas psicológicas no son importantes y el dolor desaparece con la lesión que lo originó (Cervero y Laird, 1995). El dolor agudo se activa por la estimulación de nociceptores presentes en el tejido dañado.

3. Dolor crónico: Más que asociarse con una función protectora, es un síntoma de alguna enfermedad como neuralgia (Aleksandar, 1997) o fibromialgia (Butler y cols., 1997). Este tipo de dolor, no es un proceso autolimitado por lo que puede persistir por meses o incluso años (Cervero y Laird, 1995), se ha asociado a múltiples comportamientos antiterapéuticos y frustrantes denominados con frecuencia conductas del dolor, entre las que destacan la ansiedad, depresión, insomnio, miedo, histeria, entre otros factores psicológicos y sociales (Hyman y Cassem, 1995).



Pero en general, de acuerdo a sus características fisiológicas, se acepta que existen dos tipos de sensaciones de dolor (Guyton y Hall, 1996):

1. Dolor rápido o primario: Es una sensación corta que se percibe 0.1 segundos después del estímulo doloroso como un dolor punzante, repentino y bien localizado, es debido a la activación de fibras A- δ (Zimmermann, 1984).

2. Dolor lento o secundario: Es una sensación quemante, prolongada, difusa y de carácter desagradable que se presenta después de 1 segundo o más de haberse aplicado el estímulo y se debe a la activación de fibras C (Zimmermann, 1984).

2.1.2 Nocicepción

Es un término neurofisiológico que se refiere a los mecanismos neurales por los cuales se detectan los estímulos nocivos. La nocicepción comprende dos etapas: La transducción de los estímulos nocivos por las terminales de los nervios periféricos, y la transmisión de estas señales al sistema nervioso central.

Para transmitir información nociceptiva la neurona debe ser selectiva. Es decir, debe haber algún mecanismo con la capacidad de distinguir entre estímulos inocuos y nocivos (Hyman y Cassem, 1995). Los nociceptores poseen dos características que ayudan a realizar esta distinción: un umbral alto de estimulación y la capacidad de relacionar de manera directa la frecuencia de la descarga con la intensidad del estímulo (Besson, 1969).

Los nociceptores (abreviación de nocirreceptor) se encuentran anatómicamente distribuidos en tres zonas principales: la piel, las estructuras



musculoesqueléticas y las vísceras. Estos receptores responden a estímulos mecánicos, térmicos y químicos en una serie de potenciales de acción que transmiten a lo largo de sus axones hasta la médula espinal.

Con la activación de estos receptores, se liberan sustancias endógenas como la sustancia P, bradicinina, serotonina, histamina, leucotrienos, prostaglandinas, iones sodio y potasio, entre otros (Lim, 1967; Björkman, 1995).

Los nociceptores pueden clasificarse de acuerdo a 1) Su respuesta a diferentes tipos de estímulo, 2) a la velocidad de conducción de sus axones periféricos y 3) a las diferentes respuestas que presentan ante un estímulo (Srinivasa y cols., 1988).

2.1.2.1 Clasificación de Nociceptores


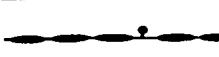

- | | |
|----------------------------|-------------------------------------|
| ▶ Nociceptores cutáneos | ▶ Nociceptores viscerales |
| ▶ Nociceptores musculares | ▶ Nociceptores óseos |
| ▶ Nociceptores articulares | ▶ Nociceptores dentales y de córnea |

Los nervios periféricos cutáneos contienen uno de varios tipos diferentes de axones (Hyman y Cassem, 1995), clasificados en tres grupos principales dependiendo de su diámetro y grado de mielinización (Tabla 1).

Existen fibras más gruesas (12-22 μm) llamadas A- α que inervan músculos y articulaciones y participan en la propiocepción, pero éstas responden a estímulos no nociceptivos (Hyman y Cassem, 1995).



Tabla 1: Nervios Periféricos. Características principales.

Figura 1	Tipo de Fibra	Receptores	Velocidad de conducción	Diámetro	Grado de mielinización	Tipo de estímulo
	A-β	Merkel Ruffini Meissner Pacini	30-120 m/s	5-15 μm	+++	Mecánico
	A-δ	Terminaciones libres	6-30 m/s	1-5 μm	++	Mecánico Térmico
	C	Terminaciones libres	0.5-2 m/s	0.5-2 μm		Mecánico Térmico Químico

Modificado de García y Herrero (1998). Figura 1. Arriba: Fibra mielinizada, Centro: Fibra poco mielinizada y Abajo: Fibra no mielinizada.

2.1.2.1.1 Nociceptores cutáneos

Hasta el momento han sido los más estudiados por su accesibilidad y pueden ser mielinizados (fibras-A) o no mielinizados (fibras-C). Están localizados en todo el cuerpo y, en términos anatómicos, son ramificaciones terminales especializadas de fibras nerviosas sensitivas que responden a estímulos térmicos, mecánicos o químicos (Hyman y Cassem, 1995).

De acuerdo a su modo de activación se pueden clasificar en 4 tipos (Tabla 2):

Tabla 2: Clasificación y características de los nociceptores cutáneos.

Tipo de Nociceptor Cutáneo	Tipo de Fibra	Tipo de Estímulos	Campo receptivo
Mecanocceptores o Mecanorreceptores de umbral alto (Fitzgerald y Lynn, 1977)	A-δ	Mecánicos pero pueden sensibilizarse con estímulos térmicos repetitivos	<1 mm ²
Mecanotermocceptores mielinizados	A-δ	Térmicos (>45°C) Mecánicos	< 5 mm ²
Nociceptores Polimodales C	C	Térmicos (>38°C) Mecánicos (>1g) Químicos (ácidos, histamina o KCl)	17 mm ²
Nociceptores de Frío	A-δ o C	Frío	1-145 mm ²

Datos tomados de Fields y Martín, 1994; Hyman y Cassem, 1995.



2.1.2.1.2 Nociceptores musculares

Se activan por contracción isquémica del músculo o irritantes químicos, el 75% de la inervación del músculo esquelético se debe a fibras A-δ (Grupo III) o C (Grupo IV) de terminaciones nerviosas libres.

2.1.2.1.3 Nociceptores articulares

Son fibras A con receptores encapsulados y A-δ o C con terminaciones libres. Juegan un papel importante en la artritis.

2.1.2.1.4 Nociceptores viscerales o silenciosos

Se han localizado en tracto gastrointestinal, sistema biliar, sistema urinario, hígado y bazo. Tienen fibras A-δ o C que no son activas de manera espontánea. Sin embargo, se hacen sensibles a estímulos mecánicos ante mediadores inflamatorios y distensión (Fields y Martín, 1994).

2.1.2.1.5 Nociceptores óseos

Son fibras A-δ o C localizadas alrededor del periostio.

2.1.2.1.6 Nociceptores dentales y de córnea

Existen fibras A-δ o C que responden a estímulos mecánicos, térmicos y químicos (Mumford y Bower, 1976; Beuerman y Tanelian, 1979).



2.1.3 Fisiología del Dolor

El proceso comienza con la activación de nociceptores aferentes primarios (fibras A- δ y C), en respuesta a estímulos físicos, mecánicos y/o químicos (Siddall y Cousins, 1998). Este mensaje se propaga a través de las aferentes primarias hasta el asta dorsal de la médula espinal (Figura 2), donde se encuentra el primer centro de relevo (García y Herrero, 1998).

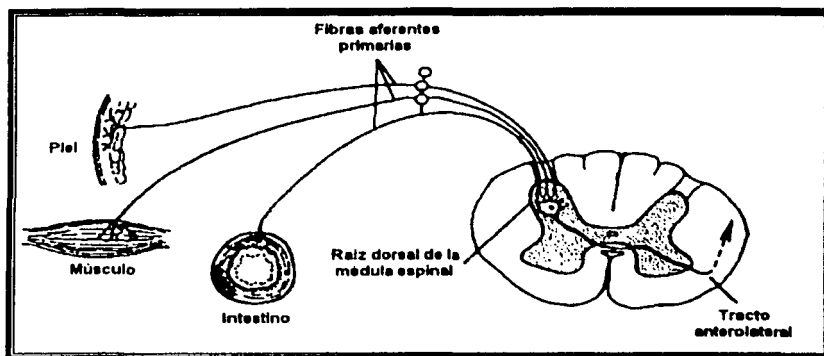


Figura 2. Esquema de la inervación cutánea, muscular y visceral por fibras aferentes nociceptivas, su relevo en la médula espinal y origen del sistema ascendente anterolateral (Modificado de Jesell y Kelly, 1991).

Cada axón aferente primario contacta con muchas neuronas medulares, y cada neurona medular recibe impulsos convergentes de muchas fibras aferentes primarias (Fields y Martín, 1994). La convergencia y la divergencia de señales tiene lugar de una forma ordenada, de manera que diferentes regiones de la piel y áreas contiguas de ésta, tienen zonas específicas en las estaciones de relevo de la corteza. De modo que la corteza tiene un mapa donde cada parte del cuerpo está representada por un grupo de neuronas (García y Herrero, 1998).



Rexed (1952) divide la sustancia gris de la médula en 10 láminas (Figura 3), de las cuales tienen especial importancia la capa marginal de Waldeyer (lámina I), la sustancia gelatinosa (lámina II), el núcleo propio (láminas III-VI), y el área que rodea el conducto central (lámina X). Los axones de la mayoría de las neuronas de dichas láminas constituyen el sistema espinotalámico (Sorkin, 1997). Las láminas del I-VI forman el asta dorsal de la médula espinal. Dentro del asta dorsal los nociceptores primarios terminan en neuronas de proyección y en interneuronas excitatorias e inhibitorias (Hyman y Cassem, 1995).

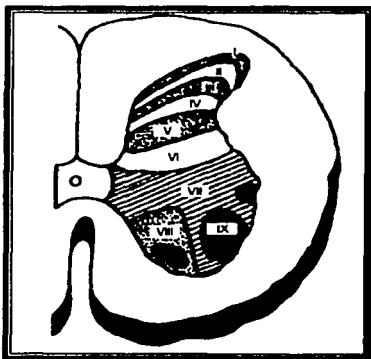


Figura 3. Clasificación de la sustancia gris de la médula espinal a nivel de la quinta vértebra lumbar (según Rexed, 1952).

2.1.3.1 Vías ascendentes

Los axones procedentes de las neuronas de proyección forman las vías ascendentes que portan el mensaje nociceptivo a centros superiores. Las principales vías se agrupan en dos sistemas generales. El sistema de columnas dorsales-lemnisco interno y el sistema anterolateral (García y Herrero, 1998).



El sistema de las columnas dorsales-lemnisco interno está formado por grandes fibras mielinizadas que en general transmiten información táctil no nociceptiva y de orientación espacial (Guyton y Hall, 1996).

Las fibras del sistema anterolateral se originan principalmente en las láminas I, IV-VII y X del asta dorsal, las cuales reciben aferencias de fibras A- δ y C (García y Herrero, 1998). Al salir del asta dorsal se cruzan al lado opuesto y ascienden por las columnas laterales de la médula para terminar a distintas alturas del tronco encefálico y en el tálamo (Figura 4). Se dividen filogenéticamente en dos ramas: El sistema neoespinotalámico que comprende el haz espinotalámico lateral y el sistema paleoespinotalámico que abarca el haz espinotalámico medio, el haz espinorreticular y el haz espinomesencefálico.

El haz espinotalámico lateral se origina en las láminas I, IV, V y VI. Sus fibras largas y mielinizadas hacen conexión con el tálamo y los núcleos ventrolateral y posterior. Este haz posee la capacidad de procesar la información nociceptiva en tiempo y espacio de forma continua (Dubner y Bennett, 1983).

El haz espinotalámico medio posee fibras cortas que hacen conexión con el núcleo gigantocelular, cerebro medio y núcleo talámico intralaminar medial. Este haz junto con el haz espinorreticular y el haz espinomesencefálico establecen contacto con fibras que conectan con el hipotálamo, cerebro límbico anterior y otras regiones cerebrales que lo involucran en respuestas reflejas de circulación, ventilación y endócrinas; además de darle al dolor la sensación desagradable.

El haz espinorreticular se origina en las láminas VII, VIII y X. Es una vía directa de la médula espinal a la formación reticular y bulbo raquídeo.



Haz espinomesencefálico: Sus fibras se originan de las láminas I, V, VII y X proyectándose hasta el subnúcleo lateral de la sustancia gris pericueductal y otras estructuras.

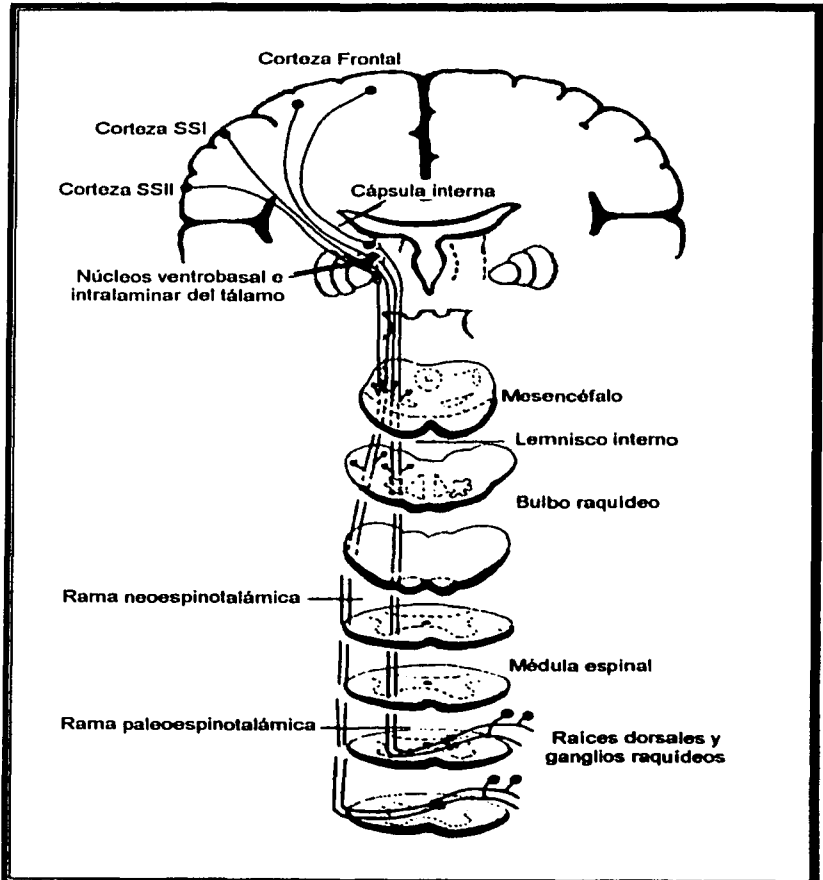


Figura 4. Representación del sistema ascendente anterolateral (Modificado de Guyton y Hall, 1996).



2.1.3.2 Tálamo y Corteza Sensorial

El tálamo está constituido por los núcleos que forman el complejo ventroposterior: núcleo ventral posterolateral (que recibe aferencias del tronco y los miembros), núcleo ventral posteromedial (con aferencias de la cara) y partes parvocelulares (que reciben aferencias de las vísceras). Es una zona de relevo con interneuronas y neuronas de proyección que envían sus axones a la corteza somatosensorial.

La corteza somatosensorial ocupa la circunvolución parietal ascendente (Figura 4), y se divide en la corteza somatosensorial primaria (SI): la cual recibe una gran cantidad de aferencias directas del tálamo, y en la corteza somatosensorial secundaria (SII) que recibe la mayoría de sus aferencias de la corteza somatosensorial primaria (García y Herrero, 1998). Esta región es particularmente importante debido a que participa en el carácter discriminativo del dolor (Fields y Martín, 1994).

Los axones del haz espinotalámico conectan también con las regiones talámicas mediales unidas con la corteza frontal y el sistema límbico. Esta vía favorece la dimensión afectiva o desagradable del dolor (Fields y Martín, 1994).

La corteza somatosensorial está conectada con ganglios basales, conexiones asociativas, conexiones callosas y con núcleos de relevo, formando así, algunas de las vías descendentes (García y Herrero, 1998).



2.1.3.3 Vías de modulación del dolor

Las vías descendentes permiten al organismo conocer y responder a los estímulos nocivos, modulando o inhibiendo el estímulo (Akil y cols., 1976). En 1965, Melzack y Wall como parte de su teoría de la compuerta proponen la existencia de un sistema específico capaz de modular el dolor. Estudios posteriores en ratas confirman la existencia de dicho sistema (Reynolds, 1969; Mayer y cols., 1971). Y aunque en la actualidad se han descubierto varios sistemas que pueden modular el dolor, sólo uno se ha estudiado en profundidad debido a su importancia (Fields y Martín, 1994). Dicho sistema consta de cuatro niveles (Figura 5A).

