

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

EFFECTO DE ALGUNOS ANTIBACTERIANOS SOBRE EL POTENCIAL
DE ACCIÓN COMPUESTO EVOCADO EN PREPARACIONES DE
NERVIO ISQUIÁTICO-RAÍZ DORSAL DE RATAS

TESIS QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

PRESENTA

LUIS ANTONIO ARMIJO GONZÁLEZ

Asesores:

Dr. Ignacio Lizarraga Madrigal
Dra. Sara del Carmen Caballero Chacón

México, D.F.

2008



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DEDICATORIA

A la parte de mi “familia” que no creyó que fuese capaz de realizar esto
y de tener todo lo que he logrado.

Al Peluso, por darme la inspiración para llegar a donde estoy.

A mi otra familia, por hacerme sentir parte de ella.

AGRADECIMIENTOS

A los que son parte de mi otra familia: Doña Angelina, Cachetón, Kika, Angelina, Don Arturo, Enano, Pillo, Doña Pilar, Alex, Nenus y Chuchín.

A toda la banda de los “Pedorros”, por tratarme como uno más.

Al Dr. Ignacio Lizarraga Madrigal, por su ayuda, paciencia y confianza para poder hacer este trabajo.

A la Dra. Sara del Carmen Caballero Chacón, por todas la facilidades, ayuda y confianza que me da.

A Here A. Rodríguez Roldán, por encaminarme y darme el empujón que necesitaba.

A mi mamá, porque todo lo que hizo me ayudó a ser más fuerte.

A la Dra. Claudia V. Rivera Cerecedo, al bioterio del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM y a su personal, por ayudarme con los animales que utilice en este trabajo.

A mis amigos, que a pesar de no ser muchos me aceptaron como soy y me apoyan cuando los necesito.

Al personal del departamento de Fisiología y Farmacología: QBP. María Angélica Martínez Zavala, Leobardo Arce Jaramillo, Claudia Cortés, Alma D. Hernández Acevedo, Don Ele, Donají Villavicencio; por proporcionarme todo lo que les pedí para poder realizar este trabajo.

Y a todos los que de alguna manera, directa o indirecta, intervinieron en la realización de este trabajo.

Esta tesis se elaboró con el apoyo de los proyectos PAPIIT 201605 y PAPIIME 206805.

CONTENIDO

Introducción.....	1
Hipótesis.....	4
Objetivo.....	4
Objetivos específicos.....	4
Materiales y Métodos.....	5
Animales.....	5
Disección.....	5
Registros electrofisiológicos.....	6
Velocidad de conducción.....	7
Fármacos.....	7
Estudios preliminares.....	9
Experimentos.....	9
Lidocaína.....	9
Capsaicina.....	12
Antibacterianos.....	12
Análisis estadístico.....	12
Resultados.....	13
Umbral de excitación y velocidad de conducción.....	13
Tratamientos control (Tyrode)	13
Lidocaína.....	15
Capsaicina.....	16
Neomicina.....	17
Gentamicina.....	18
Ampicilina.....	19
Minociclina.....	20
Discusión.....	21
Tratamientos control (Tyrode)	21
Umbral de excitación y velocidad de conducción.....	21
Lidocaína.....	22
Capsaicina.....	23
Aminoglucósidos (neomicina y gentamicina).....	23
Ampicilina.....	24
Minociclina.....	25
Conclusiones.....	26
Referencias.....	27

Introducción

La lidocaína es el anestésico local más utilizado en el mundo.¹ En medicina veterinaria se le utiliza en diferentes formas para inducir anestesia local (tópica, infiltración local, epidural, intratecal, etc.), como antiarrítmico y como suplemento a la anestesia general.² Su efecto terapéutico lo logra al alterar de forma reversible los flujos iónicos y disminuir la permeabilidad a los iones de sodio en la membrana plasmática, inhibiendo su despolarización. El bloqueo de la conducción de impulsos nerviosos se presenta 1 a 3 minutos posteriores a su administración y su efecto dura alrededor de 60 minutos.³

La lidocaína, al igual que otros anestésicos locales (v.g. etidocaína, mepivacaína, ropivacaína, bupivacaína), se metaboliza en el hígado a 2,6-xilidina⁴ (Figura 1). Primero sufre N-deetilación produciendo monoetilglicinexilidida y posteriormente N-dealquilación para formar glicinexilidida, productos que sufren hidroxilación para formar 4-OH-2,6-xilidina.²

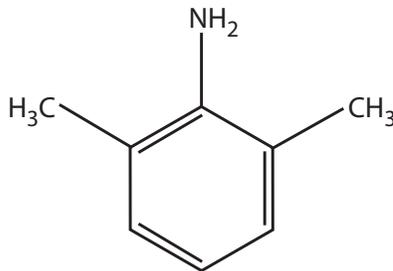


Figura 1. Fórmula estructural de la 2,6-xilidina. También se le conoce como 2-amino-1,3-dimetilbenzeno, 2-amino-1,3-xileno, 2-amino-meta-xileno, 2,6-dimetilfenilamina, ortho-xilidina, o 2,6-meta-xilidina.

Las aminas aromáticas carcinogénicas ejercen sus efectos biológicos a través de la activación metabólica por el citocromo P-450 (CYP), lo que activa intermediarios electrofílicos reactivos que se unen al ADN.⁵ En el caso de la 2,6-xilidina el grupo nitrógeno y amino, además de la posición *para* del anillo aromático, son dos sitios posibles para que la monooxigenación, mediada por el CYP, inicie la producción de N-(2,6-dimetilfenil)hidroxilamina (DMHA) y 4-amino-3,5-dimetilfenol (DMAP) respectivamente (Figura 2). El DMHA tiene la capacidad de reaccionar con el ADN

de manera directa o posterior a una esterificación.^{6,7} La DMAP es potencialmente genotóxica, ya que sufre oxidación no enzimática lo que genera una iminoquinona que es muy electrofílica.⁶

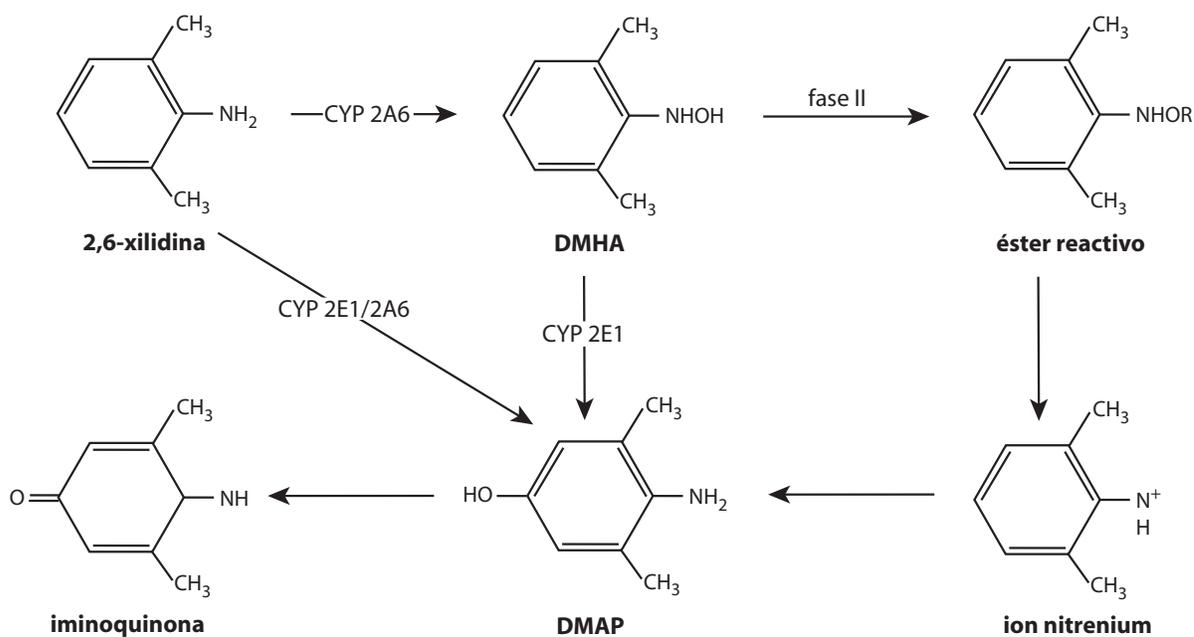


Figura 2. Vías de activación propuestas de la 2,6-xilidina. La oxidación de la 2,6-xilidina por el CYP2E1/2A6 o por el CYP2A6 forman DMAP y DMHA, respectivamente. El DMHA tiene la capacidad de reaccionar con el ADN o la hemoglobina. Además, también puede experimentar conjugación (Fase II) para activar ésteres que pueden descomponerse espontáneamente para activar iones de nitrenium, los cuales pueden reaccionar con el ADN y otras macromoléculas. Estos iones también pueden reaccionar con H₂O para formar DMAP. Éste puede experimentar oxidación no enzimática para generar una iminoquinona, que es fuertemente electrofílica. El DMHA también puede convertirse a DMAP por el CYP2E1 (adaptado de Gan *et al.*⁶).

