

37



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
"ZARAGOZA"

Participación del sistema L-arginina-ON-GMPc-canales K_{ATP} y SK_C en
el efecto antinociceptivo del diclofenaco administrado por vía oral

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A :
J A I R L O Z A N O C U E N C A

TELE CON
FALLA DE ORIGEN

MEXICO, D.F.

NOVIEMBRE 2002



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

PAGINACION DISCONTINUA



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES "ZARAGOZA"

JEFATURA DE LA CARRERA DE QUÍMICO
FARMACÉUTICO BIÓLOGO

ASUNTO: ASIGNACIÓN DE SINODALES.

ESTIMADOS MAESTROS :

La Dirección de la Facultad de Estudios Superiores "Zaragoza", ha nombrado a ustedes como Sinodales del Examen Profesional del (la) señor (ita):

LOZANO CUENCA JAIR

Para obtener el Título de Químico Farmacéutico Biólogo.

Les agradeceré se sirvan revisar el trabajo escrito intitulado: Participación del sistema L-arginina-ON-GMPc-canales K_{ATP} y SK_{Ca} en el efecto antinociceptivo del diclofenaco administrado por vía oral.

Y asistir en la fecha que después se les hará saber al Examen de Recepción Profesional.

PRESIDENTE DR. ADRÉS NAVARRETE CASTRO
VOCAL* DR. VINICIO GRANADOS SOTO
SECRETARIO. M. en F. LETICIA CRUZ ANTONIO
SUPLENTE DRA. MABEL CLARA FRAGOSO SERRANO
SUPLENTE Q.F.B. ESPERANZA JIMÉNEZ CASTAÑEDA

ATENTAMENTE.
 "POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
 México, D.F., a 24 de septiembre de 2002.

Q.F.B. ROBERTO CRUZ GONZÁLEZ MELÉNDEZ.
 JEFE DE LA CARRERA

c.c.p. Departamento de Control de Egresados
 c.c.p. Interesado

FALLA DE ORIGEN

DEDICATORIAS

A Dios por darme la vida.

A mi madre por su apoyo incondicional y por mostrarme con su ejemplo de vida que cualquier objetivo se puede alcanzar cuando se trabaja con amor y constancia.

A mis hermanos Coral, Daniel y Nancy porque aún cuando somos tan diferentes siempre estamos aprendiendo los unos de los otros.

A Jeannett por su apoyo incondicional, por ser mi amiga, mi compañera y la persona más importante de mi vida.

A Daniela por su valiosa amistad, consejos y por estar siempre presente.

A Benjamín, Carlos, Ernesto, Leonel, Liliana, Manuel, Marisol, Roberto y Tania porque más que mis compañeros y amigos de la facultad fueron como mis hermanos.

A mis compañeros de laboratorio Carlos, Héctor, Lupita, Nadia y Tere.

A mis profesores Idalia, Jorge, Leticia y Mauro por haberme brindado su amistad y conocimientos.

A todas las personas que contribuyeron en mi formación y la realización de este trabajo y que por motivos de espacio no pude nombrar.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

AGRADECIMIENTOS

- Al Dr. Vinicio Granados Soto por darme la confianza y la oportunidad de trabajar en su laboratorio, por sus acertadas observaciones y sugerencias durante el desarrollo de este trabajo.
- A la Facultad de Estudios Superiores "Zaragoza" porque como alumno me ha dado las bases para mi futuro desarrollo como profesionista.
- Al departamento de Farmacobiología del CINVESTAV-IPN (sede sur) porque en sus instalaciones se desarrolló este trabajo.
- A todos mis profesores por haber compartido sus conocimientos, por ser mis compañeros, mis amigos y una gran fuente de motivación para continuar estudiando y alcanzar nuevos objetivos.
- A mis sinodales por haber tenido la atención y amabilidad de revisar este trabajo.
- Al Lic. Héctor Vázquez Espinosa por su apoyo en la búsqueda de material bibliográfico.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

La parte experimental de este trabajo se realizó en el laboratorio 12 del 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 y la asesoría del Dr. Andrés Navarrete Castro.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

*Este trabajo fue presentado en el XLV Congreso Nacional de Ciencias
Fisiológicas celebrado del 8 al 12 de Septiembre del 2002
Colima, Col. México.*



TABLA DE CONTENIDO

<i>ABREVIATURAS</i>	i
<i>I. INTRODUCCIÓN</i>	1
<i>II. ANTECEDENTES TEÓRICOS</i>	2
<i>III. HIPÓTESIS</i>	48
<i>IV. OBJETIVOS</i>	49
<i>V. MATERIAL Y MÉTODOS</i>	50
<i>VI. RESULTADOS</i>	57
<i>VII. DISCUSIÓN DE RESULTADOS</i>	65
<i>VIII. CONCLUSIONES</i>	72
<i>IX. REFERENCIAS</i>	73

TEBES CON
FALLA DE ORIGEN



ABREVIATURAS

5-HPETE	Ácido hidroperoxitetraenoico
5-HT	5- Hidroxitriptamina
AAE	Aminoácidos excitatorios
AINEs	Analgésicos antiinflamatorios
ABC	Área bajo la curva
ADC	Arginina descarboxilasa
ALF	Fascículo anterolateral ascendente
AMPA	Ácido α -amino-metil-isoxazolpropiónico
AMPc	Adenosín monofosfato ciclico
ANOVA	Análisis de varianza
ANTI-TNF- α	Antifactor de necrosis tumoral α
APA	Apamina
CaM-Kinase II	Calcio-calmodulina cinasa
CDR	Curva dosis respuesta
CGRP	Péptido relacionado al gen de la calcitonina
COX	Ciclooxigenasa
CYP2C	Citocromo de la familia 2C
CYP3A	Citocromo de la familia 3A
D-NAME	Ester metílico de la N(G)-nitro-D-arginina
DAG	Diacylglicerol



DIC	Diclofenaco
GABA	Ácido γ -aminobutírico
GD	Glutamato descarboxilasa
GC	Guanilato ciclasa
GLI	Glibenclamida
GMPc	Guanosín monofosfato cíclico
GTP	Guanosín trifosfato
HPLC	Cromatografía de líquidos de alta eficiencia
IASP	Asociación internacional para el estudio del dolor
i.c.v.	Intracerebroventricular
ISON	Óxido nítrico sintasa inducible
i.pl.	Intraplantar
IP ₃	Inositol trifosfato
i.t.	Intratecal
K _{ATP}	Canal de potasio dependiente de adenosín trifosfato
L-NAME	Éster metílico de la N(G)-nitro-L-arginina
L-NMMA	N(G)-monometil-L-arginina
MDH	Asta dorsal de la médula
MRF	Retículo mesencefálico de formación
NGC	Núcleo gigantocelular
NGF	Factor de crecimiento neural
NMC	Núcleo magnocelular
NMDA	N-metil-D-aspartato



nSON	Óxido nítrico sintasa neuronal
NRD	Núcleo rafé dorsal
NRM	Núcleo rafé magno
ON	Óxido nítrico
PAG	Sustancia gris pericueductal
PE-10	Polietileno número 10
PG	Prostaglandina
PKA	Proteíncinasa A
PKC	Proteíncinasa C
PLA ₂	Fosfolipasa A ₂
PLC	Fosfolipasa C
PONS	Núcleo <i>locus coeruleus</i>
SI	Corteza somatosensorial primaria
SII	Corteza somatosensorial secundaria
SK _{CA}	Canal de potasio dependiente de calcio de baja conductancia
SMT	Tracto espinomesencefálico
SNC	Sistema nervioso central
SRT	Tracto espinorreticular
STT	Tracto espinotalámico
TXA ₂	Tromboxano A ₂



I. INTRODUCCIÓN

En el presente trabajo están contenidos los estudios que se realizaron para determinar la posible participación del sistema L-arginina-ON-GMPC-canales K_{ATP} y SK_{Ca} a nivel espinal y periférico en el efecto antinociceptivo del diclofenaco administrado por vía oral. Hasta la fecha no existe evidencia acerca de que los AINEs logran alcanzar concentraciones efectivas a nivel espinal y existe muy poca evidencia acerca de que alcanzan concentraciones efectivas a nivel periférico (Granados-Soto et al., 1995; Dominkus et al., 1996; Tegeder et al., 1999) después de su administración oral, aún cuando en la clínica la administración oral es su principal vía de administración. La administración oral de diclofenaco produjo un efecto antinociceptivo de manera dependiente de la dosis en la prueba de la formalina. La administración intratecal e intraplantar de L-NAME (un inhibidor no selectivo de la SON) (Rees et al., 1990; Björkman, 1995; Ferrier et al., 2001; Kankuri et al., 2001; Sayan et al., 2001), glibenclamida (un bloqueador de canales K_{ATP}) (Ashcroft et al., 1987; Belles et al., 1987; Sturgess et al., 1985; Cook, 1988; Sturgess et al., 1988) y apamina (un inhibidor de canales SK_{Ca}) (Pennefather et al., 1985; Lang y Ritchie, 1990; Zhang y Mcbain, 1995; Stocker et al., 1999), pero no D-NAME (enantiómero inactivo del L-NAME) revirtieron el efecto antinociceptivo de la administración oral del analgésico. En resumen, los resultados de este estudio sugieren que el diclofenaco alcanza concentraciones efectivas a nivel espinal y periférico después de su administración oral y que a estos niveles la estimulación del sistema L-arginina-ON-GMPC-canales K_{ATP} y SK_{Ca} es posiblemente un mecanismo que participa en su efecto antinociceptivo y son la primer evidencia que sugiere que un AINE logra alcanzar concentraciones efectivas a nivel espinal después de su administración oral y que a este nivel ejerce un mecanismo que participa en su efecto antinociceptivo.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



II. ANTECEDENTES TEÓRICOS

1. DOLOR

A. Generalidades

El enigma alrededor de la etiología del dolor data desde el origen del hombre. La interpretación más antigua del dolor lo describe como "un castigo por ofender a los dioses". La palabra "pain" dolor en el idioma inglés, deriva del latín "poene" y del griego "poine", que significan penalidad o castigo (Dallenbach, 1939). En la antigüedad el dolor también era considerado como el producto de algunos sentimientos más que como una sensación y era clasificado como "una pasión del alma" principalmente originada en la cabeza.

Aunque el dolor ha sido fuente de interés desde el origen del hombre, el estudio de su etiología no fue sistemático sino hasta la llegada de Aristóteles (384-322 AC). La teoría aristotélica atribuyó el dolor a un excesivo estímulo procedente de la piel, llevado por la sangre a la cabeza donde era interpretado. Descartes (1596-1650) fue uno de los primeros en disentir del concepto aristoteliano, postulando al dolor como originario de "vibraciones en la piel" debidas a un estímulo nocivo, el cual activa "delicadas fibras unidas a algunas zonas de la piel que viajan al cerebro, llegando a la glándula pineal" (Descartes, 1901). Aunque Galeno (131-201? AC) y Vesalio (1514-1564) también atribuyeron la sensación de dolor al cerebro, el concepto de Aristóteles prevaleció cerca de 2000 años.

Se han propuesto muchas definiciones de dolor. Sin embargo, fue hasta 1960 que se consideró como una respuesta sensorial al daño tisular y en ese entonces existía poca información acerca de su componente afectivo. En 1979 La Organización Internacional para el Estudio del Dolor (IASP, *International Association for the Study of Pain*) definió al dolor 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). Hasta la fecha esta definición de dolor se considera la más adecuada, ya que presenta un cambio con respecto a las anteriores al introducir dos nuevos conceptos. En primer lugar: considera que el dolor no es sólo una respuesta sensorial al daño tisular, sino que está integrada además por componentes emocionales y subjetivos; en segundo lugar puede producirse sin causa somática que lo justifique.

B. Componentes del dolor

La experiencia de dolor se ha dividido en dos componentes (Melzack y Casey, 1968).

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 componente localizante y discriminativo ayuda al paciente a describir la naturaleza, intensidad y localización del dolor, lo que va a proporcionar claves para el diagnóstico del estado patológico que causa el dolor. Por otra parte, el componente afectivo y de alerta se considera subjetivo ya que experimentalmente se ha observado que mucha gente reporta dolor en ausencia de daño al tejido o alguna otra causa patológica parecida (Forth et al., 1995).

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). El dolor



normalmente pone en evidencia un daño tisular, puede jugar un papel protector al prevenir los movimientos riesgosos en el caso de una fractura. Sin embargo, después de un periodo de tiempo finito, si la causa no es atendida, la prolongación de la sensación dolorosa degenera en resultados adversos y las respuestas neurohumorales complejas que inicialmente ayudan a mantener la homeostasis en la zona del daño, pueden causar morbilidad e incluso mortalidad (Cousins, 1994).

La respuesta al daño tisular es similar, no importa si es resultado de una incisión quirúrgica, una lesión traumática, una quemadura o algún padecimiento de órganos internos. Cabe esperar que la respuesta sea proporcional a la magnitud del trauma en el tejido. Sin embargo, existe una gran variabilidad individual en la respuesta al estímulo, probablemente relacionada con factores tanto fisiológicos como psicológicos (Wall, 1979).

C. Clasificación del dolor

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 et al., 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 a este proceso (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).

Björkman (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 (Cerveró 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 (Beric, 1997) o fibromialgia (Butler et al., 1997). Este tipo de dolor, no es un proceso autolimitado por lo que puede persistir por meses o incluso años (Cerveró y Laird, 1995), se ha asociado a múltiples comportamientos 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).

En general, se acepta que existen dos tipos de sensaciones de dolor, de acuerdo a sus características fisiológicas (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. 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 (nociceptores), 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 (abreviación de nocirreceptor) 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 (Bessou y Perl, 1969).

Los nociceptores se encuentran anatómicamente distribuidos en tres zonas principales: la piel, las estructuras musculoesqueléticas y las vísceras. Estos receptores traducen los estímulos mecánicos, térmicos y químicos en una serie de potenciales de acción que transmiten a lo largo de sus axones hasta la médula espinal. Debido a su capacidad de responder a estímulos dolorosos, los nociceptores también han sido llamados "receptores del dolor", lo cual no es estrictamente correcto, ya que no todas las sensaciones dolorosas son debidas a la activación de este grupo de receptores, ni toda estimulación de los nociceptores produce siempre una sensación dolorosa.




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

Los nociceptores se pueden clasificar en función de: 1) su respuesta a diferentes tipos de estímulos; 2) propiedades y velocidad de conducción de sus axones periféricos; 3) las diferentes respuestas que presentan ante un estímulo (Srinivasa et al., 1988) y 4) su localización.

A continuación se presenta la clasificación de los nociceptores en función de sus propiedades y velocidad de conducción de sus axones periféricos (Tabla 1).



Tabla 1. Clasificación y características principales de las fibras nerviosas de nociceptores cutáneos.

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

Modificado de García y Herrero (1998): A) Fibra mielinizada; B) Fibra poco mielinizada y C) Fibra no mielinizada.

Clasificación de los nociceptores en función de su localización:

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

A. Nociceptores cutáneos

Por su accesibilidad los nociceptores cutáneos hasta el momento han sido los más estudiados. Estos 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).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Presentan tres propiedades fundamentales:

1. Un alto umbral a la estimulación cutánea (se activan sólo frente a estímulos intensos).
2. Capacidad para codificar la intensidad de los estímulos en el rango nocivo.
3. Falta de actividad espontánea en ausencia de un estímulo previo.

De acuerdo a los estímulos que son capaces de traducir y de las propiedades de sus axones se pueden clasificar en 4 tipos (Tabla 2).

Tabla 2. Clasificación y características principales de los nociceptores cutáneos.

Tipo de Nociceptor	Tipo de Fibra	Tipo de Estímulos	Campo receptivo
Mecanociceptores o Mecanorreceptores de umbral alto (Fitzgerald y Lynn, 1977)	A- δ	Mecánicos pero pueden sensibilizarse con estímulos térmicos repetitivos	$\cdot 1 \text{ mm}^2$
Mecanotermociceptores mielinizados	A- δ	Térmicos ($>45^{\circ}\text{C}$) Mecánicos	$< 5 \text{ mm}^2$
Nociceptores Polimodales C	C	Térmicos ($>38^{\circ}\text{C}$) Mecánicos ($>1\text{g}$) Químicos (ácidos, histamina o KCl)	17 mm^2
Nociceptores de Frío	A- δ o C	Frío	$1-145 \text{ mm}^2$

Tabla elaborada a partir de datos de Fields y Martin (1994) y Hyman y Cassen (1995).

