

11281



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE MEDICINA  
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

**PAPEL DE LA INFORMACIÓN SENSORIAL PREVIA  
A LA DENERVACIÓN EN EL DESARROLLO  
DEL DOLOR CRÓNICO EN LA RATA**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:  
DOCTOR EN CIENCIAS**

**P R E S E N T A :  
JORGE ALBERTO LÓPEZ AVILA**

**LABORATORIO DE NEUROFISIOLOGÍA INTEGRATIVA  
SUBDIRECCIÓN DE NEUROCIENCIAS  
INSTITUTO NACIONAL DE PSIQUIATRÍA  
"RAMÓN DE LA FUENTE"**

**TUTOR: DR. FRANCISCO PELLICER GRAHAM.**



**MÉXICO, D.F.**

**2005**

m 346941



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.

# ÍNDICE

Página

## COMUNICACIONES EN CONGRESOS Y PUBLICACIONES

Carteles.....	1
Presentaciones Orales .....	3
Artículos Publicados.....	4
Capítulos en Libros .....	5

RESUMEN .....	6
---------------	---

## INTRODUCCION

Historia.....	7
Definición y Conceptos del Dolor.....	13
Modelos de Dolor Crónico.....	16
Dolor Neuropático.....	20

## PRIMERA PARTE

### Información Sensorial Previa a la Denervación en el Desarrollo del Dolor Crónico

Planteamiento del Problema.....	27
Hipótesis.....	27
Experimento 1. Quimionocicepción y Temporalidad.....	28
Material y Método.....	28
Animales.....	28
Diseño Experimental.....	28
Estímulo Quimionociceptivo.....	29
Cirugía.....	29
Conducta de Autotomía.....	29
Análisis Estadístico .....	31
Resultados.....	32
Discusión.....	33
Experimento 2. Termonocicepción y Temporalidad.....	35
Diseño Experimental.....	35
Resultados.....	36
Discusión.....	37
Experimento 3. Quimionocicepción, Temporalidad y Naltrexona.....	39
Diseño Experimental.....	39
Resultados.....	40
Discusión.....	41

**SEGUNDA PARTE****Papel de los Sistemas Glutamatérgicos y Dopaminérgicos en el Desarrollo del Dolor en la Rata.....**

42

Experimento 1. Hiperalgesia secundaria a un proceso inflamatorio.....	44
Material y Método.....	44
Animales.....	44
Diseño Experimental.....	44
Inducción del Proceso Inflamatorio.....	44
Prueba de Termonocicepción.....	45
Análisis Estadístico.....	46
Resultados.....	47
 Experimento 2. Termonocicepción Aguda.....	48
Diseño Experimental.....	48
Resultados.....	49
 Experimento 3. Nocicepción Crónica.....	50
Animales.....	50
Diseño Experimental.....	50
Proceso Inflamatorio.....	50
Cirugía.....	50
Conducta de Autotomía.....	51
Análisis Estadístico.....	51
Resultados.....	52
Discusión.....	53

**CONCLUSIÓN.....**56**BIBLIOGRAFÍA.....**58**ANEXOS.....**66

- López-Avila A., Sotres Bayón F., del Ángel R., Pellicer F. Time span between nociceptive stimulus and denervation modifies autotomy behavior in rat. *Analgesia*. 4: 475-478, 1999.

- López-Avila A., Rodríguez-Manzo G., Coffeen U., del Ángel R., Pellicer F. Self-injury behaviour induced by intraplantar carrageenan infiltration: a model of tonic nociception. *Brain Research Protocols*. 13:1: 37-44, 2004.

- López-Avila A., Coffeen U., Ortega-Legaspi JM., del Ángel R., Pellicer F. Dopamine and NMDA systems modulate long-term nociception in the rat anterior cingulate cortex. *Pain*. 111: 136-143, 2004.



## COMUNICACIONES EN CONGRESOS Y PUBLICACIONES

### Carteles.

López-Avila A., Sotres Bayón F., del Ángel R., Pellicer F. "*The previous sensorial information to denervation modifies autotomic behavior in the rat*". 29<sup>th</sup> Annual Meeting Society for Neuroscience. Miami Beach, Florida. Octubre, 1999.

Pellicer F., López-Avila A. "*La estimulación eléctrica del haz del cíngulo anticipa la aparición de autotomía inducida por inflamación crónica en la rata: Un modelo animal para el estudio del dolor patológico*". 2ª Reunión Nacional Investigadores, Coordinación de los Institutos Nacionales de Salud. Huatulco, Oaxaca. Noviembre 1999.