Estudios *in vitro* demostraron la conversión de lidocaína y monoetilglicinexilidida a 2,6-xilidina en cortes de hígado de humano⁴ y CYPs humanos recombinantes y microsomas hepáticos humanos generaron DMAP y DMHA a partir de concentraciones micromolares y nanomolares de 2,6-xilidina, respectivamente.⁶ En ratas y perros, la DMAP es el principal metabolito de la 2,6-xilidina en la orina.⁸ La 2,6-xilidina también se puede excretar a través de la leche, lo cual se observó en vacas a las que se les administró lidocaína para diversos procedimientos quirúrgicos, e inclusive en humanos que recibieron lidocaína durante un procedimiento dental.⁹

También se han detectado niveles elevados de 2,6-xilidina-hemoglobina en humanos que recibieron tratamientos con lidocaína para anestesia local o arritmias, lo que sugiere que el DMHA es un metabolito de la lidocaína en humanos. Sin embargo, este metabolito también se ha encontrado en personas que no han tenido contacto con la lidocaína.¹⁰ Además de recibir lidocaína para procedimientos quirúrgicos o terapéuticos, los humanos se pueden exponer a este compuesto por el humo de cigarro,^{11,12} por pesticidas,¹¹ o por el consumo de leche contaminada ya sea de la madre o de alguna otra especie.⁹

La 2,6-xilidina se considera como carcinógeno en ratas.¹³ El Programa Nacional de Toxicología de los Estados Unidos de Norteamérica la reconoce como un “evidente carcinogénico en animales experimentales”¹⁴ y la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer la considera como un “probable carcinogénico en humanos”.¹¹ Con base en esto, la Unidad de Evaluación de Medicina Veterinaria de la Agencia Europea para la Evaluación de Productos Medicinales, prohibió el uso de la lidocaína en animales de producción en Europa.¹⁵ La Agencia de Alimentos y Fármacos de los Estados Unidos de Norteamérica también se encuentra revisando esta posibilidad.¹

Debido a que aún no hay suficiente evidencia científica del efecto carcinogénico de la 2,6-xilidina en humanos, el uso de la lidocaína y otros anestésicos locales en esta y otras especies continúa. Esto incita a investigar nuevas alternativas para tratar de controlar el dolor, tanto en medicina humana como en veterinaria, antes de que se prohíba su uso por completo.

Una posible alternativa es el uso de antibacterianos ya que existen informes en la literatura que describen efectos analgésicos para algunos aminoglucósidos, β -lactámicos y el cloranfenicol en modelos de dolor térmico, mecánico, visceral, neuropático, quirúrgico e inflamatorio en roedores.¹⁶⁻²⁰ De ser comprobado su efecto analgésico en diferentes especies domésticas, estos compuestos se podrían utilizar con este fin en la práctica veterinaria.

El presente estudio tuvo como objetivo investigar el potencial efecto anestésico local de algunos antibacterianos en preparaciones de nervio isquiático-raíz dorsal de ratas de 10 días de edad (P10). El grado de maduración y mielinización del nervio isquiático a esta edad es adecuado para responder al efecto de los anestésicos locales, y la estimulación eléctrica de estas preparaciones induce potenciales de acción compuestos que permiten evaluar de manera simultánea las fibras nerviosas A y C.^{21,22} Esto hace que la preparación de nervio isquiático-raíz dorsal sea un buen modelo para evaluar el posible efecto anestésico local de diferentes compuestos.

RESUMEN

ARMIJO GONZÁLEZ LUIS ANTONIO. Efecto de algunos antibacterianos sobre el potencial de acción compuesto evocado en preparaciones de nervio isquiático-raíz dorsal de ratas. (Bajo la dirección de: Dr. Ignacio Lizarraga Madrigal, Dra. Sara del Carmen Caballero Chacón).

La lidocaína es el anestésico local más utilizado en el mundo, pero se ha demostrado que, indistintamente del número de exposiciones, sus metabolitos son potencialmente carcinogénicos. Debido a esto es necesario buscar alternativas que permitan controlar el dolor y que eviten la presencia de dichos efectos secundarios. Con base en lo anterior se planteó determinara a través de preparaciones *in vitro* de nervio isquiático-raíz dorsal de ratas de 10 días de edad, el potencial anestésico local de algunos antibacterianos. Las preparaciones se colocaron en cámaras de acrílico con el nervio isquiático en contacto con los electrodos de estimulación y su raíz dorsal con los de registro. Para este estudio se utilizaron los antibacterianos trisulfato de neomicina, sulfato de gentamicina, clorhidrato de minociclina y ampicilina sódica, todos diluidos en solución Tyrode modificada. Los tratamientos se aplicaron de menor a mayor concentración (1 μ M – 100 mM) para determinar su efecto sobre la amplitud de las fibras A y C del potencial de acción compuesto, el cual se evocó de manera eléctrica. La gentamicina, ampicilina y minociclina disminuyeron de manera significativa la amplitud de onda de las fibras A sin afectar significativamente la de las fibras C; la neomicina no produjo efectos significativos. Es posible que el efecto analgésico de algunos antibacterianos se deba a un efecto anestésico local. Si esto se comprueba posteriormente en animales, estos fármacos podrían constituir una alternativa que sustituya el empleo de la lidocaína para bloquear la transmisión neuronal.

Hipótesis

La aplicación de concentraciones crecientes de algunos antibacterianos deprimirá, en forma dependiente de la concentración, la amplitud de onda de las fibras tipo A y C evocadas de manera eléctrica en preparaciones de nervio isquiático-raíz dorsal de ratas P10.

Objetivos

Determinar, por medio de preparaciones *in vitro* de nervio isquiático-raíz dorsal de ratas P10, el potencial anestésico local de varios antibacterianos.

Objetivos específicos

Determinar el umbral de excitación de cada una de las preparaciones de nervio isquiático-raíz dorsal de ratas P10.

Determinar la velocidad de conducción de las fibras tipo A y C en preparaciones de nervio isquiático-raíz dorsal de ratas P10.

Determinar el tiempo necesario para que cada una de las soluciones de antibacterianos

a utilizar logre el equilibrio con respecto al tejido nervioso.

Realizar curvas de la concentración-respuesta y determinar la concentración necesaria para inhibir en 50% (CI_{50}) la amplitud de las ondas de las fibras A y C para los antibacterianos que produzcan un efecto inhibitorio en preparaciones de nervio isquiático-raíz dorsal de ratas P10.

Materiales y Métodos

Animales

Se utilizaron 32 ratas P10 (Figura 3), de ambos sexos, de la cepa Wistar provenientes del bioterio del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM. Dieciséis animales se utilizaron para los estudios preliminares y 16 para los trabajos de experimentación.



Figura 3. Rata de la cepa Wistar de 10 días de edad.

Dissección

De acuerdo a la NOM-062-ZOO-1999, las ratas se sacrificaron por medio de dislocación cervical y posteriormente se decapitaron.^{21,23} La piel de la región ventral

se retiró haciendo dos incisiones longitudinales sobre las cavidades torácica y abdominal. Los órganos de ambas cavidades se retiraron para exponer el canal vertebral, el cual se abrió por su parte ventral. Los nervios isquiáticos, junto con los ganglios de la raíz dorsal L4 o L5 y sus respectivas raíces dorsales y ventrales, se disecaron en solución de Tyrode modificada (118 mM NaCl, 24 mM NaHCO₃, 12 mM glucosa, 3 mM KCl, 1.5 mM CaCl₂, 1.25 mM MgSO₄·7H₂O; pH 7.4) y aerada (O₂ 95%/CO₂ 5%). Las preparaciones de nervio isquiático-raíz dorsal se colocaron en una caja de Petri con solución Tyrode modificada para retirar los remanentes de tejido conjuntivo y muscular, así como la raíz ventral de cada uno de los nervios.²¹

Registros electrofisiológicos

Las preparaciones se colocaron en cámaras de acrílico con el nervio isquiático en contacto con los electrodos de estimulación y la raíz dorsal en contacto con los electrodos de registro. Los electrodos se aislaron eléctricamente por medio de barreras hechas con una mezcla de vaselina y aceite mineral (5:4 v/v). Las preparaciones se bañaron en solución Tyrode modificada a temperatura ambiente (24- 26 °C).²¹

Las preparaciones se estimularon (Estimulador modelo BSLSTM, BIOPAC Systems, Santa Barbara, CA, Estados Unidos) por medio de pulsos sencillos en forma de cuadrado con duración de 500 µs cada uno. Para cada preparación, se determinó el umbral de excitación, que aquí se definió como el voltaje mínimo necesario para producir una respuesta clara por arriba del nivel basal (umbral de excitación de fibras A). Para evocar un potencial de acción compuesto en la raíz dorsal (PACRD) que tuviera una onda C (umbral de excitación de fibras C), las preparaciones se estimularon a intensidades de 2, 4, 8, 16, 24, 32, 48 y hasta 64 veces el umbral de excitación. Los estímulos se aplicaron cada 2 minutos. Los experimentos subsecuentes se llevaron a cabo utilizando voltajes dos veces mayor al umbral de excitación de las fibras C para cada preparación. Los potenciales de acción se amplificaron y transfirieron por medio de un sistema digital de adquisición de datos

(Modelo MP35, BIOPAC Systems), y se obtuvieron (10 kHz) por medio del programa BIOPAC Student Lab PRO® (v. 3.7, BIOPAC Systems) para su análisis posterior fuera de línea.

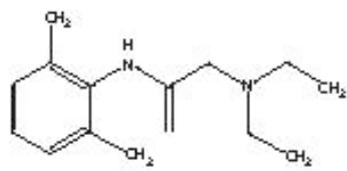
Velocidad de conducción

Los PACRD se obtuvieron acorde al método anteriormente descrito y la velocidad de conducción de las fibras tipo A y C se determinaron a partir del tiempo transcurrido entre la estimulación del nervio y la generación del pico de la onda para la deflexión respectiva (velocidad pico). La velocidad de conducción se calculó dividiendo la distancia de conducción (15 mm) entre el tiempo de conducción para cada onda.

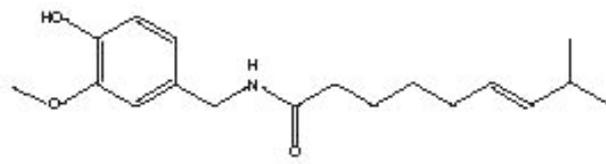
Fármacos

Los fármacos utilizados fueron trisulfato de neomicina, sulfato de gentamicina, clorhidrato de minociclina, ampicilina sódica, hclato de doxiciclina, amoxicilina, lidocaína y capsaicina. Todos los fármacos se obtuvieron de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, Estados Unidos), a excepción de la lidocaína que se obtuvo de Pisa Farmacéutica Mexicana (Guadalajara, Jalisco, México). Los tratamientos se aplicaron sobre 5 mm de la preparación y cada preparación recibió un solo tratamiento (fármaco). Todos los tratamientos se administraron en un volumen de 400 µl. La fórmula estructural de cada fármaco se muestra en la Figura 4.