B. 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.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



C. Nociceptores articulares

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

D. 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 Martin, 1994).

E. Nociceptores óseos

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

F. 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).

3. FISIOLÓGÍA 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 1), donde se encuentra el primer centro de relevo (García y Herrero, 1998).

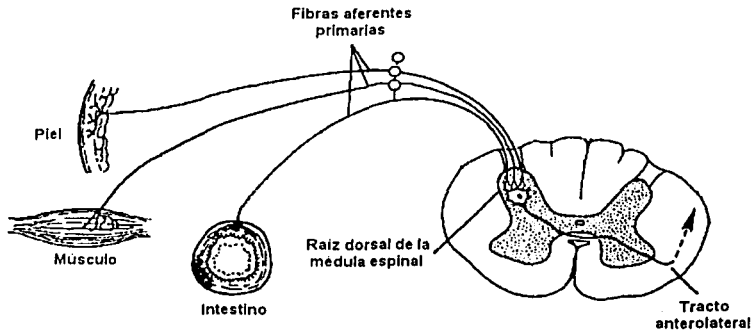


Figura 1. Esquema de la inervación cutánea, muscular y visceral por fibras aferentes nociceptivas, su relevo en la médula espinal y origen del sistema ascendente anterolateral. Modificado de Jesell y Kelly (1991).

Cada axón aferente primario contacta con muchas neuronas medulares, y cada neurona medular recibe impulsos convergentes de muchas fibras aferentes primarias (Fields y Martin, 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 2), 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).

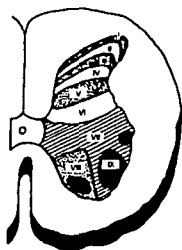


Figura 2. Clasificación de la sustancia gris de la médula espinal a nivel de la quinta vértebra lumbar según Rexed (1952).

A. 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 3). 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.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

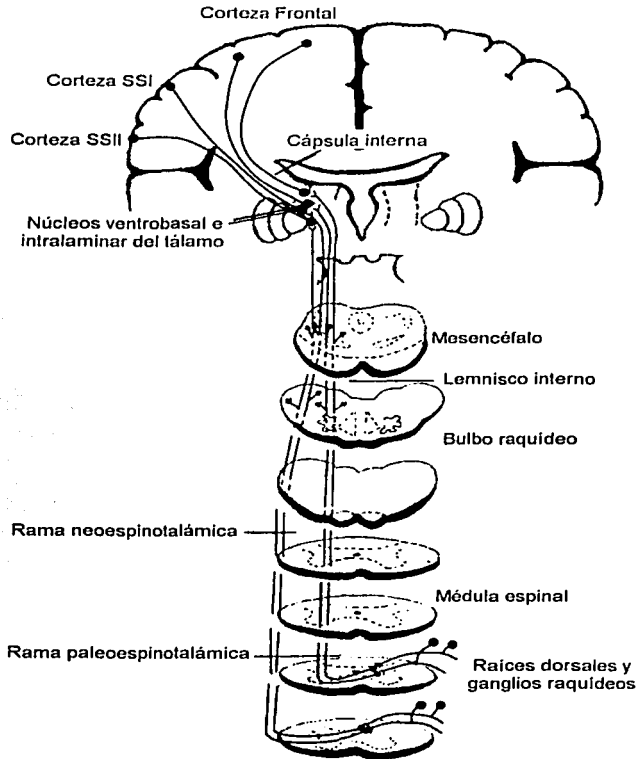
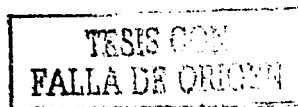


Figura 3. Representación del sistema ascendente anterolateral. Modificado de Guyton y Hall (1996).

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 espinoreticular 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 espinoreticular 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.

B. 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 Martin, 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 Martin, 1994).

La corteza somestésica 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).

C. Vías de modulación del dolor

Las vías descendentes permiten al organismo conocer y responder a los estímulos nocivos, modulando o inhibiendo el estímulo (Akil et al., 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 et al., 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 Martin, 1994). Dicho sistema consta de cuatro niveles (Figura 4A).

El sistema fascículo anterolateral ascendente (ALF) está integrado por los tractos espinotalámico, espinoreticular y espinomesencefálico; se conecta en el núcleo del rafé magno (NRM), núcleo magnocelular (NMC), núcleo gigantocelular (NGC) y la sustancia gris pericueductal (PAG). Así como con el núcleo del rafé dorsal (NRD) y el retículo mesencefálico de formación (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).

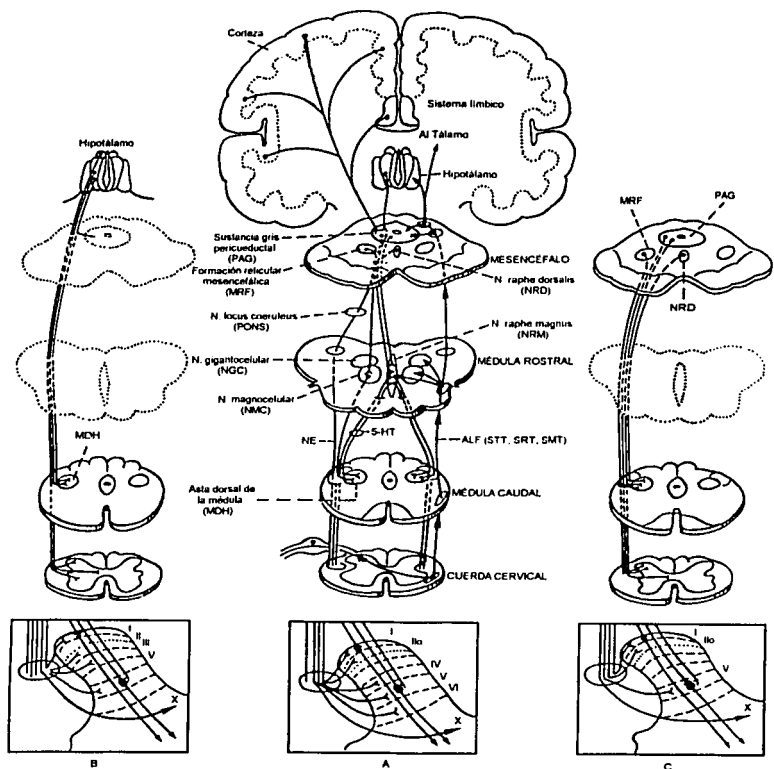


Figura 4. Sistemas de modulación nociceptiva: A) Sistema anterolateral ascendente (ALF); B) Sistema hipotálamo-espinal descendente y C) Sistema PAG-espinal. Modificado de Bonica (1987).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



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 4B); y 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).

4. NEUROREGULADORES

La actividad y metabolismo de las fibras sensoriales es profundamente alterada 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 (Tabla 3). 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 et al., 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 et al., 1978; Stimmel, 1983).

Tabla 3. Principales neuroreguladores implicados en la respuesta del dolor

Acetilcolina	Glicina	Norepinefrina	Factor de crecimiento neural
Angiotensina	Óxido nítrico	Serotonina	Neurotensina
Dopamina	Encefalina	Colecistocinina	Prostaglandinas
Bradicinina	Dinorfina	β -endorfinas	Somatostatina
Agmatina	Histamina	Glutamato	Sustancia P
Epinefrina	Vasopresina	GABA	

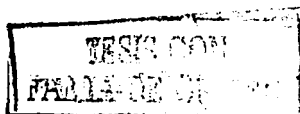
Tabla elaborada con datos de Stimmel (1983).

A. 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 et al., 1992; Dray, 1995).

B. 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).





C. 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).

D. 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 et al., 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 Chaouch, 1987).

E. Serotonina

La 5-hidroxitriptamina (5-HT) es liberada por neuronas serotoninérgicas que se proyectan del PAG al núcleo del rafé magno y de ahí a las láminas I, II, IV y V del asta dorsal (Roberts, 1984; Ruda et al., 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).

F. 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, 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 en la actividad fagocitaria de neutrófilos y macrófagos. Todos estos efectos provocan que la sustancia P tenga un efecto hiperalgesico (Dray, 1995).

G. Ácido γ -aminobutírico (GABA)

El GABA es el neurotransmisor inhibitor más abundante en el SNC, es sintetizado 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 et al., 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 et al., 2002) y un receptor metabotrópico (GABA_B) acoplado a través de proteínas G a canales de K⁺ y Ca²⁺ (Bowery, 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).



H. Bradicinina

Junto con la caliceína, 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 caliceínas 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 et al., 2000).

I. 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 et al., 1994). El NGF afecta la sobrevivencia de las células manifestándose como una disfunción neuronal degenerativa con sensaciones anormales (Anand, 1995).

J. 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 de 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 rafé magno y el núcleo reticular paragigantocelular (Glazer et al., 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).

K. Prostaglandinas

Junto con los leucotrienos y tromboxanos, las prostaglandinas (PGs) 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 et al., 2000), son moléculas que se sintetizan a partir de fosfolípidos de membrana por activación de la lipólisis mediante la acción de la fosfolipasa A₂ y fosfolipasa C, 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 et al. (2000) propone tres isoformas para la COX, sólo se han estudiado ampliamente dos de ellas: La COX₁ o "constitutiva", descrita como la responsable de la biosíntesis de PGs importantes en la homeostasis y la COX₂ o "inducible" que aparece en respuesta a daño tisular (Vanegas y Schaible, 2001).

La liberación de las prostaglandinas PGD₂, PGE₂, PGF_{2α} y PGI₂ ocurre en la médula espinal y la raíz ganglionar. Estas 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 y CGRP que a su vez incrementan la liberación de prostaglandinas produciendo hiperalgesia y alodinia (Vanegas y Schaible, 2001).

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

L. Noradrenalina

La noradrenalina es sintetizada a partir de dopamina por la dopamina β-hidroxilasa, es almacenada en vesículas y liberada por el influjo de calcio en la neurona



(Lefkowitz et al., 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 et al., 1986).

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

M. 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- β) y diámetro pequeño (A- δ) y son liberados por estímulos tanto nociceptivos como no nociceptivos (Kangrga y Rnadac, 1991).

Las acciones de los AAE están mediadas por distintos receptores (Watkins et al., 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 et al., 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 (NR₁, NR_{2A-D}) se encuentran ligados a canales de Ca²⁺ y están relacionados con la estimulación nociceptiva mediada por fibras A δ y C



mientras que los receptores AMPA (GluRs 1-4) y kainato (KA-R, GluRs 5-7) lo están a canales de K^+ y Na^+ principalmente y se activan por estímulos de bajo umbral mediante fibras A- β (MacDermott et al., 1986; Anonsen y Wilcox, 1987).

La unión del glutamato a receptores NMDA permite que se active la entrada de calcio, 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 proteínas 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 Ca^{2+} 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 et al., 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 calcio aumentan su actividad o tiempo de apertura (Chen et al., 1988).

N. 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, la fiebre, la neurotoxicidad, la neuroplasticidad y la nocicepción, además de modular secreciones endócrinas de hormonas (hormona del crecimiento, insulina, oxitocina, vasopresina, etc.) (Brunetti, 1994).

Relacionado al principio con el factor relajante derivado del endotelio (Marletta et al., 1998), el ON 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 ON es sintetizado durante la conversión enzimática de L-arginina a L-citrulina por la ON sintasa neuronal (nSON), una enzima localizada en neuronas del SNC y que requiere calcio para activarse, o por la ON sintasa inducible (iSON) localizada en la glia y que requiere activación por endotoxinas y citocinas (Meller y Gebhart, 1993) (Figura 5).

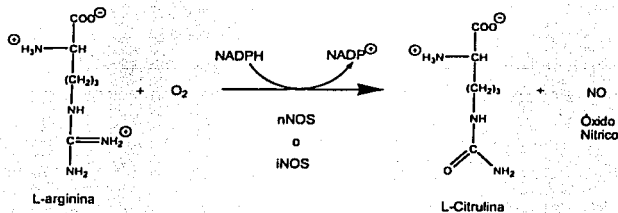


Figura 5. Representación química de la conversión enzimática de la L-arginina a L-citrulina.

El ON es sintetizado enzimáticamente en el SNC, en estructuras post-sinápticas, en respuesta a la activación de receptores NMDA (Garthwaite, 1991). Los receptores NMDA provocan la apertura de canales de calcio, incrementando la concentración intracelular del ion. El calcio se une a la calmodulina formando un complejo necesario para que la SON lleve a cabo la síntesis de ON. El ON sintetizado activa



la guanilato ciclasa (GC), provocando un aumento en los niveles de GMPc y la activación de varias protein-quinasas (Moncada et al., 1989).

Actualmente existe controversia sobre la función del ON en la transmisión dolorosa, ya que se han reportado efectos contradictorios. Por una parte, se ha sugerido que aparece en el foco inflamatorio, liberado por macrófagos activados (Jorens et al., 1995). En experimentos preliminares, Reeh et al. (1991) observaron la activación y sensibilización significativa de nociceptores cuando se impregnaban a los campos receptivos cutáneos con soluciones de concentraciones precisas de ON gaseoso. Otro estudio determina que la administración intradérmica de soluciones de ON causa dolor en humanos (Holthusen y Arndt, 1994). También se ha reportado que la administración intratecal de L-arginina y NMDA produce una facilitación rápida y transitoria del reflejo doloroso que se bloquea por inhibidores de la síntesis de ON (éster metílico de la N(G)-nitro-L-arginina, L-NAME) y por inhibidores de la guanilato ciclasa soluble (azul de metileno, MB) (Meller et al., 1992).

En contraposición, también se ha reportado que la administración local de donadores de ON (nitroprusiato de sodio y nitroglicerina) producen analgesia y reducción del edema en diversos estados dolorosos (Ferreira et al., 1992; Duarte y Ferreira, 1992) y que la administración intracerebroventricular (i.c.v.) de L-arginina, un precursor de la síntesis de ON, produce un efecto analgésico en ratones (Kawabata et al., 1992) y en pacientes con varios tipos de dolor crónico (Harima et al., 1991).

1. INHIBIDORES DE LA SON

Existe una considerable variedad de inhibidores de la SON que han permitido determinar la participación de la vía L-arginina-ON en la actividad biológica de diferentes fármacos. Entre los más utilizados se encuentran el L-NAME, la N(G)-nitro-L-arginina (L-NNA) y la N(G)-monometil-L-arginina (L-NMMA).



a. L-NAME

El éster metílico de la N(G)-nitro-L-arginina (L-NAME) ó L-ornitina-N⁵-[imino(nitroamino)metil]-metil éster (Figura 6A) es un inhibidor no selectivo de la SON (Rees et al., 1990; Björkman, 1995; Ferrier et al., 2001; Kankuri et al., 2001; Sayan et al., 2001) (Figura 7).

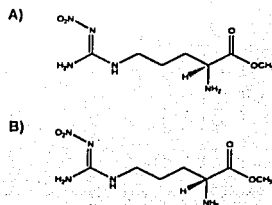


Figura 6. Estructura química de: A) L-NAME y B) D-NAME.

b. D-NAME

El éster metílico de la N(G)-nitro-D-arginina (D-NAME) ó D-ornitina-N⁵-[imino(nitroamino)metil]-metil éster (Figura 6B) es el enantiómero del L-NAME y no posee ninguna actividad biológica (enantiómero inactivo).

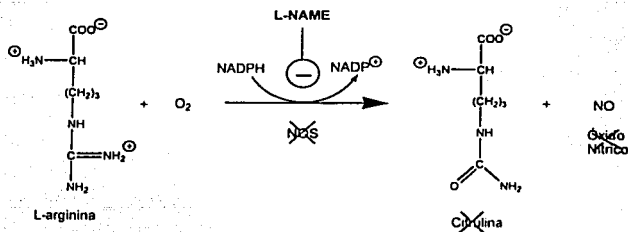


Figura 7. Representación química de la inhibición de la NOS por L-NAME.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



5. CANALES IÓNICOS

La transducción de los estímulos nocivos por las terminales de los nervios periféricos (nociceptores) y la transmisión de estas señales a lo largo de sus axones en forma de potenciales de acción, depende de la participación combinada de diferentes canales iónicos: sodio (Na^+), potasio (K^+) y calcio (Ca^{2+}) (Alberts, 2002).

Los canales iónicos forman parte de una familia de proteínas transmembranales que forman poros llenos de agua. A través de estos canales pasan 10^6 iones por segundo (velocidad más de 100 veces mayor que el transporte mediado por cualquier transportador conocido), presentan selectividad iónica (permiten que algunos iones puedan pasar y otros no), no están continuamente abiertos, es decir, tienen "puertas" que se abren generalmente en respuesta a perturbaciones específicas de la membrana (cambios de voltaje, estimulaciones mecánicas y uniones a diferentes ligandos) (Alberts, 2002).