Sotres Bayón F., López-Avila A., del Ángel R., Pellicer F. "*Papel del Área Tegmental Ventral y la Dopamina en la Corteza Anterior de Cíngulo en un Modelo de Dolor Crónico en la Rata*". XX Congreso Latinoamericano de Ciencias Fisiológicas. Cancún, Quintana Roo. Septiembre, 2000.

Graff A., López-Avila A., García Marín, J., Pellicer, F. "*Aspectos psiquiátricos del dolor*". 1ª Reunión Nacional de Residentes de Neurociencias. México, D.F. Octubre 2000.

Graff A., López-Avila A., García-Marín J., Pellicer F., Heinze-Martín G. "*El dolor en los padecimientos psiquiátricos: causa o efecto*." 1ª Reunión Nacional de Residentes de Neurociencias. Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía. México, DF. Octubre 2000.

López-Avila A. "*Amantadina, agonista dopaminérgico, antagonista NMDA disminuye la conducta de autotomía en un modelo de dolor crónico en la rata*". XV Reunión de Investigación del Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente. México, D.F. Septiembre 2000.

Sotres Bayón F., López-Avila A., del Ángel R., Pellicer F. "*Effect of ventral tegmental area stimulation and dopamine microinjection into the anterior cingulate cortex on a rat chronic pain*". 30th Annual Meeting Society for Neuroscience. Nueva Orleans, LA. Noviembre 2000.

López-Avila A., Sotres Bayón F., del Ángel R., Pellicer F. "*Single amantadine microinjection into anterior cingulate cortex diminishes autotomy behavior in a model of chronic pain in the rat*". 2<sup>nd</sup> World Congress of World Institute of Pain, Estambul, Turquía. Junio 2001.

Pellicer F., López-Avila A., Sotres Bayón F., del Ángel R. "*Dopamine microinjection into the anterior cingulate cortex diminishes persistent nociceptive behavior in the rat*". 2<sup>nd</sup> World Congress of World Institute of Pain. Estambul, Turquía. Junio 2001.

Pellicer, F., Ortega-Legaspi, J., López-Avila, A., Coffeen, U., del Ángel, R. "*Interruption of nociceptive-related memory acquisition by scopolamine into the anterior cingulate cortex in a neuropathic pain model in the rat*". 6th IBRO World Congress of Neuroscience. Praga. Julio 2003.

Pellicer F, López-Avila A, Coffeen y del Ángel R "*Amantadina (l-amino-adamantane), agonista dopaminérgico y antagonista NMDA disminuye la conducta de autotomía en un modelo de dolor crónico en la rata*". VIII Encuentro Nacional de Investigadores. Acapulco, Guerrero. Noviembre 2003.

## Presentaciones Orales.

López-Avila A., Sotres Bayón F., del Ángel R., Pellicer F. *“La información sensorial previa a la denervación modifica la conducta de autotomía en la rata”*. XLII Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas. Zacatecas, Zac. México. Septiembre 1999.

López-Avila A., Sotres Bayón F., del Ángel R., Pellicer F. *“Amantadina, agonista dopaminérgico, antagonista NMDA disminuye la conducta de autotomía en un modelo de dolor crónico en la rata”*. XX Congreso Latinoamericano de Ciencias Fisiológicas. Cancún, Quintana Roo. Septiembre 2000.

López-Avila A. Amantadina, Agonista Dopaminérgico, *“Antagonista NMDA disminuye la conducta de autotomía en un modelo de dolor crónico en la rata”* XV Reunión de Investigación del Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente. México, D.F. Septiembre 2000.

López-Avila A. *“Amantadina una droga alternativa para el estudio y tratamiento del dolor.”* IASP Mexican Chapter Congress and Palliative Care Latino American Association Congress. Guadalajara, México 2002.

López-Avila A., Sotres Bayón F., del Ángel R., Pellicer F. *“Amantadine, a Dopaminergic Agonist and NMDA Receptor Antagonist, Diminishes Autotomy Behavior in a Model of Chronic Pain in the Rat”*. 30th Annual Meeting Society for Neuroscience. Nuevo Orleans. Noviembre 2000.

## Artículos Publicados.

López-Avila A., Sotres Bayón F., del Ángel R., Pellicer F.

*"Time span between nociceptive stimulus and denervation modifies autotomy behavior in rat."*

Analgesia. 4: 475-478, 1999.

López-Avila A, Pellicer F.