El sistema fascículo anterolateral ascendente (ALF) está integrado por los tractos espinotalámico, espinoreticular y espinomesencefálico; se conecta en el núcleo raquí magno (NRM), núcleo magnocelular (NMC), núcleo gigantocelular (NGC) y la sustancia gris pericueductal (PAG). Así como con el núcleo raquí dorsal (NRD) y el retículo de formación mesencefálico (MRF). Por su parte, la sustancia gris pericueductal recibe axones ricos en β -endorfinas de diversos sitios de la corteza y otras partes del cerebro involucradas con el sistema límbico, el tálamo y el hipotálamo. El *locus coeruleus* es la principal vía de neuronas noradrenérgicas hacia el PAG y el asta dorsal (láminas I, II, IV-VI y X).

Las estructuras mesencefálicas contienen neuronas de encefalina, dinorfina, serotonina y neurotensina que proyectan al NRM y NGC. Estas neuronas hacen sinapsis con neuronas serotoninérgicas en el asta dorsal, las cuales descienden



por el funículo dorsolateral y mandan sus terminales a las láminas I, II, V y IX de la médula espinal (Bonica, 1987).

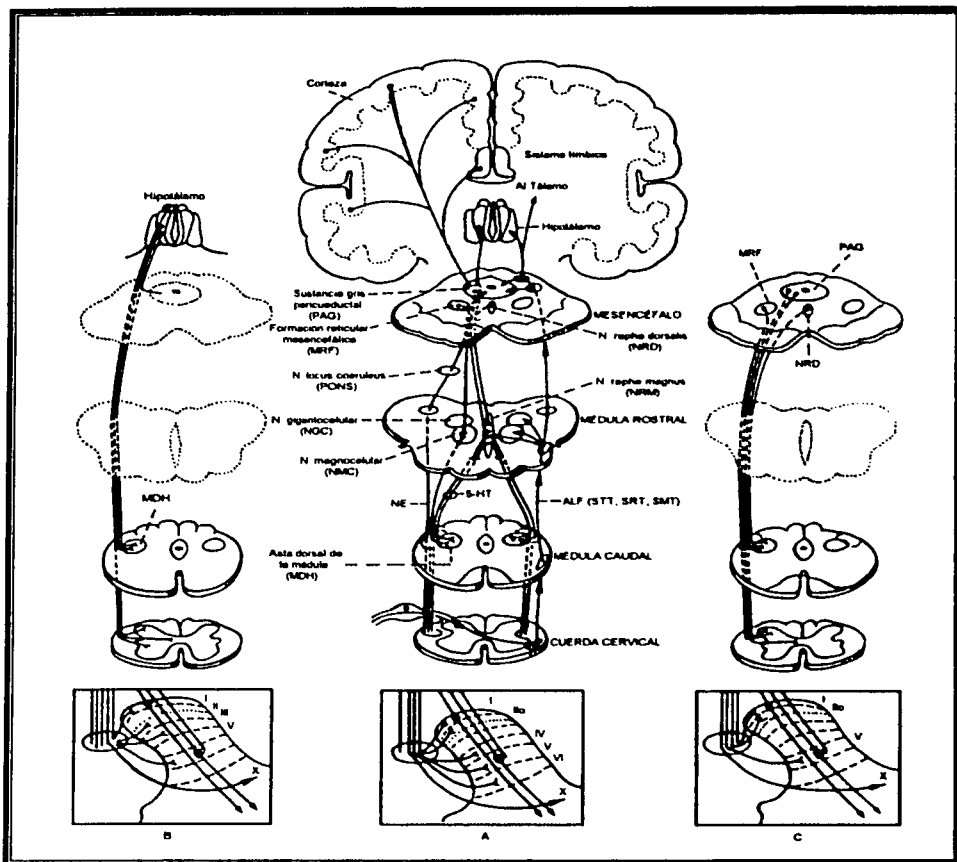


Figura 5. Sistemas de modulación nociceptiva: A. Sistema anterolateral ascendente (ALF), B. Sistema hipotálamo-espinal descendente y C. Sistema PAG-espinal (Modificado de Bonica, 1987).



Otros sistemas que funcionan como moduladores del dolor son el sistema descendente hipotálamo-espinal que se origina en el núcleo hipotalámico paraventricular y medial, el cual se encuentra formado principalmente por neuronas de vasopresina y oxitocina, aunque también existen neuronas ricas en endorfinas. Este sistema hace sinapsis en las láminas I, II, III, V y X del asta dorsal (Figura 5B);

El sistema PAG-espinal (Figura 5C) integrado en su mayoría por neuronas noradrenérgicas y serotoninérgicas, el cual desciende por el funículo dorsolateral proyectándose directamente a las láminas I, II, V y X del asta dorsal (Bonica, 1987).

2.1.4 Neuroreguladores

La actividad y metabolismo de las fibras sensoriales se puede alterar profundamente por una variedad de mediadores que se generan por el daño tisular y la inflamación. Estos mediadores incluyen sustancias liberadas por el tejido dañado, sustancias de origen vascular, de fibras aferentes, fibras simpáticas y diversas células inmunes. El efecto de estos mediadores consiste en activar o sensibilizar las fibras aferentes produciendo cambios en los canales iónicos y receptores de membrana. Estos cambios tienen el potencial de alterar la transcripción de genes e inducir a largo plazo alteraciones en la bioquímica de las neuronas sensoriales (Dray, 1995).



La comprensión de la transmisión y modulación del dolor es el resultado de la convergencia de métodos morfológicos, bioquímicos, histológicos, psicológicos, entre otros.

Dentro de la modulación los neurorreguladores juegan un papel muy importante en la comunicación celular nerviosa. Estos neurorreguladores pueden subdividirse en neurotransmisores y neuromoduladores (Barchas y cols., 1978). Los neurotransmisores básicamente llevan información entre células nerviosas adyacentes, mientras que los neuromoduladores aumentan o disminuyen la actividad: afectando la síntesis, recaptura, biotransformación o unión al receptor de los neurotransmisores (Barchas y cols., 1978; Stimmel, 1983).

A continuación se describen algunos de los más importantes neurorreguladores.

Tabla 3: Principales neurorreguladores implicados en la respuesta del dolor.

Neurorreguladores			
Acetilcolina	Glicina	Norepinefrina	Factor de crecimiento neural
Angiotensina	Oxido nítrico	Serotonina	Neurotensina
Dopamina	Encefalina	Colocistocinina	Prostaglandinas
Bradicinina	Dinorfina	β -endorfinas	Somatostatina
Dopamina	Histamina	Glutamato	Sustancia P
Epinefrina	Vasopresina	GABA	AGMATINA

Modificado de Stimmel (1983).

2.1.4.1 Protones

Son producidos en condiciones tisulares ácidas como la isquemia, hipoxia e inflamación, producen dolor, espasmo muscular y en estados de enfermedad hiperalgesia debido a que aumentan la permeabilidad de la membrana. El proceso



ocurre principalmente en nociceptores polimodales (Steen y cols., 1992; Dray, 1995).

2.1.4.2 Acetilcolina

Es el neurotransmisor más abundante en el cuerpo, se ha identificado en diversas regiones del SNC, principalmente en el hipocampo, núcleo caudado y núcleo supraóptico (Stimmel, 1983). Estudios recientes establecen que la acetilcolina interactúa con opioides que estimulan su liberación a la médula espinal produciendo antinocicepción tanto en animales como en humanos (Chen y Pan, 2001). Así también, se ha comprobado que la administración de agonistas para receptores colinérgicos neuronales e inhibidores de la colinesterasa producen analgesia (Naguib y Yaksh, 1997).

2.1.4.3 Dopamina

Existen neuronas dopaminérgicas en la sustancia negra, el tegumento ventral de el cerebro medio, el núcleo interpeduncular del mesencéfalo y el hipotálamo. Los mecanismos dopaminérgicos juegan un papel muy importante en la modulación de dolor pues la dopamina administrada de manera intracerebral aumenta el efecto analgésico de la morfina (Stimmel, 1983).

2.1.4.4 Histamina

Es sintetizada a partir de histidina por la histidina descarboxilasa y puede encontrarse libre o almacenada en vesículas sinápticas (Stimmel, 1983). La



histamina es liberada en el proceso de desgranulación de mastocitos por mediadores de la inflamación (Dray, 1995), la cual activa receptores H_1 (Mobarakeh y cols., 2000) que producen un aumento en la entrada de calcio a la célula, lo que libera neuropéptidos y cininas que ocasionan la amplificación de la señal dolorosa (Besson y Perl, 1987).

2.1.4.5 Serotonina

La 5-hidroxitriptamina (5-HT) es liberada por neuronas serotoninérgicas que se proyectan del PAG al núcleo rafé magno y de ahí a las láminas I, II, IV y V del asta dorsal (Roberts, 1984; Ruda y cols., 1986). Actualmente se han relacionado tres subtipos de receptores de serotonina con la multiplicidad de efectos observados: 5-HT₁, 5-HT₂ y 5-HT₃. Se ha comprobado que los receptores 5-HT_{1A} facilitan la respuesta nociceptiva en tanto que los receptores 5-HT_{1B/D} la inhiben (Alhaider y Wilcox, 1993).

Por su parte, los receptores 5-HT₂ acoplados a proteínas G sensibilizan a las neuronas mediante la activación de la fosfolipasa C que produce IP₃ y DAG, lo que libera calcio, aumentando su concentración intracelular, que a su vez provocan un aumento en la descarga neuronal (Fozard, 1984). Los receptores 5-HT₃ se encuentran acoplados a canales iónicos que aumentan la permeabilidad de sodio y disminuyen la de potasio produciendo hiperalgesia (Dray, 1995)



2.1.4.6 Sustancia P

La sustancia P es un polipéptido perteneciente a la familia de las neurocininas que agrupa a la neurocinina A y al péptido relacionado al gen de la calcitonina. Posee tres tipos de receptores: NK₁, NK₂ y NK₃ siendo el principal receptor NK₁, localizado en la duramadre, médula espinal y aferencias sensoriales (Hall y Geppetti, 1995; Basbaum y Fields, 1999).

La sustancia P es un neurotransmisor aferente primario liberado por la activación de fibras C, está involucrado en reacciones inflamatorias debidas a un daño tisular químico o térmico (Gamse, 1984) que produce vasodilatación, aumento en la permeabilidad plasmática, liberación de histamina por mastocitos e incremento de la actividad fagocitaria de neutrófilos y macrófagos. Todos estos efectos provocan que la sustancia P tenga un efecto hiperalérgico (Dray, 1995).

2.1.4.7 Ácido γ -aminobutírico (GABA)

El GABA es el neurotransmisor inhibitor más abundante en el SNC, se sintetiza a partir del glutamato por la glutamato descarboxilasa (GAD) y se ha relacionado con una gran variedad de funciones fisiológicas en el cerebro y tejidos no neuronales (Watanabe y cols., 2002).

Se han descubierto hasta la fecha tres receptores para GABA: Dos receptores ionotrópicos ligados a canales de cloro (GABA_A y GABA_C) (Stephenson, 1995; Watanabe y cols., 2002) y un receptor metabotrópico (GABA_B) acoplado a través de proteínas G a canales de K⁺ y Ca²⁺ (Bowerly, 1993). De los receptores GABA, los GABA_A y GABA_B han sido los más estudiados y se



han relacionado con una acción analgésica a nivel espinal y supraespinal (Sawynok, 1987).

2.1.4.8 Bradicinina

Junto con la calicreína, la bradicinina pertenece al grupo de las cininas. Éstas son sintetizadas a partir de cininógenos de alto y bajo peso molecular por la acción de calicreínasas en plasma y tejido periférico. Sus efectos principales se atribuyen a dos receptores: B₁ y B₂, aunque existe una mayor afinidad por los receptores B₂. Ambos receptores se encuentran acoplados a proteínas G.

La bradicinina se genera rápidamente estimulando receptores B₂ que a su vez activan a la PLA₂ y PLC. La PLA₂ incrementa la liberación de ácido araquidónico que es transformado en prostaglandinas, en tanto, se incrementa la concentración de calcio intracelular por la acción de la PLC, prolongando la sensación de dolor.

Además del incremento de prostaglandinas, la bradicinina se ve involucrada en la liberación de otros mediadores del dolor como neurocininas, neuropéptidos, citocinas, CGRP, óxido nítrico, histamina y serotonina. Estos mediadores participan en procesos como la vasodilatación, incremento de la permeabilidad vascular, extravasación plasmática, migración celular e hiperalgesia (Calixto y cols., 2000).



2.1.4.9 Factor de crecimiento neural

El factor de crecimiento neural es sintetizado en respuesta al proceso de inflamación o por daño tisular, se une al receptor TrK A, el cual está expresado principalmente en nociceptores viscerales y estimula la liberación y regulación de diversos péptidos como la sustancia P y el CGRP (McMahon y cols., 1994). El NGF afecta la sobrevivencia de las células manifestándose como una disfunción neuronal degenerativa con sensaciones anormales (Anand, 1995).

2.1.4.10 Encefalinas y β -endorfinas

Las encefalinas, β -endorfinas y dinorfinas son consideradas opioides endógenos. Los opioides endógenos son derivados de tres precursores que contienen alrededor de 260 aminoácidos. La proopiomelanocortina es el precursor de las β -endorfinas, la proencefalina B de la dinorfina, mientras que la proencefalina A genera la mayor parte de las encefalinas (Björkman, 1995).

Se han confirmado cinco tipos de receptores opioides: mu (μ), delta (δ), sigma (σ), kappa (κ) y épsilon (ϵ) en las diferentes regiones del SNC (Terenius, 1985) de los cuales μ , κ y δ son los de mayor importancia. Los receptores μ se asocian con la analgesia espinal y supraespinal, así como con la depresión respiratoria, euforia, relajación muscular, sedación y problemas de adicción.

Los receptores κ producen analgesia espinal y disforia. Finalmente, los receptores δ se encuentran involucrados en el desarrollo a la tolerancia, neuraxis, náusea, vómito y depresión respiratoria (Björkman, 1995).



Las β -endorfinas son particularmente abundantes en el hipotálamo, el *locus coeruleus*, tálamo y glándula pituitaria (Björkman, 1995). Por su parte, las encefalinas se distribuyen en las láminas I, II, V, VII y X del asta dorsal, donde contribuyen de manera importante a la modulación del dolor, también se encuentran en la PAG, el *globus pallidus*, núcleo raquídeo y el núcleo reticular paraventricular (Glazer y cols., 1981; Basbaum y Fields, 1984).

Los opioides endógenos producen analgesia al unirse a sus receptores acoplados a proteínas G (Reisini y Pasternak, 1996). La unión a los receptores opioides inhibe la actividad de la adenilato ciclasa, lo que reduce los niveles de AMPc (Andrade y Aghajanian, 1985). Este mecanismo provoca que se inhiban canales de Ca^{2+} y se activen canales de K^+ provocando una hiperpolarización que impide la liberación de neurotransmisores y por ende la transmisión del dolor (Duggan y North, 1983).

2.1.4.11 Prostaglandinas

Junto con los leucotrienos y tromboxanos, las prostaglandinas pertenecen al grupo de los prostanoides (Abbadie y Besson, 1993). Las prostaglandinas son moléculas lipofílicas que contienen en su estructura 20 átomos de carbono y un anillo cíclico (Mycek y cols., 2000), son moléculas que se sintetizan a partir de fosfolípidos de membrana por activación de la lipólisis mediante la acción de la fosfolipasa A_2 y fosfolipasa C (Figura 6), que dan como resultado la liberación de ácido araquidónico, el más abundante precursor de prostaglandinas en mamíferos (Campbell y Halushka, 1996). El ácido araquidónico es entonces transformado en



PGG₂ y después en PGH₂ por la acción de la enzima ciclooxigenasa (COX) en la médula espinal y los nervios aferentes primarios. Aunque Willoughby y cols. (2000) propone tres isoformas para la COX, sólo se han estudiado ampliamente dos de ellas: COX₁ y COX₂ (Vanegas y Schaible, 2001).