A. Canales de K^+

Los canales de K^+ se clasifican de acuerdo a su número de poros y dominios (Tabla 4), se encuentran presentes en células que pueden ser o no excitadas. Los canales miembros de esta familia juegan un papel crítico en los procesos de señalización, excitabilidad neuronal, secreción de insulina, transporte epitelial de electrolitos, contracción del músculo esquelético, regulación de la liberación de neurotransmisores, frecuencia cardíaca y regulación del volumen celular. Durante la década pasada se logró la clonación de alrededor de 50 genes humanos que codifican para diferentes canales de K^+ . Así mismo, se logró precisar sus propiedades biofísicas, la estequiometría de sus subunidades, su conformación espacial, y su modulación por ligandos y segundos mensajeros (Shieh, 2000). Hasta la fecha se han descrito varios ligandos que modulan como agonistas o antagonistas la actividad de los canales de K^+ (Tabla 4).



Tabla 4. Clasificación general de canales de potasio.




CLASIFICACIÓN GENERAL	TIPO DE CANAL	NOMENCLATURA	MODULADORES		
			ANTAGONISTAS (BLOQUEO)	AGONISTAS (APERTURA)	
6-TM, UN PORO A) 	SENSIBLES A VOLTAJE	CANAL A	K_A	4-AP, QUINIDINA	-
		RECTIFICADORES RETARDADOS	K_V	4-AP, DENDROTOXINA	-
		RECTIFICADORES RETARDADOS RÁPIDOS	K_{VF1}	DOFETILIDA, QUINIDINA	-
		RECTIFICADORES RETARDADOS LENTOS	K_{VF2}	CROMANOL 293B	-
	SENSIBLES A Ca^{2+}	DE CONDUCTANCIA ALTA	BK_{Ca}	CARIBDOTOXINA, TEA	17 β -ESTRADIOL
		DE CONDUCTANCIA INTERMEDIA	IK_{Ca}	CARIBDOTOXINA, CLOTRIMAZOL	1-ETIL-2-BENZIMIDAZOLINA
		DE CONDUCTANCIA PEQUEÑA	SK_{Ca}	APAMINA, (+)-TUBOCURARINA	-
	CORRIENTE M	K_M	SUSTANCIA P, LINOPRIDINA	-	
2-TM, UN PORO B) 	RECTIFICADORES ENTRANTES (RE)	RE	K_{IR}	Ba^{2+} , Cs^+ , TERTIAPINA	-
		SENSIBLES A ATP	K_{ATP}	GLIBENCLAMIDA, TOLBUTAMIDA	DIAZOXIDO, PINACIDIL
4-TM, 2 POROS C) 	DÉBIL RECTIFICACIÓN ENTRANTE	TWIK, THIK-1	Ba^{2+} , QUININA, HALOTANO	-	
		TASK	LIDOCAINA, BUPIVACAINA	HALOTANO, CLOROFORMO	
		TREK, TRAAK	QUINIDINA, Gd^{3+}	HALOTANO, CLOROFORMO	

Tabla elaborada con datos de Catterall (2002): A) Canal de K^+ con un poro y seis dominios transmembranales; B) Canal de K^+ con un poro y dos dominios transmembranales; C) Canal de K^+ con dos poros y cuatro dominios transmembranales.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN



El K^+ es el catión que se encarga de equilibrar las cargas que aportan los aniones intracelulares fijos y es quien establece el potencial de reposo de la membrana plasmática de la célula nerviosa cuando alcanza su potencial de equilibrio. La concentración extracelular e intracelular de K^+ al alcanzar su potencial de equilibrio es alrededor de 5 mM y 140 mM, respectivamente. Cuando se abren los canales de K^+ , éste tiende a salir impulsado por gradiente de concentración (Figura 8) y a medida que va fluyendo al exterior de la célula deja detrás suyo una carga neta negativa, aumentando así la diferencia entre el potencial de reposo y el umbral de potencial de acción (Alberts, 2002).

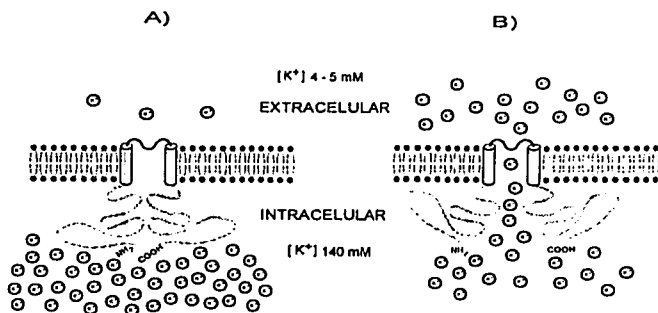


Figura 8. Representación gráfica de un canal de K^+ de dos dominios transmembranales con un poro: A) Canal de K^+ cerrado; B) Canal de K^+ abierto.

La importancia farmacológica del estudio de canales de K^+ radica en su apertura por diversos grupos de fármacos. Esto ocasiona la hiperpolarización de la membrana plasmática y la reducción de la excitabilidad eléctrica de diversos grupos de células, lo cual proporciona un amplio espectro de potencial aplicación terapéutica (Ashcroft et al., 1987; Shieh, 2000).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1. BLOQUEADORES DE CANALES DE K^+

A los agentes que restringen el movimiento del K^+ se les conoce de manera indiferente como bloqueadores, antagonistas o inhibidores. El término inhibidor no tiene ninguna implicación mecánica y ha sido adoptado de manera indiferente para todos los agentes que modulan el flujo de K^+ (Gillian y Weston, 1993; Cook, 1988).

a. Glibenclamida

La glibenclamida (gliburida) ó (5-cloro-N-[2-[[[(ciclohexil-amino)carbonil]amino]-sulfonil]fenil]etil)-2-metoxibenzamida) (Figura 9A) es una sulfonilurea ampliamente utilizada para el tratamiento de la diabetes mellitus tipo II (no insulino dependiente) (Gillian y Weston, 1993; Shieh, 2000). Inhibe la apertura de canales de K^+ sensibles a ATP (K_{ATP}) en las células pancreáticas β , estimulando la secreción de insulina (Ashcroft et al., 1987; Belles et al., 1987; Sturgess et al., 1985; Cook, 1988; Sturgess et al., 1988).

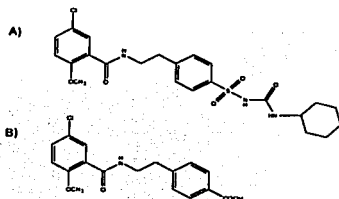


Figura 9. Estructura química de: A) Glibenclamida y B) Meglitinida.

La glibenclamida es el más potente de los fármacos hipoglucemiantes, esta cualidad se le atribuye a que posee como grupo sustituyente a un derivado de la meglitinida (hipoglucemiante derivado del ácido benzoico) (Figura 9B) además de su grupo funcional sulfonilurea que la capacitan para inhibir canales de K_{ATP} por interacción



con un sitio adicional que no reconocen otros fármacos derivados de sulfonilureas (Garrino et al., 1986; Garrino et al., 1988).

b. Apamina

La apamina es una neurotoxina aislada del veneno de la abeja, es un polipéptido de 18 aminoácidos (Haux et al., 1967) (Figura 10). Tiene la capacidad de inhibir la apertura de canales de K^+ activados por Ca^{2+} de baja conductancia (SK_{Ca}) en varios tipos de células (particularmente en neuronas) (Pennefather et al., 1985; Lang y Ritchie, 1990; Zhang y Mcbain, 1995; Stocker et al., 1999).

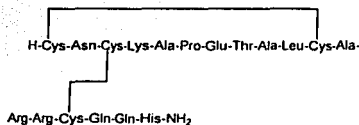


Figura 10. Secuencia de aminoácidos de la apamina según Latoxan, 2002.

6. MODELOS PARA EVALUAR LA NOCICEPCIÓN EN ANIMALES

El conocimiento científico concerniente a la percepción del "dolor en animales" es limitado y se ha obtenido por analogías basadas en la anatomía comparativa, fisiología, patología y por inferencias basadas en respuestas subjetivas del dolor (Erickson y Kitchell, 1984). 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 que 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.



Se han desarrollado una gran variedad de modelos experimentales para determinar la actividad antinociceptiva de fármacos en animales de laboratorio con el fin de desarrollar, seleccionar y predecir la actividad farmacológica de analgésicos, así como estudiar y comprender los mecanismos de acción de los fármacos que actúan a nivel periférico y central. La mayoría de los modelos experimentales desarrollados hasta ahora no son ideales (Le Bars et al., 2001). Sin embargo, han sido muy útiles en la farmacología para evaluar y caracterizar efectos analgésicos.

A. Modelos de dolor con estímulos de corta duración (Dolor fásico)

Involucran un corto período de estimulación, son empleados para producir principalmente dolor somático, se estimula una área superficial mínima 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 et al., 2001).

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 et al., 2001).

a. 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 et al., 1959). En ambos casos se cuantifica el tiempo de reacción del animal.



b. 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 et al., 1988).

c. Prueba "Hot Plate"

Originalmente descrita por Woolfe y MacDonald (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.

d. Prueba "Cold Plate"

Esta prueba es usada principalmente en modelos de dolor neuropático (Jasmin et al., 1998).

2. PRUEBAS BASADAS EN UN ESTÍMULO MECÁNICO

Estas pruebas poseen la ventaja de poder graduar 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 et al., 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



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 et al., 2001).

a. Pruebas que utilizan descargas eléctricas largas

Estas pruebas presentan 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 chilla 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.

b. Pruebas que utilizan choques eléctricos o descargas eléctricas cortas

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

B. Modelos de dolor con estímulos de larga duración (Dolor tónico)

Involucran la administración de sustancias algésicas 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 et al., 2001).



1. ESTIMULACIÓN A ÓRGANOS

Estas pruebas sirven para estudiar el dolor visceral, involucran la administración de sustancias algésicas directamente a diferentes órganos, como el colón (Miampamba et al., 1994), el útero (Wesselmann et al., 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. INYECCIÓN INTRAPERITONEAL O "WRITHING TEST"

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

3. INYECCIÓN INTRADERMAL

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

4. PRUEBA DE LA FORMALINA

El modelo de la formalina 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 (formaldehído en un intervalo 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 derecha 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 (biting), lamer (licking) y sacudir (flinching/shakes) la pata inyectada, siendo este último el parámetro más utilizado para cuantificar el grado de dolor (Dubuissou 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 es bifásica. La primera fase (aguda o neurogénica) inicia después de la inyección y dura entre 3 y 5 minutos y se debe a la estimulación directa de nociceptores, principalmente fibras C. La segunda fase (tónica o inflamatoria) 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 et al., 1992). Se propone una temperatura de 22-23°C (Rosland, 1991) para ratones y 25-27°C para ratas (temperatura estandarizada en el laboratorio).

C. Desventajas de los modelos para evaluar la nocicepción en animales

A pesar de que los modelos descritos anteriormente han sido de gran utilidad para el estudio de diversas sustancias analgésicas, presentan una serie de desventajas:



1. El medicamento es administrado antes de la aplicación del estímulo nociceptivo.
2. El estímulo nociceptivo aplicado en forma repetida, puede causar daño a los tejidos, los cuales al ser dañados, ya no responden igual que al principio.
3. Las respuestas a evaluar son generalmente subjetivas.
4. Como no hay reporte verbal de la sensación del dolor, la respuesta observada puede ser usada para indicar que un estímulo es doloroso aunque no exista la certeza de que así sea.
5. Es frecuente que se presenten respuestas de aprendizaje o condicionamiento si se aplica el estímulo más de una vez sobre el mismo animal, lo que limita una caracterización del curso temporal del efecto analgésico en un mismo sujeto experimental, después de la administración del fármaco.

7. ANALGÉSICOS

Un analgésico es una sustancia que a través de su acción sobre el SNC o bien en la periferia, sirve para reducir o abolir el dolor, sin producir inconsciencia. Los fármacos analgésicos usados comúnmente se pueden dividir en dos grupos: analgésicos narcóticos u opioides que se emplean generalmente para el tratamiento del dolor intenso o crónico y analgésicos no narcóticos o antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) que son los más utilizados en la clínica (Kuhar y Pasternak, 1984). Aunque es común también el empleo de fármacos anticonvulsivantes, antiarrítmicos, anestésicos y antidepressivos tricíclicos para aliviar el dolor (Ashburn y Staasts, 1999).



A. 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 importante.

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 y North, 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 et al., 2001).

B. Analgésicos anti-inflamatorios no esteroideos (AINEs)

Los analgésicos "tipo aspirina" o AINEs son un grupo de fármacos con acciones similares que ejercen sus efectos por uno o más mecanismos de acción, pero su estructura química es diversa. Los fármacos más utilizados son el ibuprofeno, naproxeno, ketoprofeno, indometacina, sulindaco, piroxicam, meloxicam, nimesulida,



ketorolaco y diclofenaco (Björkman, 1995; Vaile y Davis, 1998). En la práctica clínica se utilizan en el alivio del dolor de leve a moderado. Tradicionalmente se ha descrito que su mecanismo de acción es a través de la inhibición de la ciclooxigenasa 1 (COX-1; constitutiva) y ciclooxigenasa 2 (COX-2; inducida en el sitio de la inflamación), que trae como consecuencia, la reducción de la síntesis de prostaglandinas (PGs) y tromboxanos (Figura 11).

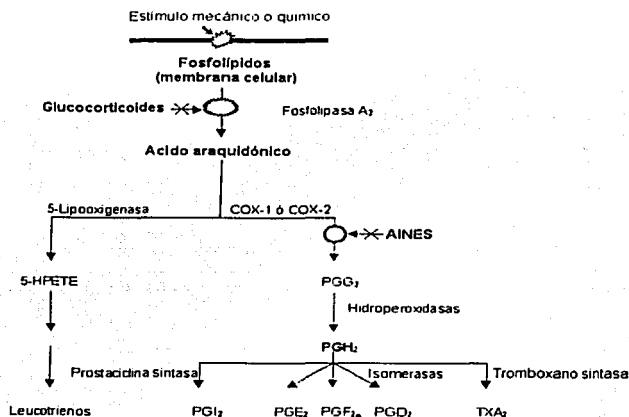


Figura 11. Vía catabólica del ácido araquidónico.

Se cree que la inhibición de la COX-2 media (cuando menos parcialmente) las acciones antipiréticas, analgésicas y anti-inflamatorias de los AINEs, pero la inhibición simultánea de la COX-1 ocasiona efectos colaterales no deseados, en particular los que culminan en úlceras gástricas (Forth et al., 1995). El principal sitio de acción de los AINEs es a nivel periférico. Sin embargo, algunos resultados experimentales sugieren que otros mecanismos y sitios de acción pueden estar involucrados (Cashman, 1996).



Recientemente se han propuesto mecanismos adicionales que contribuyen en el efecto analgésico de los AINEs, como el del sistema L-arginina-ON-GMPc (Duarte et al., 1990; Ferreira et al., 1991; Tonussi y Ferreira, 1994; Björkman, 1995; Granados-Soto et al., 1995b; López-Muñoz et al., 1996; Aguirre-Buñuelos y Granados-Soto, 2000; Lázaro-Ibáñez et al., 2001) y canales de potasio (Lázaro-Ibáñez et al., 2001; Ortiz et al., 2002) .

6. DICLOFENACO

El diclofenaco ó ácido o-[(2,6-diclo-fenil) amino] fenil acético (Figura 12) es un AINE derivado del ácido fenil acético, con actividad antiinflamatoria, analgésica y antipirética (Menassé et al., 1978; Todd y Sorkin, 1988), se emplea para el tratamiento del dolor inflamatorio reumático y no reumático (Todd y Sorkin, 1988). Su actividad antiinflamatoria, al igual que la de otros fármacos tipo aspirina, se atribuye a su potente capacidad de inhibir *in vitro* e *in vivo* a la COX (Oliw et al., 1978; Todd y Sorkin, 1988).