*"Miembro fantasma: ¿una alteración de la conciencia corporal?"*

Salud Mental, 24 (3) pp 29-34, 2001.

Sotres-Bayón, Torres-López, López-Ávila, del Ángel y Pellicer .

*"Lesion and electrical stimulation of the ventral tegmental area modify persistent nociceptive behavior in the rat."*

Brain Research, 898 pp 342-49, 2001.

Ortega-Legaspi JM., López-Avila A., Coffeen U., del Ángel R., Pellicer F.

*"Scopolamine into the anterior cingulate cortex diminishes nociception in a neuropathic pain model in the rat: an interruption of 'nociception memory acquisition' "*

European Journal of Pain, 7: 425-429, 2003.

López-Avila A., Rodríguez-Manzo G., Coffeen U., del Ángel R., Pellicer F.

*"Self-injury behaviour induced by intraplantar carrageenan infiltration: a model of tonic nociception".*

Brain Research Protocols. 13:1: 37-44, 2004.

López-Avila A., Coffeen U., Ortega-Legaspi JM., del Ángel R., Pellicer F.

*"Dopamine and NMDA systems modulate long-term nociception in the rat anterior cingulate cortex".*

Pain. 111: 136-143, 2004.

## Capítulos en Libros.

López-Avila A., Pellicer F.

*“Modelos Animales de Dolor Crónico.”*

Ediciones Palia. Compilador: Guillermo Aréchiga Ornelas.

Pellicer F., López-Avila A.

*“Neurobiología del dolor.”*

Ediciones del Colegio Nacional, Compilador: Ramón de la Fuente, 2003.

## RESUMEN

El contenido de esta tesis se divide en dos partes. En la primera se analiza el papel de la información sensorial previa a la denervación en el desarrollo de la nocicepción crónica evaluada a través de la conducta de autotomía en la rata. En este contexto se estudió el efecto de la nocicepción química (250  $\mu$ l de carragenina intraplantar) así como de la nocicepción térmica (55°C durante 20 segundos), aplicadas en dos eventos, el primero 24 horas previas a la denervación y el segundo 30 minutos antes de la misma. Se registró el inicio, la intensidad y el porcentaje de sujetos que presentaron la autotomía. El análisis de los resultados muestra que la estimulación nociceptiva previa a la denervación incrementa la nocicepción crónica y que la ventana temporal entre el estímulo nociceptivo y la denervación es determinante en el desarrollo del dolor crónico.

En la segunda parte de la tesis se evalúa el papel de los sistemas dopaminérgicos y glutamatérgicos, mediante la inyección de amantadina intraperitoneal (agonista dopaminérgico y antagonista NMDA), en los siguientes tres modelos de dolor en la rata: nocicepción aguda, hiperalgesia secundaria a la inflamación y nocicepción crónica. Los resultados indican que la inyección única de amantadina (3, 30 y 90 mg/kg ip) disminuye la hiperalgesia secundaria a la inflamación de manera dosis dependiente, y disminuye también la nocicepción crónica inducida por denervación, sin embargo no causa efecto en la nocicepción aguda. Esto muestra que el bloqueo del sistema glutamatérgico y la potenciación del dopaminérgico disminuyen de manera eficaz la nocicepción crónica y sugiere a la amantadina como una buena alternativa terapéutica en la prevención y tratamiento del dolor crónico.

## INTRODUCCIÓN

### Historia.

El dolor ha sido una de las preocupaciones más remotas de la raza humana. Hoy en día el dolor es objeto de investigaciones con el fin de entenderlo y controlarlo.

En la antigua Babilonia se consideraba que el dolor era el resultado de la intrusión de objetos al cuerpo ya sea de una manera física o "demoníaca". Los sacerdotes fungían como médicos y a través de la observación de las estrellas y sacrificio de animales disminuían el dolor y sus enfermedades acompañantes. Los egipcios sostenían que el dolor era infringido por influencias religiosas de sus dioses o espíritus de la muerte, principalmente Seth. Estas influencias penetraban por las fosas nasales u oídos y se distribuían a través de una red vascular llamada *metu* hasta llegar al corazón. Según lo descrito en el papiro de Ebers el dolor disminuía expulsando a los demonios por medio del vómito, la orina, el sudor y sonarse (Bonica and Loeser 2001). La cultura China propone que en una persona normal existen dos fuerzas opositoras: el Yin o fuerza pasiva y el Yang o fuerza activa, estas fuerzas se encuentran en balance y asistidas por la energía vital llamada *chi*, el cual corre a través del cuerpo por 14 meridianos. Un desbalance en las fuerzas, o una alteración en el flujo del *chi* provoca enfermedad y dolor. Al menos desde 2600 años antes de Cristo los chinos utilizan la acupuntura con el fin de disminuir o curar el dolor y sus enfermedades. Actualmente la acupuntura sigue siendo una alternativa eficaz para el tratamiento de ciertos tipos de dolor (Tu 1980).