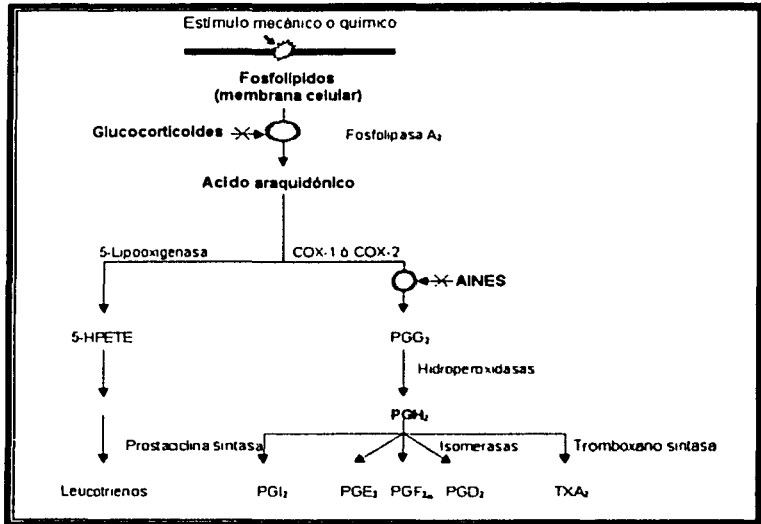


Figura 6. Vía catabólica del ácido araquidónico (Modificado de Björkman, 1995).

La liberación de las prostaglandinas PGD₂, PGE₂, PGF_{2α} y PGI₂ ocurre en la médula espinal y la raíz ganglionar, las cuales se unen a sus receptores en neuronas de la médula espinal (DP y EP₂) y neuronas aferentes primarias (EP₁, EP₃, EP₄ e IP). Los receptores de prostaglandinas se encuentran acoplados a proteínas G que al ser activados inhiben canales de potasio y activan canales de sodio vía AMPc y PKA. La despolarización producida incrementa la velocidad de



disparo e induce la liberación de aminoácidos excitatorios (AAE), sustancia P, CGRP y óxido nítrico (ON) que a su vez incrementan la liberación de prostaglandinas produciendo hiperalgesia y alodinia (Vanegas y Schaible, 2001).

Las prostaglandinas por si solas no causan dolor, sin embargo, su función consiste en sensibilizar los nociceptores mediante la liberación de diversos mediadores (Ferreira, 1972).

2.1.4.12 Noradrenalina

La noradrenalina se sintetiza a partir de dopamina por la dopamina β -hidroxilasa, se almacena en vesículas y se libera por el influjo de calcio en la neurona (Lefkowitz y cols., 1996) a través de toda la vía bulboespinal que va desde los núcleos pontobulbares, núcleo *coeruleus* y *subcoeruleus* a las láminas I, II, IV, V, VI y X del asta dorsal (Ruda y cols., 1986).

La noradrenalina se une a receptores α y β , de los cuales se ha encontrado que los receptores adrenérgicos α (Kuraishi y cols., 1985), principalmente α_2 (Mansikka y Pertovaara 1995; Galeotti y cols., 1999) inhiben la nocicepción impidiendo la liberación de sustancia P (Kuraishi y cols., 1985).

2.1.4.13 Glutamato

Existen diversos aminoácidos que han sido clasificados como AAE, entre los que encontramos al glutamato, el aspartato y la homocisteína debido a que se relacionan con una neurotransmisión excitatoria rápida entre nociceptores y neuronas de la médula espinal (Wilcox, 1991).



Los AAE se encuentran en fibras aferentes primarias de diámetro grande ($A\beta$) y diámetro pequeño ($A\delta$) y son liberados por estímulos tanto nociceptivos como no nociceptivos (Kangrgra y Rnadic, 1991).

Las acciones de los AAE están mediadas por distintos receptores (Watkins y cols., 1990), clasificados en receptores NMDA (N-metil-D-aspartato), AMPA (ácido α -amino-metil-isoxazolpropiónico o quisqualato), kainato y metabotrópicos que se localizan a nivel post-sináptico en el asta dorsal (Wilcox, 1991). El glutamato posee mayor afinidad por receptores NMDA aunque actúa sobre todos los tipos de receptores mencionados (Haley y cols., 1990). A este aminoácido se le ha involucrado en la plasticidad neuronal (Collingridge y Singer, 1990) y la tolerancia a opioides (Kolesnikov y Pasternak, 1999).

Los receptores NMDA (NR_1 , NR_{2A-D}) se encuentran ligados a canales de Ca^{2+} y están relacionados con la estimulación nociceptiva mediada por fibras $A\delta$ y C mientras que los receptores AMPA (GluR 1-4) y kainato (GluR 5-7) lo están a canales de K^+ y Na^+ principalmente y se activan por estímulos de bajo umbral mediante fibras $A\beta$ (MacDermott y cols., 1986; Aanonsen y Wilcox, 1987).

La unión del glutamato a receptores NMDA remueve el Mg^{2+} que bloquea el canal iónico en su estado de reposo y permite que se active la entrada de calcio que incrementa su concentración intracelular activando sistemas de señalización como el de Calcio-calmodulina cinasa (CaM-Kinase II) que promueven la liberación de neurotransmisores y la amplificación de las señales dolorosas (Dougherty y Willis, 1991).



Por su parte, algunos receptores de glutamato metabotrópicos (mGluR₁, mGluR₃ y mGluR₅) están involucradas en la activación de fosfolipasa C vía proteínass G. Las proteínas G están compuestas de tres subunidades α , β y γ . Al unirse el glutamato al receptor, la subunidad α toma una molécula de GTP disociándose de la subunidad $\beta\gamma$, la cual sirve como un mensajero intracelular. La activación de la proteína G causa la producción de IP₃ y DAG (Berridge, 1987). El IP₃ abre canales de Ca²⁺ del retículo endoplásmico que activa la vía CaM-Kinase II y promueve la liberación de neurotransmisores. El DAG en tanto, activa la PKC que estimula otras vías de señalización, las cuales incrementan la conductancia de canales de sodio vía receptores NMDA (Kelso y cols., 1992).

Otros receptores metabotrópicos (mGluR₂, mGluR₄, mGluR₆, mGluR₇ y mGluR₈) elevan los niveles de AMPc mediante la activación de la adenilato ciclasa. El AMPc activa a la PKA que se encarga de fosforilar proteínas, canales y enzimas. Al fosforilarse los canales de potasio se ven inhibidos, en tanto, los canales de calcio ven aumentada su actividad o tiempo de apertura (Chen y cols., 1988).

2.1.4.14 Óxido Nítrico

El óxido nítrico (ON) recientemente ha recibido una extraordinaria atención debido a que participa en diversos eventos neuronales como son el control del apetito, la memoria, fiebre, neurotoxicidad, neuroplasticidad y nocicepción, además de modular secreciones endócrinas de hormonas como la hormona del crecimiento, insulina, oxitocina, vasopresina, entre otras (Brunetti, 1994).



Relacionado al principio con el factor relajante derivado del endotelio (Marletta y cols., 1998), el óxido nítrico es un radical libre soluble tanto en medios lipídicos como acuosos, lo que le permite difundir rápidamente desde su lugar de síntesis hasta otros sitios (Schuman y Madison, 1994), por lo cual se ha sugerido que juega un papel en la transmisión tanto a nivel central (SNC) como a nivel periférico (Sousa y Prado, 2001).

El óxido nítrico es sintetizado durante la conversión enzimática de L-arginina a L-citrulina por la óxido nítrico sintasa neuronal (nNOS), una enzima localizada en neuronas del SNC y que requiere calcio para activarse, o por la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) localizada en la glia y que requiere activación por endotoxinas y citocinas (Meller y Gebhart, 1993).

En el SNC el ON es sintetizado enzimáticamente en estructuras post-sinápticas en respuesta a la activación de receptores NMDA (Garthwaite, 1991), los cuales abren canales de calcio, incrementando la concentración intracelular de éste, el cual se une a la calmodulina formando un complejo necesario para que la NOS lleve a cabo la síntesis de ON, que activa la guanilato ciclasa (GC) que incrementa los niveles de GMPc (Moncada y cols., 1989).

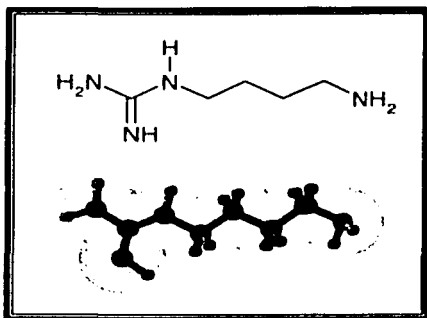
Actualmente existe controversia sobre la función del ON en la transmisión dolorosa, la mayoría de los estudios establecen que el ON promueve hiperalgesia a nivel de la médula espinal (Malmberg y Yaksh, 1993; Inoue y cols., 1997), mientras que a nivel supraespinal se ha observado tanto el efecto nociceptivo (Przewlocka y cols., 1994) como el no-nociceptivo (Xu y cols., 1995). Por su parte, a nivel local la administración de diversos donadores de ON produce analgesia en



diversos estudios (Ferreira y cols.,1992; Kawabata y cols., 1992), mientras que en otros produce nocicepción (Aley y cols., 1998).

2.1.4.15 Agmatina

2.1.4.15.1 Estructura, nombre químico y propiedades físicas



4-(Aminobutil)guanidina;
1-amino-4-guanidobutano

PM=130.19 g
C 46.13%, H 10.84%, N 43.03%
p.f.=231°C como sulfato de agmatina
Usos: Marcador de células cancerosas

Figura 7. Estructura química de la agmatina.
(Modificado de The Merck Index, 2001).

2.1.4.15.2 Biosíntesis

La agmatina (Figura 7) es un neurotransmisor recientemente descubierto que se sintetiza a partir de L-arginina (Figura 8) por descarboxilación mediante la enzima arginina descarboxilasa (Cox y Boeker, 1987). La arginina descarboxilasa (ADC) está expresada en un amplio rango de invertebrados, en bacterias, plantas (Tabor y Tabor, 1984) y recientemente se ha descubierto su presencia en mamíferos (Li y cols., 1994).



La ADC presente en mamíferos posee un pH óptimo de 8.3 y una temperatura óptima de 25°C y se encuentra enriqueciendo la membrana mitocondrial. Esta enzima utiliza como sustratos arginina ($K_m=0.75$) y ornitina ($K_m=0.25$) y es inhibida por Ca^{2+} , Co^{2+} y poliaminas (Regunathan y Reis, 2000). La agmatina se sintetiza en neuronas o astrocitos por ADC y su reacción depende en gran manera de la concentración de L-arginina presente. La arginina es transportada al interior de las neuronas por acarreadores específicos (Reis y Regunathan, 2000).

2.1.4.15.3 Distribución

La agmatina ha sido identificada mediante HPLC en el cerebro, así como en diversos órganos, entre los que destacan el estómago, bazo, intestino delgado, músculo esquelético (Raasch y cols., 1995) y riñón (Morrissey y cols., 1995). En el sistema nervioso se encuentra ampliamente distribuida en el hipotálamo, cerebro medio rostral y paraventricular, núcleo dorsal, PAG, *locus coeruleus* y núcleo ralé dorsal (Otake y cols., 1998). Su distribución se concentra en sitios relacionados con el control endocrino y visceral, así como con el procesamiento de emociones, percepción del dolor y razonamiento (Reis y Regunathan, 2000).

A nivel subcelular la agmatina se localiza en la perikaria, en dendritas, axones y axones terminales. En la perikaria la agmatina forma densos racimos asociados con la mitocondria y vesículas tubulares, mientras que en las dendritas, axones y axones terminales es almacenada por vesículas sinápticas (Reis y cols., 1998).



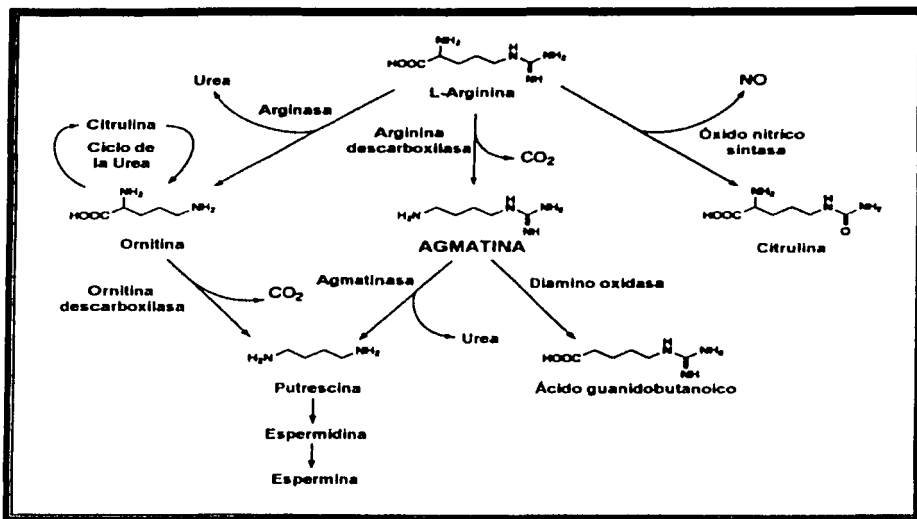


Figura 8. Vía metabólica de la agmatina y compuestos relacionados. La agmatina es sintetizada a partir de L-arginina por la acción de la arginina descarboxilasa y puede ser metabolizada a espermina durante la biosíntesis de poliaminas o a ácido guanidobutanóico (Modificado de Reis y Regunathan, 2000).

2.1.4.15.4 Liberación

Como otros neurotransmisores, la agmatina es liberada de los sinaptosomas por despolarización de forma dependiente de Ca²⁺ (Reis y Regunathan, 1998).

2.1.4.15.5 Inactivación

La agmatina es inactivada en el cerebro de los mamíferos por recaptura en los sinaptosomas (Sastre y cols., 1997) o por degradación enzimática (Sastre y cols., 1998). La recaptura está íntimamente relacionada a la activación de canales



de Ca^{2+} vía receptores nicotínicos (Kuzirian y cols, 1986), receptores de imidazol (Sastre y cols., 1997) y posiblemente receptores NMDA (Yang y Reis, 1999).

Así también, la agmatina puede ser hidrolizada por la enzima agmatinasa, recientemente descubierta en mamíferos. Esta enzima posee un pH óptimo de 8-8.5 y $K_m=5.3$ mM. Se encuentra enriqueciendo la membrana mitocondrial de neuronas en el hipotálamo y la corteza cerebral y es inhibida por Mn^{2+} (Sastre y cols., 1996).

2.1.4.15.6 Acciones farmacológicas

La agmatina como otras drogas de imidazolina se une con alta afinidad a receptores adrenérgicos α_2 (Piletz y cols., 1995) y a ambas subclases (I_1 e I_2) de receptores de imidazolina (Reis y cols., 1995). Puede modular la función de receptores NMDA bloqueando selectivamente sus canales (Yang y Reis, 1999), antagonizando de esta manera las acciones excitatorias de los principales neurotransmisores post-sinápticos (Figura 9).

Se ha sugerido que la agmatina puede bloquear otros canales catiónicos acoplados a receptores nicotínicos (Loring, 1990) y de serotonina, principalmente 5-HT₃ (Reis, 1998).

Existen reportes de que la agmatina modula la producción de ON inhibiendo la actividad de todas las isoformas de la NOS inducibles por inhibición catalítica (Galea y cols., 1996) pero no de la NOS constitutiva (Auguet y cols., 1995).

La agmatina en la periferia modula el metabolismo de la insulina, libera adrenalina y noradrenalina. En el riñón funciona como natriurético ya que



incrementa la excreción de Na^+ , además de bloquear la proliferación de células del músculo liso.

En el SNC la agmatina libera la hormona luteinizante del hipotálamo (Reis y Regunathan, 2000) y antagoniza algunos estados de hiperalgesia (Horváth y cols., 1999), dolor persistente (Önal y Soykan, 2001), inflamación, neuropatía y daño a la médula espinal (Fairbanks y cols. 2000). La agmatina también potencia el efecto analgésico de la morfina y previene cambios en la función neuronal, incluyendo la tolerancia a opioides (Trujillo y Akil, 1991).