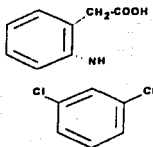


Figura 12. Estructura química del diclofenaco.

a. Actividad antiinflamatoria

Suprime la inflamación en diferentes modelos animales incluyendo el edema inducido por carragenina (Takashima et al., 1972; Tsurumi et al., 1973b; Krupp et al., 1975; Mörsdorf y Wolf, 1977; Menassé et al., 1978; Noguchi et al., 1984; Todd y Sorkin, 1988).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



b. Actividad analgésica

Es un analgésico efectivo en ratas y ratones, inhibe conductas dolorosas (contorsiones y agitación) inducidas por ácido etacrínico (Menassé et al., 1978), ácido acético (Takashima et al., 1972; Tsurumi et al., 1973a; Menassé et al., 1978; Noguchi et al., 1984; Todd y Sorkin, 1988), fenilbenzoquinona (Menassé et al., 1978) y levadura (Noguchi et al., 1984).

c. Actividad antipirética

Reduce la temperatura del cuerpo por 1.5°C en ratas con fiebre inducida por levadura (Menassé et al., 1978).

d. Mecanismos de acción

1. Efectos en el metabolismo del ácido araquidónico

In vitro, el diclofenaco es un potente inhibidor de la COX, ya que su administración causa una marcada reducción en la síntesis de prostaglandinas, prostaciclina y productos de tromboxano en vesículas seminales de oveja (Ku et al., 1975; 1985), vesículas seminales de cobayo (Krupp et al., 1976), vesículas seminales de toro (Taylor y Salata, 1976), células polimorfonucleares y macrófagos de rata (Ku et al., 1985). Por otra parte, aunque la administración de altas concentraciones de diclofenaco *in vitro* no inhibe a la fosfolipasa A₂ y tiene un efecto insignificante en las enzimas 5 y 15-lipoxigenasa, disminuye la disponibilidad intracelular del ácido araquidónico para la formación de productos que siguen el camino de la lipooxigenasa (leucotrienos y ácido 5-hidroxiicosatetraenoico), favoreciendo su reincorporación a la membrana celular (Ku et al., 1986). *In vivo*, el diclofenaco disminuye las concentraciones de PGF_{2α} y PGE₂ en la medula renal (Oliw et al.,



1978), PGE₂, 6-ceto-PGF_{1α} y PGI₂ en la mucosa gástrica de ratas y cobayos (Rainsford y Willis, 1982; Kobayashi et al., 1985).

2. Otros mecanismos que participan en el efecto analgésico del diclofenaco

Además de su efecto inhibitorio en la síntesis de protanoides, el diclofenaco aparentemente tiene otros mecanismos que participan en su efecto analgésico (Attal et al., 1988). Se ha sugerido que uno de los mecanismos que participan en el efecto analgésico del diclofenaco es la estimulación de la síntesis opioides endógenos (β -endorfinas) en el hipotálamo y la liberación de los mismos de la glándula pituitaria (Sacerdote et al., 1985; Vescovi et al., 1986; Björkman, 1995). En contraposición, existe evidencia de que la naloxona (un antagonista de receptores opioides) y la N-metil-nalorfina (un antagonista de receptores opioides periféricos) tienen la capacidad de bloquear el efecto antinociceptivo que se produce por la administración de morfina, pero no el efecto que se produce por la administración de diclofenaco (Tonussi y Ferreira, 1994).

Otro mecanismo que se ha sugerido es la activación de la transmisión serotoninérgica espinal, ya que el pretratamiento de ratas con paraclorofenilalanina (un inhibidor de la síntesis de serotonina), 5,7-dihidroxitriptamina (una neurotoxina que destruye selectivamente la serotonina de los cuerpos celulares), metiotepina y ritanserina (bloqueadores de receptores serotoninérgicos), reduce su antinociceptivo en un modelo de dolor visceral (Björkman, 1995).

También se ha sugerido que otro mecanismo que participa en su efecto antinociceptivo es la inhibición de la expresión de la L-selectina en la superficie de los neutrófilos. Esto reduce la adhesión de estos polimorfonucleares al endotelio vascular durante el proceso inflamatorio, evitando su migración al tejido dañado (Díaz-González et al., 1995).



Aunque aún no está aclarado el papel que desempeña el ON en la transmisión de procesos nociceptivos, se ha sugerido que otro mecanismo que participa en el efecto antinociceptivo del diclofenaco es la inhibición de la activación del sistema L-arginina-ON-GMPc a nivel espinal, ya que el pretratamiento de ratas con este fármaco administrado por vía intratecal (i.t.), bloquea de manera dependiente de la dosis la hiperalgesia inducida por la administración intratecal de N-metil-D-aspartato (NMDA), pero no la inducida por la administración intratecal de sustancia P (agonista de receptores NK₁, NK₂ y NK₃) o por el ácido DL- α -NH₂-2,3-dihidro-5-metil-3-oxo-4-isoxazolpropanoico (AMPA), además de que el efecto antinociceptivo del diclofenaco se revierte por la administración de L-arginina (sustrato natural de la SON), pero no por D-arginina (enantiómero inactivo de la L-arginina) (Björkman, 1995).

En contraposición también existe evidencia que sugiere que el efecto antinociceptivo del diclofenaco administrado a nivel periférico resulta de la estimulación del sistema L-arginina-ON-GMPc, ya que su efecto antinociceptivo disminuye parcialmente por la administración de un inhibidor de la síntesis de ON (L-NMMA) y de la guanilato ciclasa soluble (azul de metileno) (Tonussi y Ferreira, 1994). Por otra parte, evidencia muy reciente que sugiere que otro mecanismo que participa en el efecto antinociceptivo del diclofenaco es la apertura de canales de K⁺, ya que el efecto de este fármaco administrado a nivel periférico se revierte por la administración periférica de bloqueadores de canales de K⁺ (glibenclamida, tolbutamida, carbodotóxina, apamina, 4-aminopiridina y tetraetilamonio) (Ortiz et al., 2002).

e. Propiedades farmacocinéticas

Estudios de biodisponibilidad con dosis únicas del fármaco administrado por vía oral sugieren que es absorbido casi en su totalidad (John, 1979; Kendall et al., 1979; Riess et al., 1978). Sufre el efecto del primer paso y alrededor del 60% llega a la circulación sistémica en forma intacta (John, 1979). El producto se liga fuertemente a



proteínas séricas que varían entre 99.5 y 99.7%. Su volumen de distribución es de 0.1 a 0.2 L/Kg (Davies y Anderson, 1997). El diclofenaco se metaboliza en el hígado por la acción de la isoenzima de la subfamilia CYP2C del citocromo P450. Primero se hidroxila y por fase II se conjuga con ácido glucurónico y el aminoácido taurina (Masubuchi et al., 2001). Se conocen los siguientes metabolitos: 3-hidroxi, 4-hidroxi, 3-hidroxi-4-metoxi y 4, 5-dihidroxi-diclofenaco (John, 1979). La vida media terminal del diclofenaco basada en concentraciones de líquido sinovial es de 5.2 ± 1.1 horas (Riess et al., 1986), es decir, se acumula en líquido sinovial después de su ingestión (esto explica la duración de su efecto terapéutico que es considerablemente más largo que su vida media plasmática). El metabolito principal en humanos es el 4-hidroxi-diclofenaco (Davies y Anderson, 1997). El diclofenaco y sus metabolitos se excreta por orina en un 60 a 70%, el resto se excreta en bilis y heces (Stierlin y Faigle, 1979), su vida media de eliminación es de 1.1 a 1.8 horas.

8. ANTECEDENTES PARTICULARES

Tradicionalmente se ha descrito que la inhibición de la COX es el mecanismo que produce el efecto antinociceptivo del diclofenaco (Ku et al., 1975; Krupp et al., 1976; Menassé et al., 1978; Ku et al., 1985). Estudios más recientes han sugerido que además de su efecto inhibitorio en la síntesis de protanoides, el diclofenaco aparentemente tiene otros mecanismos que participan en su efecto antinociceptivo (Attal et al., 1988). Se ha sugerido que entre estos mecanismos se encuentran: la estimulación de la síntesis y liberación de opioides endógenos (Sacerdote et al., 1985; Vescovi et al., 1986; Björkman, 1995), la activación de la transmisión serotoninérgica del sistema inhibitorio descendente endógeno (Björkman, 1995), la inhibición de la expresión de la L-selectina en la superficie de los neutrófilos durante el proceso inflamatorio (Díaz-González, 1995), la inhibición (Björkman, 1995) y estimulación (Tonussi y Ferreira, 1994; Ortiz et al., 2002) del sistema L-arginina-ON-GMPc-canales de K^+ a nivel espinal y periférico, respectivamente. Hasta la fecha, en todos los estudios *in vivo* en los que se ha evaluado la participación de mecanismos



diferentes a la inhibición de la COX en el efecto antinociceptivo del diclofenaco y de otros AINEs se ha optado por la administración periférica, espinal o supraespinal de los fármacos. Sin embargo, no existe evidencia de que los AINEs alcancen niveles espinales o periféricos y que a estos niveles ejerzan su(s) mecanismo(s) de acción después de administrarlos por vía oral, tampoco existe evidencia de la participación del sistema L-arginina-ON-GMPc-canales de K^+ (K_{ATP} y SK_{Ca}) a nivel espinal y periférico en el efecto antinociceptivo del diclofenaco administrado por vía oral.

El propósito de este trabajo es determinar la posible participación del sistema L-arginina-ON-GMPc-canales de K^+ (K_{ATP} y SK_{Ca}) a nivel espinal y periférico en el efecto antinociceptivo del diclofenaco administrado por vía oral, mediante la administración intratecal e intraplantar de un inhibidor de la sintasa de ON (L-NAME) y de bloqueadores de canales K_{ATP} y SK_{Ca} (glibenclamida y apamina, respectivamente).



III. HIPÓTESIS

Si el efecto antinociceptivo del diclofenaco administrado por vía oral está mediado, al menos en parte, por la participación del sistema L-arginina-ON-GMPc-canales de K^+ (K_{ATP} y SK_{Ca}) a nivel espinal y periférico, la inhibición de la sintasa de ON con L-NAME y el bloqueo de los canales K_{ATP} y SK_{Ca} con glibenclamida y apamina respectivamente, deberán disminuirlo.



IV. OBJETIVOS

1. Objetivo General

- Determinar la posible participación del sistema L-arginina-ON-GMPc-canales de K^+ (K_{ATP} y SK_{Ca}) a nivel espinal y periférico en el efecto antinociceptivo de diclofenaco administrado por vía oral.

2. Objetivos Particulares

- Determinar la relación dosis-respuesta de diclofenaco administrado por vía oral.
- Evaluar el efecto de la administración intratecal e intraplantar de glibenclamida en el efecto antinociceptivo de diclofenaco administrado por vía oral.
- Evaluar el efecto de la administración intratecal e intraplantar de apamina en el efecto antinociceptivo de diclofenaco administrado por vía oral.
- Evaluar el efecto de la administración intratecal e intraplantar de L-NAME y D-NAME en el efecto antinociceptivo de diclofenaco administrado por vía oral.



V. MATERIAL Y MÉTODOS

1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

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.

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.

2. FÁRMACOS Y REACTIVOS

El diclofenaco sódico fue donado por Novartis Farmacéutica (Ciudad de México), la glibenclamida y la apamina fueron adquiridos en Sigma (St. Louis, MO, USA), el L-NAME y el D-NAME fueron adquiridos en RBI (Natick, MA, USA). El diclofenaco, la apamina, el L-NAME y el D-NAME fueron disueltos en solución salina isotónica y la glibenclamida en dimetil sulfóxido (DMSO) al 20 y 50% en solución salina para su administración intraplantar e intratecal, respectivamente.

3. METODOLOGÍA

A. Prueba de la formalina

El efecto antinociceptivo del diclofenaco y la participación del sistema L-arginina-ON-GMPc-canales de K⁺ (SK_{Ca} y K_{ATP}) en este efecto se evaluó con la prueba de la



formalina (Dubuisson y Dennis 1977). La rata se colocó en una cámara de observación transparente de acrílico (Plexiglas) de 20 cm de diámetro y 30 cm de altura durante 30 minutos (esto le permitió al animal adaptarse a su entorno), después de este periodo de tiempo se les administró de manera subcutánea 50 μ L de formalina (solución de formaldehído al 1% en solución salina isotónica) en el dorso de la pata posterior derecha utilizando una aguja del No. 30. Inmediatamente después de la administración, la rata fue colocada nuevamente en el interior de la cámara de observación. En la parte trasera de estos cilindros previamente se colocaron dos espejos de 30 x 30 cm cada uno formando un ángulo de 45° entre ellos para facilitar la observación de la pata inyectada. La conducta dolorosa o nociceptiva de la pata inyectada, manifestada en forma de sacudidas (flinching/shakes) se cuantificó en intervalos de 1 minuto cada 5 minutos hasta completar 60 minutos después de la inyección (Malmberg y Yaksh, 1992). La sacudida de la pata se discriminó fácilmente de otras conductas (licking y biting) y se caracterizó por la sacudida breve y rápida o la flexión de la pata inyectada. La prueba se realizó en un intervalo de temperatura de 25 a 27°C. Al final del experimento los animales se sacrificaron en una cámara de CO₂.

B. Procedimiento para realizar la canulación intratecal

Para evaluar la participación del sistema L-arginina-ON-GMPC-canales de K⁺ en el efecto antinociceptivo del diclofenaco 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). Se insertó un catéter de polietileno del No. 10 (PE-10) a través de una pequeña abertura hecha en la membrana atlantooccipital de la cisterna magna e introducido cuidadosamente 8.5 cm en el espacio intratecal con la finalidad de colocarla en los segmentos L4-L5 de la región lumbar de la médula espinal (Figura 13). 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 (catatonía, alodinia o pérdida de movilidad en alguna extremidad) no fueron utilizadas.

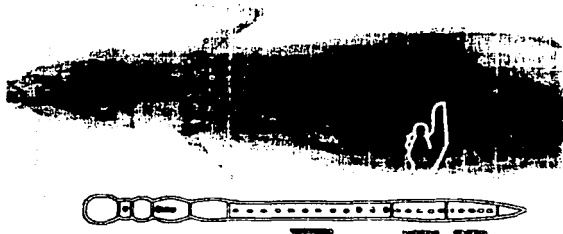


Figura 13. Radiografía de la colocación del catéter en los segmentos L4-L5 de la región lumbar de la médula espinal después de la cirugía intratecal.

C. Evaluación del efecto antinociceptivo de diclofenaco administrado por vía oral

El diclofenaco se administró por vía oral (p.o.) a tres grupos de ratas ($n \geq 6$) en dosis crecientes (1, 3 y 10 mg/Kg) veinte minutos previos a la administración de formalina y diez minutos previos a la administración intraplantar (i.pl.) de 50 μ L de salina. Un grupo control de ratas ($n \geq 6$) recibió solamente salina p.o. antes de la administración de salina y formalina.

D. Participación del sistema L-arginina-ON-GMPc a nivel espinal

Para determinar la participación del sistema L-arginina-ON-GMPc a nivel espinal en el efecto antinociceptivo de diclofenaco p.o., se evaluaron tres grupo de ratas ($n \geq 6$) previamente canuladas a las que se les administró una dosis del analgésico de 10 mg/Kg veinte minutos previos a la administración de formalina y diez minutos previos a la administración intratecal (i.t.) de dosis crecientes de L-NAME (1, 10 y

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



50 $\mu\text{g}/10 \mu\text{L}$). Un grupo de ratas ($n \geq 6$) recibió una dosis de D-NAME de 50 $\mu\text{g}/10 \mu\text{L}$ del mismo modo que se administró L-NAME. Después de la administración de L-NAME y D-NAME se administraron 10 μL de salina i.t. para asegurar que el inhibidor de la SON y su enantiómero inactivo logaran atravesar la cánula y fueran administrados. Se evaluaron cuatro grupos control de ratas ($n \geq 6$): el primer grupo recibió solamente salina p.o., salina i.t. y formalina; el segundo grupo recibió diclofenaco, salina i.t. y formalina; el tercer grupo recibió salina p.o., L-NAME i.t. (50 $\mu\text{g}/10 \mu\text{L}$) y formalina; el cuarto y último grupo recibió salina p.o., D-NAME i.t. (50 $\mu\text{g}/10 \mu\text{L}$) y formalina.

E. Participación del sistema L-arginina-ON-GMPc a nivel periférico

Para determinar la participación del sistema L-arginina-ON-GMPc a nivel periférico en el efecto antinociceptivo de diclofenaco p.o., se evaluaron tres grupo de ratas ($n \geq 6$) a las que se les administró una dosis del analgésico de 10 mg/Kg veinte minutos previos a la administración de formalina y diez minutos previos a la administración i.pl. de dosis crecientes de L-NAME (1, 10 y 100 $\mu\text{g}/50 \mu\text{L}$). Un grupo de ratas ($n \geq 6$) recibió una dosis de D-NAME de 100 $\mu\text{g}/10 \mu\text{L}$ del mismo modo que se administró L-NAME. Se evaluaron cuatro grupos control de ratas ($n \geq 6$): el primer grupo recibió solamente salina p.o., salina i.pl. y formalina; el segundo grupo recibió diclofenaco, salina i.pl. y formalina; el tercer grupo recibió salina p.o., L-NAME i.pl. (50 $\mu\text{g}/50 \mu\text{L}$) y formalina; el cuarto y último grupo recibió salina p.o., D-NAME i.pl. (50 $\mu\text{g}/50 \mu\text{L}$) y formalina.