En el México prehispánico, diversas culturas como la Azteca, también sostenían que el dolor y las enfermedades eran de origen divino, pero los sacerdotes no sólo las curaban a través de rezos sino tenían un amplio conocimiento en herbolaria y curaban cierto tipo de enfermedades con plantas específicas para cada una de ellas (Fig. 1).

Otra cultura a considerar es la Maya, la cual tenía a la diosa *Ixtab*. Esta diosa era la encargada de llevar al cielo a los sujetos que se suicidaban por tener un dolor insoportable o que consideraban incurable su mal (Viesca 1998).

**Figura 1**  
Manuscrito azteca tomado del libro  
Libellus de medicinalibus indorum herbis, de  
1552.  
La planta Xonachton azcapayxiia,  
se recomienda contra el dolor del corazón.



En Grecia, Anaxágoras (500-458 a.C) sostenía que el dolor, así como todas las sensaciones, radicaba en el cerebro. Por el contrario, Empédocles (490-430 a.C), Platón (427-347 a.C) y Aristóteles (384- 322 a.C) opinaban que todas las sensaciones pero en especial el placer y el dolor radicaban en el corazón y la sangre. Hipócrates a través de su teoría de los humores, mencionaba que el origen del dolor y la enfermedad era el resultado de un desequilibrio de estos. No fue hasta la muerte de Aristóteles, que sus discípulos fueron en contra de esta idea y postularon nuevamente que el centro de las sensaciones radica en el cerebro. Galeno (131-200) retomó estos estudios, y realizó grandes avances en la anatomía y fisiología del sistema nervioso central. Galeno experimentaba con cerdos recién nacidos a los cuales les cortaba parcialmente la médula espinal. A través de estos experimentos propuso la existencia de nervios blandos con funciones sensoriales, nervios duros con funciones motoras y nervios exclusivos para el dolor. Durante la Edad Media y gran parte del Renacimiento, predominó la idea aristotélica de que las sensaciones, incluido el dolor, radicaban en el corazón (Rey 1995), a pesar de que los estudios de Alberto Magno, Andreas Vesalius y Leonardo da Vinci apoyaban que era el cerebro el centro de las sensaciones.



Sin duda alguna los conceptos mas representativos en el estudio del dolor durante los siglos XVII y XVIII son los propuestos por Descartes, quien retomando la teoría de Galeno así como su basta observación del sistema nervioso central, postula que los nervios son unos tubos llenos de pequeños hilos los cuales conectan al cerebro con la piel y otros órganos. Refiere que la transmisión sensorial incluyendo el dolor se da a través de estos hilos. Descartes plasma esta teoría en su obra *L'Homme* publicada en 1664 (Damasio 1994). (Fig 2)

**Figura 2.** Grabado publicado en el libro *Homine Figuris* (1664), donde René Descartes, define su concepto de la vía del dolor. Al respecto escribe: " Si por ejemplo, el fuego (A) está cerca del pie (B), las minúsculas partículas de este fuego, que como se sabe se mueven a gran velocidad, tienen el poder de mover un punto de la piel del pie cuando la tocan, y de esta forma jalar unos delicados hilos (c) que se encuentran fijos en un punto de la piel, ellos abren, al mismo tiempo, en la parte superior del poro (d, e, F) que hacen sonar una campana que se encuentra en el otro extremo de la cuerda".