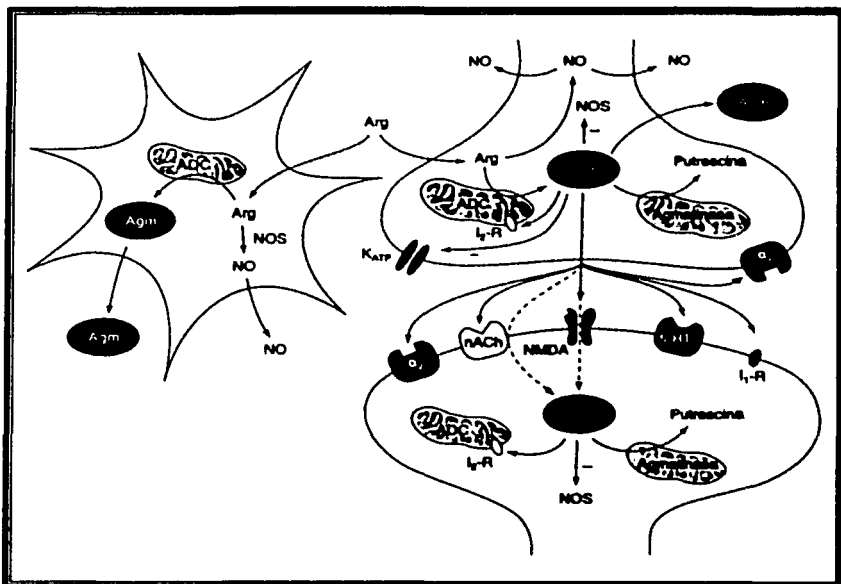


Figura 9. Esquema de los mecanismos de acción de la agmatina.



2.2 ANALGÉSICOS

Los analgésicos son fármacos que logran disminuir o abolir el dolor sin producir pérdida de la conciencia. Los analgésicos se emplean según el origen, gravedad e intensidad del dolor (Lim, 1967).

Katzung (2001) clasifica los analgésicos más usados en los siguientes grupos:

2.2.1 Analgésicos opioides

Aunque las propiedades de la planta del opio (*papaver somniferum*) eran conocidas hace cientos de años por los egipcios, griegos y romanos. No fue sino hasta 1806 que Sertürner informó de una sustancia pura contenida en el opio a la que nombró morfina, en referencia a Morfeo el dios griego del sueño.

Los analgésicos opioides pertenecen a varios subgrupos químicos, que incluyen fenantrenos (morfina, codeína), fenilheptilaminas (metadona), fenilpiperidinas (butorfanol) y benzomorfanos (pentazocina).

La mayoría de estos analgésicos se absorben en las superficies mucosas de la nariz o boca, intramuscular y subcutáneamente. Su absorción en tracto gastrointestinal es rápida aunque algunos opioides como la morfina y la oximorfona presentan efecto del primer paso.

Se unen a proteínas plasmáticas con afinidad variable y se distribuyen con una elevada concentración en cerebro, hígado, riñón, bazo y pulmones. Son biotransformados por metabolismo hepático antes de ser excretados por riñón.



Se unen a receptores μ , κ , y δ impidiendo la liberación de neurotransmisores y por ende, la transmisión del dolor (Duggan, 1983). Se usan clínicamente para aliviar el dolor, la tos, diarrea, edema pulmonar y como anestésicos.

Entre sus principales desventajas se encuentran la tolerancia y la dependencia tanto física como psicológica (Way y cols., 2001).

2.2.2 Analgésicos anti-inflamatorios no esteroideos (AAINE's)

Los salicilatos son medicamentos tradicionalmente usados en el tratamiento del dolor, inflamación y fiebre. Su principal representante es el ácido acetilsalicílico, obtenido por Hoffman. Los AAINE's son un grupo integrado por diversas clases de moléculas. Son ácidos orgánicos que se absorben adecuadamente y se unen ampliamente a proteínas ($\geq 98\%$), principalmente a albúmina. Son biotransformados por metabolismo hepático mediante la vía CYP3A o CYP2C, son eliminados principalmente por el riñón, aunque también se excretan por la bilis.

Todos los AAINE's inhiben a la COX, enzima que convierte el ácido araquidónico a precursores endoperóxidos de las prostaglandinas PGG y PGH. Como consecuencia, la síntesis de prostaglandinas y tromboxanos disminuye. La diferencia entre la aspirina y los demás AAINE's radica en el hecho de que la aspirina acetila de manera irreversible a la COX, en tanto, la inhibición producida por los AAINE's más recientes lo hace de forma reversible.

Durante la terapia con estas drogas, la inflamación se reduce debido a la disminución en la liberación de mediadores por granulocitos, basófilos y células



cebadas. Así también los AAINE's disminuyen la sensibilidad de los vasos a bradiginina e histamina, revierten la vasodilatación y afectan la liberación de linfocitos T.

Son empleados en la clínica como analgésicos, anti-inflamatorios, antipiréticos e inhibidores de la agregación plaquetaria. Sus principales desventajas radican en su elevada toxicidad sobre el estómago, riñón e hígado.

2.2.3 Analgésicos antirreumáticos que modifican la enfermedad (DMARD's)

Este es un grupo heterogéneo que ha demostrado tener actividad antirreumática y en diversas enfermedades autoinmunes. Los miembros principales del grupo son los compuestos de oro, antipalúdicos, agentes alquilantes, fármacos anti-TNF- α , penicilamina, sulfasalazina, leflunomida, entre otros.

Los mecanismos de acción mediante el cual ejercen su efecto es variado. Los compuestos de oro alteran la acción de macrófagos, inhiben la actividad enzimática lisosómica, inhiben la liberación de histamina, prostaglandinas y leucotrienos, inactivan el primer componente del complemento e inhiben la actividad fagocitaria. Los agentes alquilantes actúan rompiendo el DNA; mientras que los antimaláricos suprimen la acción de los linfocitos T, inhiben la síntesis de DNA, RNA, capturan radicales libres y disminuyen la quimiotaxis leucocitaria.



La mayoría de estos fármacos son metabolizados en hígado y excretados por orina y bilis. Todos los agentes de este grupo causan intoxicación grave o mortal, siendo los efectos tóxicos principales: trastornos gastrointestinales, nefrotoxicidad, hepatotoxicidad, náusea, vómito y anemia.

2.2.4 Analgésicos no anti-inflamatorios no opioides

El acetaminofén es el único miembro de este grupo. Se absorción está relacionada con el vaciamiento gástrico y su máxima concentración plasmática se alcanza de 30 a 60 minutos después de su administración por vía oral. Se une de forma débil a la COX e inhibe la síntesis de prostaglandinas.

Tiene poca unión a proteínas, se inactiva por proteínas microsomales hepáticas como sulfato y glucorónido de acetaminofén. Su vida media dura de 2-3 horas y no se ve afectada por daño renal.

Se utiliza como analgésico y antipirético pero no posee las propiedades anti-inflamatorias de los AAINE's. A bajas dosis sus efectos son mínimos, pero a dosis elevadas puede producir hepatotoxicidad, necrosis renal y centrilobular.

2.2.5 Analgésicos antigotosos

La gota se relaciona con un incremento en las reservas corporales de ácido úrico. Los ataques agudos se manifiestan como inflamación en las articulaciones por precipitación de ácido úrico. El tratamiento se dirige a reducir la inflamación inhibiendo la migración de leucocitos, la producción de leucotrieno B₄ y la fagocitosis (colchicina), acelerando la excreción renal de ácido úrico (probenecid o



sulfipirazona) y disminuyendo la conversión de purinas a ácido úrico por inhibición de la enzima xantina oxidasa (alopurinol).

El principal uso de estos analgésicos se da en el tratamiento de la gota, sin embargo, el alopurinol también es empleado en leishmaniasis. Entre sus principales efectos tóxicos encontramos daño profundo al hígado y riñón (colchicina), trastornos gastrointestinales (uricosúricos), neuritis y vasculitis periférica (alopurinol) (Furst y Munster, 2001).

2.3 MODELOS DE NOCICEPCIÓN EN ANIMALES

El estudio del dolor en animales presenta problemas éticos, filosóficos y técnicos. Desde un punto de vista general, los investigadores tienen que seguir las recomendaciones dictadas por la IASP (Zimmermann, 1983; Roberts, 1989) en las cuales se establece que el animal no debe ser visto como un objeto, sino como un ser vivo con sensaciones. También se recomienda minimizar o eliminar de los protocolos el dolor producido a los animales, la evaluación del beneficio potencial que traerá la investigación y en la medida de lo posible que el estímulo nocivo que se va a aplicar se lleve en el menor número de animales y que no sea invasivo.

Un modelo ideal debe ser específico, sensible, preciso, repetible y reproducible. Cabe señalar que los diferentes modelos de dolor empleados en la investigación presentan ventajas y desventajas, con la conclusión de que ningún modelo empleado es ideal (Le Bars y cols, 2001).

En 1957 Beecher llevó a cabo una revisión de todos los modelos existentes hasta ese entonces, describiendo 60 modelos distintos. Al transcurrir del tiempo



se fueron desarrollando nuevos modelos, pero entre los más utilizados encontramos los siguientes:

2.3.1 Modelos de dolor con estímulos de corta duración (Dolor fásico)

Estas pruebas involucran un corto período de estimulación, son empleadas para producir principalmente dolor somático, se estimula una mínima área superficial con excepción de la prueba "hot plate" (plancha caliente) y "electrified grid" (reja electrificada) y pueden clasificarse de acuerdo a la naturaleza del estímulo en mecánicos, térmicos o eléctricos (Le Bars y cols., 2001).

2.3.1.1 Pruebas basadas en un estímulo térmico

El calor es una vía más selectiva para estimular nociceptores cutáneos, pero tiene su principal desventaja en la velocidad en que se produce el estímulo debido a que sucede de forma lenta ($<10^{\circ}\text{C/s}$), lo que resulta en una activación asincrónica de las fibras periféricas y centrales. Estas pruebas no involucran estimulación a vísceras o músculo esquelético (Le Bars y cols., 2001).

2.3.1.1.1 Prueba "Tail-Flick"

Esta prueba tiene dos variantes. Una consiste en aplicar calor radiante mediante un bulbo eléctrico sobre una pequeña superficie de la cola del animal (D'Amour y Smith, 1941) y la otra involucra la inmersión de la cola en agua caliente a una determinada temperatura (Ben-Bassat y cols., 1959). En ambos casos se cuantifica el tiempo de reacción del animal.



2.3.1.1.2 Prueba "Paw Withdrawal"

El principio de esta prueba es comparable a la prueba Tail-Flick, con la diferencia de que esta prueba no involucra el órgano de termorregulación en ratas y ratones. La prueba consiste en aplicar calor radiante a la pata del animal que se encuentra inflamada debido a una inyección subcutánea de carragenina (Hargreaves y cols., 1988).

2.3.1.1.3 "Prueba Hot Plate"

Originalmente descrita por Woolfe y Mc Donald (1944), esta prueba consiste en introducir a la rata en un espacio cilíndrico con un piso metálico que es calentado por un líquido hirviendo. Se cuantifica el tiempo transcurrido desde que el animal es puesto en la plancha caliente, hasta que responde al estímulo.

2.3.1.1.4 Prueba "Cold Plate"

Esta prueba es usada principalmente en modelos de dolor neuropático (Jazmín y cols., 1998).

2.3.1.2 Pruebas basadas en un estímulo mecánico

Este tipo de estímulos poseen la ventaja de poderse graduar de acuerdo a la intensidad o duración del estímulo, pero tienen la desventaja de no ser específicos. Pues hay estimulación de mecanorreceptores de bajo umbral, como de nociceptores (Le Bars y cols., 2001).



Se basan en la aplicación de una presión constante ya sea en la cola o en la pata posterior del animal (Bianchi y Francheschini, 1954). Tan pronto como el animal presenta reacciones de lucha o emite sonidos de queja se interrumpe el estímulo

2.3.1.3 Pruebas basadas en un estímulo eléctrico

Los estímulos eléctricos poseen la ventaja de ser cuantificables, reproducibles, no invasivos y producir señales aferentes sincronizadas, sin embargo, tienen la desventaja de ser un estímulo no selectivo debido a que estimulan también fibras no nociceptivas (Le Bars, 2001).

2.3.1.3.1 Pruebas que utilizan largas descargas eléctricas

Esta prueba presenta dos variantes: La primera consiste en colocar electrodos en la cola de la rata o ratón y dar descargas durante algunos milisegundos. En esta prueba se evalúa el movimiento reflejo de la cola y si la rata chillaba durante o después del estímulo (Paalzow, 1969). La segunda prueba consiste en colocar a la rata en una jaula metálica, a la cual se le dan descargas eléctricas (Evans, 1961), se mide el dolor de acuerdo a diversos comportamientos como son: el intentar escapar de la jaula, el chillido y las contorsiones.



2.3.1.3.2 Pruebas que utilizan choques eléctricos o descargas eléctricas cortas

En estas pruebas encontramos una estimulación eléctrica de corta duración (10-20 ms) mediante electrodos en sitios como la cola (Charpentier, 1961), la pulpa dental (Holland y Robinson, 1983; Cadden, 1985) y los miembros (McClane y Martín, 1967). Estas pruebas analizan el sonido emitido por la rata, así como sus diferentes conductas y reflejos del miembro estimulado.

2.3.2 Modelos de dolor con estímulos de larga duración (Dolor tónico)

Básicamente estas pruebas involucran la administración de sustancias algogénicas representando una forma lenta o muy lenta de estimulación. Este tipo de estímulo es diferente a los otros tipos de estímulos debido a que son progresivos, de larga duración y ofrecen la ventaja de medir el comportamiento del animal a través del tiempo (Le Bars y cols., 2001).

2.3.2.1 Estimulación a órganos

Estas pruebas sirven para estudiar el dolor visceral, involucran la administración de sustancias algogénicas directamente a diferentes órganos, como el colon (Miampamba y cols., 1994) y el útero (Wesselmann y cols., 1998), entre otros.

La prueba más conocida es la de distensión colorectal en rata que evalúa mediante un electromiógrafo el reflejo de los músculos abdominales (Ness y Gebhart, 1988).



2.3.2.2 Inyección intraperitoneal o "Writhing Test"

La administración intraperitoneal de agentes que irritan la membrana serosa provocan un comportamiento típico que se caracteriza por contracción abdominal y reducción de la coordinación y actividad motora. Esta prueba cuantifica generalmente el número de contracciones por unidad de tiempo (Siegmund, 1957). Entre las sustancias alrogénicas frecuentemente empleadas en este modelo encontramos la benzoquinona, ácido acético, ácido etacrínico y la p-benzoquinona (Jaques, 1977).

2.3.2.3 Inyección intradermal

Esta prueba utiliza sustancias como la salina hipertónica (Lewis y Kellgren, 1939), EDTA (Teiger, 1976), adyuvante de Freund (Iadarola y cols., 1988) y capsaicina (Sakurada y cols., 1992) con gran frecuencia, sin embargo, es la formalina la sustancia más utilizada (Dubuisson y Dennis, 1977).

2.3.2.3.1 Prueba de la Formalina

Esta prueba se lleva a cabo principalmente en roedores, aunque se han hecho experimentos en gatos, conejos, cobayos, primates, cocodrilos y aves domésticas. La prueba consiste en la administración subcutánea de formalina en un rango de concentraciones que van del 1 al 5%, en un volumen de 20-25 μL en ratones y 30-100 μL en ratas. La inyección se da generalmente en la superficie dorsal de la pata posterior y los animales son generalmente sacrificados poco después de terminada la prueba. La prueba de formalina describe diferentes



comportamientos, entre los que se encuentran el morder, lamer y sacudir la pata inyectada, siendo este último el parámetro más utilizado para cuantificar el grado de dolor (Dubuisson y Dennis, 1977).

Esta prueba se ve afectada por factores de estrés como son los sonidos, los olores, luz intensa, elevada presión atmosférica o intensa actividad humana en el cuarto durante el período en que se está llevando a cabo la prueba, por lo que se recomienda tener un cuarto exclusivo para la realización de esta prueba o establecer restricciones en cuanto al sonido y nivel de actividad durante la realización de la misma.

La prueba de formalina en roedores presenta dos fases. La primera fase inicia después de la inyección y dura entre 3 y 5 minutos y se debe a la estimulación directa de nociceptores, principalmente fibras C que liberan bradicinina y sustancia P.

La segunda fase inicia 15-20 minutos después de la inyección y dura entre 20 y 40 minutos. Se atribuye al proceso inflamatorio desencadenado por la histamina, serotonina, prostaglandinas y bradicinina. Es por esta segunda fase que la temperatura es un factor importante de controlar, pues a menor temperatura el proceso de inflamación se desarrolla más lentamente (Tjølsen y cols., 1992). Se propone una temperatura de 22-23°C (Rosland, 1991) para ratones y 25-27°C para ratas.



2.4 CANULACIÓN INTRATECAL

El método de canulación intratecal crónico fue introducido por Yaksh y Rudy en 1976. La técnica consiste en introducir un catéter de polietileno a través de una incisión en la membrana atlanto-occipital a diferentes niveles de la médula espinal.