F. Participación de canales K_{ATP} a nivel espinal

Para determinar la participación de canales SK_{ATP} a nivel espinal en el efecto antinociceptivo de diclofenaco p.o., se evaluaron tres grupo de ratas ($n \geq 6$) previamente canuladas a las que se les administró una dosis del analgésico de 10



mg/Kg veinte minutos previos a la administración de formalina y diez minutos previos a la administración i.t. de dosis crecientes de glibenclamida (25, 50 y 75 $\mu\text{g}/10 \mu\text{L}$). Después de la administración de glibenclamida se administraron 10 μL de vehículo (DMSO 50%) para asegurar que todo el hipoglucemiante lograra atravesar la cánula y fuera administrado. Se evaluaron tres grupos control de ratas ($n \geq 6$): el primer grupo recibió solamente salina p.o., vehículo i.t. y formalina; el segundo grupo recibió diclofenaco, vehículo i.t. y formalina; el tercer y último grupo recibió salina p.o., glibenclamida i.t. (75 $\mu\text{g}/10 \mu\text{L}$) y formalina.

G. Participación de canales K_{ATP} a nivel periférico

Para determinar la participación de canales SK_{ATP} a nivel periférico en el efecto antinociceptivo de diclofenaco p.o., se evaluaron tres grupo de ratas ($n \geq 6$) a las que se les administró una dosis del analgésico de 10 mg/Kg veinte minutos previos a la administración de formalina y diez minutos previos a la administración i.pl. de dosis crecientes de glibenclamida (12.5, 25 y 100 $\mu\text{g}/50 \mu\text{L}$). Se evaluaron tres grupos control de ratas ($n \geq 6$): el primer grupo recibió solamente salina p.o., Vehículo (DMSO 20%) i.pl. y formalina; el segundo grupo recibió diclofenaco, vehículo i.pl. y formalina; el tercer grupo recibió salina p.o., glibenclamida i.pl. (100 $\mu\text{g}/50 \mu\text{L}$) y formalina.

H. Participación de canales SK_{Ca} a nivel espinal

Para determinar la participación de canales SK_{Ca} a nivel espinal en el efecto antinociceptivo de diclofenaco p.o., se evaluaron tres grupo de ratas ($n \geq 6$) previamente canuladas a las que se les administró una dosis del analgésico de 10 mg/Kg veinte minutos previos a la administración de formalina y diez minutos previos a la administración i.t. de dosis crecientes de apamina (0.001, 0.01 y 1 ng/10 μL). Después de la administración de apamina se administraron 10 μL de salina para asegurar que toda la neurotoxina lograra atravesar la cánula y fuera



administrada. Se evaluaron tres grupos control de ratas ($n \geq 6$): el primer grupo recibió solamente salina p.o., salina i.t. y formalina; el segundo grupo recibió diclofenaco, salina i.t. y formalina; el tercer y último grupo recibió salina p.o., apamina i.t. (1 ng/10 μ L) y formalina.

I. Participación de canales SK_{Ca} a nivel periférico

Para determinar la participación de canales SK_{Ca} a nivel periférico en el efecto antinociceptivo de diclofenaco p.o., se evaluaron tres grupo de ratas ($n \geq 6$) a las que se les administró una dosis del analgésico de 10 mg/Kg veinte minutos previos a la administración de formalina y diez minutos previos a la administración i.pl. de dosis crecientes de apamina (100, 300 y 1000 ng/50 μ L). Se evaluaron tres grupos control de ratas ($n \geq 6$): el primer grupo recibió solamente salina p.o., salina i.pl. y formalina; el segundo grupo recibió diclofenaco, salina i.pl. y formalina; el tercer grupo recibió salina p.o., apamina i.pl. (1000 ng/50 μ L) y formalina.

J. Análisis estadístico

Los resultados están expresados como el promedio \pm el error estándar (e.e.) de la media para cada grupo experimental ($n \geq 6$). Se construyeron curvas del número de sacudidas/minuto en función del tiempo. Se calculó el Área Bajo la Curva (ABC) de la segunda fase (15-60min) de los cursos temporales (una expresión global de la intensidad y duración del efecto) por el método de los trapezoides (Tallarida y Murray, 1981).

Todos los datos de ABC se graficaron en el programa Prism 3.0. Las diferencias entre los promedios de los grupos tratados y sus controles se determinaron por análisis de varianza de una cola (ANOVA), seguido por la prueba de Tukey en el programa SigmaStat 2.03. Los resultados con una $p < 0.05$ se consideraron significativos.

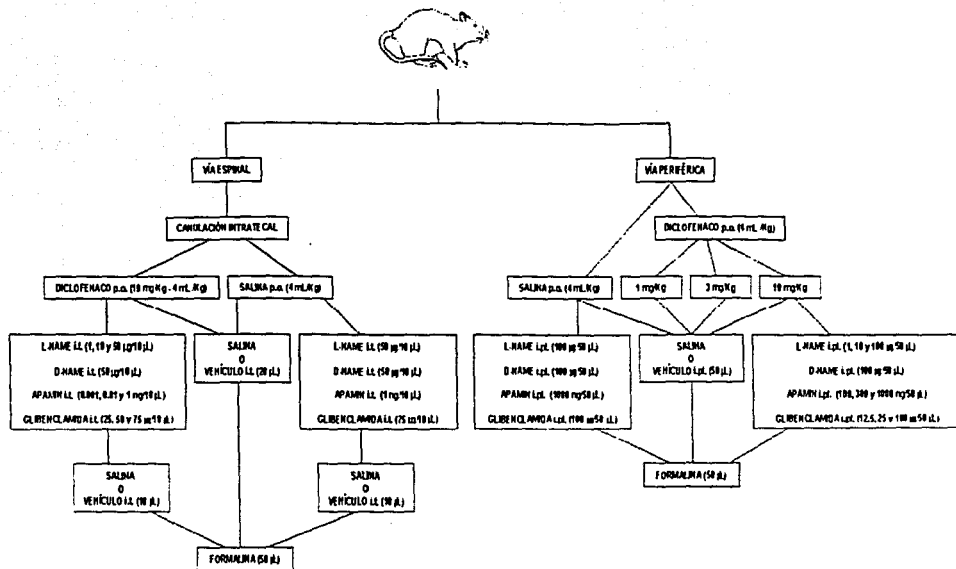


Figura 14. Diagrama de flujo del diseño experimental.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN



VI. RESULTADOS

1. CONDUCTA DOLOROSA INDUCIDA POR FORMALINA

La inyección intraplantar de formalina produjo la conducta típica de sacudidas caracterizada por el retro breve y rápido o la flexión de la pata inyectada (Lázaro-Ibáñez et al., 2001). Cuando se graficó el número de sacudidas en función del tiempo se obtuvieron gráficas donde se distingue la conducta bifásica característica de este modelo (Tjølsen et al, 1992) (Figura 15).

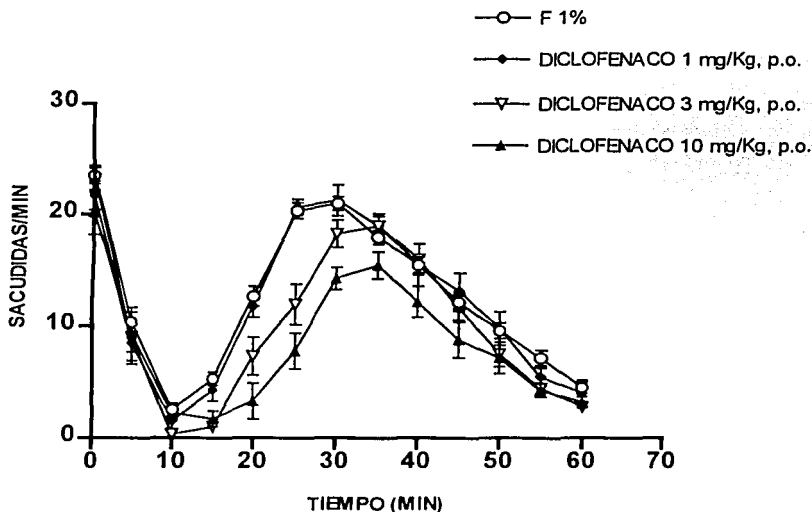


Figura 15. Curso temporal del efecto antinociceptivo de la administración oral de dosis crecientes de diclofenaco en la prueba de la formalina. Los datos son el promedio de $(n \geq 6)$ ratas \pm e.e.



2. EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN ORAL DE DICLOFENACO

La administración de diclofenaco por vía oral redujo de manera dependiente de la dosis el número de sacudidas sólo durante la segunda fase de la prueba de la formalina, alcanzando diferencia significativa a una dosis de 3 mg/Kg y un máximo de antinocicepción a una dosis de 10 mg/Kg (Figura 16).

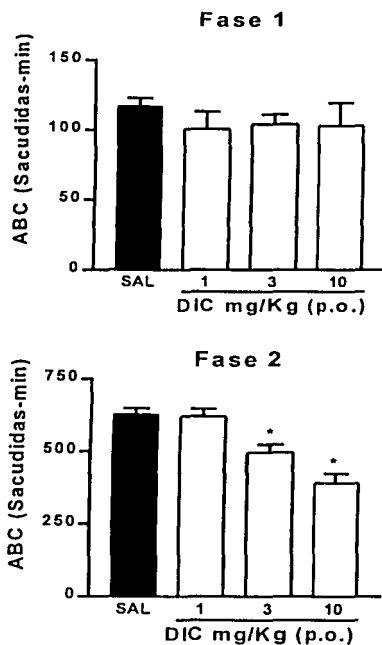


Figura 16. Efecto antinociceptivo de la administración oral de dosis crecientes de diclofenaco (DIC), evaluado durante la primera y segunda fase de la prueba de la formalina y expresado como ABC. Las ratas recibieron diclofenaco como pretratamiento. Los datos son el promedio de ($n \geq 6$) ratas \pm e.e. *Significativamente diferente del grupo tratado con salina ($p < 0.05$). La diferencia fue determinada por análisis de varianza de una cola (ANOVA), seguido por la prueba de Tukey.



3. EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN INTRATECAL DE L-NAME

El pretratamiento con el inhibidor de la SON (administración intratecal de L-NAME) revirtió de manera dependiente de la dosis el efecto antinociceptivo del diclofenaco administrado por vía oral, durante la segunda fase de la prueba de la formalina, alcanzando diferencia significativa y un efecto máximo a una dosis de 50 $\mu\text{g}/10 \mu\text{L}$. El pretratamiento con el enantiómero inactivo del L-NAME (administración intratecal de D-NAME) no produjo ningún efecto (Figura 17).

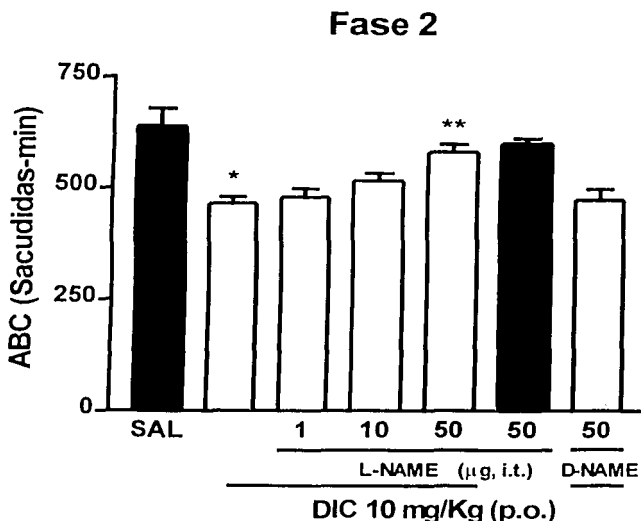


Figura 17. Efecto de la administración intratecal de dosis crecientes de L-NAME en el efecto antinociceptivo de diclofenaco (DIC) administrado por vía oral, evaluado durante la segunda fase de la prueba de la formalina y expresado como ABC. Las ratas recibieron diclofenaco y L-NAME como pretratamiento. Los datos son el promedio de ($n \geq 6$) ratas \pm e.e. *Significativamente diferente del grupo tratado con salina ($p < 0.05$) y **significativamente diferente del grupo tratado con diclofenaco ($p < 0.05$). Las diferencias fueron determinadas por análisis de varianza de una cola (ANOVA), seguido por la prueba de Tukey.



4. EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN INTRAPLANTAR DE L-NAME

El pretratamiento con el inhibidor de la SON (administración intraplantar de L-NAME) revirtió de manera dependiente de la dosis el efecto antinociceptivo del diclofenaco administrado por vía oral, durante la segunda fase de la prueba de la formalina, alcanzando diferencia significativa y un efecto máximo a una dosis de 100 $\mu\text{g}/50 \mu\text{L}$. El pretratamiento con el enantiómero inactivo del L-NAME (administración intraplantar de D-NAME) no produjo ningún efecto (Figura 18).

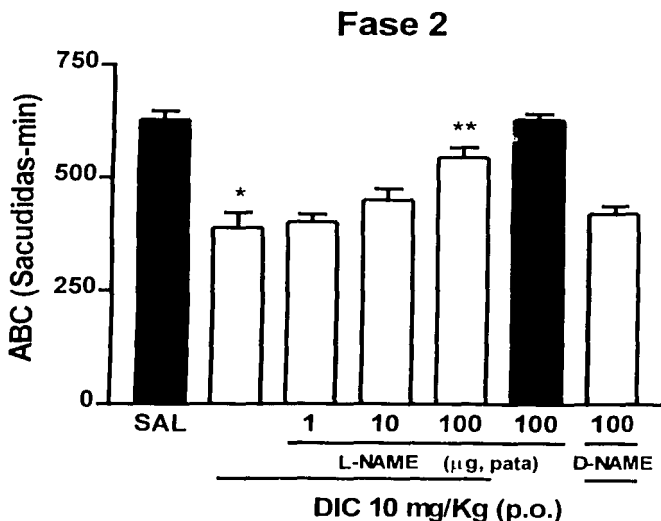


Figura 18. Efecto de la administración intraplantar de dosis crecientes de L-NAME en el efecto antinociceptivo de diclofenaco (DIC) administrado por vía oral, evaluado durante la segunda fase de la prueba de la formalina y expresado como ABC. Las ratas recibieron diclofenaco y L-NAME como pretratamiento. Los datos son el promedio de ($n \geq 6$) ratas \pm e. *Significativamente diferente del grupo tratado con salina ($p < 0.05$) y **significativamente diferente del grupo tratado con diclofenaco ($p < 0.05$). Las diferencias fueron determinadas por análisis de varianza de una cola (ANOVA), seguido por la prueba de Tukey.



5. EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN INTRATECAL DE GLIBENCLAMIDA

El pretratamiento con el bloqueador de canales K_{ATP} (administración intratecal de glibenclamida) revirtió de manera dependiente de la dosis el efecto antinociceptivo del diclofenaco administrado por vía oral, durante la segunda fase de la prueba de la formalina, alcanzando diferencia significativa a una dosis de 50 $\mu\text{g}/10 \mu\text{L}$ y un efecto máximo a una dosis de 75 $\mu\text{g}/10 \mu\text{L}$ (Figura 19).