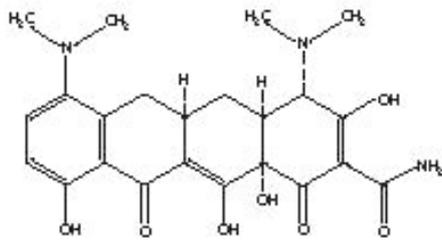
La lidocaína se diluyó en agua bidestilada hasta lograr una solución madre de 40 mM, mientras que la capsaicina se diluyó en etanol al 96% a una concentración de 1 mM. Ambas soluciones madre se mantuvieron a 4°C y, durante los días de experimentación, se diluyeron en solución Tyrode para obtener las concentraciones deseadas. Cada día de experimentación se prepararon diluciones nuevas en solución Tyrode para los antibacterianos, únicamente la minociclina se mantuvo en



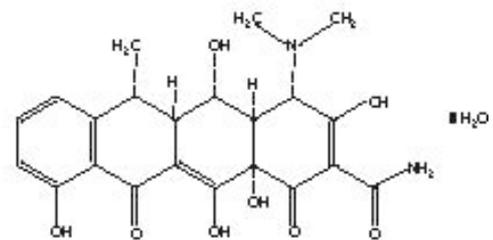
Lidocaína



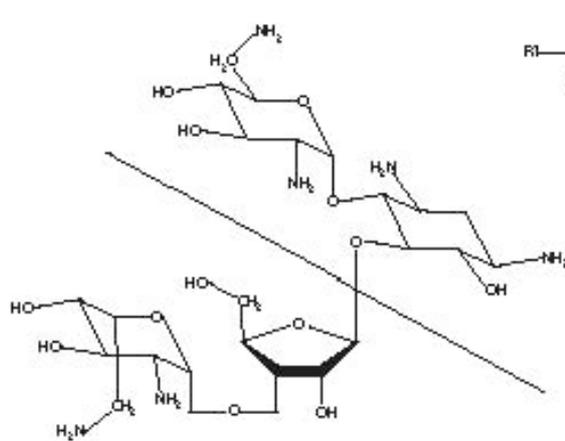
Capsaicina



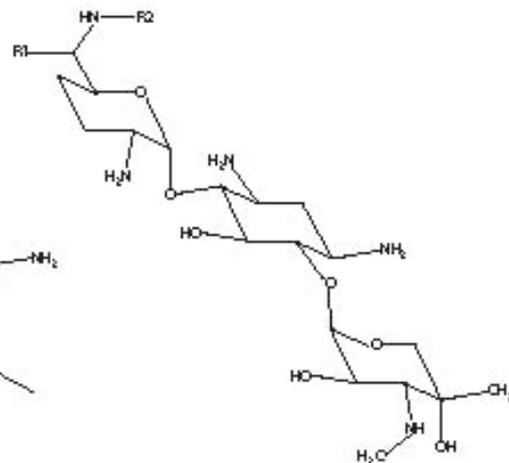
Minociclina



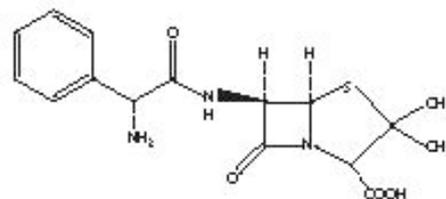
Doxiciclina



Neomicina



Gentamicina



Ampicilina

Figura 4. Fórmula estructural de los fármacos utilizados (adaptado de Sumano y Ocampo²⁴).

refrigeración (por una sola noche) una vez hecha en solución.

Debido a que el hclato de doxiciclina (1 μ M, 100 μ M, 1 mM, 50 mM, 100 mM) se precipitó y la amoxicilina (1 μ M, 100 μ M, 1 mM, 50 mM, 100 mM) formó una solución turbia de color blanco, estos antibacterianos no se utilizaron en los experimentos.

Estudios preliminares

Los estudios preliminares se llevaron a cabo con neomicina y ampicilina para tratar de establecer las concentraciones a utilizar en los experimentos, así como los tiempos necesarios para que los antibacterianos se equilibraran. Se obtuvieron cuatro registros basales del PACRD a intervalos de 2 minutos y posteriormente se administraron concentraciones crecientes de estos antibacterianos (156 μ M, 312 μ M, 625 μ M, 1.25 mM, 2.5 mM, 5 mM y 10 mM). Cada concentración permaneció en contacto con la preparación por 5 minutos y se tomaron registros cada minuto.

Los registros de las ondas C mostraron gran variabilidad después de la aplicación de ambos antibacterianos (Figura 5). Para determinar si las variaciones se debían a los tratamientos o alguna otra causa, se tomaron registros del PACDR siguiendo el mismo protocolo que en los estudios preliminares con neomicina y ampicilina, pero en esta ocasión únicamente en presencia de solución Tyrode. Estos registros control mostraron una variabilidad similar a la observada en los estudios preliminares con neomicina y ampicilina (Figura 6), por lo que se determinó que era un problema de interferencia.

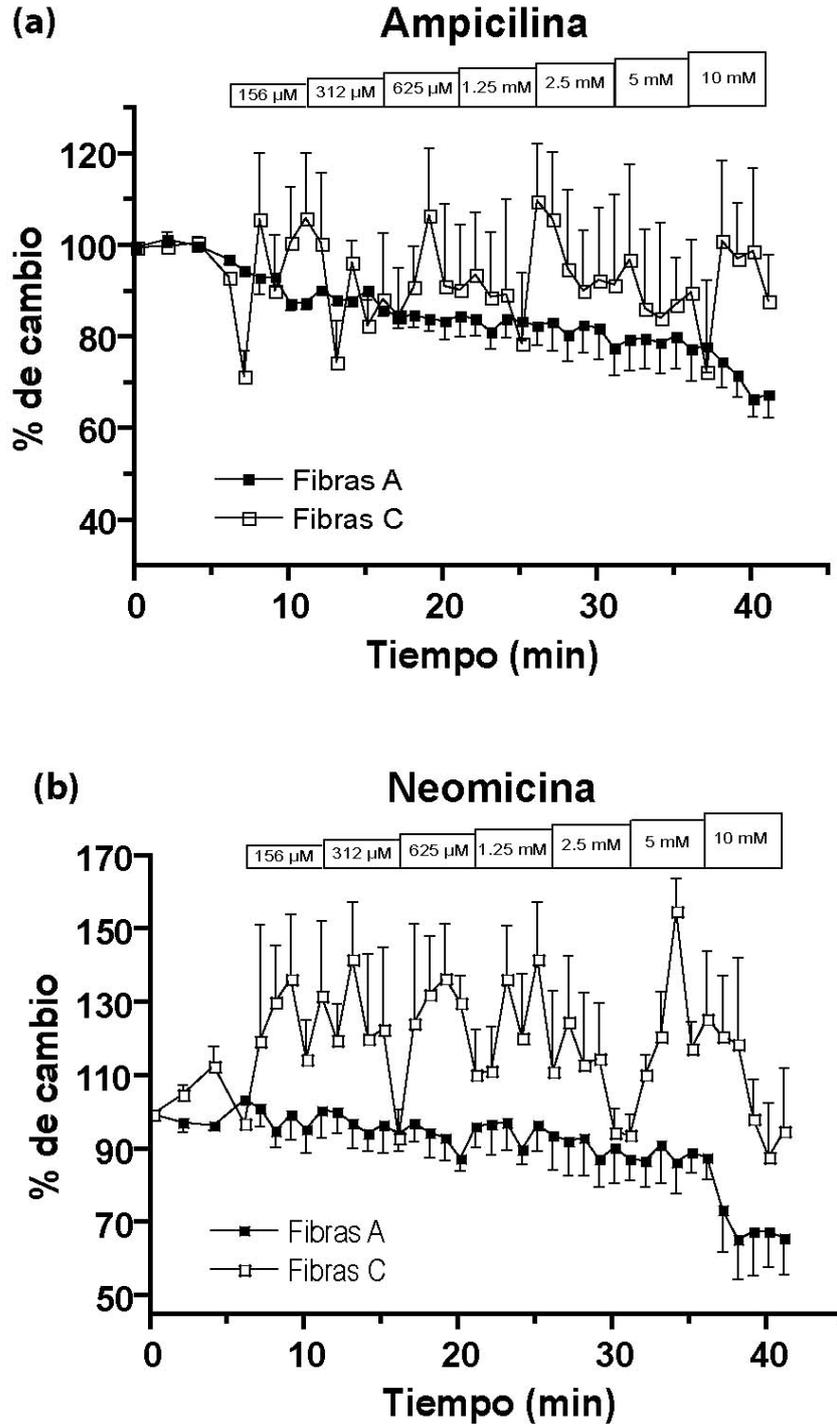


Figura 5. Estudios preliminares. Efecto de la ampicilina (a; 156 μ M - 10 mM) y neomicina (b; 156 μ M - 10 mM) sobre la amplitud de onda de las fibras A y C del potencial de acción compuesto de preparaciones de nervio isquiático-raíz dorsal L4 o L5 de ratas de 10 días de edad. Cada punto representa la media \pm e.e.m. (n = 4).

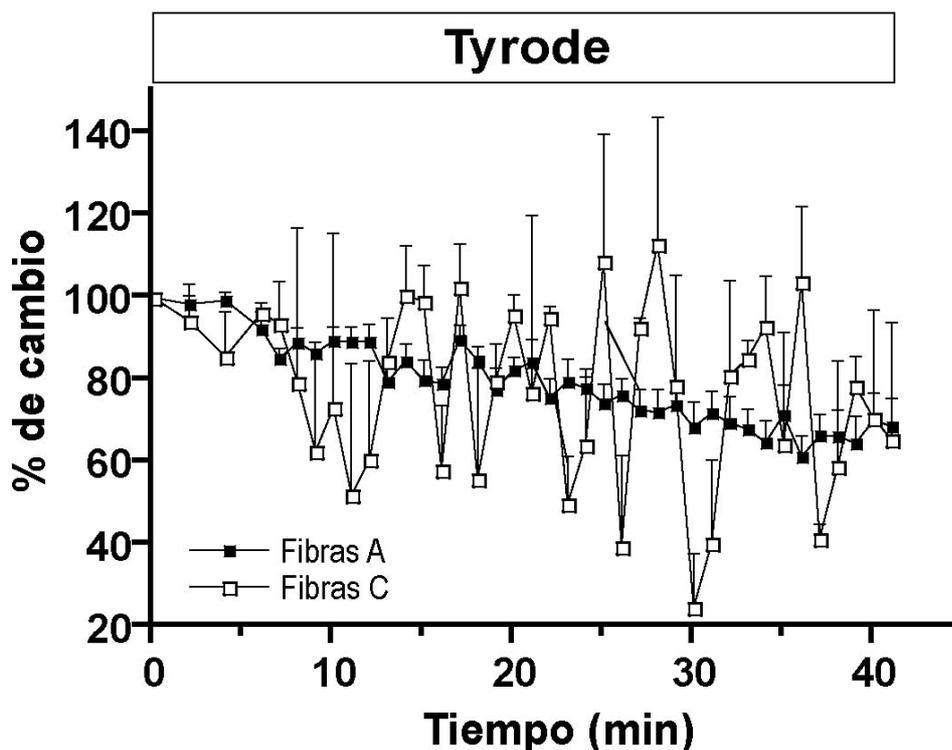


Figura 6. Estudios preliminares. Efecto de la solución Tyrode sobre la amplitud de onda de las fibras A y C del potencial de acción compuesto de preparaciones de nervio isquiático-raíz dorsal L4 o L5 de ratas de 10 días de edad. Cada punto representa la media \pm e.e.m. (n = 4).