El método posee la ventaja de poderse emplear en animales pequeños, además de que la administración no requiere de mucha experiencia, la sustancia a evaluar se administra de forma directa al nivel deseado de la médula espinal y la canulación no produce intolerancia por un período de 4 meses (Yaksh y Rudy, 1976).

2.5 ANTECEDENTES PARTICULARES

Estudios previos han descrito que la agmatina modula la producción de óxido nítrico inhibiendo todas las isoformas inducibles de la óxido nítrico sintasa (Auguet y cols., 1995). Así también, otros autores concluyen que la agmatina se une con alta afinidad a receptores NMDA (Reis y cols., 1995), α_2 -adrenérgicos (Piletz y cols., 1995) y a otros receptores acoplados a canales catiónicos (Reis, 1998; Loring, 1990).

Diversos artículos sugieren que la unión a receptores NMDA e inhibición de las iNOS le permiten a la agmatina jugar un papel muy importante en la regulación del dolor, ya que se ha encontrado que logra antagonizar algunos estados de hiperalgesia (Horváth y cols., 1999), dolor persistente (Önal y Soykan, 2001), inflamación, neuropatía y daño a la médula espinal (Fairbanks y cols., 2000). La



agmatina también presenta sinergismo analgésico al administrarse junto con morfina y previene cambios en la función neuronal, incluyendo la tolerancia a opioides (Trujillo y Akil, 1991). Por lo que se ha sugerido que la agmatina pudiera ser un candidato ideal para ser fármaco analgésico.

Hasta la fecha se ha estudiado el efecto analgésico producido por agmatina y su posible mecanismo de acción mediante administración intratecal (Horváth y cols., 1999; Fairbanks y cols., 2000), intraperitoneal (Önal y Soykan, 2001) y en cultivos celulares (Yang y Reis, 1999; Abe y cols.2000) pero no existe evidencia de la actividad analgésica de la agmatina después de una administración periférica local, por lo que uno de los propósitos del presente trabajo es evaluar el posible efecto analgésico que produce la agmatina a nivel local y compararlo con su efecto a nivel espinal.



3. OBJETIVOS**3.1 OBJETIVO PARTICULAR**

➤ Evaluar el posible efecto analgésico que produce la agmatina como pretratamiento y post-tratamiento a nivel periférico y espinal en un modelo de dolor inflamatorio en ratas.

3.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- Realizar una curva dosis-respuesta (CDR) con agmatina como pretratamiento a nivel periférico.
- Realizar una CDR con agmatina como post-tratamiento a nivel periférico.
- Realizar una CDR con agmatina como pretratamiento a nivel espinal.
- Realizar una CDR con agmatina como post-tratamiento a nivel espinal.
- Administrar agmatina contralateral a una dosis efectiva como pretratamiento y post-tratamiento local.



4. HIPÓTESIS**HIPÓTESIS NULA:**

➤ La agmatina no produce efecto analgésico como pre-tratamiento y post-tratamiento a nivel periférico y espinal en la prueba de la formalina.

HIPÓTESIS ALTERNATIVA:

➤ La agmatina produce efecto analgésico como pre-tratamiento y post-tratamiento a nivel periférico y espinal en la prueba de la formalina.



MATERIAL Y MÉTODOS**5.1 ANIMALES**

Se utilizaron ratas hembra Wistar de 9-11 semanas de edad con un peso corporal de 180-200 g provenientes del Bioterio del CINVESTAV-IPN (Sede Sur). Las ratas se mantuvieron con libre acceso a agua y alimento.

Todos los experimentos se realizaron de acuerdo a las guías sobre aspectos éticos para la investigación del dolor experimental en animales (Zimmermann, 1983). Adicionalmente, el estudio fue aprobado por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales (Departamento de Farmacobiología, CINVESTAV-IPN). Cada rata se utilizó solo una vez y se sacrificó en una cámara saturada con CO₂ al final del experimento.

5.2 FÁRMACOS

La agmatina se compró en SIGMA (St. Louis, USA). La ketamina fue comprada en Galen (México, D.F.) y la xilazina en Fort Dodge (Iowa, USA). Todos los compuestos fueron preparados con solución salina 0.9% como vehículo, adquirido en Abbott (México, D.F.).



5.3 METODOLOGÍA

5.3.1 Canulación intratecal

Para evaluar el efecto de la agmatina a nivel espinal fue necesario llevar a cabo el método de canulación intratecal crónico (Yaksh y Rudy, 1976). Las ratas fueron preparadas para cirugía con Ketamina-Xilazina intraperitoneal (65 y 14 mg respectivamente, en un volumen de 0.2 mL). Un catéter intratecal (PE-10) fue insertado a través de una pequeña abertura en la cisterna magna e introducido 8.5 cm en el espacio intratecal. Después de la cirugía las ratas se colocaron individualmente en cajas con libre acceso a agua y alimento permitiéndoles un período de recuperación de cinco días antes de usarse. Las ratas que presentaron deficiencias neurológicas post-operativas no fueron utilizadas.

5.3.2 Prueba de la Formalina

El efecto analgésico de la agmatina se evaluó con la prueba de la formalina (Dubuisson y Dennis 1977). Las ratas se colocaron en una cámara de observación de acrílico (Plexiglas) rodeada con espejos en la parte posterior por 30 minutos para permitirles adaptarse a su entorno.

Después de este período de tiempo se les administró de manera subcutánea 50 μ L de formalina diluida al 1% con solución salina 0.9% en el dorso de la pata posterior derecha utilizando una aguja del No. 30. Inmediato a la administración las ratas se colocaron nuevamente en los cilindros de acrílico y se cuantificó la conducta dolorosa como el número de sacudidas de la pata inyectada en



intervalos de 1 minuto cada 5 minutos por 60 minutos (Malmberg y Yaksh, 1993). Esta prueba se realizó entre 25 y 27°C.

5.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados se expresan como el promedio \pm el error estándar de la media para cada grupo experimental ($n \geq 6$). Se realizaron curvas del número de sacudidas contra el tiempo y se obtuvo el área bajo la curva (ABC) de la segunda fase que abarca de los 15 a los 60 minutos, por el método de trapezoides (Tallarida y Murray, 1981).

Los datos (ABC) fueron graficados en el programa Prism 3.0 y se les realizó un Análisis de Varianza seguido por la prueba de Tukey para comparar las diferencias entre los distintos tratamientos, mediante el programa SigmaStat 2.03. Una $p < 0.05$ se consideró significativa.

5.5 DISEÑO EXPERIMENTAL

En el presente estudio se administraron dosis crecientes de agmatina como pretratamiento (-5 min) o post-tratamiento (+10 min) por vía periférica local o espinal para evaluar el efecto analgésico que produce la agmatina, así como su efectividad en el modelo de dolor tónico producido por formalina.

Para determinar si el efecto analgésico producido por la agmatina administrada localmente era debido a un efecto local y no sistémico, se administró una dosis efectiva de agmatina (900 ng) en la pata izquierda (contralateral) y formalina 1% en la pata derecha (ipsilateral).



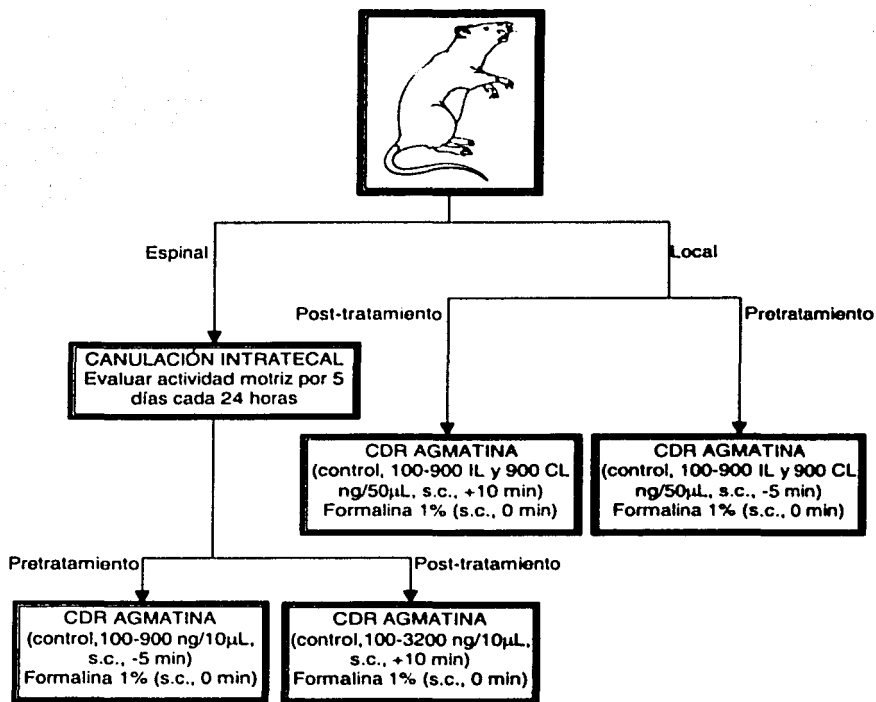


Figura 10. Diagrama de flujo del diseño experimental.



RESULTADOS

La administración de formalina produjo el perfil típico de sacudidas en la pata inyectada. El perfil doloroso observado en la prueba de formalina es bifásico (Tjølsen, 1992). La primera fase también llamada fase fásica comienza inmediatamente después de la administración de formalina produciendo un número de sacudidas relativamente alto, el cual va disminuyendo hasta alcanzar los 10 minutos.

La segunda fase o fase tónica comienza a los 10 minutos después de haber administrado formalina y se debe principalmente al proceso inflamatorio desencadenado. En esta fase se observa un incremento gradual en el número de sacudidas que alcanza un máximo entre los 25-40 minutos, después del cual comienza a disminuir el número de sacudidas hasta completar una hora (Aguirre-Bañuelos y Granados-Soto, 2000). En este trabajo se midió el ABC de la segunda fase por el método de trapezoides para cada tratamiento (Figura 11).

El pretratamiento local (Figura 12) y espinal con agmatina (Figura 13) redujo de manera dependiente a la dosis el número de sacudidas durante la segunda fase de la prueba de formalina ($p < 0.05$). De la misma forma el post-tratamiento local (Figura 14) y espinal (Figura 15) redujeron el número de sacudidas de manera dependiente a la dosis. En todos los casos, a excepción del post-tratamiento espinal, con 300 ng se alcanzó el máximo efecto. En el post-tratamiento espinal se requirió una dosis tres veces mayor.



La administración contralateral de agmatina (900 ng) para el pretratamiento (Figura 12) y post-tratamiento local (Figura 14) no tuvo cambios significativos con respecto a su grupo control.

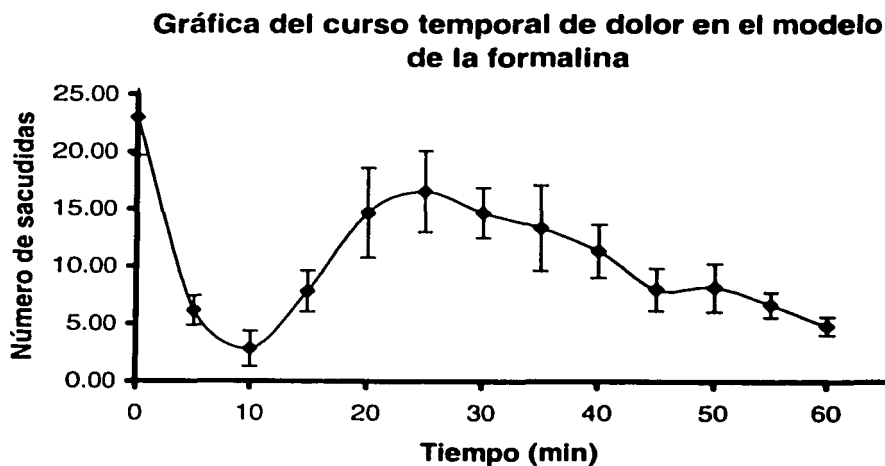


Figura 11. Gráfica que muestra el curso temporal del dolor producido en el modelo de formalina. Se administró salina (0.9%) 5 minutos antes de administrar formalina (1%) como grupo control. La conducta dolorosa observada es bifásica, la primera fase abarca de los 0 a los 10 min, en tanto, que la segunda fase comienza a los 15 min y se prolonga hasta los 60 min. Los datos son expresados como el número de sacudidas promedio de al menos 6 ratas \pm el error estándar.



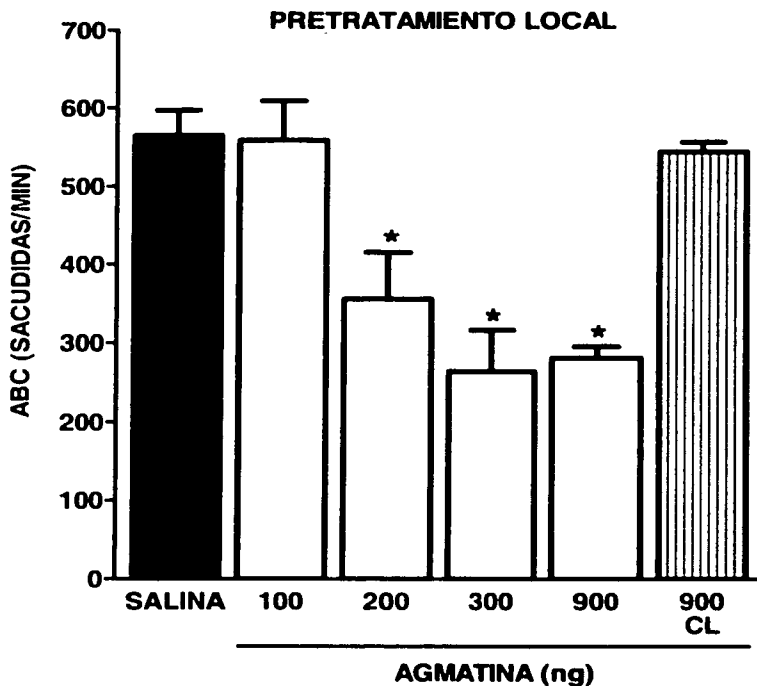


Figura 12. Efecto analgésico del pretratamiento (-5 min) local con agmatina ipsilateral y contralateral durante la fase 2 en la prueba de formalina. Los datos expresados en barras corresponden al ABC promedio obtenida durante la fase 2 de al menos 6 ratas \pm el error estándar. * Significativamente diferente con respecto al grupo control tratado con salina ($p < 0.05$) y determinado por análisis de varianza de una cola (ANOVA) seguido por la prueba de Tukey. (CL) contralateral.



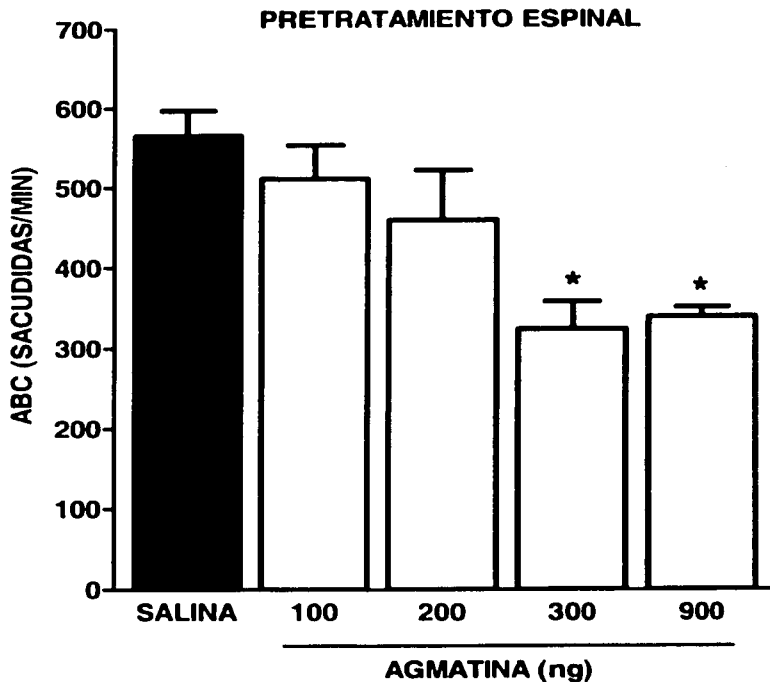


Figura 13. Efecto analgésico del pretratamiento (-5 min) espinal con agmatina durante la fase 2 en la prueba de formalina. Los datos expresados en barras corresponden al ABC promedio obtenida durante la fase 2 de al menos 6 ratas \pm el error estándar. * Significativamente diferente con respecto al grupo control, tratado con salina ($p < 0.05$) y determinado por análisis de varianza de una cola (ANOVA) seguido por la prueba de Tukey.