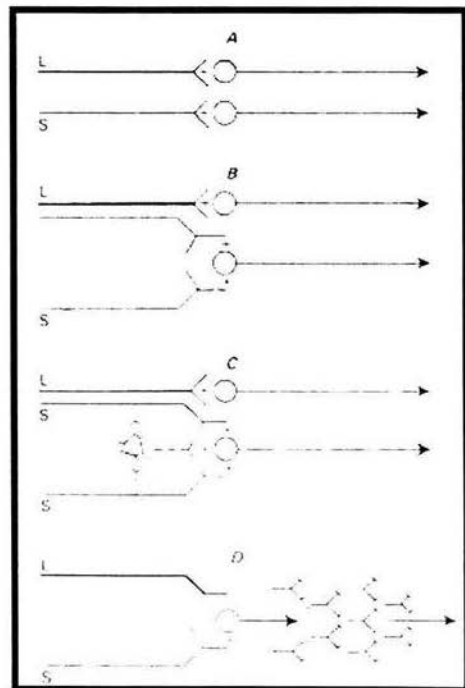


Durante el siglo XIX hubo un gran avance en los estudios histológicos, anatómicos y fisiológicos y fue en este siglo cuando se postularon dos principales teorías. La primera es la teoría de la Especificidad, postulada por Schiff en 1858, que propone que el dolor es una sensación específica que tiene su propio aparato de medición independiente de las demás sensaciones. La segunda teoría es de la Sumación que se sustenta en el concepto aristotélico en que el dolor es una estimulación excesiva del sentido del tacto y completamente desarrollada por Goldscheider en 1894 quien refiere que el dolor es el resultado de la intensidad del estímulo así como de la sumación del mismo a nivel central (Fig. 3b)(Bonica and Loeser 2001) .

En el siglo XX se desató el debate entre las dos teorías previamente propuestas, lo cual dio origen a una serie de diversas posturas. Von Frey expresó que el dolor viaja a través de fibras específicas (pequeñas) desde el receptor hasta la médula y de ahí a centros específicos para el procesamiento del dolor en el cerebro (Fig. 3a). Por el contrario, Livingston apoyó la teoría de la sumación y mencionó que existe sumación y reverberación en las fibras pequeñas y que éste era el mecanismo involucrado en el dolor crónico (Fig. 3c). Noordenbos en 1959 propone la teoría de la interacción sensorial la cual involucra ambos sistemas (Bonica and Loeser 2001). Esta teoría menciona que el estímulo doloroso se transmite a la médula espinal a través de fibras pequeñas con poca mielina, pero puede ser inhibido por la estimulación de fibras grandes o mielinizadas las cuales están encargadas de otras percepciones (Fig. 3d).

**Figura 3.** Esquema de los modelos del dolor .

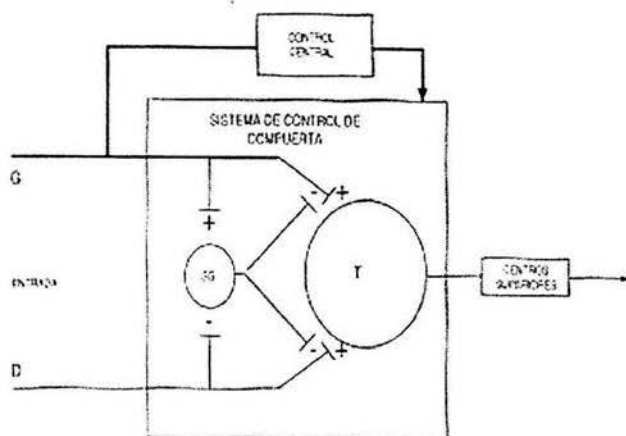
- A.** Modelo de von Frey quien supuso que las fibras largas (L) transmitían tacto y las pequeñas (S) dolor de una manera separada y específica.
- B.** Modelo de la sumación por Goldscheider, quien propuso que la convergencia de las fibras pequeñas en el asta dorsal producen dolor y el tacto es transmitido por fibras largas.
- C.** Modelo conceptual de circuitos reverberantes involucrado en el dolor crónico, propuesto por Livingston.
- D.** Modelo de la interacción sensorial propuesto por Noordenbos donde propone que las fibras largas inhiben (-) y las pequeñas excitan (+) y la nocicepción es transmitida a través de un sistema polisináptico al cerebro.



Wall y Melzack en la década de los 50s estudiaron estas teorías y llegaron a la conclusión que la más adecuada era la teoría de la especificidad pero no había evidencia que apoyara que la percepción dolorosa fuera directamente proporcional al estímulo recibido, por lo cual sugirieron que la experiencia dolorosa estaba en gran parte modificada por factores psicológicos. Como resultado de lo anterior Wall y Mezack publicaron su teoría la cual nombraron "la compuerta del dolor" (Fig. 4). Ésta incluye elementos como especialización fisiológica, sumación central e influencia psicógena en la experiencia dolorosa (Wall y Melzack 1965).