En estudios subsecuentes en los cuales sólo se administró solución Tyrode, se colocó un caimán al electrodo negativo de las preparaciones para hacer “tierra” y disminuir la interferencia que se pudiese generar por los equipos eléctricos y electrónicos en el y alrededor del laboratorio de experimentación y que pudieran alterar los registros. Después se hizo otro tratamiento control en el que cada minuto la solución Tyrode aplicada a la preparación fue reemplazada por una nueva.

Experimentos

Lidocaína

La solución madre de lidocaína se diluyó en solución Tyrode hasta lograr concentraciones de 0.0625, 0.125, 0.25, 0.5, 1, y 2 mM. Después de obtener tres registros basales del PACRD para cada preparación, con un lapso de 2 minutos entre cada uno de ellos, se aplicaron concentraciones crecientes de lidocaína

(0.0625, 0.125, 0.25, 0.5, 1, y 2 mM). Cada concentración se dejó en contacto con el nervio por 2 minutos antes de obtener un registro. Una vez aplicada la concentración más alta, las preparaciones se lavaron con solución Tyrode por 70 minutos. Durante los primeros 10 minutos, los lavados se realizaron cada 30-45 segundos; los siguientes 20 minutos, los lavados fueron cada minuto, y los últimos 40 minutos, los lavados se llevaron a cabo cada 2 minutos. Durante el tiempo que duraron los lavados se registraron PACRD cada 10 minutos para determinar el grado de recuperación de las fibras A y C.

Capsaicina

La solución madre de capsaicina se diluyó en solución Tyrode para obtener una concentración de 2 μ M. Esta concentración se aplicó a las mismas preparaciones que recibieron lidocaína una vez que pasó el tiempo de lavado del fármaco. Se obtuvieron tres registros basales con un lapso de 2 minutos entre cada uno de ellos y después se aplicó la capsaicina a la preparación y se registraron dos PACRD con 2 minutos de intervalo entre ellos. No se hicieron lavados para intentar la recuperación de los PACRD.

Antibacterianos

En los experimentos subsecuentes con antibacterianos se obtuvieron cinco registros basales con un lapso de 2 minutos entre cada uno de ellos y cada concentración se dejó en contacto con la preparación por 10 minutos. Durante este tiempo, se registraron respuestas cada minuto sin cambiar la solución hasta que se aplicara la siguiente concentración. Las concentraciones que se utilizaron para los antibacterianos fueron mayores a las empleadas en los estudios preliminares ya que en estos no se observó un efecto marcado por parte de la neomicina y la ampicilina. Las concentraciones utilizadas fueron: neomicina 1 μ M, 100 μ M, 1 mM, 100 mM; ampicilina sódica 1 μ M, 100 μ M, 1 mM, 100 mM; minociclina 1 μ M, 100 μ M, 1 mM, 17.8 mM; y gentamicina 100 mM. Las diferencias en las concentraciones a utilizar se debieron a la disponibilidad de los antibacterianos.

Una vez que se aplicó la concentración más alta de cada tratamiento, las preparaciones se lavaron con solución Tyrode durante 30 minutos (a excepción de aquellas que recibieron minociclina). Durante este tiempo se realizaron registros cada 10 minutos para determinar el porcentaje de recuperación en la amplitud de las ondas de las fibras A y C.

Análisis estadístico

Los datos se expresaron como media \pm e.e.m. El efecto de cada concentración y tratamiento sobre el PACRD se evaluó midiendo la amplitud de las ondas de las fibras A y C. Los valores absolutos de las amplitudes de ambas ondas se transformaron a valores porcentuales con respecto a sus niveles basales para cada preparación. Los datos obtenidos en los experimentos se evaluaron por medio de análisis de varianza (ANOVA) para mediciones repetidas seguido de la prueba de Tukey. El programa GraphPad Prism (Prism 4 for Macintosh, v4.0b, GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) se utilizó para estos fines. Valores de $P < 0.05$ se consideraron estadísticamente significativos.

Resultados

Umbral de excitación y velocidad de conducción

En 31 preparaciones en las que se obtuvieron registros estables en cuanto a la amplitud de las fibras A y C, el umbral de excitación de las primeras fue de 0.45 ± 0.02 V y de las últimas de 7.94 ± 0.3 V. La velocidad de conducción de las fibras A fue de 10.56 ± 0.58 m/s y de las fibras C de 0.74 ± 0.02 m/s.

Tratamientos control (Tyrode)

La amplitud de las fibras A disminuyó de manera significativa ($P < 0.0001$, ANOVA) cuando se aplicó únicamente solución Tyrode y ésta se reemplazó por solución fresca cada 5 minutos. Las diferencias fueron significativas a partir del minuto 8 ($P \geq 0.05$, Tukey). Bajo este mismo esquema, la amplitud de las fibras C también disminuyó a través del tiempo ($P < 0.0001$, ANOVA), pero permanecieron estables durante 38 minutos ($P \geq 0.05$, Tukey) (Figura 7a).

Aunque los registros de las fibras A fueron más estables cuando la solución Tyrode se reemplazó por solución fresca cada minuto, también hubo diferencias significativas ($P < 0.0001$, ANOVA). En este caso los valores no variaron de manera significativa durante los primeros 33 minutos ($P \geq 0.05$, Tukey). La amplitud de las fibras C también varió de manera significativa ($P < 0.0001$, ANOVA) y los registros fueron estables los primeros 30 minutos ($P \geq 0.05$, Tukey) (Figura 7b).

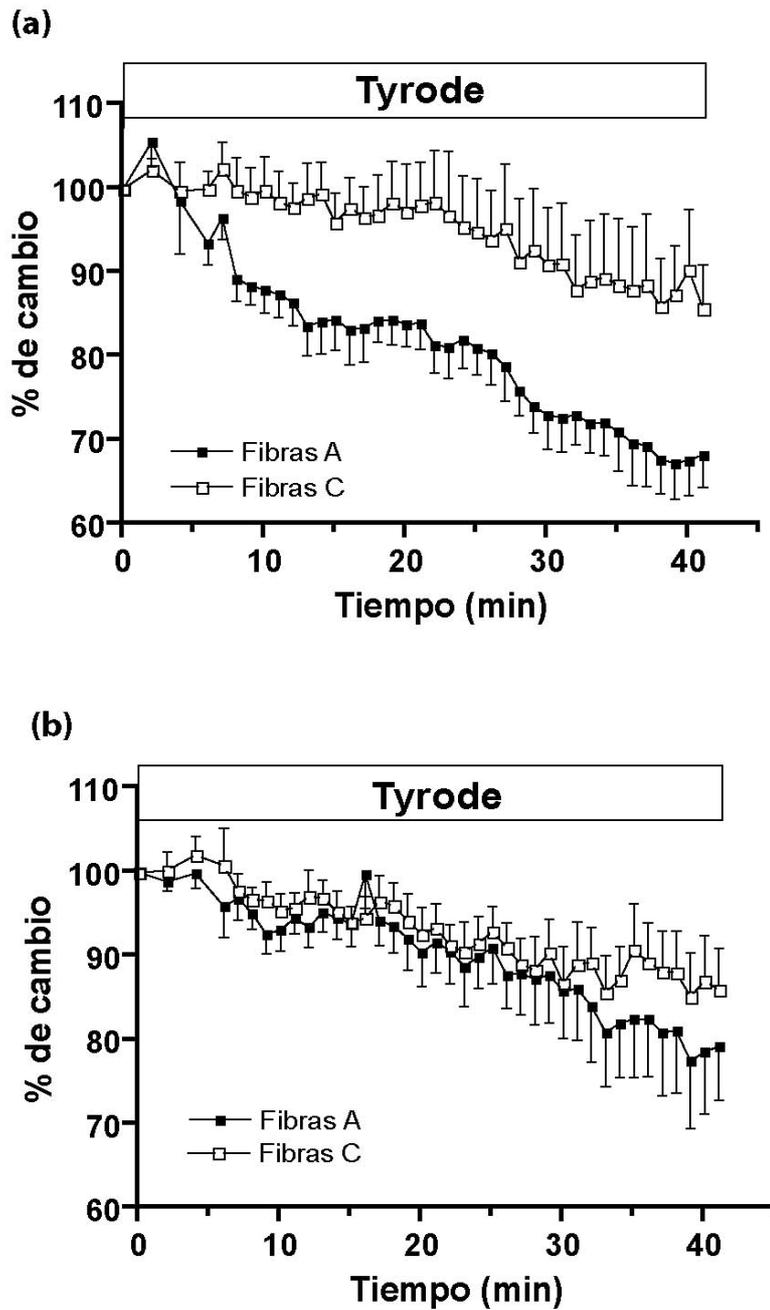


Figura 7. Efecto de la solución Tyrode sobre la amplitud de onda de las fibras A y C del potencial de acción compuesto de preparaciones de nervio isquiático-raíz dorsal L4 o L5 de ratas de 10 días de edad. **(a)** La solución Tyrode se reemplazó cada 5 minutos a partir del último registro basal (minuto 6). **(b)** La solución Tyrode se reemplazó cada minuto a partir del último registro basal (minuto 6). Cada punto representa la media \pm e.e.m. ($n = 4$).