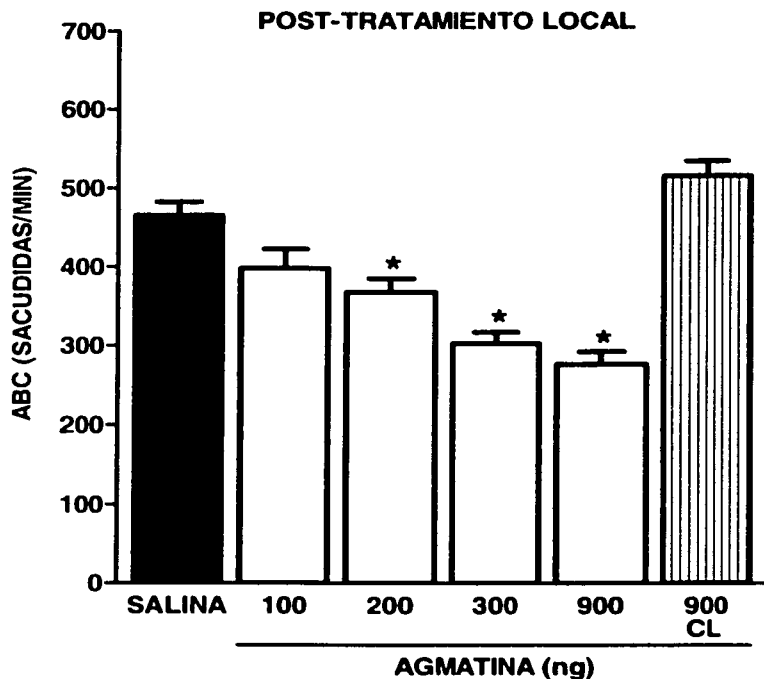


Figura 14. Efecto analgésico del post-tratamiento (+10 min) local con agmatina ipsilateral y contralateral durante la fase 2 en la prueba de formalina. Los datos expresados en barras corresponden al ABC promedio obtenida durante la fase 2 de al menos 6 ratas \pm el error estándar. *Significativamente diferente con respecto al grupo control, tratado con salina ($p < 0.05$) y determinado por análisis de varianza de una cola (ANOVA) seguido por la prueba de Tukey, (CL) contralateral.



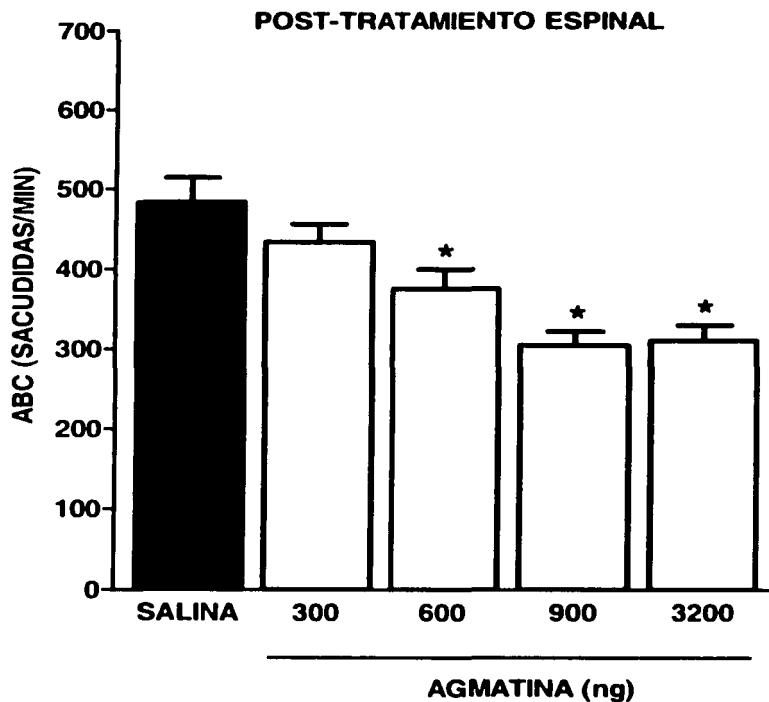


Figura 15. Efecto analgésico del post-tratamiento (-5 min) espinal con agmatina durante la fase 2 en la prueba de formalina. Los datos expresados en barras corresponden al ABC promedio obtenida durante la fase 2 de al menos 6 ratas \pm el error estándar. * Significativamente diferente con respecto al grupo control, tratado con salina ($p < 0.05$) y determinado por análisis de varianza de una cola (ANOVA) seguido por la prueba de Tukey.



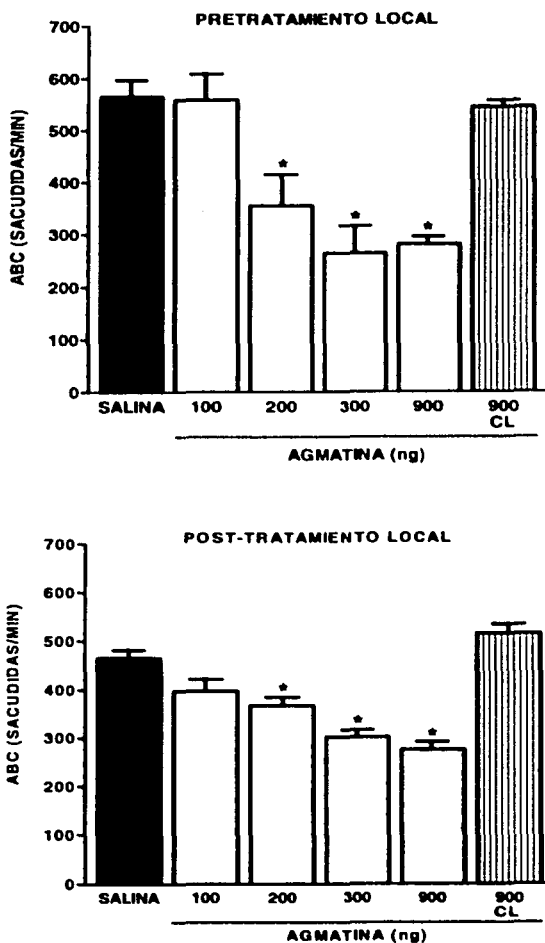


Figura 16. Comparación del efecto analgésico producido por agmatina entre el pretratamiento y post-tratamiento local. Los datos expresados en barras corresponden al ABC promedio obtenida durante la fase 2 de al menos 6 ratas \pm el error estándar. * Significativamente diferente con respecto al grupo control, tratado con salina ($p < 0.05$) y determinado por análisis de varianza de una cola (ANOVA) seguido por la prueba de Tukey. (CL) contralateral.



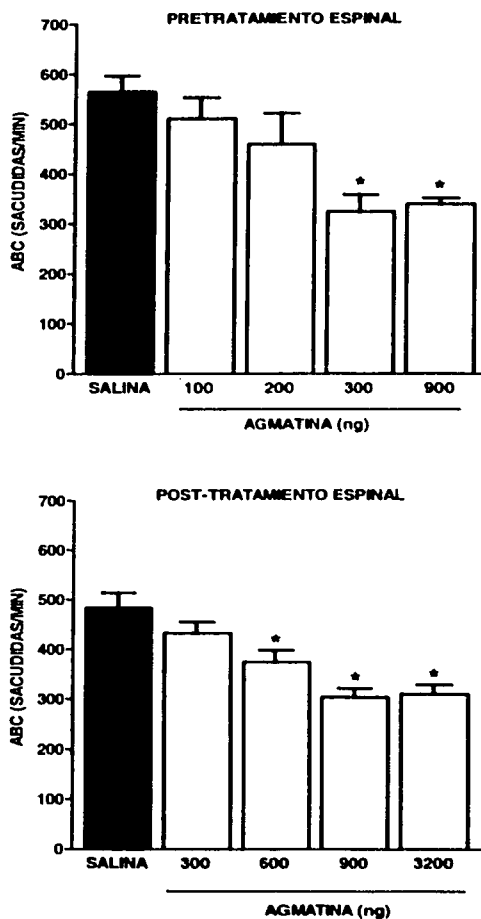


Figura 17. Comparación del efecto analgésico producido por agmatina entre el pretratamiento y post-tratamiento espinal. Los datos expresados en barras corresponden al ABC promedio obtenida durante la fase 2 de al menos 6 ratas \pm el error estándar. * Significativamente diferente con respecto al grupo control, tratado con salina ($p < 0.05$) y determinado por análisis de varianza de una cola (ANOVA) seguido por la prueba de Tukey.



Tabla 4: Areas bajo la curva de la fase 2 obtenidas por el método de trapezoides en la prueba de formalina después de haber administrado diferentes dosis de agmatina en cada tratamiento. *Significativamente diferente con respecto al grupo control, tratado con salina ($p < 0.05$), determinado por análisis de varianza de una cola (ANOVA) seguido por la prueba de Tukey.

TIPO DE TRATAMIENTO	DOSIS (ng)	NUMERO DE ANIMALES	ABC (promedio \pm e.e.)
PRETRATAMIENTO: 15 MIN			
Salina		6	564.6 \pm 32.1
Agmatina	100	6	558.3 \pm 50.0
Agmatina	200	6	355.0 \pm 59.9*
Agmatina	300	6	263.8 \pm 52.3*
Agmatina	900	6	280.8 \pm 14.4*
Agmatina contralateral	900	6	543.3 \pm 12.5
PRETRATAMIENTO: 30 MIN			
Salina		6	564.6 \pm 32.1
Agmatina	100	6	510.8 \pm 42.2
Agmatina	200	6	459.0 \pm 62.5
Agmatina	300	6	323.8 \pm 34.1*
Agmatina	900	6	338.8 \pm 11.8*
POST TRATAMIENTO: 15 MIN			
Salina		8	465.0 \pm 17.2
Agmatina	100	7	397.5 \pm 24.7
Agmatina	200	6	367.5 \pm 17.2
Agmatina	300	6	302.1 \pm 14.5*
Agmatina	900	6	275.8 \pm 16.4*
Agmatina contralateral	900	6	515.0 \pm 18.6
POST TRATAMIENTO: 30 MIN			
Salina		6	483.3 \pm 30.8
Agmatina	300	8	433.2 \pm 22.3
Agmatina	600	6	375.0 \pm 24.0*
Agmatina	900	6	304.6 \pm 17.4*
Agmatina	3200	6	310.4 \pm 19.3*



7. DISCUSIÓN

La prueba de formalina está descrita como un modelo de dolor tónico (Albe-Fessard y cols., 1990) que se aproxima a las condiciones clínicas que se presentan ante estímulos cutáneos agudos (Tjølsen y cols., 1992). El comportamiento nociceptivo reportado describe dos fases (Dubuisson y Dennis, 1977). La primera fase comienza desde el momento en que se administra la formalina y se prolonga por un período de 10 minutos. Datos experimentales indican que esta fase se debe principalmente a la liberación de bradicinina y sustancia P (Shibata y cols., 1989) por estimulación de fibras C (Heapy y cols., 1987). Por su parte, la segunda fase comienza después de 10-20 minutos y dura alrededor de 20-40 minutos presentando un máximo entre los 25 y 40 minutos después de la administración de formalina. Se ha reportado que esta fase presenta liberación de histamina, serotonina, prostaglandinas y bradicinina debido a el estímulo nocivo aplicado y al proceso inflamatorio desencadenado (Shibata y cols., 1989).

El curso temporal de dolor descrito por Dubuisson y Dennis (1992) para la prueba de formalina corresponde al obtenido en nuestros resultados. En la figura 11 se observan las dos fases de comportamiento que presentan los roedores en esta prueba, para nuestro experimento el máximo durante la segunda fase se obtuvo entre 25-35 minutos.

Los resultados obtenidos en el presente estudio demuestran que la agmatina administrada como pretratamiento y post-tratamiento en el modelo de formalina produce analgesia periférica y espinal a dosis bajas durante la segunda fase. Este



comportamiento concuerda con los estudios publicados por Ónal y Soykan (1992), donde concluyen que la agmatina reduce la respuesta dolorosa en ratones de manera dependiente con el incremento de la dosis en ambas fases de la prueba de formalina y, con el estudio hecho por Horváth y cols. (1999) donde establecen que la agmatina produce efecto antihiperalgésico en ratas tratadas con carragenina intraplantar.

En el pretratamiento local y espinal dosis mayores de 300 ng no produjeron un efecto analgésico mayor. Por su parte, el post-tratamiento local presentó un comportamiento similar al del pretratamiento, alcanzando su máximo efecto a 300 ng, mientras que el post-tratamiento espinal requirió el triple de la dosis (900 ng) para alcanzar el máximo efecto analgésico producido por agmatina en este modelo de dolor. Evidencia previa indica que el pretratamiento espinal con agmatina atenúa significativamente la hiperalgesia térmica producida por carragenina intraplantar, mientras que el post-tratamiento espinal con agmatina posee menor eficacia (Horváth y cols., 1999).

En el modelo de formalina la agmatina no es capaz de bloquear completamente la conducta nociceptiva, sin embargo, se alcanza a obtener un efecto analgésico alrededor del 50% para el pretratamiento y del 40% para el post-tratamiento. Cabe señalar que en el post-tratamiento la administración de salina 10 minutos después de la inyección de formalina redujo el número de sacudidas con respecto a la formalina sola.

El pretratamiento, como el post-tratamiento con agmatina produce un efecto analgésico local, pero no sistémico debido a que la administración contralateral de



una dosis efectiva de agmatina (900 ng) no redujo el número de sacudidas durante la fase dos de la prueba de formalina.

Existen reportes (Kolesnikov y cols., 1996, Bradley y Headley, 1997, Li y cols., 1999; Önal y Soykan, 2001) que demuestran que la agmatina no presenta efecto significativo en modelos de dolor fásico como el "tail flick", lo que sugiere que la agmatina produce analgesia solo en modelos de dolor que cursan por procesos inflamatorios, como la prueba de formalina o la de hiperalgesia térmica inducida por carragenina intraplantar.

Los efectos analgésicos observados en el presente estudio se alcanzaron con dosis menores a los 900 ng, las cuales están por debajo de las dosis empleadas en estudios previos (Önal y Soykan, 2001 y Horváth y cols., 1999). La potencia presentada por la agmatina se puede atribuir a la multiplicidad de mecanismos de acción que posee y a la posible interacción sinérgica de dichos mecanismos.

Se ha demostrado que la unión del glutamato a receptores NMDA remueve al Mg^{2+} que bloquea el canal iónico en su estado de reposo y permite que se active la entrada de calcio incrementando su concentración intracelular (Dougherty y Willis, 1991). El calcio se une a la calmodulina y forma un complejo necesario para que la NOS lleve a cabo la síntesis de ON (Moncada y cols., 1989). Dichos receptores NMDA juegan un papel muy importante en la formación del dolor tónico debido a que promueven la liberación de neurotransmisores y la amplificación de las señales dolorosas (Dougherty y Willis, 1991). Asimismo, los inhibidores de la NOS y antagonistas de los receptores NMDA han sido involucrados en la plasticidad neuronal (Collingridge y Singer, 1990), la tolerancia a opioides (Kolesnikov y Pasternak, 1999), la sensibilización espinal y el mantenimiento e inhibición del



desarrollo de la hiperalgesia térmica (Malmberg y Yaksh, 1993; Meller y cols., 1994).

El efecto analgésico mostrado por la agmatina en la prueba de formalina se puede explicar por su acción antagonista sobre receptores de glutamato, principalmente del tipo NMDA (Yang y Reis, 1999) y su acción inhibitoria sobre todas las isoformas inducibles de la NOS (Auguet y cols., 1995). Estos dos mecanismos y la aparente baja toxicidad que presenta la agmatina, hacen de ella un candidato para ser fármaco analgésico (Yang y Reis, 1999).

Se ha visto que la agmatina se une a receptores adrenérgicos α_2 , pero aún no está claro como contribuyen estos receptores al efecto analgésico (Raasch y cols., 1995), aunque Önal y Soykan (2001) proponen una mayor participación de estos receptores en dolores de tipo tónico. La propuesta publicada por Önal y Soykan (2001) concuerda con los resultados obtenidos en nuestro laboratorio, donde la naloxona, un antagonista de receptores opioides, modificó parcialmente el efecto analgésico producido por agmatina en el pretratamiento local (datos no mostrados).

Por otro lado, el L-NAME, un inhibidor de todas las isoformas de la NOS, no produjo un efecto significativo sobre la analgesia producida por agmatina (datos no mostrados); lo que nos lleva a la conclusión de que el ON no participa en el efecto analgésico local de agmatina como lo hace a nivel espinal (Abe y cols., 2000).