**Figura 4.**  
**Esquema de la Compuerta del Dolor.**

El estímulo doloroso es codificado y conducido a la médula espinal por las fibras delgadas A $\delta$  y C (D). Esta información llega a una neurona (T) que se encarga de enviarla al tálamo. Hasta este punto, la compuerta por donde pasa la información sensorial dolorosa se encuentra abierta, es decir, la sinapsis que se establece entre la neurona sensitiva primaria y la neurona T esta excitada (+). La compuerta se cierra al activar un receptor cutáneo mediante vibración o tacto. Esta información se transmite por fibras gruesas A $\beta$  (G), que activan las neuronas inhibitorias de la sustancia gelatinosa de Rolando (SG), las terminaciones de estas células hacen contacto presináptico con las terminaciones de la neurona sensitiva primaria, inhibiendo la liberación de neurotransmisor excitador sobre la neurona T (-). De esta forma se disminuye la transmisión de la información dolorosa hacia el tálamo, y por tanto se cierra la compuerta. Melzack (1965)



A partir de esta teoría, la investigación en el campo de dolor ha crecido exponencialmente y actualmente se sabe que el dolor no radica en un receptor ni vía específica sino que es el resultado de la interacción fisiológica o fisiopatológica de diversos sistemas neuronales con diferentes funciones específicas.

En resumen se considera que el desarrollo del estudio de dolor presenta tres estadios históricos. El primero es la etapa místico religiosa en la cual se atribuye el origen del daño al igual que la curación a deidades propias de cada cultura. Una segunda etapa que denominamos precientífica que se caracteriza por el planteamiento de hipótesis funcionales (Descartes) que, en conjunto con los primeros estudios anatómicos sistematizados (Vesalius), dieron la primera etapa para el estudio dirigido al entendimiento del dolor. Por último la etapa científica en la cual se han aportado una serie de evidencias morfofuncionales y neuroquímicas que han, inclusive, propiciado el desarrollo racional de métodos analgésicos y antialgésicos así como un mejor entendimiento de este fenómeno.

## **Definición y Conceptos del Dolor.**

Todos hemos experimentado en varias ocasiones el dolor y lo contextualizamos como una experiencia desagradable. No obstante, en la mayoría de los casos la definición del mismo plantea varias controversias. En 1979 Bonica (Merskey and Bodguk 1990) tuvo la necesidad de definir al dolor y las patologías dolorosas de una manera universal con el fin de proporcionar un mejor entendimiento para su estudio y tratamiento. Con ese propósito la Asociación Internacional para el Estudio del Dolor (IASP) lo define de la siguiente manera: “el dolor es una experiencia sensorial y emocional desagradable asociada a un daño real o potencial del tejido, o descrito en términos de dicho daño” (Merskey and Bodguk 1990). Chapman (1996) pone especial énfasis en el componente emocional de esta definición y agrega que: “la emoción no es simplemente una consecuencia de la sensación dolorosa que ocurre después de que llega un mensaje sensorial nocivo a la corteza somatosensorial, es en sí, una parte fundamental de la experiencia misma”.

Al igual que la definición, la clasificación del dolor ha tenido varios problemas. En la actualidad existen diversas clasificaciones del dolor entre las cuales hay dos que destacan. La primera es la propuesta por la IASP la cual tiene relevancia clínica ya que clasifica al dolor en 5 ejes, identificando la región del dolor (eje 1), el sistema involucrado (eje 2), las características temporales (eje 3), la intensidad (eje 4) y la etiología del mismo (eje 5) (Merskey and Bodguk 1990). La segunda propuesta por Cervero y Laird (Cervero and Laird 1991) tiene un mayor valor neurofisiológico ya que integra, en tres fases, los probables mecanismos involucrados en los diferentes tipos de dolor. Fase 1: consiste en un estímulo nociceptivo breve y que es procesado por una vía directa al sistema nervioso central (SNC) a través de un receptor específico hacia la médula espinal, al tálamo y corteza en donde se integra como breve. Fase 2: dolor persistente secundario a un estímulo periférico intenso que causa daño tisular e inflamación.

Esta fase se caracteriza por hiperestimulación de los receptores así como de las aferencias medulares algésicas, lo cual genera un cambio del SNC a un estado de sensibilización temporal. Hay que poner énfasis en que las dos primeras fases son estados dolorosos fisiológicos, mecanismos de alarma, ya que cuando la estimulación periférica cesa la percepción dolorosa también. Fase 3: se caracteriza por estados dolorosos anormales secundarios a lesión del SNC o periférico. En esta fase se pierde el correlato funcional entre la estimulación periférica y la percepción central ya que un estímulo mínimo e incluso en la ausencia de estimulación el sujeto puede percibir dolor en la región antes inervada por el nervio lesionado. A este dolor también se le conoce como dolor patológico o neuropático (Fig. 5).