Lidocaína

La aplicación de lidocaína disminuyó, de manera dependiente de la concentración, la amplitud de las fibras A y C, logrando inhibir ambas fibras de manera casi completa con la concentración de 2 mM. La recuperación de la amplitud de las fibras A y C fue de ~60% (Figura 8a,b). La concentración necesaria para inhibir en 50% (CI₅₀) la amplitud de las fibras A fue de $662.8 \pm 1.38 \mu\text{M}$ y el valor correspondiente para las fibras C fue de $369.8 \pm 1.34 \mu\text{M}$ (Figura 8c).

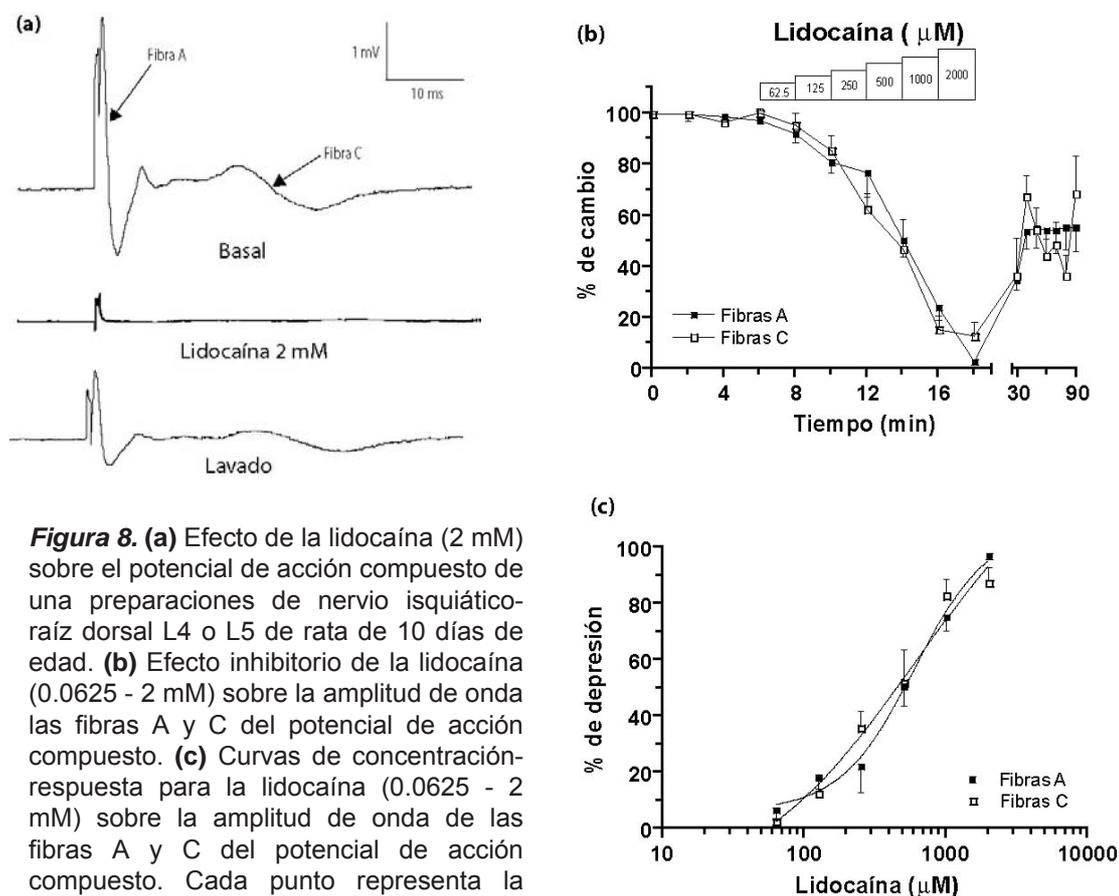


Figura 8. (a) Efecto de la lidocaína (2 mM) sobre el potencial de acción compuesto de una preparaciones de nervio isquiático-raíz dorsal L4 o L5 de rata de 10 días de edad. (b) Efecto inhibitorio de la lidocaína (0.0625 - 2 mM) sobre la amplitud de onda las fibras A y C del potencial de acción compuesto. (c) Curvas de concentración-respuesta para la lidocaína (0.0625 - 2 mM) sobre la amplitud de onda de las fibras A y C del potencial de acción compuesto. Cada punto representa la media \pm e.e.m. (n = 6).

Capsaicina

La aplicación de 2 μM de capsaicina disminuyó de manera significativa la amplitud de onda de las fibras C ($P < 0.0001$; ANOVA); hubo diferencias significativas entre todos los valores basales y aquellos obtenidos 4 minutos después de la aplicación de capsaicina ($P < 0.001$, Tukey). La respuesta de las fibras A no varió de manera significativa ($P = 0.0836$; ANOVA) (Figura 9).

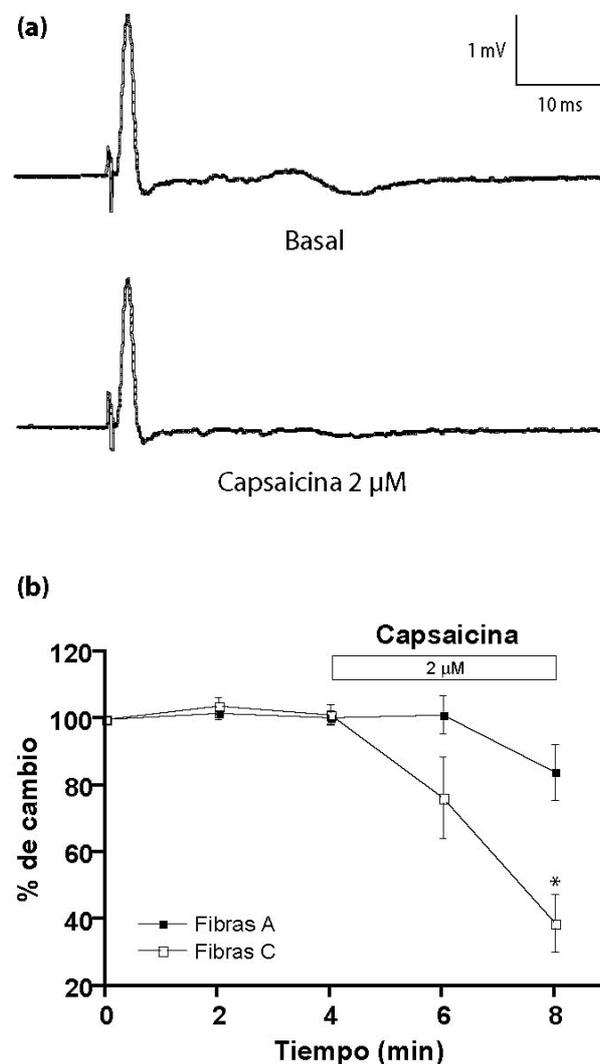


Figura 9. (a) Efecto de la capsaicina (2 μM) sobre el potencial de acción compuesto de una preparación de nervio isquiático-raíz dorsal L4 o L5 de ratas de 10 días de edad. **(b)** Efecto de la capsaicina (2 μM) sobre la amplitud de onda de las fibras A y C del potencial de acción compuesto.

* Representa diferencia significativa con respecto a los valores basales ($P < 0.001$). Cada punto representa la media \pm e.e.m. ($n = 6$).

Neomicina

La aplicación de neomicina (1 μ M - 100 mM) no disminuyó de manera significativa la amplitud de las fibras A ($P = 0.0506$, ANOVA) ni de las fibras C ($P = 0.7524$, ANOVA) (Figura 10).

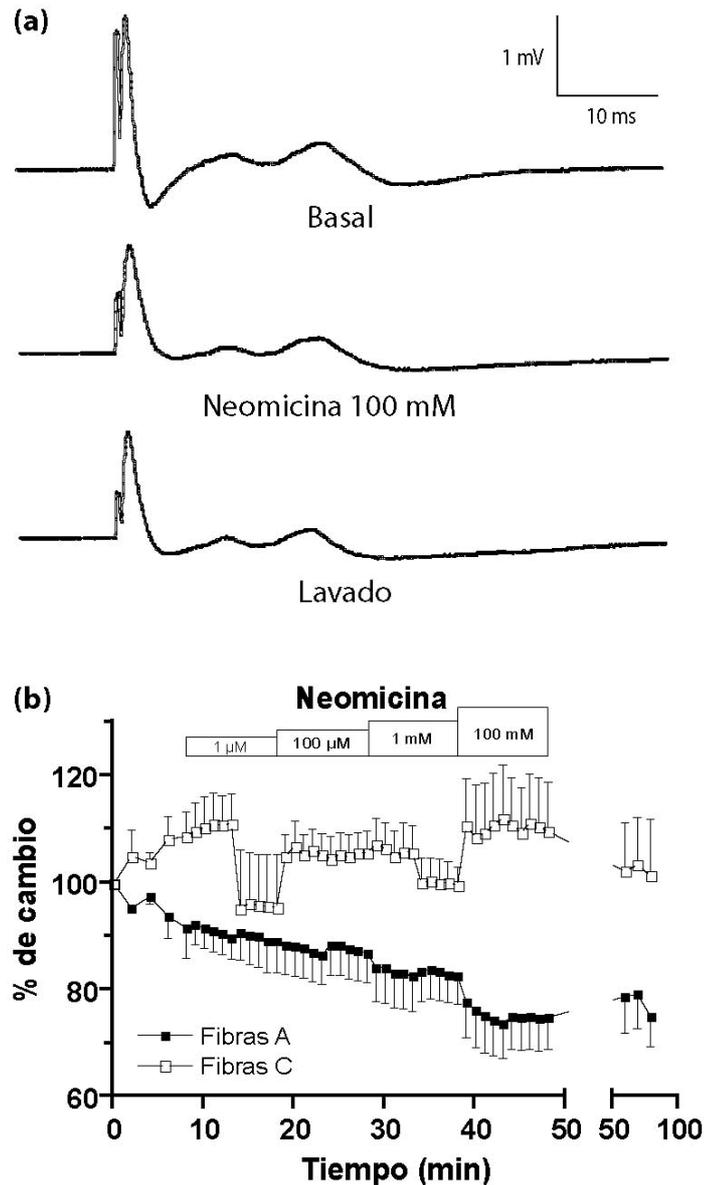


Figura 10. (a) Efecto de la neomicina (100 mM) sobre el potencial de acción compuesto de una preparación de nervio isquiático-raíz dorsal L4 o L5 de ratas de 10 días de edad. (b) Efecto de la neomicina (1 μ M - 100 mM) sobre la amplitud de onda de las fibras A y C del potencial de acción compuesto. Cada punto representa la media \pm e.e.m. ($n = 4$).