Los resultados obtenidos en este estudio nos permiten sugerir la posibilidad de usar la administración periférica de agmatina para aliviar el dolor de tipo inflamatorio, en virtud de su habilidad para producir analgesia sin efectos adversos graves.



CONCLUSIONES

- La agmatina administrada como pretratamiento y post-tratamiento a nivel periférico y espinal produce analgesia en el modelo de formalina.

- La administración subcutánea de agmatina en la superficie dorsal de la pata posterior derecha de la rata produce un efecto local y no sistémico.

- La agmatina administrada por vía local requiere menor dosis para producir el mismo efecto en relación con la vía espinal en el post-tratamiento.

- La agmatina actúa mejor en el pretratamiento espinal con relación al post-tratamiento espinal.

- Es un candidato para ser utilizada como analgésico en el dolor de tipo inflamatorio.



BIBLIOGRAFÍA

- ◆ Aanonsen LM, Wilcox GL. 1987. Nociceptive action of excitatory amino acids in the mouse: Effects of spinally administered opioids, phencyclidine and agonists. *J Pharmacol Exp Ther.* 243:9-19.
- ◆ Abbadie C, Besson JM. 1993. C-fos expression in rat lumbar spinal cord following peripheral stimulation in adjuvant induced arthritic and normal rats. *Brain Res.* 607:195-204.
- ◆ Abe K, Abe Y, Saito H. 2000. Agmatine suppresses nitric oxide production in microglia. *Brain Res.* 872:141-148.
- ◆ Aguirre-Bañuelos P, Granados-Soto V. 2000. Evidence for the participation of the nitric oxide cyclic GMP pathway in the antinociceptive action of meloxicam in the formalin test. *Eur J Pharmacol.* 395:9-13.
- ◆ Albe-Fessard D, Giamberardino MA, Rampin O. 1990. Comparison of different animal models of chronic pain. *Adv Pain Res Ther.* 13:11-25.
- ◆ Aleksander Beric. 1997. Estados dolorosos después de una lesión de la médula espinal. En: *Clínicas de Anestesiología de Norteamérica.* Wallace MS, Dunn JS, Yaksh TL. Ed. Mc Graw Hill. 2:295-314.
- ◆ Aley KO, McCarter G, Levine JD. 1998. Nitric oxide signaling in pain and nociceptor sensitization in the rat. *J Neurosci.* 18:7008-7014.
- ◆ Alhaider AA, Wilcox GL. 1993. Differential roles of 5-HT_{1A} and 5-HT_{1B} receptor subtypes in modulating spinal nociceptive transmission in mice. *J Pharmacol Exp Ther.* 265(1): 378-385.
- ◆ Anand P. 1995. Nerve growth factor regulates nociceptors in human health and disease. *BJA.* 75:201-208.
- ◆ Andrade R, Aghajanian GK. 1985. Opiate and alpha 2 adrenoceptor induced hyperpolarizations of locus ceruleus neurons in brain slices: reversal by cyclic adenosine 3',5' monophosphate analogues. *J Neurosci.* 5:2359-2364.
- ◆ Akil H, Mayer DJ, Liebeskind JC. 1976. Antagonism of stimulation-produced analgesia by naloxone, a narcotic antagonist. *Science.* 191:961-967.
- ◆ Auguet M, Viossat I, Martín GJ, Chabrier PE. 1995. Selective inhibition of inducible nitric oxide synthase by agmatine. *Jpn J Pharmacol.* 69(3):285-287.



- ◆ Barchas JD, Akil H, Elliott GR, Holman RB, Watson SJ. 1978. Behavioral Neurochemistry: Neuroregulators and Behavioral States. *Science*. 200:964-973.
- ◆ Basbaum AI, Fields HL. 1984. Endogenous pain control systems: Brain stem spinal pathways and endorphin circuitry. *Ann Rev Neurosci*. 7:309-338.
- ◆ Basbaum AI. 1999. Spinal mechanisms of acute and persistent pain. *Reg Anesth Pain Med*. 24:59-67.
- ◆ Beecher HK. 1957. The measurement of pain: prototype for the quantitative study of subjective responses. *Pharmacol Rev*. 9:59-209.
- ◆ Ben-Bassat J, Peretz E, Sulman FG. 1959. Analgesimetry and ranking of analgesic drugs by the receptacle method. *Arch Int Pharmacodyn Ther*. 122:434-447.
- ◆ Berridge MJ. 1987. Inositol triphosphate and diacylglycerol: two interacting second messengers. *Ann Rev Biochem*. 56:159-193.
- ◆ Besson JM, Chaouch A. 1987. Descending Serotonergic Systems; Neurotransmitters and pain control. In: *Pain Headache*. Ed. H. Akil, JW Lewis. 9:64-100.
- ◆ Besson P, Perl E. 1969. Responses of cutaneous sensory units with unmyelinated fibers to noxious stimuli. *J. Neurophysiol* 32:1025.
- ◆ Beurman RW, Tanelian DL. 1979. Corneal pain evoked by thermal stimulation. *Pain* 7:1-14.
- ◆ Bianchi C, Francheschini J. 1954. Experimental observations on Haffner's method for testing analgesic drugs. *Br J Pharmacol*. 9:280-284.
- ◆ Björkman R. 1995. Central antinociceptive effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs and paracetamol. *Acta Anaesthesiol Scand Suppl*. 103:1-44.
- ◆ Bonica JJ. 1987. Importance of effective pain control. *Acta Anaesthesiol Scand Suppl*. 85:1-16
- ◆ Bonica JJ. 1990. Evolution and current status of pain programs. *J Pain Syntom Manage*. 5:347-368.
- ◆ Bowery NG. 1993. GABA_B receptor pharmacology. *Ann Rev Pharmacol Toxicol*. 33:109-147.



- ◆ Bowman WC, Rand MJ. 1984. Farmacología. Bases Bioquímicas y Patológicas. Aplicaciones clínicas. 2^{da} ed. Ed. Interamericana. 1-36.
- ◆ Bradley KJ, Headley PM. 1997. Effect of agmatine on spinal nociceptive reflexes: Lack of interaction with α_2 -adrenoceptor or μ -opioid receptor mechanisms. *Eur J Pharmacol.* 331:133-138.
- ◆ Brunetti L. 1994. Nitric oxide: a gas as a modulator of neuroendocrine secretions. *Clin Ter.* 144(2):147-153.
- ◆ Butler MJ. 1997. Artritis y dolor musculoesquelético. En: Clínicas de Anestesiología de Norteamérica. Wallace MS, Dunn JS, Yaksh TL. Ed. Mc Graw Hill. 2:459-477.
- ◆ Cadden SW. 1985. The digastric reflex evoked by tooth-pulp stimulation in the cat and its modulation by stimuli applied to the limbs. *Brain Res.* 336:33-43.
- ◆ Calixto JB, Cabrini DA, Ferreira J, Campos MM. 2000. Kinins in pain and inflammation. *Pain* 87:1-5.
- ◆ Campbell WB, Halushka PV. 1996. Lipid-derived autacoids. In: Goodman and Gilman's, The Pharmacological Basis of Therapeutics. Hardman JG, Limbird LE, Molinoff PB, Ruddon RW, Gilman AG. 9th ed. Mc Graw Hill. Cap. 26:601-616.
- ◆ Cassell EJ. 1982. The nature of suffering and the goals of medicine. *N Engl J Med.* 306:639-645.
- ◆ Cerveró F, Laird JMA. 1995. Fisiología del Dolor. En: Tratamiento del Dolor: Teoría y Práctica Aliaga L. Baños JE, Barutell C, et.al. MCR. Barcelona. 9-25
- ◆ Charpentier J. 1961. Sur une nouvelle méthode psychophysiologique de mesure quantitative des réactions douloureuses chez le rat. *C R Soc Biol.* 155:727-731.
- ◆ Chen GG, Chalazonitis A, Shen KF, Crain SM. 1988. Inhibitor of cyclic AMP-dependent protein kinase blocks opioid induced prolongation of the action potential of mouse sensory ganglion neurons in dissociated cell cultures. *Brain Res.* 462(2):372-377.
- ◆ Chen SR, Pan HL. 2001. Spinal endogenous acetylcholine contributes to the analgesic effect of systemic morphine in rats. *Anesthesiol.* 95(2):525-530
- ◆ Collingridge GL, Singer W. 1990. Excitatory amino acid receptors and synaptic plasticity. *Trends in Pharm Sci.* 11:290-296.
- ◆ Cox TT, Boeker EA. 1987. Analysis of enzyme kinetics by using integrated rate equations: arginine descarboxylase. *Biochem J.* 245:59-65.



- ◆ D'Amour FE, Smith DL. 1941. A method for determining loss of pain sensation. *J Pharmacol Exp Ther.* 72:74-79.
- ◆ D'Amours RH, Ferrante FM. 1997. Fármacos perioperatorios y tratamiento del dolor posoperatorio. En: *Clínicas de Anestesiología de Norteamérica.* Wallace MS, Dunn JS, Yaksh TL. Ed. Mc Graw Hill. 2:261-278.
- ◆ Dougherty PM, Willis WD. 1991. Enhancement of spinothalamic neuron responses to chemical and mechanical stimuli following combined micro-iontophoretic application of N-methyl-D-aspartic acid and substance P. *Pain.* 47:85-93.
- ◆ Dray A. 1995. Inflammatory mediators of pain. *Br J Anaesth.* 75(2):125-131.
- ◆ Dubner R, Bennett GJ. 1983. Spinal and trigeminal mechanisms of nociception. *Ann Rev Neurosci.* 6:381-418.
- ◆ Dubuisson D, Dennis SG. 1977. The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine and brain stem stimulation in rats and cats. *Pain.* 4:161-174.
- ◆ Duggan AW, North RA. 1983. Electrophysiology of opioids. *Pharmacol Rev.* 35(4):219-281.
- ◆ Evans WO. 1961. A new technique for the investigation of some drugs on a reflexive behavior in the rat. *Psychopharmacol (Berl).* 2:318-325.
- ◆ Fairbanks CA, Schreiber KL, Brewer KL, Yu C-G, Stone LS, Kitto KF, Nguyen HO, Grocholski BM, Shoeman DW, Kehl LJ, Regunathan S, Reis DJ, Yezielski RP, Wilcox GL. 2000. Agmatine reverses pain induced by inflammation, neuropathy, and spinal cord injury. *PNAS.* 97:10584-10589.
- ◆ Ferreira SH. 1972. Prostaglandins, aspirin-like drugs and analgesia. *Nat New Biol.* 240(102):200-203.
- ◆ Ferreira SH, Lorenzetti BB, Faccioli LH. 1992. Blockade of hyperalgesia and neurogenic o edema by topical application of nitroglycerin. *Eur J Pharmacol.* 217:207-209.
- ◆ Fields HL, Martín JB. 1994. Dolor: Fisiopatología y Tratamiento. En: *Harrison. Principios de Medicina Intena.* 13^{ra} ed. Ed. Mc Graw Hill-Interamericana. España. Cap. 11:57-63.
- ◆ Fitzgerald M. y Lynn B. 1977. The sensitization of high threshold mechanoreceptors with myelinated axons by repeated heating. *J. Physiol.* 365:549-563.



- ◆Forth W, Martín E, Peter K. 1995. El alivio del dolor. Ed. Hoechst SA. México. 1-20.
- ◆Fozard JR. 1984. Neuronal 5-HT receptors in the periphery. *Neuropharmacol.* 23(12B):1473-1486
- ◆Furst DE, Munster T. 2001. Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs, Disease-Modifying Antirheumatic Drugs, Nonopioid Analgesics, & Drugs Used in Gout. In: *Basic & Clinical Pharmacology*. Bertram G. Katzung. 8th ed. Mc Graw-Hill. Cap.36:596-623.
- ◆Galea E, Ragunathan S, Eliopoulos V, Feinstein DL, Reis DJ. 1996. Inhibition of mammalian nitric oxide synthases by agmatine, an endogenous polyamine formed by decarboxylation of arginine. *Biochem J.* 1996. 316(Pt):247-249.
- ◆Galeotti N, Ghelardini C, Vinci MC, Bartolini A. 1999. Role of potassium channels in the antinociception induced by agonists of alpha 2 adrenoceptors. *Br J Pharmacol.* 126(5):1214-1220.
- ◆Gamse VR. 1984. Physiologie und Pathophysiologie der Substanz P. *Drug. Res.* 34(II):1074-1079.
- ◆García JAL, Herrero JF. 1998. Somestesia: Mecanorrecepción, Termorrecepción y Nocicepción. En: *Manual de Neurociencia*. Jose Ma. Delgado, Alberto Ferrús, Francisco Mora y J. Rubio. Ed.Síntesis. España. 18:457-481.
- ◆Garthwaite J. 1991. Glutamate, nitric oxide and cell-cell signaling in the nervous system. *Trends Neurosci.* 14:60-67.
- ◆Glazer EJ, Steinbush H, Verhofstad A, Basbaum AI. 1981. Serotonin neurons in nucleus raphe dorsalis and paragigantocellularis of the cat contain enkephalin. *J Physiol* 77:241-245.
- ◆Guyton AC, Hall JE. Dolor, cefalea y sensaciones de temperatura. En: *Tratado de Fisiología Médica*. Ed. Interamericana-Mc Graw-Hill. 1996:661-674
- ◆Haley JE, Sullivan AF, Dickenson AH. 1990. Evidence for spinal N-methyl-D-aspartate receptor involvement in prolonged chemical nociception in the rat. *Brain Res.* 518:218-226.
- ◆Hall JM, Geppetti L. 1995. Kinins and kinin receptors in the nervous system. *Neurochem Int.* 26:17-26.



- ◆ Hargreaves K, Dubner R, Brown F, Flores C, Joris J. 1988. A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. *Pain*. 32:77-88.
- ◆ Heapy CG, Jamieson A, Russell NJW. 1987. Afferent C-fibre and A- δ activity in models of inflammation. *Br J Pharmacol*. 90:164P.
- ◆ Holland GR, Robinson PP. 1983. The number and sizes of axons at the apex of the cat's canine tooth. *Anat Rec*. 205:215-222.
- ◆ Horvath G, Kekesi G, Dobos I, Szikszay M, Klimscha W, Benedek G. 1999. Effect of intrathecal agmatine on inflammation-induced thermal hyperalgesia in rats. *Eur J Pharmacol*. 368:197-204.
- ◆ Hyman SE, Cassem NH. Dolor. En: *Neurologa*. Ed. Cientfica Mdica Latinoamericana. 1995:1-20
- ◆ Iadarola MJ, Brady LS, Draisci G, Dubner R. 1988. Enhancement of dynorphin gene expression in spinal cord following experimental inflammation: stimulus specificity, behavioral parameters and opioid receptor binding. *Pain*. 35:313-326.
- ◆ Inoue T, Mashimo T, Shibuta S, Yoshiya I. 1997. Intrathecal administration of a new nitric oxide donor, NOC-18, produces acute thermal hyperalgesia in the rat. *J Neurol Sci*. 153:1-7.
- ◆ Jaques R. 1977. Antagonism of non-steroidal anti-inflammatory drugs and narcotic analgesics against ethacrynic acid induced writhing. *Arzneimittelforschung*. 27:1698-1700.
- ◆ Jasmin L, Kohan L, Franssen M, Janni G, Goff JR. 1998. The cold plate as a test of nociceptive behaviors: description and application to the study of chronic neuropathic and inflammatory pain models. *Pain*. 75:367-382.
- ◆ Jesell TM, Kelly DD. 1991. Pain and Analgesia. In: *Principles of Neural Science*. Kandel ER, Schwartz JH, Jesell TM. 3rd ed. Elsevier. pp:385-399
- ◆ Kangrga I, Rnadic M. 1991. Outflow of endogenous aspartate and glutamate from the rat spinal dorsal horn in vitro by activation of low and high threshold primary afferent fibers. *Brain Res*. 553:347-352.
- ◆ Kawabata A, Fukuzumi Y, Fukushima Y, Takagi H. 1992. Antinociceptive effect of L-arginine on the carrageenan-induced hyperalgesia of the rat: possible involvement of central opioidergic systems. *Eur J Pharmacol*. 218:153-158.