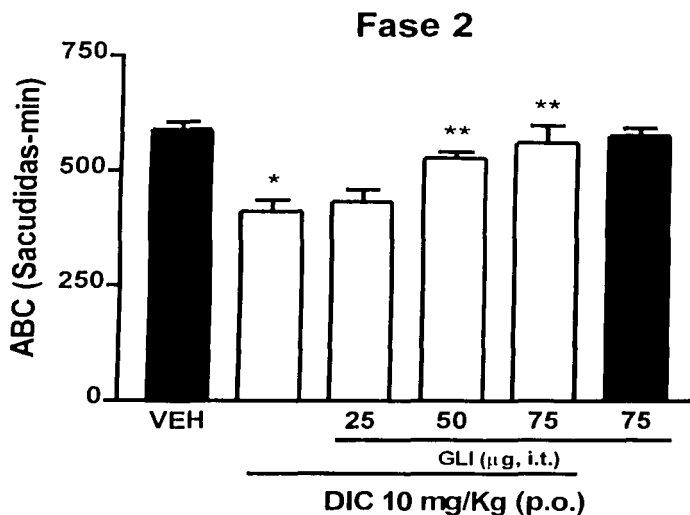


Figura 19. Efecto de la administración intratecal de dosis crecientes de glibenclamida (GLI) en el efecto antinociceptivo de diclofenaco (DIC) administrado por vía oral, evaluado durante la segunda fase de la prueba de la formalina y expresado como ABC. Las ratas recibieron diclofenaco y glibenclamida como pretratamiento. Los datos son el promedio de ($n \geq 6$) ratas \pm e.e. *Significativamente diferente del grupo tratado con salina ($p < 0.05$) y **significativamente diferente del grupo tratado con diclofenaco ($p < 0.05$). Las diferencias fueron determinadas por análisis de varianza de una cola (ANOVA), seguido por la prueba de Tukey.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



6. EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN INTRAPLANTAR DE GLIBENCLAMIDA

El pretratamiento con el bloqueador de canales K_{ATP} (administración intraplantar de glibenclamida) revirtió de manera dependiente de la dosis el efecto antinociceptivo del diclofenaco administrado por vía oral, durante la segunda fase de la prueba de la formalina, alcanzando diferencia significativa y un efecto máximo a una dosis de 100 $\mu\text{g}/50\mu\text{L}$ (Figura 20).

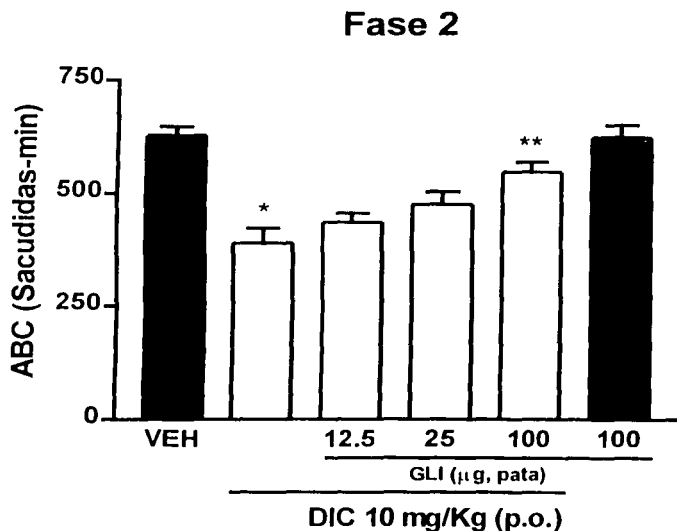
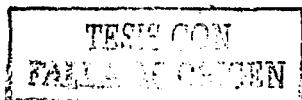


Figura 20. Efecto de la administración intraplantar de dosis crecientes de glibenclamida (GLI) en el efecto antinociceptivo del diclofenaco (DIC) administrado por vía oral, evaluado durante la segunda fase de la prueba de la formalina y expresado como ABC. Las ratas recibieron diclofenaco y glibenclamida como pretratamiento. Los datos son el promedio de ($n \geq 6$) ratas \pm e.e. *Significativamente diferente del grupo tratado con salina ($p < 0.05$) y **significativamente diferente del grupo tratado con diclofenaco ($p < 0.05$). Las diferencias fueron determinadas por análisis de varianza de una cola (ANOVA), seguido por la prueba de Tukey.





7. EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN INTRATECAL DE APAMINA

El pretratamiento con el bloqueador de canales SK_{Ca} (administración intratecal de apamina) revirtió de manera dependiente de la dosis el efecto antinociceptivo del diclofenaco administrado por vía oral, durante la segunda fase de la prueba de la formalina, alcanzando diferencia significativa y un efecto máximo a una dosis de 1 ng/ 10 μ L (Figura 21).

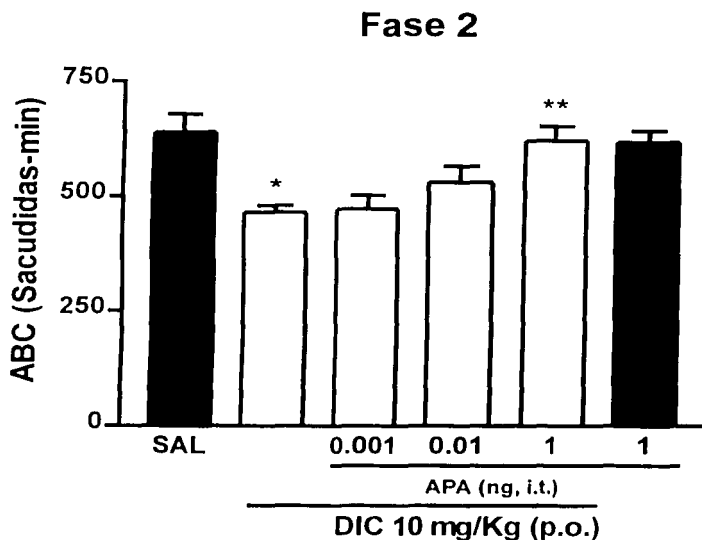


Figura 21. Efecto de la administración intratecal de dosis crecientes de apamina (APA) en el efecto antinociceptivo de diclofenaco (DIC) administrado por vía oral, evaluado durante la segunda fase de la prueba de la formalina y expresado como ABC. Las ratas recibieron diclofenaco y apamina como pretratamiento. Los datos son el promedio de ($n \geq 6$) ratas \pm e.e. *Significativamente diferente del grupo tratado con salina ($p < 0.05$) y **significativamente diferente del grupo tratado con diclofenaco ($p < 0.05$). Las diferencias fueron determinadas por análisis de varianza de una cola (ANOVA), seguido por la prueba de Tukey.



8. EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN INTRAPLANTAR DE APAMINA

El pretratamiento con el bloqueador de canales SK_{Ca} (administración intraplantar de apamina) revirtió de manera dependiente de la dosis el efecto antinociceptivo del diclofenaco administrado por vía oral, durante la segunda fase de la prueba de la formalina, alcanzando diferencia significativa y un efecto máximo a una dosis de 1000 ng/50 μ L (Figura 22).

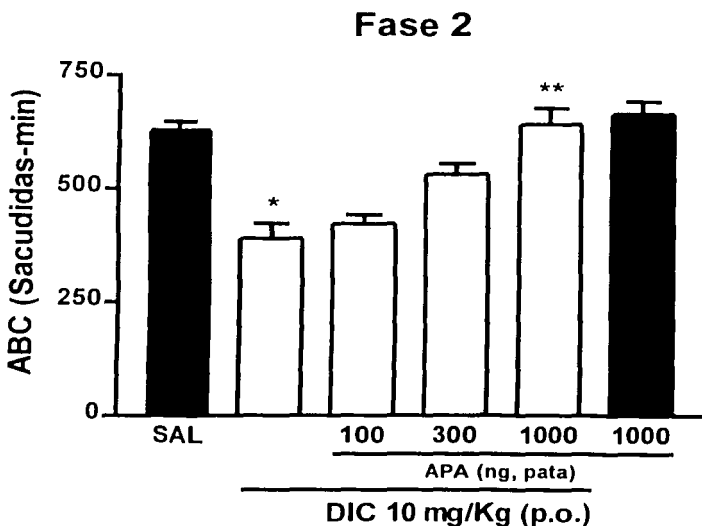


Figura 22. Efecto de la administración intraplantar de dosis crecientes de apamina (APA) en el efecto antinociceptivo de diclofenaco (DIC) administrado por vía oral, evaluado durante la segunda fase de la prueba de la formalina y expresado como ABC. Las ratas recibieron diclofenaco y apamina como pretratamiento. Los datos son el promedio de ($n \geq 6$) ratas \pm e.e. *Significativamente diferente del grupo tratado con salina ($p < 0.05$) y **significativamente diferente del grupo tratado con diclofenaco ($p < 0.05$). Las diferencias fueron determinadas por análisis de varianza de una cola (ANOVA), seguido por la prueba de Tukey.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



VII. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La prueba de la formalina es un modelo útil para el estudio del dolor (Wheeler-Aceto et al., 1991). La conducta dolorosa después de la inyección intraplantar fue bifásica: La fase 1 inició inmediatamente después de la inyección del irritante (0-10 min), mientras que la fase 2 comenzó después de los 10 minutos, con una respuesta máxima entre los 20-35 minutos. La fase 1 y 2 se consideran dolor neurogénico e inflamatorio, respectivamente. A la fecha, la evidencia experimental farmacológica y electrofisiológica sugiere que la fase 1 es por una acción directa de la formalina sobre los nociceptores (Dickenson y Sullivan, 1987; Puig y Sorkin, 1995) y la liberación inmediata de mediadores químicos. La fase 2 es el resultado de una combinación de eventos periféricos y centrales. Se ha descrito que hay cambios en la actividad neuronal en el asta dorsal de la médula espinal con evolución temporal similar a la conducta dolorosa observada (Dickenson y Sullivan, 1987; Puig y Sorkin, 1995). Sin embargo, se requiere del estímulo periférico para el desarrollo de la segunda fase y está asociado con la liberación de diferentes mediadores inflamatorios a nivel periférico y espinal.

1. EFECTO ANTINOCICEPTIVO DE LA ADMINISTRACIÓN ORAL DEL DICLOFENACO

La administración de diclofenaco por vía oral redujo de manera dependiente de la dosis el número de sacudidas sólo durante la segunda fase de la prueba de la formalina. Este resultado es congruente con los resultados obtenidos por Ortiz et al. (2002) y Torres-López et al. (2002) quienes reportan que la administración intraplantar de diclofenaco produjo un efecto antinociceptivo de manera dependiente de la dosis sólo en la segunda fase de la prueba de la formalina. También son congruentes con los resultados obtenidos en otros modelos de dolor e inflamación. En un modelo de inflamación aguda (edema inducido por carragenina) la administración oral de diclofenaco inhibió la formación del edema de manera



dependiente de la dosis (Winter et al., 1963) y en un modelo de nocicepción crónico-inflamatorio (disfunción articular en la rata) la administración oral de diclofenaco produjo un efecto antinociceptivo de manera dependiente de la dosis (Torres-López et al., 1997). El efecto antinociceptivo de la administración oral de diclofenaco puede ser explicado, en parte, por la inhibición de la actividad de la COX (Ku et al., 1975; Krupp et al., 1976; Menassé et al., 1978; Ku et al., 1985).

2. PARTICIPACIÓN DEL SISTEMA L-ARGININA-ON-GMPC-CANALES DE K^+ (K_{ATP} Y SK_{Ca}) A NIVEL ESPINAL Y PERIFÉRICO EN EL EFECTO ANTINOCICEPTIVO DEL DICLOFENACO ADMINISTRADO POR VÍA ORAL

Hasta la fecha, no existe evidencia acerca de que los AINEs logran alcanzar concentraciones efectivas a nivel espinal y existe muy poca evidencia acerca de que alcanzan concentraciones efectivas a nivel periférico (Granados-Soto et al., 1995; Dominkus et al., 1996; Tegeder et al., 1999) después de su administración oral y de que estos fármacos al alcanzar esas concentraciones ejercen algún mecanismo que participa en su efecto antinociceptivo (Granados-Soto et al., 1995), aún cuando en la clínica la vía de administración oral es su principal vía de administración. Una de las técnicas que se emplea para determinar si una sustancia se encuentra en un sitio específico es la microdiálisis (Menacherry et al., 1992; Marsala et al., 1995; Khan et al., 1996; Hansen et al., 1998). Esta técnica está limitada porque sólo permite evidenciar si una sustancia está presente a diferentes niveles cuando alcanza concentraciones que se pueden detectar (las concentraciones de una sustancia, específicamente las concentraciones de un fármaco que pueden ser detectadas a diferentes niveles pueden ser relativamente elevadas con respecto a las concentraciones en las que ejerce su actividad biológica) y porque que es muy difícil trabajar con los volúmenes pequeños que de ésta se obtienen (volúmenes que en algunos casos deben ser sometidos a extracciones o que son susceptibles de evaporación) (Menacherry et al., 1992; Hansen et al., 1998). Por otra parte, la administración oral de un fármaco no es tan popular en investigación porque su



administración directa en un sitio específico es una garantía de que está presente y de que se encuentra en su(s) posible(s) sitio(s) de acción.

En este estudio el problema de proporcionar evidencia acerca de que un AINE alcanza niveles espinales y sistémicos después de su administración oral y de que a estos niveles ejerce algún mecanismo que participa en su efecto antinociceptivo se abordó de la siguiente manera: primero se administró el diclofenaco por vía oral como pretratamiento veinte minutos antes de la prueba de la formalina para asegurar que el fármaco alcanzara su C_{MAX} (Torres-López et al., 1997) como una garantía de que logró alcanzar concentraciones efectivas en su(s) sitio(s) de acción. La administración del fármaco fue a la dosis a la que presentaba su efecto antinociceptivo máximo. Esto se hizo para asegurar que se iban a poder apreciar, si es que existía, algún efecto cuando se administrara el inhibidor de la SON (L-NAME) o alguno de los bloqueadores de canales de K^+ (glibenclamida o apamina). Posteriormente se administró el L-NAME, la glibenclamida o apamina K^+ por vía intratecal o intraplantar también como pretratamiento diez minutos antes de la prueba de la formalina para garantizar su distribución en la zona de administración. Finalmente se realizó la prueba de la formalina y se cuantificó el número de sacudidas como indicativo del proceso de nocicepción. La administración intratecal e intraplantar de L-NAME (un inhibidor no selectivo de la SON) (Rees et al., 1990; Björkman, 1995; Ferrier et al., 2001; Kankuri et al., 2001; Sayan et al., 2001), glibenclamida (un bloqueador de canales K_{ATP}) (Ashcroft et al., 1987; Belles et al., 1987; Sturgess et al., 1985; Cook, 1988; Sturgess et al., 1988) y apamina (un inhibidor de canales SK_{Ca}) (Pennefather et al., 1985; Lang y Ritchie, 1990; Zhang y Mcbain, 1995; Stocker et al., 1999), pero no D-NAME (enantiómero inactivo del L-NAME) revirtieron el efecto antinociceptivo del diclofenaco administrado por vía oral. Estos resultados sugieren que el fármaco alcanza niveles espinales y periféricos después de su administración oral y que a estos niveles la estimulación del sistema L-arginina-ON-GMPc-canales de K^+ es un mecanismo que participa en su efecto antinociceptivo y son evidencia farmacológica contundente de que este es



posiblemente un nuevo método para determinar los mecanismos que están involucrados en el efecto antinociceptivo de los AINEs a nivel espinal y periférico cuando se administran por vía oral.

Se ha propuesto que la activación de la SON con el consecuente incremento en la producción de ON a nivel central y periférico está involucrado en los estados de dolor (Meller y Gebhart, 1993). En contraste, los resultados que se presentan aquí sugieren que la activación del sistema L-arginina-ON-GMPc-canales de K^+ (K_{ATP} y SK_{Ca}) a nivel espinal y periférico es uno de los mecanismos que participa en el efecto antinociceptivo del diclofenaco administrado por vía oral, ya que la administración intraplantar e intratecal de L-NAME, pero no D-NAME, revirtió de manera dependiente de la dosis el efecto antinociceptivo del fármaco durante la segunda fase de la prueba de la formalina. Los resultados de la administración oral del diclofenaco y la administración periférica del inhibidor de la SON son congruentes con los resultados que obtuvieron Tonussi y Ferreira en 1994, quienes reportaron que el efecto antinociceptivo de la administración intraperitoneal del diclofenaco era un proceso dependiente de la participación periférica del ON, ya que este efecto fue revertido por el pretratamiento de ratas con L-NMMA o azul de metileno administrado por vía intraplantar, en un modelo de incapacidad inflamatoria (incapacitación inducida por carragenina). También son consistentes con los resultados obtenidos para otros fármacos y sustancias en los que se ha sugerido que la base molecular que modula negativamente la sensibilización de receptores periféricos deriva de un incremento de GMPc en los nociceptores que se produce a través de la estimulación de la vía arginina-ON-GMPc (Duarte et al., 1990; Ferreira et al., 1991a,b; 1992; Duarte et al., 1992a,b; Ferreira y Lorenzetti, 1994; Granados-Soto et al., 1995b; López-Muñoz et al., 1996; Granados-Soto et al., 1997; Aguirre-Buñuelos y Granados-Soto, 2000; Abacioglu et al., 2001; Lázaro-Ibáñez et al., 2001; Bulutcu et al., 2002). Sin embargo, contrastan con resultados que también se han reportado y que sugieren que a nivel periférico la vía arginina-ON-GMPc



modula positivamente la sensibilización de las terminales de las fibras aferentes primarias (Moore et al., 1991; Morgan et al., 1992; Aley et al., 1998).