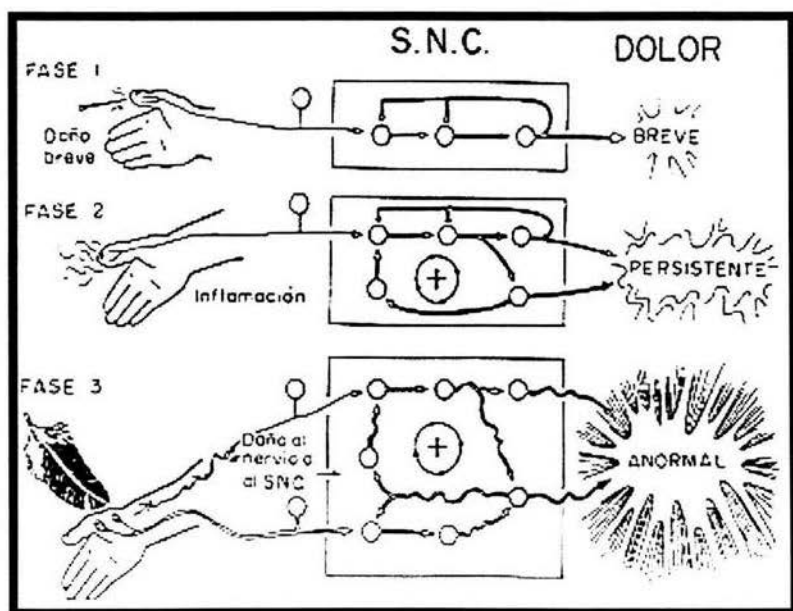
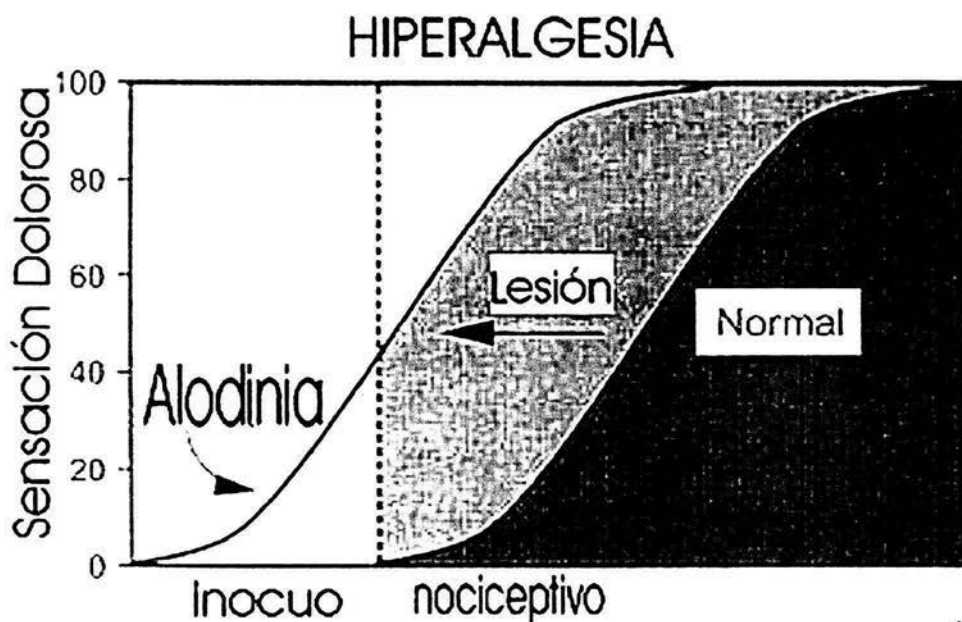


Figura 5. Esquema de las fases de dolor propuesta por Cervero y Laird (1991)

En las fases 2 y 3 podemos encontrar dos estados particulares en la experiencia nociceptiva como resultado de la hiperestimulación: la hiperalgesia que significa la percepción dolorosa exagerada a un estímulo nociceptivo y la alodinia que es percibir dolor con un estímulo no nociceptivo (Fig. 6).



**Figura 5.** Diagrama que ilustra los cambios en la percepción dolorosa. En una situación normal (curva oscura) la sensación dolorosa sólo se evoca cuando se aplica un estímulo nociceptivo. En la lesión esta curva se desplaza hacia la izquierda provocando que un estímulo nociceptivo produzca una sensación dolorosa mayor (hiperalgesia), e incluso que un estímulo inocuo produzca dolor (alodinia)(Cervero and Laird 1999).