- ◆ Kelso SR, Nelson TE, Leonard JP. 1992. Protein kinase C-mediated enhancement of NMDA currents by metabotropic glutamate receptors in *Xenopus* oocytes. *J Physiol.* 449:705-718.
- ◆ Kolesnikov Y, Jain S, Pasternak GW. 1996. Modulation of opioid analgesia by agmatine. *Eur J Pharmacol.* 296:17-22.
- ◆ Kolesnikov Y, Pasternak GW. 1999. Topical opioids in mice: analgesia and reversal of tolerance by a topical N-methyl-D-aspartate antagonist. *J Pharmacol Exp Ther.* 290:247-252.
- ◆ Kuraishi Y, Hirota N, Sato Y, Kaneko S, Satoh M, Tagaki H. 1985. Noradrenergic inhibition of the release of substance P from the primary afferents in the rabbit spinal dorsal horn. *Brain Res.* 359(1-2):177-182.
- ◆ Kuzirian A, Meyhofer E, Hill L, Neary JT, Alkon DL. 1986. Autoradiographic measurement of tritiated agmatine as an indicator of physiologic activity in Hermissenda visual and vestibular neurons. *J Neurocytol.* 15(5):629-643.
- ◆ Le Bars D, Gozariu M, Cadden SW. 2001. Animal models in nociception. *Pharmacol Rev.* 53:597-652.
- ◆ Lefkowitz RJ, Hoffman BB, Taylor P. 1996. Neurotransmission: The Autonomic and Somatic Motor Nervous Systems. In: Goodman and Gilman's, *The Pharmacological Basis of Therapeutics.* Hardman JG, Limbird LE, Molinoff PB, Ruddon RW, Gilman AG. 9th ed. Mc Graw Hill. Cap. 6:121.
- ◆ Lewis T, Kellgren JH. 1939. Observations relating to referred pain, visceromotor reflexes and other associated phenomena. *Clin Sci.* 4:47-71.
- ◆ Li G, Regunathan S, Barrow CJ, Eshraghi J, Cooper R, Reis DJ. 1994. Agmatine: an endogenous clonidine-displacing substance in the brain. *Science.* 263:966-969.
- ◆ Li J, Li X, Pei G, Qin BY. 1999. Analgesic effect of agmatine and its enhancement on morphine analgesia in mice and rats. *Acta Pharmacol Sinica.* 20:81-85.
- ◆ Lim RK. 1967. Pain mechanisms. *Anesthesiol.* 28(1):106-110
- ◆ Loeser JD, Melzack R. 1999. Pain: an overview. *Pain.* 353:1607-1609.
- ◆ Loring RH. 1990. Agmatine acts as an antagonist of neuronal nicotinic receptors. *Br J Pharmacol.* 99:207-211.



- ◆ Malmberg AB, Yaksh TL. 1993. Spinal nitric oxide synthesis inhibition blocks NMDA-induced thermal hyperalgesia and produces antinociception in the formalin test in rats. *Pain*. 54:291-300.
- ◆ Mansikka H, Pertovaara A. 1995. The role of alpha 2-adrenoceptors of the medullary lateral reticular nucleus in spinal antinociception in rats. *Brain Res Bull*. 37(6):633-638.
- ◆ Marletta MA, Hurshman AR y Rusche KM. 1998. Catalysis by nitric oxide synthase. *Curr Opin Chem Biol*. 2(5):656-663.
- ◆ Mayer DJ, Wolfle TL, Akil H, Carder B, Liebeskind JC. 1971. Analgesia from electrical stimulation in the brain stem of the rat. *Science*. 174:1351-1354
- ◆ McClane TK, Martin WR. 1967. Effects of morphine, nalorphine, cyclazocine and naloxone on the flexor reflex. *Int J Neuropharmacol*. 6:89-98.
- ◆ McDermott AB, Mayer ML, Westbrook GL, Smith SJ, Barker JL. 1986. NMDA-receptor activation increases cytoplasmic calcium concentration in cultured spinal cord neurons. *Nature*. 321:519-522.
- ◆ McMahon SB, Armanini MP, Ling LH, Phillips HS. 1994. Expression and coexpression of Trk receptors in subpopulations of adult primary sensory neurons projecting to identified peripheral targets. *Neuron*. 12(5):1161-1171
- ◆ Meller ST, Gebhart GF. 1993. Nitric oxide (NO) and nociceptive processing in the spinal cord. *Pain*. 52:127-136.
- ◆ Meller ST, Cummings CP, Traub RJ, Gebhart GF. 1994. The role of nitric oxide in the development and maintenance of the hyperalgesia produced by intraplantar injection of carrageenan in the rat. *Neurosci*. 60:367-374.
- ◆ Melzack R, Wall PD. 1965. Pain mechanism: A new theory. *Science*. 150:971-979.
- ◆ Melzack R, Casey KL. 1968. Sensory, motivational and central control determinants of pain: a new conceptual model. In: Kenshalo D. *The skin senses*. Ed. Charles C. Thomas. Springfield. Ill. 423-443.
- ◆ Merskey H. 1979. Pain terms: A list with definitions and notes on usage. Recommended by the IASP Subcommittee on Taxonomy. *Pain*. 6:249
- ◆ Miampamba M, Chery-Croze S, Gorry F, Berger F, Chayvialle JA. 1994. Inflammation of the colonic wall induced by formalin as a model of acute visceral pain. *Pain*. 57:327-334.



- ◆ Mobarakeh JI, Sakurada S, Katsuyama S, Kutsuwa M, Kuramasu A, Lin ZY, Watanabe T, Hashimoto Y, Yanai K. 2000. Role of histamine H(1) receptor in pain perception: a study of the receptor gene knockout mice. *Eur J Pharmacol.* 391(1-2):81-89.
- ◆ Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. 1989. Biosynthesis of nitric oxide from L-arginine. A pathway for the regulation of cell function and communication. *Biochem Pharmacol.* 38:1709-1715.
- ◆ Morrissey J, McCracken R, Ishidoya S, Klahr S. 1995. Partial cloning and characterization of an arginine decarboxylase in the kidney. *Kidney Int.* 47(5):1458-1461.
- ◆ Mumford J, Bower D. 1976. Pain and prothopatic sensibility: A review with particular reference to the teeth. *Pain.* 2:223-243.
- ◆ Mycek MJ, Harvey RA, Champe PC. 2000. Anti-inflammatory Drugs and Autacoids. In: Lippincott's Illustrated Review: Pharmacology. 2nd ed. Lippincott Williams & Wilkins. Cap. 39:401-403.
- ◆ Naguib M, Yaksh TL. 1997. Characterization of muscarinic receptor subtypes that mediate antinociception in the rat spinal cord. *Anesth Analg.* 85(4):847-853.
- ◆ Ness TJ, Gebhart GF. 1988. Colorectal distension as a noxious visceral stimulus. Physiologic and pharmacologic characterisation of pseudoaffective reflexes in the rat. *Brain Res.* 450:153-169.
- ◆ O'Neil MJ, Smith A, Heckelman P. 2001. The Merck Index: An encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals. Merck & Co., Inc. Whitehouse Station, NJ. 13th ed. pp.184.
- ◆ Önal A, Soykan N. 2001. Agmatine produces antinociception in tonic pain in mice. *Pharmacol Biochem Behav.* 69:93-97.
- ◆ Otake K, Ruggiero DA, Regunathan S, Wang H, Milner TA, Reis DJ. 1998. Regional localization of agmatine in the rat brain: an immunocytochemical study. *Brain Res.* 787(1):1-14.
- ◆ Piletz JE, Chikkala DN, Ernsberger P. 1995. Comparison of the properties of agmatine and endogenous clonidine-displacing substance at imidazoline and alpha-2 adrenergic receptors. *J Pharmacol Exp Ther.* 272(2):581-587.
- ◆ Przewlocka B, Machelska H, Przewlocki R. 1994. Involvement of the nitric oxide pathway in nociceptive processes in the central nervous system in rats. *Regul Pept.* 1:S75-S76.



- ◆ Raasch W, Regunathan S, Li G, Reis DJ. 1995. Agmatine, the bacterial amine, is widely distributed in mammalian tissues. *Life Sci.* 56(26):2319-2330.
- ◆ Regunathan S, Reis DJ. 2000. Characterization of arginine decarboxylase in rat brain and liver: distinction from ornithine decarboxylase. *J Neurochem.* 74(5):2201-2208.
- ◆ Reis DJ, Li G, Regunathan S. 1995. Endogenous ligands of imidazoline receptors: classic and immunoreactive clonidine-displacing substance and agmatine. *Ann N Y Acad Sci.* 763:295-313.
- ◆ Reis DJ, Regunathan S. 1998. Agmatine: a novel neurotransmitter?. *Adv Pharmacol.* 42:645-649.
- ◆ Reis DJ, Yang XC, Milner TA. 1998. Agmatine containing axon terminals in rat hippocampus form synapses on pyramidal cells. *Neurosci Lett.* 250(3):185-188.
- ◆ Reis DJ, Regunathan S. 2000. Is agmatine a novel neurotransmitter in brain?. *TIPS.* 21:187-193.
- ◆ Reisine T, Pasternak G. 1996. Opioid analgesics and antagonists. In: Goodman and Gilman's, *The Pharmacological Basis of Therapeutics.* Hardman JG, Limbird LE, Molinoff PB, Ruddon RW, Gilman AG. 9th ed. Mc Graw Hill. Cap. 23:521-554.
- ◆ Rexed B. 1952. Cytoarchitectonic atlas of the spinal cord in the cat. *J Comp Neurol.* 96:415.
- ◆ Reynolds DV. 1969. Surgery in the rat during electrical analgesia induced by focal brain stimulation. *Science.* 164:444-445.
- ◆ Roberts MH. 1984. 5-Hydroxytryptamine and antinociception. *Neuropharmacol.* 23(12B):1529-1536.
- ◆ Roberts VJ. 1989. Ethical issues in the use of animals for pain research. In: *Issues in Pain Measurement: Advances in Pain Research and Therapy.* Chapman CR, Loeser JD. vol.12. Raven Press. pp.169-174.
- ◆ Rosland JH. 1991. The formalin test in mice: the influence of ambient temperature. *Pain.* 45:211-216.
- ◆ Ruda MA, Bennett GJ, Dubner R. 1986. Neurochemistry and neurocircuitry in the dorsal horn. *Progr Brain Res.* 66:219.
- ◆ Sakurada T, Katsumata K, Tan-No K, Sakurada S, Kisara K. 1992. The capsaicin test in mice for evaluating tachykinin antagonists in the spinal cord. *Neuropharmacol.* 31:1279-1285.



- ◆ Sastre M, Regunathan S, Galea E, Reis DJ. 1996. Agmatinase activity in rat brain: a metabolic pathway for the degradation of agmatine. *J Neurochem.* 67(4):1761-1765.
- ◆ Sastre M, Regunathan S, Reis DJ. 1997. Uptake of agmatine into rat brain synaptosomes: possible role of cation channels. *J Neurochem.* 69(6):2421-2426.
- ◆ Sastre M, Galea E, Feinstein D, Reis DJ, Regunathan S. 1998. Metabolism of agmatine in macrophages: modulation by lipopolysaccharide and inhibitory cytokines. *Biochem J.* 330(Pt 3):1405-1409.
- ◆ Sawynok J. 1987. GABAergic mechanisms of analgesia: an update. *Pharmacol Biochem Behav.* 26(2):463-474.
- ◆ Schuman EM, Madison DV. 1994. Locally distributed synaptic potentiation in the hippocampus. *Science.* 263:532-536.
- ◆ Siddall PJ, Cousins MJ. 1998. Introduction to Pain Mechanisms. In: *Neural Blockade in Clinical Anesthesia and Management of Pain.* Lippincott-Raven Publishers. 3rd.ed. Philadelphia. Chapter 23:675-699.
- ◆ Siegmund E, Cadmus R, Lu G. 1957. A method for evaluating both non-narcotic and narcotic analgesics. *Pro Soc Exp Biol Med.* 95:729-731.
- ◆ Sorkin LS. 1997. Farmacología y fisiología básicas del proceso del dolor agudo. En: *Clínicas de Anestesiología de Norteamérica.* Wallace MS, Dunn JS, Yaksh TL. Ed. Mc Graw Hill. 2:245-259.
- ◆ Sousa AM, Prado WA. 2001. The dual effect of a nitric oxide donor in nociception. *Brain Res.* 897:9-19.
- ◆ Srinivasa NR, Richard AM, James NC. 1988. Peripheral Mechanisms of Somatic Pain. *Anesthesiol.* 68:571-590.
- ◆ Steen KH, Reeh PW, Anton F, Handwerker HO. 1992. Protons selectively induce lasting excitation and sensitization to mechanical stimulation of nociceptors in rat skin, in vitro. *J Neurosci.* 12(1):86-95
- ◆ Stephenson FA. 1995. The GABAA receptors. *Biochem J.* 15;310 (Pt 1):1-9.
- ◆ Stimmel B. 1983. Neuroregulators and Pain. In: *Pain, analgesia and addiction: The pharmacologic treatment of pain.* Ed. Raven Press. N. York. Cap.2:18-36
- ◆ Tabor CW, Tabor H. 1984. Polyamines. *Ann Rev Biochem.* 53:749-790.



- ◆ Tallarida RJ, Murray RB. 1981. Manual of pharmacologic calculations with computer programs. Springer-Verlag. New York. Heidelberg, Berlin.
- ◆ Teiger DG. 1976. A test for antinociceptive activity of narcotic and narcotic antagonists analgesic in the guinea pig. *J Pharmacol Exp Ther.* 197:311-316.
- ◆ Terenius L. 1985. Families of opioid peptides and classes of opioid receptors. In: *Advances in Pain Research and Therapy.* HL Fields, R Dubner, F Cervero. 9^m ed. Raven Press. 463-477.
- ◆ Tjolsen A, Berge O-G, Hunskaar S, Rosland JH, Hole K. 1992. The formalin test: an evaluation of the method. *Pain.* 51:5-17
- ◆ Trujillo KA, Akil H. 1991. Opiate tolerance and dependence: recent findings and synthesis. *New Biol.* 3(10):915-923.
- ◆ Turk DC, Okifuji A. 1999. Assessment of patient's reporting of pain: an integrated perspective. *The Lancet.* 353:1784-1788.
- ◆ Vanegas H, Schaible HG. 2001. Prostaglandins and cyclooxygenases in the spinal cord. *Progress in Neurobiology.* 64:327-363.
- ◆ Watanabe M, Maemura K, Kanbara K, Tamayama T, Hayasaki H. 2002. GABA and GABA receptors in the central nervous system and other organs. *Int Rev Cytol.* 213:1-47.
- ◆ Watkins JC, Krosggaard-Larsen P, Honore T. 1990. Structure-activity relationships in the development of excitatory amino acid receptor agonists and competitive antagonists. *Trends Pharmacol Sci.* 11:25-33.
- ◆ Way WL, Fields HL, Schumacher MA. 2001, *Opioid Analgesics & Antagonists.* In: *Basic & Clinical Pharmacology.* Bertram G. Katzung. 8^m ed. Mc Graw-Hill. Cap.31:512-531.
- ◆ Wesselmann U, Czakanski PP, Affaitati , Giamberardino MA. 1998. Uterine inflammation as a noxious visceral stimulus: behavioral characterization in the rat. *Neurosci Lett.* 246:73-76.
- ◆ Wilcox GL. 1991. Excitatory neurotransmitters and pain. In: *Pain Research and Clinical Management: Proceedings of the Sixth World Congress on Pain.* Bond M, Woolf CJ, Charlton JE. Elsevier Science Publishers BV. 97-117.
- ◆ Willoughby DA, Moore AR, Colville-Nash PR. 2000. COX-1, COX-2 and COX-3 and the future treatment of chronic inflammatory disease. *Lancet.* 355:646-648.
- ◆ Woolfe G, MacDonald AL. 1944. The evaluation of the analgesic action of pethidine hydrochloride. *J Pharmacol Exp Ther.* 80:300-307.



- ◆ Wu G, Morris SM Jr. 1998. Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. *Biochem J* 336 (Pt 1):1-17
- ◆ Xu JY, Pieper GM, Tseng LF. 1995. Activation of a NO-cyclic GMP system by donors potentiates β -endorphin-induced antinociception in the mouse. *Pain*. 63:377-383.
- ◆ Yaksh TL, Rudy TA. 1976. Chronic catheterization of the spinal subarachnoid space. *Physiol Behav*. 17:1031-1036.
- ◆ Yang X-C, Reis DJ. 1999. Agmatine selectively blocks the NMDA subclass of glutamate receptor channels in cultured mouse hippocampal neurons. *J Pharmacol Exp Ther*. 288:544-549
- ◆ Zimmermann M. 1983. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain*. 16:109-110.
- ◆ Zimmermann M. 1984. Basic concepts of pain and pain therapy. *Drug Res*. 34(II):1053-1059.