Por otra parte, los resultados de la administración oral del diclofenaco y la administración intratecal del inhibidor de la SON contrastan con los resultados obtenidos por Björkman en 1995 quien reporta que el efecto antinociceptivo de la administración intratecal de diclofenaco se revierte por la administración intratecal de AMPA, SP y L-arginina. También contrasta con los resultados obtenidos para otros fármacos y sustancias que sugieren que el ON a nivel espinal juega un papel importante en la modulación positiva de la transmisión del proceso nociceptivo en las fibras aferentes secundarias (Aanonsen y Wilcox, 1987; Moore et al., 1991; Meller et al., 1992; MalMBER y Yaksh, 1993; Inoue et al., 1997; Li y Clark, 2001). Sin embargo, los datos son congruentes con los resultados de algunos reportes en los que se ha sugerido que a nivel espinal, la estimulación de la vía L-arginina-ON-GMPc modula negativamente la transmisión del proceso nociceptivo (Kawabata et al., 1992; Zhuo et al., 1993). Las discrepancias entre los resultados de Björkman (1995) y los resultados que se presentan aquí, posiblemente se debe a que el diclofenaco se administra por diferente vía, mientras que Björkman (1995) administra en fármaco por vía intratecal, aquí se administra por vía oral, y a que la evaluación se hizo en diferentes modelos animales. Las discrepancias con los resultados obtenidos para otros fármacos y sustancias posiblemente se debe a que se han evaluado en diferentes especies, modelos de dolor, vías de administración y concentraciones. Sin embargo, la gran mayoría de los reportes sugieren que la estimulación del sistema L-arginina-ON-GMPc modula negativamente la sensibilización de las terminales en las fibras aferentes primarias y positivamente la transmisión del proceso nociceptivo en fibras aferentes espinales secundarias.

Aunque la función dual y tan controversial que tiene el ON como hiperalgésico o analgésico a diferentes niveles no se ha podido aclarar (Zhuo et al., 1993), aquí se sugiere que una posible explicación de esta función dual es el empleo de diferentes



dosis de fármacos y sustancias. Raigorodsky y Urca (1987) reportan que al administrar concentraciones bajas y altas de NMDA obtiene como resultado efectos analgésicos e hiperalgésicos, respectivamente. Esto sugiere que la concentración de los agentes que se emplean en las evaluaciones es un factor crítico, ya que puede traer como consecuencia resultados confusos.

Si comparamos los resultados que obtuvo Zhuo et al. (1993) y los resultados que obtuvieron Malmberg y Yaksh en 1993 con los resultados obtenidos aquí, podemos observar que Zhuo et al. (1993) no obtuvieron ningún efecto después de la administración intratecal de una dosis de 2.59 μg de L-NAME, y aunque emplea un modelo diferente, sus resultados corresponden a los que se presentan aquí, ya que no se observó diferencia significativa en el efecto antinociceptivo de la administración oral de diclofenaco cuando se administraron dosis de 1 y 10 μg de L-NAME por vía intratecal. El efecto antinociceptivo obtenido por Malmberg y Yaksh (1993) después de la administración intratecal de una dosis de 100 μg de L-NAME no es contradictorio con los resultados de este estudio ya que esa dosis es el doble de la dosis más alta empleada aquí, por lo que es lógico pensar que posiblemente sigue otro mecanismo en la modulación de la transmisión del proceso nociceptivo. En base a los resultados que se han obtenido en otras evaluaciones y aquí, se sugiere que en un futuro se realice un estudio a todos los niveles (supraespinal, espinal y periférico) que contemple la administración de un agente que inhiba o estimule la vía L-arginina-ON-GMPc en un amplio intervalo de concentraciones, para aclarar si el ON realmente tiene una función dual dependiente de la concentración en la modulación del proceso nociceptivo.

Los resultados de la administración oral del diclofenaco y la administración intraplantar de glibenclamida y apamina confirman las observaciones que previamente se han hecho acerca de la participación de canales K_{ATP} y SK_{Ca} a nivel periférico en el efecto antinociceptivo del diclofenaco administrado por vía intraplantar (Ortiz et al., 2002) y son congruentes con otros resultados que sugieren



que la apertura de canales K_{ATP} a nivel periférico es uno de los mecanismos que participa en el efecto antinociceptivo del ketorolaco administrado por vía intraplantar (Lázaro-Ibáñez et al., 2001) e intraarticular (Granados-Soto et al., 1995). Este último, al igual que el diclofenaco, es un AINE derivado del ácido acético. Los resultados de la administración oral del diclofenaco y la administración intratecal de glibenclamida y apamina sugieren que la apertura de canales de K^+ (K_{ATP} y SK_{Ca}) en las fibras aferentes primarias y posiblemente secundarias es un mecanismo que participa en el efecto antinociceptivo de este analgésico, es decir, este mecanismo se presenta no sólo a nivel periférico, sino también a nivel espinal. La capacidad que tienen la glibenclamida y la apamina administradas por vía intratecal e intraplantar para revertir el efecto antinociceptivo del diclofenaco administrado por vía oral sugiere que la apertura de canales de K^+ (K_{ATP} y SK_{Ca}) a nivel espinal y periférico posiblemente se deba a que el fármaco induce la activación de proteínas dependientes de GMPc a través de un incremento en la producción de ON.

En resumen, los resultados de este estudio sugieren que el diclofenaco alcanza concentraciones efectivas a nivel espinal y periférico después de su administración oral y que a estos niveles la estimulación del sistema L-arginina-ON-GMPc-canales de K^+ es posiblemente un mecanismo que participa en su efecto antinociceptivo y son la primer evidencia que sugiere que un AINE logra alcanzar concentraciones efectivas a nivel espinal después de su administración oral y que a estos nivel ejerce un mecanismo que participa en su efecto antinociceptivo.



VIII. CONCLUSIONES

- La administración oral del diclofenaco produce antinocicepción de manera dependiente de la dosis en el modelo de la formalina.
- La estimulación del sistema L-arginina-ON-GMP_c a nivel espinal y periférico participa en el efecto antinociceptivo del diclofenaco administrado por vía oral.
- La posible apertura de canales K_{ATP} a nivel espinal y periférico participa en el efecto antinociceptivo del diclofenaco administrado por vía oral.
- La posible apertura de canales SK_{Ca} a nivel espinal y periférico participa en el efecto del diclofenaco administrado por vía oral.



IX. REFERENCIAS

- 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.
- Abacioglu N, Tunçtan B, Cakici I, Akbulut E, Uludag O, Kanzik I. 2001. The role of L-arginine/nitric oxide pathway in the antinociceptive activity of pyridoxine in mouse. *Arzneimittelforschung.* 51:832-838.
- 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.
- 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.
- Akil H, Mayer DJ, Liebeskind JC. 1976. Antagonism of stimulation-produced analgesia by naloxone, a narcotic antagonist. *Science.* 191:961-967.
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. 2002. *Molecular biology of the cell.* Fourth edition. Published by Garland Publishing. USA, NY.
- Ashcroft FM, Gribble FM. 2000. New window on the mechanism of action of K_{ATP} channel openers. *TIPS.* 21:439-445.
- 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.* 265:378-385.
- 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.



- Ashburn MA, Slaats PS. 1999. Management of chronic pain. *Lancet*. 353(9167):1865-1869.
- Ashcroft FM, Kakei M, Kelly RP, Sutton B. 1987. ATP-sensitive K⁺ channels in human isolated pancreatic β -cells. *FEBS Lett*. 215:9-12.
- Attal N, Kayser V, Eschaliér A, Benoist JM, Guilbaud G. 1988. Behavioural and electrophysiological evidence for an analgesic effect of a non-steroidal anti-inflammatory agent, sodium diclofenac. *Pain*. 35:341-348.
- 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.
- Belles B, Hescheler J, Trube G. 1987. Changes of membrane currents in cardiac cells induced by long whole-cell recordings and tolbutamide. *Pfluegers Arch*. 409:582-588.
- 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.
- Beric Aleksander. 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.
- 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.
- Bessou P, Perl ER. 1969. Responses of cutaneous sensory units with unmyelinated fibers to noxious stimuli. *J Neurophysiol*. 32:1025-1043.
- Beuerman RW, Tanelian DL. 1979. Corneal pain evoked by thermal simulation. *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. 1995. Central antinociceptive effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs and paracetamol. *Acta Anaesthesiol Scand*. 103:9-44.
- 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 Syptom Manag*. 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.
- Brunetti L. 1994. Nitric oxide: a gas as a modulator of neuroendocrine secretions. *Clin Ter*. 144(2):147-153.
- Bulutcu F, Dogrul A, Güç MO. 2002. The involvement of nitric oxide in the analgesic affects of ketamine. *Life Sciences*. 71:841-853.
- Butler MJ, FRCP, FRACP. 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.
- Cashman JN. 1996. The mechanisms of action of NSAIDs in analgesia. *Drugs*. 52 (Suppl 5):13-23.
- Cassell EJ. 1982. The nature of suffering and the goals of medicine. *N Engl J Med*. 306:639-645.



- Catterall WA, Chandy KG, Gutman GA. 2002. **The IUPHAR: compendium of voltage-gated ion channels**. Printed in the UK by Mighthale Press.
- Cerveró F, Laird JM. 1995. **Fisiología del dolor**. En: **tratamiento del dolor: teoría y práctica**. MCR. Barcelona. 9-25.
- Charpentier J. 1961. **Sur une nouvelle méthode psychophysique 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**. *TIPS*. 11:290-296.
- Cook NS. 1988. **The pharmacology of potassium channels and their therapeutic potential**. *TIPS*. 9:21-28.
- Cousins M, 1994. **Acute and postoperative pain**. En: **Wall and Melzack editores**. *Textbook of pain*. 3rd ed. London: Churchill Livingstone, pp 16-28.
- D'Amour FE, Smith DL. 1941. **A method for determining loss of pain sensation**. *J Pharmacol Exp Ther*. 72:74-79.
- Dallenbach KM. 1939. **History and present status**. *Am J Psychol*. 52:331-347.
- Davies NM, Anderson KE. 1997. **Clinical pharmacokinetics of diclofenac. Therapeutic insights and pitfalls**. *Clin Pharmacokinet*. 33 (3):184-213.
- Descartes R. 1901. **L'Homme**. En: **"Lectures on the history of physiology during the 16th, 17th and 18th centuries"**, traducido por M. Foster. Cambridge, England.
- Díaz-González F, González-Alvaro I, Campanero MR, Mollinedo F, del Pozo MA, Muñoz C, Pivel JP, Sánchez-Madrid F. 1995. **Prevention of in vitro neutrophil-endothelial attachment through shedding of L-selectin by nonsteroidal antiinflammatory drugs**. *J Clin Invest*. 95(4):1756-1765.

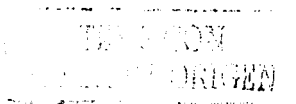
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



- Dickenson AH, Sullivan AF. 1987. Subcutaneous formalin-induced activity of dorsal horn neurones in the rat: differential response to an intrathecal opiate administered pre or post formalin. *Pain*. 30:349-360.
- Dominkus M, Nicolakis M, Kotz R, Wilkinson FE, Kaiser RR, Chlud K. 1996. Comparison of tissue and plasma levels of ibuprofen after oral and topical administration. *Arzneimittelforschung*. 46:1138-1143.
- Doughtery 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.
- Duarte ID, Faccioli LH, Ferreira SH. 1992b. Blockade of the peripheral pain sensory system via the L-arginine-nitric oxide-cGMP pathway. En: the biology of nitric oxide, Vol. 1. Portland Press proceeding. 258.
- Duarte ID, Ferreira SH. 1992a. The molecular mechanism of central analgesia induced by morphine or carbachol and the L-arginine-nitric oxide-cGMP pathway. *Eur J Pharmacol*. 22:171-174.
- Duarte ID, Lorenzetti BB, Ferreira SH. 1990. Peripheral, analgesia and activation of the nitric oxide-cyclic GMP pathway. *Eur J pharmacol*. 221(1):171-174.
- 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.
- Erickson HH, Kitchell RL. 1984. Pain perception and alleviation in animals. *Fed Proc*. 43(5):1307-1312.
- Evans WO. 1961. A new technique for the investigation of some drugs on a reflexive behavior in the rat. *Psychopharmacol*. 2:318-325.
- Ferreira SH. 1972. Prostaglandins, aspirin-like drugs and analgesia. *Nat New Biol*. 240(102):200-203.



- Ferreira SH, Duarte ID, Lorenzetti BB. 1991. The molecular mechanism of activation of peripheral morphine analgesia: stimulation of the cGMP system via nitric oxide release. *Eur J Pharmacol.* 201(1):121-122.
- Ferreira SH, Lorenzetti BB. 1994. Glutamate spinal retrograde sensitization of primary sensory neurons associated with nociception. *Neuropharmacology.* 33(11):1479-1485.
- Ferreira SH, Lorenzetti BB, Faccioli LH. 1992. Blockade of hyperalgesia and neurogenic oedema by topical application of nitroglycerin. *Eur J Pharmacol.* 217:207-209.
- Ferrier ML, Combet S, Van Landschoot M, Stoenoiu MS, Cnops Y, Lameire N, Devuys O. 2001. Inhibition of nitric oxide synthase reverses changes in peritoneal permeability in a rat model of acute peritonitis. *Kidney Int.* 60(6): 2343-2350.
- Fields HL, Martin JB. 1994. Dolor: Fisiopatología y tratamiento. En: Harrison. Principios de medicina interna. 13^{va} ed. Ed. Mc Graw Hill-Interamericana. España. Cap. 11:57-63.
- Forth W, Martin E, Peter K. 1995. Dolor. En: 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.
- 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 JA, Herrero JF. 1998. Somestesia: mecanorrecepción, termorrecepción y nocicepción. En: manual de neurociencia. Ed. Síntesis. España. 18:457-481.
- Garrino MG, Henquin JC. 1988. Highly potent and stereoselective effects of the benzoic acid derivative AZ-DF265 on pancreatic β -cells. *Br J Pharmacol.* 93:61-68.
- Garrino MG, Meissner HP, Henquin JC. 1986. The non-sulfonylurea moiety of gliquidone mimics the effects of the parent molecule on pancreatic β -cells. *Eur J Pharmacol.* 124:309-316.

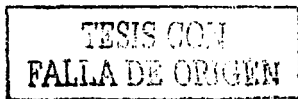




- Garthwaite J. 1991. Glutamate, nitric oxide and cell-cell signaling in the nervous system. *Trends Neurosci.* 14:60-67.
- Gillian E, Weston AH. 1993. The pharmacology of ATP-sensitive potassium channels. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 33:597-637.
- Glazer EJ, Steinbush H, Verhofstad A, Basbaum AI. 1981. Serotonin neurons in nucleus raphe dorsalis and paragigantocellularis of the cat contain enkephalin. *J Physiol.* 77:241-245.
- Granados-Soto V, Flores-Murrieta FJ, Castañeda-Hernández G, López-Muñoz FJ. 1995b. Evidence for the involvement of nitric oxide in the antinociceptive effect of ketorolac. *Eur J Pharmacol.* 277:281-284.
- Granados-Soto V, Rufino MO, Gomes Lopes LD, Ferreira SH. 1997. Evidence for the involvement of the nitric oxide-cGMP pathway in the antinociception of morphine in the formalin test. *Eur J Pharmacol.* 340(2-3):177-180.
- Guyton AC, Hall JE. 1996. Dolor, cefalea y sensaciones de temperatura. En: tratado de fisiología médica. Ed. Interamericana-Mc Graw-Hill. 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.
- Hansen DK, Davies MI, Lunte SM, Lunte CE. 1998. Pharmacokinetic and metabolism studies using microdialysis sampling. *J Pharm Sci.* 88:14-27.
- 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.
- Harima A, Shimizu H, Takagi H. 1991. Analgesic effect of L-arginine in patients with persistent pain. *Eur Neuropsychopharmacol.* 1(4):529-533.
- Haux P, Sawerthal H, Habermann E. 1967. Sequence analysis of bee venom neurotoxin (apamin) from tryptic and chymotryptic cleavage products. *Physiol Chem.* 348:737-738.
- 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.