Gentamicina

La gentamicina (100 mM) disminuyó de manera significativa la amplitud de las fibras A ($P < 0.0001$, ANOVA), siendo los valores basales diferentes a los de los registros obtenidos 5 minutos a partir de la aplicación del antibacteriano ($P < 0.05$, Tukey). La amplitud de las fibras A regresó a niveles similares a los basales después de los lavados con solución Tyrode (Figura 11).

A pesar de que la prueba de ANOVA detectó diferencias significativas para las fibras C ($P = 0.0006$), las diferencias encontradas fueron entre el valor del último lavado con solución Tyrode y los valores obtenidos durante la aplicación de gentamicina ($P < 0.05$, Tukey) (Figura 11).

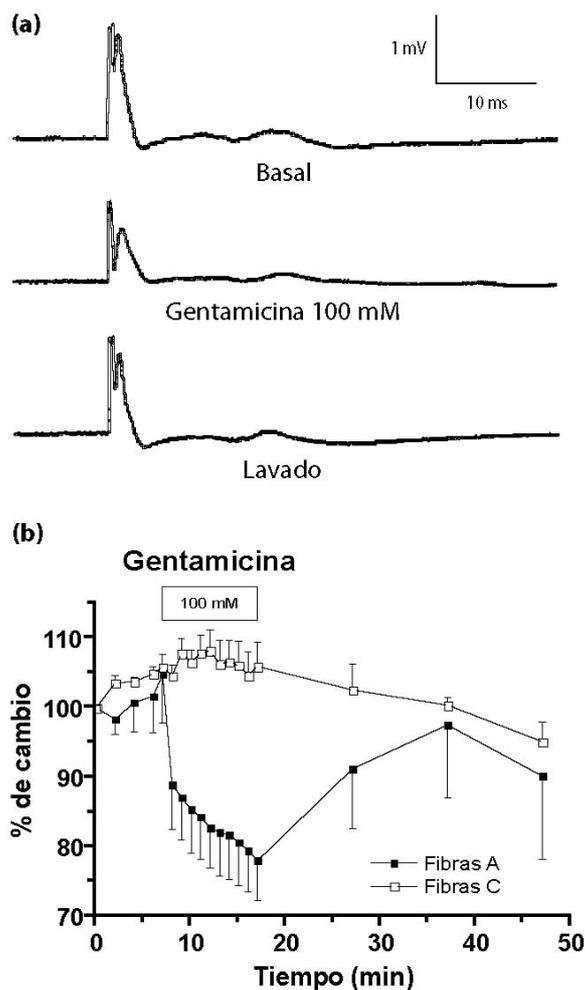


Figura 11. (a) Efecto de la gentamicina (100 mM) sobre el potencial de acción compuesto de una preparación de nervio isquiático-raíz dorsal L4 o L5 de ratas de 10 días de edad. **(b)** Efecto de la gentamicina (100 mM) sobre la amplitud de onda de las fibras A y C del potencial de acción compuesto. Cada punto representa la media \pm e.e.m. ($n = 4$).

Ampicilina

El análisis de varianza detectó un efecto significativo de la ampicilina sobre la amplitud de las fibras A ($P < 0.0001$). Aunque no hubo cambios significativos con las concentraciones más bajas (1 - 1000 μM), la aplicación de 100 mM de ampicilina deprimió de manera significativa la amplitud de las fibras A con respecto a los valores basales ($P \leq 0.05$, Tukey) (Figura 12).

La amplitud de las fibras C también varió a través del tiempo ($P < 0.0001$, ANOVA). Después de aplicar la ampicilina se observó una tendencia a incrementar la amplitud de las fibras C con las concentraciones más bajas del antibacteriano (1 - 1000 μM), pero con la concentración más alta (100 mM) la tendencia fue a disminuir la amplitud de las fibras. En ningún caso hubo diferencias significativas entre los valores basales y los obtenidos durante la aplicación de ampicilina ($P \geq 0.05$, Tukey) (Figura 12).

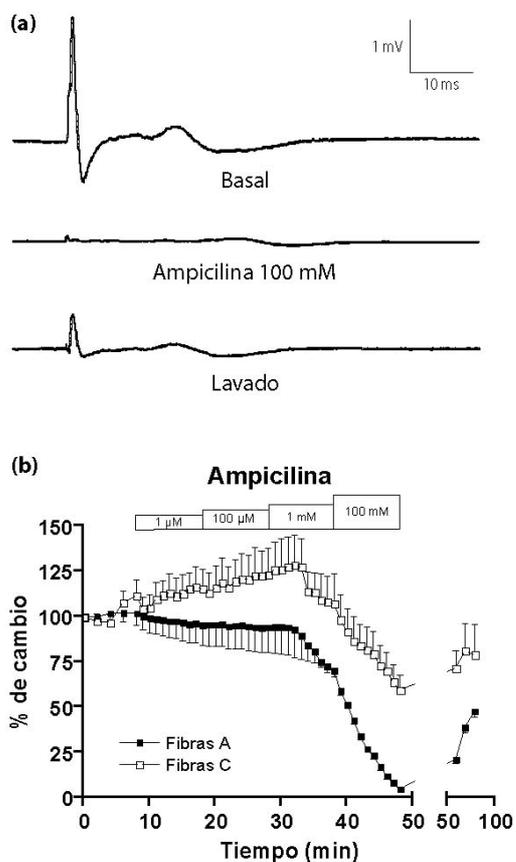


Figura 12. (a) Efecto de la ampicilina (100 mM) sobre el potencial de acción compuesto de una preparación de nervio isquiático-raíz dorsal L4 o L5 de ratas de 10 días de edad. (b) Efecto de la ampicilina (1 μM - 100 mM) sobre la amplitud de onda de las fibras A y C del potencial de acción compuesto. Cada punto representa la media \pm e.e.m. ($n = 4$).

Minociclina

La minociclina disminuyó, de manera dependiente de la concentración, la amplitud de las fibras A ($P < 0.0001$, ANOVA). La reducción fue significativa, con respecto a las mediciones basales, a partir de la aplicación de 1 mM del antibacteriano ($P \leq 0.05$, Tukey). La variación de las fibras C no fue significativa ($P = 0.9469$, ANOVA) (Figura 13).

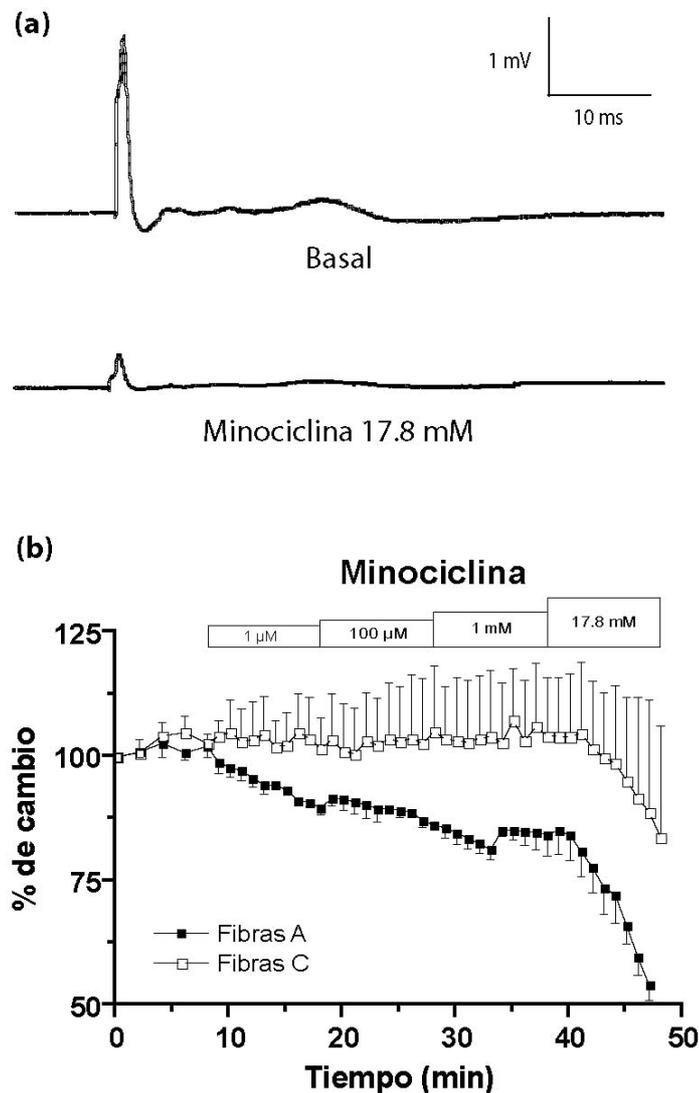


Figura 13. (a) Efecto de la minociclina (17.8 mM) sobre el potencial de acción compuesto de una preparación de nervio isquiático-raíz dorsal L4 o L5 de ratas de 10 días de edad. (b) Efecto de la minociclina (1 µM - 17.8 mM) sobre la amplitud de onda de las fibras A y C del potencial de acción compuesto. Cada punto representa la media \pm e.e.m. ($n = 3$).

Discusión

La serie de experimentos que se presentan en este trabajo investigaron la capacidad anestésico local de la neomicina, gentamicina, ampicilina y minociclina. Los tres últimos antibacterianos deprimieron la amplitud de las fibras A, mientras que ninguno de los cuatro fármacos tuvo un efecto significativo sobre las fibras C. El presente estudio es el primero que reporta un efecto anestésico local para los antibacterianos.