- Holthusen H, Arndt JO. 1994. Nitric oxide evokes pain in humans on intracutaneous injection. *Neurosci Lett.* 165(1-2):71-74.
- Hyman SE, Cassem NH. 1995. Dolor. En: *neurología*. Ed. Científica médica latinoamericana. 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. En: *Principles of Neural Science*. Kandel ER, Schwartz JH, Jesell TM. 3rd ed. Elsevier, pp.385-399.
- John VA. 1979. The pharmacokinetics and metabolism of diclofenac sodium (Voltarol®) in animals and man. *Rheumatology and Rehabilitation. (Suppl 2):* 22-35.
- Jorens PG, Matthys KE, Bult H. 1995. Modulation of nitric oxide synthase activity in macrophages. *Me inflammation.* 4:75-89.
- 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.
- Kankuri E, Vaali K, Knowles RG, Lahde M, Korpela R, Vapaatalo H, Moilanen E. 2001. Suppression of acute experimental colitis by a highly selective inducible nitric-oxide synthase inhibitor, N-[3-(aminomethyl)benzyl]acetamidine. *J Pharmacol Exp Ther.* 298(3):1128-1132.
- 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.
- Kendall MJ, Thornhill DP, Willis JV. 1979. Factors affecting the pharmacokinetics of diclofenac sodium. *Rheumatol Rehabil. (Suppl 2):*38-45.
- Khan I, Marsala M, Printz M, Taylor P, Yaksh T. 1996. Intrathecal nicotinic agonist-elicited release of excitatory amino acids as measured by *in vivo* spinal microdialysis in rats. *J Pharm Exp Ther.* 278:97-106.
- Kobayashi K, Arakawa T, Satoh H, Fukuda T, Nakamura H. 1985. Effect of indomethacin, tiaprofenic acid and diclofenac on rat gastric mucosal damage and content of prostacyclin and prostaglandin E₂. *Prostaglandins.* 30:609-618.
- 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.
- Krupp P. 1975. New aspects of inflammation prevention by means of non-steroid antiphlogistics: the effect of voltaren. *Schweiz Med Wochenschr.* 105(20):646-652.
- Krupp P, Menassé R, Riesterer L, Ziel R. 1976. The role of prostaglandins in inflammation. Huber Publishers. Bern, pp. 108-121.
- Ku EC, Lee W, Kothari HV, Kimble EF, Liauw L, Tian J. 1985. The effects of diclofenac sodium on arachidonic acid metabolism. *Semin Arthritis Rheum.* 15(Suppl 1):36-41.
- Ku EC, Lee W, Kothari HV, Scholer DW. 1986. Effect of diclofenac sodium on the arachidonic cascade. *Amer J Med.* 80(Suppl 4B):18-23.
- Ku EC, Wasvary JM, Cash WD. 1975. Diclofenac sodium (GP 45, 840 voltaren), a potent inhibitor of prostaglandin synthetase. *Biochem Pharmacol.* 24:641-643.
- Kuhar MJ, Pasternark GW. 1984. "Analgesics: neurochemical, behavioral and clinical perspectives". Editado por Kuhar MJ y Pasternark GW. Raven Press. USA, NY: 289-312.



- 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.
- Lang DG, Ritchie AK. 1990. Tetraethylammonium blockade of apamin-sensitive and insensitive Ca^{2+} -activated K^{+} channels in a pituitary cell line. *J Physiol.* 425:17-132.
- Latoxan. <http://www.latoxan.com/HTML/00000149.html>. 8 de julio del 2002.
- Lázaro-Ibáñez GG, Torres-López JE, Granados-Soto V. 2001. Participation of the nitric oxide-cyclic GMP-ATP-sensitive K^{+} channel pathway in the antinociceptive action of ketorolac. *Eur J Pharmacol.* 426:41-46.
- 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. 9th ed. Mc Graw Hill. Cap. 6.
- Lewis T, Kellgren JH. 1939. Observations relating to referred pain, visceromotor reflexes and other associated phenomena. *Clin Sci.* 4:47-71.
- Li X, Clark JD. 2001. Spinal cord nitric oxide synthase and heme oxygenase limit morphine induced analgesia. *Brain Res Mol.* 95(1-2):96-102.
- Lim RK. 1967. Pain mechanisms. *Anesthesiol.* 28(1):106-110.
- Loeser JD, Melzack R. 1999. Pain: an overview. *Pain.* 353:1607-1609.
- López-Muñoz FJ, Castañeda-Hernández G, Torres-López JE, Picazo YF, Flores-Murrieta FJ, Granados Soto V. 1996. Differences in the mechanism of antinociceptive action of non-steroidal anti-inflammatory drugs in the rat. *Pharm Sci.* 2:189-190.
- MacDermott 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.
- Malmberg AB, Yaksh TL. 1992. Antinociceptive actions of spinal nonsteroidal anti-inflammatory agents on the formalin test in the rat. *J Pharmacol Exp Ther.* 263(1):136-146.

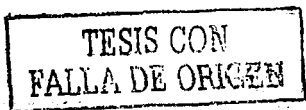
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



- 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, Rusche KM. 1998. Catalysis by nitric oxide synthase. *Curr Opin Chem Biol*. 2(5):656-663.
- Marsala M, Malmberg A, Yaksh T. 1995. The spinal loop dialysis catheter: characterization of use in the unanesthetized rat. *J Neurosci*. 62:43-53.
- Masubuchi Y, Ose A, Horie T. 2001. Mechanism-based inactivation of CYP2C11 by diclofenac. *Am Soc Pharmacol Exp Ther*. 29:1190-1195.
- Mayer DJ, Wolfe 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.
- 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, Dykstra C, Gebhart GF. 1992. Production of endogenous nitric oxide and activation of soluble guanylate cyclase are required for N-methyl-D-aspartate produced facilitation of the nociceptive tail-flick reflex. *Eur J Pharmacol*. 214:93-96.
- Meller ST, Gebhart GF. 1993. Nitric oxide (NO) and nociceptive processing in the spinal cord. *Pain*. 52:127-136.
- 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, pp. 423-443.
- Melzack R, Wall PD. 1965. Pain mechanism: A new theory. *Science*. 150:971-979.
- Menacherry S, Hubert W, Justice JB. 1992. In vivo calibration of microdialysis probes for exogenous compounds. *Anal Chem*. 64:577-583.



- Menassé R, Hedwall PR, Kraetz J, Pesicin C, Riesterer L. 1978. Pharmacological properties of diclofenac sodium and its metabolites. *Scand J Rheumatol. (Suppl. 22):5-16.*
- 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.*
- Moore PK, Oluyomi AO, Babbedge RC, Gaffen Z, Wallace P, Hart SL. 1991. L-N^G-nitro arginine methyl ester exhibits antinociceptive activity in mice. *Br J Pharmacol. 102:198-202.*
- Morgan CV, Babbedge RC, Gaffen Z, Wallace P, Hart SL, Moore PK. 1992. Synergistic antinociceptive effect of L-N-nitro arginine methyl ester (L-NAME) and flubiprofen in the mouse. *Br J Pharmacol. 106:493-497.*
- Mörsdorf K, Wolf G. 1977. Zur Wirkungspotenz neuerer Antiphlogistika. *Arzneimittel-Forschung. 27:531-533.*
- 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.*





- Noguchi Y, Ishiko J, Ohtsuki I. 1984. Comparative pharmacological profiles of piroxicam, indomethacin, phenylbutazone, diclofenac, ibuprofen, and mefenamic acid. *Royal society of medicine international congress and symposium series*. 67:61-67.
- Oliu E, Lundén I, Anggård E. 1978. *In vivo* inhibition of prostaglandin synthesis in rabbit kidney by non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Acta Pharmacol Toxicol*. 42:179-184.
- Ortiz MI, Torres-López JE, Castañeda-Hernández G, Rosas R, Vidal-Cantú GC, Granados-Soto V. 2002. Pharmacological evidence for the activation of K⁺ channels by diclofenac. *Eur J Pharmacol*. 438(1-2):85-91.
- Paalzow L. 1969. An electrical method for stimulation of analgesic activity in mice. II. Application of the method in investigations of some analgesic drugs. *Acta Pharm Suec*. 6(2):207-226.
- Pennefather P, Lancaster B, Adams PR, Nicoll RA. 1985. Two distinct Ca-dependent K currents in bullfrog sympathetic ganglion cells. *Proc Natl Acad Sci*. 82:3040-3044.
- Puig S, Sorkin LS. 1995. Formalin-evoked activity in identified primary primary afferent fibers: systemic lidocaine suppress phase-2 activity. *Pain*. 64:345-355.
- Raigorodsky G, Urca G. 1987. Intrathecal N-methyl-D-aspartate (NMDA) activates both nociceptive and antinociceptive systems. *Brain Res*. 422:158-162.
- Rainsford KD, Willis C. 1982. Relationship of gastric mucosal damage induced in pigs by anti-inflammatory drugs to their effects on prostaglandin production. *Dig Dis Sci*. 27(7):624-635.
- Reeh PW, Steen KH, Hanesch A. 1991. A dominant role of pH in inflammatory excitation of nociceptors in rat skin. *Soc Neurosci Abstr*. 17:537
- Rees DD, Palmer RMJ, Schulz R, Hodson HF, Moncada S. 1990. Characterization of three inhibitors of endothelial nitric oxide synthase *in vitro* and *in vivo*. *Br J Pharmacol*. 101:746-752.
- Reisine T, Pasternak GW. 1996. Opioid analgesics and antagonists. In: Goodman and Gilman's, *The pharmacological basis of therapeutics*. 9th ed. Mc Graw Hill. Cap. 23:521-554.



- Rexed B. 1952. Cytoarchitectonic atlas of the spinal cord in the cat. *J Comp Neurol.* 96:415-466.
- Reynolds DV. 1969. Surgery in the rat during electrical analgesia induced by focal brain stimulation. *Science.* 164:444-445.
- Riess W, Stierlin H, Degen P, Faigle JW, Gerardin A, Moppert J, Sallmann A, Schmid K, Schweizer A, Sulc M, Theobald W, Wagner J. 1978. Pharmacokinetics and metabolism of the anti-inflammatory agent voltaren. *Scand J Rheumatol. (Suppl 22):17-29.*
- Riess VW, Schmid K, Botta L, Kobayashi K and Moppert J. 1986. Die perkutane resorption von diclofenaco. *Arzneimittel Forschung.* 36:1092-1096.
- 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.* 66:219-268.
- Sacerdote P, Monza G, Mantegazza P and Panerai AE. 1985. Diclofenac and piroprofen modify pituitary and hypothalamic beta-endorphin concentrations. *Pharmacol Res Commun.* 8:17-21.
- 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.
- Sawynok J. 1987. GABAergic mechanisms of analgesia: an update. *Pharmacol Biochem Behav.* 26(2):463-474.
- Sayan H, Babul A, Ugurlu B. 2001. Effects of nitric oxide donor and inhibitor on prostaglandin E2-like activity, malondialdehyde and reduced glutathione levels after skeletal muscle ischemia-reperfusion. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 65(4):179-183.
- Schuman EM, Madison DV. 1994. Locally distributed synaptic potentiation in the hippocampus. *Science.* 263:532-536.



- Shieh C-C, Coghlan M, Sullivan JP, Gopalakrishnan M. 2000. Potassium channels: molecular defects, diseases, and therapeutic opportunities. *Pharmacol Rev.* 52(4):557-593.
- 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. Cap. 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):1-9.
- Stierlin H, Faigle JW, Sallmann A, Küng W. 1979. Biotransformation of diclofenac sodium (voltaren®) in animals and in man: I. Isolation and identification of principal metabolites. *Xenobiotica.* 9:601-610.
- Stimmel B. 1983. Neuroregulators and pain. In: pain, analgesia and addiction: The pharmacologic treatment of pain. Ed. Raven Press. NY. Cap. 2:18-36.
- Stocker M, Krause M, Pedarzani P. 1999. An apamin-sensitive Ca²⁺-activated K⁺ current in hippocampal pyramidal neurone. *Proc Natl Acad Sci.* 96:4662-4667.
- Sturgess NC, Ashford MJ, Cook DL, Hales CN. 1985. The sulphonylurea receptor may be an ATP-sensitive potassium channel. *Lancet.* 2:474-475.
- Sturgess NC, Kozlowski RZ, Carrington CA, Hales CN, Ashford ML. 1988. Effects of sulphonylureas and diazoxide on insulin secretion and



- nucleotide-sensitive channels in an insulin-secreting cell line. *Br J Pharmacol.* 95:83-94.
- Takashima T, Kado Y, Ono T. 1972. Anti-inflammatory effects of GP 49, 840. *Clinical Reports.* 6:50-57.
- Taylor RJ, Salata JJ. 1976. Inhibition of prostaglandin synthetase by tolmetin (tolectin, McN-2559), a new non-steroidal anti-inflammatory agent. *Biochem Pharmacol.* 25:2479-2484.
- Tegeder I, Muth-Selbach U, Lotsh J, Rusing G, Oelkers R, Brune K, Meller S, Kelm GR, Sorgel F, Geisslinger G. 1999. Application of microdialysis for the determination of muscle and subcutaneous concentrations after oral and topical ibuprofen administration. *Clin Pharmacol Ther.* 65:357-368.
- 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. 9th ed. Raven Press, pp. 463-477.
- Tjölse A, Berge O-G, Hunskaar S, Rosland JH, Hole K. 1992. The formalin test: an evaluation of the method. *Pain.* 51:5-17.
- Todd PA, Sorkin EM. 1988. Diclofenac sodium: a reappraisal of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic efficacy. *Drugs.* 35:244-285.
- Tonussi CR, Ferreira SH. 1994. Mechanism of diclofenac analgesia: direct blockade of inflammatory sensitization. *Eur J Pharmacol.* 251:173-179.
- Torres-López JE, López-Muñoz FJ, Castañeda-Hernández G, Flores-Murrieta FJ, Granados-Soto V. 1997. Pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling of the antinociceptive effect of diclofenac in the rat. *J Pharmacol Exp Ther.* 282:685-690.
- Torres-López JE, Ortiz MI, Castañeda-Hernández G, Alonso-López R, Asomoza-Espinosa R, Granados-Soto V. 2002. Comparison of the antinociceptive effect of celecoxib, diclofenac and resveratrol in the formalin test. *Life Sciences.* 70:1669-1676.



- Tsurumi K, Hiramatsu Y, Yamaguchi A, Hayashi M, Shibuya T. 1973a. Effects of GP 45/840 on acute experimental inflammations. *Fol Pharmacol Jap.* 69:299-318.
- Tsurumi K, Hiramatsu Y, Yamaguchi A, Hayashi M, Shibuya T. 1973b. Effects of GP-45,840 on subchronic experimental inflammations. *Fol pharmacol Jap.* 69:319-334.
- Turk DC, Okifuji A. 1999. Assessment of patient's reporting of pain: an integrated perspective. *The Lancet.* 353:1784-1788.
- Vaile JH, Davis P. 1998. Topical NSAIDs for musculoskeletal conditions. A review of the literature. *Drugs.* 56:783-799.
- Vanegas H, Schaible HG. 2001. Prostaglandins and cyclooxygenases in the spinal cord. *Progress in Neurobiology.* 64:327-363.
- Vescovi P, Passeri M, Gerra G, Grossi. 1986. Naloxone inhibits the early phase of diclofenac analgesia in man. *Pain Clinic.* 87:151-155.
- Wall PD. 1979. On the relation of injury to pain. *Pain.* 6:253-264.
- 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. *TIPS.* 11:25-33.
- Way WL, Fields HL, Schumacher MA. 2001. Opioid Analgesics & Antagonists. In: basic & clinical pharmacology. Bertram G. Katzung. 8th ed. Mc Graw-Hill. Cap. 31:512-531.
- Wheeler-Aceto H, Cowan A. 1991. Standardization of the rat paw formalin test for evaluation of analgesics. *Psychopharm.* 104:35-44.
- Wessellmann 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, pp. 97-117.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



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.

Winter CA, Risley EA, Nuss GW. 1963. Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for inflammatory drugs. *Proc Soc Exp Biol Med*. 162:544-547.

Woolfe G, MacDonald AL. 1944. The evaluation of the analgesic action of pethidine hydrochloride. *J Pharmacol Exp Ther*. 80:300-307.

Yaksh TL, Rudy TA. 1976. Chronic catheterization of the spinal subarachnoid space. *Physiol Behav*. 17:1031-1036.

Zhang L, McBain CJ. 1995. Potassium conductances underlying repolarization and after-hyperpolarization in rat CA1 hippocampal interneurons. *J Physiol*. 488:661-672.

Zhuo M, Meller ST, Gebhart GF. 1993. Endogenous nitric oxide is required for tonic cholinergic inhibition of spinal mechanical transmission. *Pain*. 54(1):71-78.

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.