Tratamientos control (Tyrode)

Debido a la variabilidad en la amplitud de las fibras C de los registros obtenidos en estudios preliminares con neomicina, ampicilina y solución Tyrode (ver Materiales y Métodos), se realizaron registros en preparaciones a las cuales únicamente se les administró solución Tyrode, la cual se reemplazó por solución fresca cada 5 minutos, a efecto de determinar la causa de las diferencias obtenidas con el fin de obtener registros más constantes en cuanto a la actividad de las fibras A y C.

Una de las causas más comunes de variabilidad en registros electrofisiológicos es la interferencia ocasionada por aparatos eléctricos y electrónicos así como otras fuentes de energía. Para eliminar esta posibilidad, se colocó el extremo de un caimán al electrodo negativo de la cámara de registro y el otro extremo a la mesa de trabajo, la cual era de acero inoxidable, para hacer "tierra". Esto fue suficiente para eliminar las interferencias, aunque se observó disminución progresiva en la amplitud de las fibras A y C, siendo más marcada en las primeras. Para solucionar este problema, se decidió reemplazar la solución Tyrode cada minuto, en lugar de cada 5 minutos, por solución fresca, lo cual permitió tener registros estables por más de 30 minutos.

Umbral de excitación y velocidad de conducción

Los umbrales de excitación y la velocidad de conducción de las fibras A y C que se obtuvieron en este estudio (0.45 ± 0.02 V y 7.94 ± 0.3 V; 10.56 ± 0.58 m/s y 0.74 ± 0.02 m/s, respectivamente) fueron similares a los reportados con anterioridad en preparaciones de nervio isquiático-raíz dorsal L4 o L5 de ratas de 10 días de edad (0.22 ± 0.19 V y 11.0 ± 1.61 V; 7.94 ± 0.48 m/s y 0.74 ± 0.05 m/s, respectivamente).²¹ Esta comparación fue posible ya que en ambos estudios se utilizó el mismo patrón de estimulación. Esto confirma que las preparaciones utilizadas en este estudio fueron viables y que las ondas de los registros corresponden a las despolarizaciones de las fibras A y C.

Lidocaína

La lidocaína es un anestésico local amídico que ejerce su efecto por infiltración o por aplicación superficial, el cual consiste en impedir la generación y la conducción del impulso nervioso.³ La aplicación de lidocaína disminuyó la amplitud de las fibras A y C en forma dependiente de la concentración hasta inhibirla completamente con una concentración 2 mM. Debido a que la respuesta de un nervio ante un estímulo depende de la despolarización de sus axones, lo cual implica la entrada de iones de sodio del líquido extracelular al líquido intracelular a través de canales dependientes de voltaje,²⁵ la lidocaína debió disminuir la permeabilidad a este ión impidiendo la despolarización de las fibras.

Los valores CI_{50} de lidocaína para las fibras A y C obtenidos en este estudio (662.8 ± 1.38 μ M y 369.8 ± 1.34 μ M, respectivamente) fueron mayores a los reportados con anterioridad (242.25 ± 94.27 μ M y 267.53 ± 27.12 μ M, respectivamente) en preparaciones de ratas de 10 días de edad mantenidas en condiciones similares a las aquí descritas.²¹ Es posible que estas diferencias se deban a las cepas de ratas utilizadas (Wistar en este estudio y Sprague-Dawley en el otro) y que existan diferencias en la expresión y cinética de los diferentes tipos de canales de sodio que poseen estos animales en el nervio isquiático a los 10 días de edad.

Capsaicina

Para confirmar lo demostrado a partir de la velocidad de conducción de las fibras C se utilizó capsaicina, la cual es un bloqueador selectivo de la conducción aferente de las fibras C.²¹ Este compuesto, el cual es responsable de la sensación picante de los chiles, disminuyó la amplitud de las fibras C pero no la de las A. Esto demuestra que las ondas del potencial de acción compuesto denominadas como fibras C en este estudio fueron en realidad producidas por despolarización de axones amielínicos. Se desconoce el mecanismo de acción por el cual la capsaicina disminuye la actividad de las fibras C, pero se cree que tiene un efecto neurotóxico sobre estas fibras.²¹

Aminoglucósidos (neomicina y gentamicina)

Los aminoglucósidos bloquean canales dependientes de voltaje para calcio por lo que actúan como antagonistas competitivos del flujo del calcio hacia el interior de las neuronas.^{26,27} El calcio es importante para la regulación de varios procesos biológicos, incluyendo la transmisión de información dolorosa. Por ejemplo, la aplicación de cloruro de calcio por vía intracerebroventricular en ratones produjo hiperalgesia.²⁸ En congruencia con el efecto nociceptivo del calcio, los agentes químicos que disminuyen la disponibilidad extracelular del este ión (agentes quelantes como el EDTA) también son capaces de inducir antinocicepción.²⁹

En un estudio en el cual se administró sulfato de neomicina (5 - 15 µg) y sulfato de gentamicina (2.5 - 5 µg) por vía intratecal hubo reducción, de manera dependiente de la dosis, de la alodinia mecánica en ratas.²⁷ En forma similar, la administración intraperitoneal de sulfato de gentamicina (5 - 800 µg) produjo antinocicepción en ratas y ratones que recibieron carragenina en la articulación femoro-tibio-patelar y fueron sometidos a una prueba de dolor térmico.¹⁷ La gentamicina, al bloquear

canales dependientes de voltaje para calcio, disminuye la disponibilidad de este ion, lo cual impide la liberación de algunos neurotransmisores (glutamato, aspartato) y disminuye la actividad neuronal.¹⁶ Los aminoglucósidos no atraviesan la barrera hematoencefálica de manera eficiente, por lo se piensa que el mecanismo por el cual inducen antinocicepción podría ser a nivel de sistema nervios periférico.^{16,17}

La hipótesis anterior se desafió en este estudio al administrar gentamicina (100 mM) y neomicina (1 μ M - 100 mM) a las preparaciones de nervio isquiático-raíz dorsal. Únicamente la gentamicina disminuyó la amplitud de las fibras A, lo cual se puede interpretar como un efecto anestésico local por bloqueo de flujo iónicos. El efecto depresor del aminoglucósido fue de ~25%, a diferencia de lo reportado por Raisinghani *et al.*, quienes con neomicina (100 μ M) lograron inhibir de manera total las corrientes de calcio inducidas por capsaicina (1 μ M) a través de receptores vaniloides VR1 en neuronas cultivadas a partir de ganglios de la raíz dorsal de ratas.³⁰ En forma similar, Zhou y Zhao inhibieron casi por completo las corrientes calcio y las corrientes de sodio resistentes a la tetrodotoxina en neuronas cultivadas a partir de ganglios de la raíz dorsal de ratas al utilizar 40 μ M y 100 mM de neomicina, respectivamente.³¹

Debido a que las concentraciones de los aminoglucósidos utilizadas en este estudio fueron lo suficientemente altas como para inhibir el flujo iónico de calcio y sodio según lo reportado en la literatura,^{30,31} las diferencias en resultados se podrían explicar por la forma en que se aplicaron los antibacterianos. En este estudio la preparación de nervio isquiático-raíz dorsal se bañó con el antibacteriano diluido en solución Tyrode, mientras que en los trabajos en donde se reportó inhibición total con aminoglucósidos, estos se aplicaron directamente a nivel intracelular. Es posible que los aminoglucósidos no hayan atravesado el epineuro de manera eficiente y por lo tanto no hayan inducido un efecto anestésico local más evidente.

Ampicilina

La administración subcutánea de ampicilina (100 mg/kg) en ratas con comportamiento de automutilación (autotomía) indujo analgesia comparable a la producida por el ácido salicílico (300 mg/kg) y el ketoprofeno (4 mg/kg).¹⁸ Sin embargo, cuando se administraron diferentes penicilinas, incluyendo ampicilina, por vía intracerebral (300 µg intraventricular y 30 µg en zonas cerebrales involucradas con los efectos analgésicos de diferentes fármacos) no hubo cambios en la sensibilidad al dolor en ratas.³² Esto sugiere que los efectos analgésicos de la ampicilina están mediados a nivel periférico.

La aplicación de ampicilina (100 mM) inhibió casi por completo la amplitud de las fibras A, sin afectar de manera significativa la de las fibras C. Este antibacteriano tuvo el mayor efecto anestésico local en este estudio y es posible que esto contribuya al efecto analgésico del fármaco.

Minociclina

La minociclina tiene efectos a nivel de sistema nervioso central, donde actúa como inhibidor de la activación y proliferación de la microglia, sin tener algún efecto directo sobre los astrocitos o las neuronas.³³ La activación de la microglia y la subsecuente liberación de citocinas proinflamatorias (interleucina-1 β y factor de necrosis tumoral α) inducen el desarrollo de hipersensibilidad y facilitan la transmisión de dolor.^{34,35} La activación de la proteincinasa p38 en la raíz dorsal y en la médula espinal interviene en la generación de este proceso.³⁶

La administración intraperitoneal de minociclina (40 mg/kg) una hora antes de la constricción de la raíz dorsal L5, pero no 5 días después de la cirugía, disminuyó la alodinia y la hiperalgesia en ratas. Este efecto se atribuyó a la capacidad de la minociclina de inhibir la activación de las células de la microglia y la consiguiente liberación de citocinas proinflamatorias.³⁴ De manera similar, Ledebøer *et al.* demostraron que la minociclina (50 µg por vía intratecal) fue más eficaz en prevenir

y retardar el desarrollo de la alodinia que en revertirla en ratas con neuropatía inducida en el nervio isquiático.³⁵ Estos datos sugieren que la activación de la microglia participa en la generación, pero no en el mantenimiento, del dolor neuropático.

En este estudio, la aplicación de minociclina (1 y 17.8 mM) disminuyó la respuesta de las fibras A en preparaciones de nervio isquiático-raíz dorsal. Esto demuestra que la minociclina no solo tiene un efecto analgésico central al actuar sobre la microglia, sino que también ejerce un efecto anestésico local a nivel periférico. Esto se debe a que los nervios periféricos carecen de este tipo de células.

Conclusiones

El presente trabajo reporta por primera vez un efecto anestésico local para la gentamicina, ampicilina y minociclina. El efecto fue evidente sobre las fibras A, pero no en las C, por lo que se acepta la hipótesis formulada en este trabajo únicamente para las fibras A. Debido a que se utilizaron preparaciones de nervio isquiático-raíz dorsal provenientes de animales de 10 días de edad, el desarrollo neuronal aún es incompleto pero funcional y sensible al efecto anestésico de la lidocaína, como se demostró aquí y en otros trabajos.^{21,22}

Las raíces dorsales de cada nervio son una vía aferente de la transmisión de impulsos. Al aplicar los antibacterianos antes mencionados sobre las preparaciones se bloqueó de manera selectiva la transmisión de impulsos de los axones mielinizados. Aunque estos axones no son los principales responsables de transmitir señales de dolor, se sabe que algunas de éstas dependen de ellos. Esto abre la posibilidad de que algunos antibacterianos interrumpieran de alguna manera la transmisión a lo largo del axón y por lo tanto se inhiba la sensación de dolor.

Debido a que el efecto analgésico de los antibacterianos no depende de la familia en la que se clasifican ni de su capacidad de atravesar la barrera hematoencefálica, sino más bien del fármaco en particular,¹⁸ se evaluó el efecto anestésico local de diferentes antibacterianos, incluso algunos de una misma familia (los aminoglucósidos neomicina y gentamicina). Los resultados demostraron un efecto anestésico local en nervios periféricos, siendo más evidente este efecto para la ampicilina.

Las concentraciones utilizadas en los experimentos y con las que se logró un efecto anestésico local de los antibacterianos fueron más altas a las que se alcanzan de manera terapéutica en animales tratados con estos antibacterianos. Sin embargo,

la administración perineural de los mismos podría permitir alcanzar concentraciones suficientes para bloquear la transmisión de impulsos nerviosos. También es posible que los antibacterianos puedan tener un efecto analgésico que no dependa del efecto anestésico local que se encontró en este trabajo. Se necesitan estudios que evalúen esta hipótesis.

Durante el transcurso de la fase experimental se presentaron varias dificultades (interferencia, variabilidad en las amplitudes de las fibras C) inherentes a la técnica utilizada. Estas dificultades fueron solucionadas y se lograron obtener, con ayuda de un sistema digital de adquisición de datos, registros electrofisiológicos que representan el primer trabajo de este tipo en el Departamento de Fisiología y Farmacología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Este trabajo será la base de futuras investigaciones.

Referencias

1. Bearsdley T. Take the Pain?: Lidocaine comes under suspicion as a carcinogen. *Scientific Am* (1994) 270:28-9.
2. Mama K, Steffey E. Local anesthetics. En: Adams HR. *Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 8th ed. Ames, Iowa, USA: Iowa State Press, (2001) 343-59.
3. Rojas Ramírez JA. Lidocaína. En: Rodríguez Carranza R. *Vademécum académico de medicamentos*, 3^a ed. Mexico D.F.: McGraw-Hill Interamericana, (2001) 557-9.
4. Parker RJ, Collins JM, Strong JM. Identification of 2,6-xylidine as a major lidocaine metabolite in human liver slices. *Drug Metab Disp* (1996) 24:1167-73.
5. Marques MM, Mourato LL, Amorim MT, Santos MA, Melchior WB, Beland FA. Effect of substitution site upon the oxidation potentials of alkyilanilines, the

mutagenicities of N-hydroxyalkylanilines, and the conformations of alkylaniline-DNA adducts. *Chem Res Toxicol* (1997) 10:1266-74.

6. Gan J, Skipper PL, Tannenbaum SR. Oxidation of 2,6 dimethylaniline by recombinant human cytochrome P450s and human liver microsomes. *Chem Res Toxicol* (2001) 14: 672-77.
7. Marques M, Gamboa da Costa G, Blankenship LR, Culp SJ, Beland FA. The effect of deuterium and fluorine substitution upon the mutagenicity of N-hydroxy-2,6-dimethylaniline. *Mutant Res* (2002) 506-507:41-48.
8. Short CR, Hardy ML, Barker SA. The *in vivo* oxidative metabolism of 2,4- and 2,6-dimethylaniline in the dog and rat. *Toxicology* (1989) 57:45-58.
9. Puente NW, Josephy PD. Analysis of the lidocaine metabolite 2,6-dimethylaniline in bovine and human milk. *J Anal Toxicol* (2001) 25:711-5.
10. Bryant MS, Simmons HF, Harrell RE, Hinson JA. 2,6-Dimethylaniline-hemoglobin adducts from lidocaine in humans. *Carcinogenesis* (1994) 15:2287-90.
11. International Agency for Research on Cancer (IARC). IARC monographs on the evaluation of the carcinogenic risks of chemicals to humans. 2,6-dimethylaniline (2,6-xylylidine). IARC Press, Lyon, France (1993) 57: 323-35.
12. Patrianakos C, Hoffman D. Chemical studies of tobacco smoke. LXIV. On analysis of aromatic amines in cigarette smoke. *J Anal Toxicol* (1979) 3:150-4.
13. Tydén E, Tjälve H, Larsson P. Metabolic activation of 2,6-xylylidine in the nasal olfactory mucosa and the mucosa of the upper alimentary and respiratory tracts in rats. *Toxicol Sci* (2004) 81:263-72.

14. National Toxicology Program. Toxicology and carcinogenesis studies of 2,6-xylydine (2,6-dimethylaniline) (CAS No. 87-62-7) in Charles River CD rats (feed studies). National Toxicology Program Technical Report Series (1990) 278:1-138.
15. The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, Veterinary Medicines Evaluation Unit. Committee for Veterinary Medicinal Products: Lidocaine, Summary Report. 1999. Disponible en: <http://www.emea.eu.int/pdfa/vet/mrls/058499en.pdf>
16. Luger TJ, Farkas W, Geisler H, Lorenz IH. The effect of ciprofloxacin and gentamicin on spinal morphine-induced antinociception in rats. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* (2005) 96:366-74.
17. Prado WA, Tonussi CR, Rego EM, Corrado AP. Antinociception induced by intraperitoneal injection of gentamicin in rats and mice. *Pain* (1989) 41:365-71.
18. Suaudeau C, Chait A, Cimetiere C, de Beaupaire R. Analgesic effects of antibiotics in rats. *Pharmacol Biochem Behav* (1993) 46:361-4.
19. Atamer-Simsek S, Ölmez-Salvarli H, Güc O, Eroglu L. Antinociceptive effect of amikacin and its interaction with morphine and naloxone. *Pharmacol Res* (2000) 41:355-60.
20. Blenk K-H, Häbler H-J, Jänig W. Neomycin and gadolinium applied to an L5 spinal nerve lesion prevent mechanical allodynia-like behaviour in rats. *Pain* (1997) 70:155-65.
21. Lizarraga I, Chambers JP, Johnson CB. Developmental changes in threshold, conduction velocity, and depressive action of lignocaine on dorsal root potentials

from neonatal rats are associated with maturation of myelination. *Can J Physiol Pharmacol* (2007) 85:251-63.

22. Nagy I, Woolf CJ. Lignocaine selectively reduces C fibre-evoked neuronal activity in rat spinal cord *in vitro* by decreasing *N*-methyl-D-aspartate and neurokinin receptor-mediated post-synaptic depolarizations: implications for the development of novel centrally acting analgesics. *Pain* (1996) 64:59-70.
23. Passmore G. Dorsal root ganglion neurons in culture: A model system for identifying novel analgesic targets? *J Pharmacol Toxicol Meth* (2005) 51:201-8.
24. Sumano H, Ocampo L. *Farmacología y Terapéutica Veterinaria*, 3ª ed. México, D.F.: Mc Graw-Hill Interamericana, 2006.
25. Hernández Cruz A. Excitabilidad y potencial de acción. En: Drucker Colín R. *Fisiología médica*. México, D.F.: El Manual Moderno. 2005:47-8.
26. Nomura K, Naruse K, Watanabe K, Sokabe M. Aminoglycoside blockade of Ca²⁺-activated K⁺ channel from rat brain synaptosomal membranes incorporated into planar bilayers. *J Membrane Biol* (1990) 115:241-51.
27. Prado WA, Machado Filho EB. Antinociceptive potency of aminoglycoside antibiotics and magnesium chloride: a comparative study on models of phasic and incisional pain in rats. *Braz J Med Biol Res* (2002) 35:395-403.
28. Prado WA. Involvement of calcium in pain and antinociception. *Braz J Med Biol Res* (2001) 34:449-61.
29. Schmidt WK, Way EL. Hyperalgesic effects of divalent cations and antinociceptive effects of a calcium chelator in naive and morphine-dependent

mice. *J Pharmacol Exp Ther* (1980) 212:22-7.

30. Raisinghani M, Premkumar L. Block of native and cloned vanilloid receptor 1 (TRPV1) by aminoglycoside antibiotics. *Pain* (2005) 113:123-33.
31. Zhou Y, Zhao Z-Q. Effects of neomycin on high-threshold Ca^{2+} currents and tetrodotoxin-resistant Na^{+} currents in rat dorsal root ganglion neurons. *Eur J Pharmacol*. (2002) 450:29-35.
32. de Beaurepaire R, Suaudeau C, Chait A, Cimetière C. Anatomical mapping of brain sites involved in the antinociceptive effects of ketoprofen. *Brain Res* (1990) 536:201-6.
33. Tikka T, Fiebich BL, Goldsteins G, Keinanen R, Koistinaho J. Minocycline, a tetracycline derivate, is neuroprotective against excitotoxicity by inhibiting activation and proliferation of microglia. *J Neurosci* (2001) 21:2580-88.
34. Raghavendra V, Tanga F, Deleo J. Inhibition of microglial activation attenuates the development but not existing hypersensitivity in a rat model of neuropathy. *J Pharmacol Exp Ther* (2003) 306:624-30.
35. Ledeboer A, Sloane E, Milligna E, Frank M, Mahony J, Maier S, Watkins L. Minocycline attenuates mechanical allodynia and proinflammatory cytokine expression in rat models of pain facilitation. *Pain* (2005) 115:71-83.
36. Hua XY, Svensson C, Matsui T, Fitzsimmons B, Yaksh T, Webb M. Intrathecal minocycline attenuates peripheral inflammation-induced hyperalgesia by inhibiting p38 MAPK in spinal microglia. *Eur J Neurosci* (2005) 22:2431-40.