## **Modelos de Dolor Crónico.**

El estudio del dolor tónico o crónico en el humano presenta la ventaja de tener un correlato cognitivo conductual altamente preciso. En este contexto existen diversos modelos humanos para el estudio del dolor tónico (LaMotte et al. 1991; Raja et al. 1984; Torebjork et al. 1992), sin embargo, en el estudio electrofisiológico así como el de la génesis y mantenimiento del dolor crónico en el hombre existen muchas limitantes tanto técnicas como éticas (Zimmermann 1983). Por este motivo se han desarrollado diversos modelos animales con el fin de entender la complejidad del dolor.

La investigación experimental del dolor crónico, mediante la utilización de animales íntegros, también ha sido un abordaje con problemas metodológicos que involucran la esfera ética y el análisis e interpretación de resultados a través del tiempo. Al respecto se pensó que un modelo experimental para el estudio del dolor crónico debe de tener las siguientes características:

- a) que el modelo animal utilizado presente un fenómeno razonablemente equiparable con el humano.
- b) que el modelo provea los mecanismos intrínsecos para el entendimiento del fenómeno que se pretende estudiar.
- c) que se lleve a cabo bajo las normas y criterios éticos para la experimentación con dolor.

Albe-Fessard y cols (Albe-Fessard et al. 1990), realizaron una revisión de los diferentes modelos animales para el estudio del dolor crónico y los clasificaron de acuerdo con el mecanismo de génesis del mismo en 3 grupos: Hiperestimulación, Deaferentación y Foco Irritativo Central. En estos tres modelos el animal despliega una conducta nociceptiva caracterizada por vocalización, auto lesión y pérdida de la función del área afectada o sólo alguna de estas.



Cabe resaltar que en estos tres modelos se han observado conductas autodirigidas caracterizadas por lamido intenso, mordisqueo, rasguño e incluso hasta la auto amputación del sitio afectado. A este respecto diversas revisiones de autores como Levitt (1985), Coderre et al. (1986) y Kauppila et al. (1991), han coincidido en que esta conducta autodirigida es el resultado de estimulación nociceptiva periférica la cual genera alteraciones morfofuncionales en la percepción de la nocicepción a nivel central.

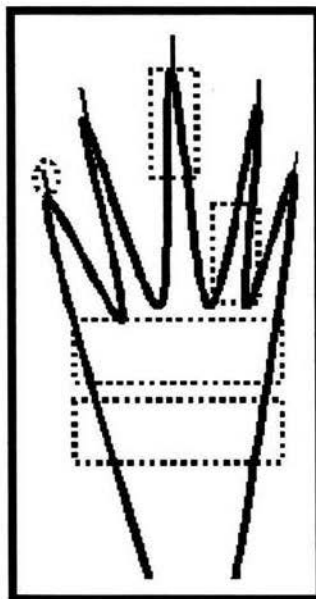
El modelo de hiperestimulación consiste en la producción de un foco irritativo periférico mediante la inyección de un agente quimionociceptivo (carragenina o formalina) de manera subcutánea (Dubuisson and Dennis 1977), o intraarticular (Adyuvante Freund o modelo PIFIR) (Colpaert et al. 1982; Diaz\_Reval et al. 2001), lo cual desencadena un comportamiento caracterizado generalmente por vocalización, rascado y mordisqueo, así como pérdida de la función del área afectada. A este respecto en el laboratorio hemos desarrollado un modelo experimental que despliega una conducta de auto lesión cuantificable y con recuperación conductual *ad integrum*. Este modelo consiste en la inyección subcutánea de 250  $\mu$ l de carragenina al 1% en la región plantar lo que desencadena un proceso inflamatorio de un lapso aproximado de 10 días así como una conducta de auto lesión cuantificable en 4 grados (López-Avila et al 2004; Pellicer et al. 1999; Sotres Bayón et al. 2001).

Otro modelo es el de deaferentación, el cual ha sido ampliamente utilizado en la experimentación del dolor crónico animal para el estudio de patologías humanas como miembro fantasma doloroso (Wall et al. 1979), avulsión del plexo braquial (Lombard et al. 1979) y otras neuropatías en donde la destrucción neural es extensa o completa. Este procedimiento consiste en la sección o ablación de la raíz dorsal en regiones cervicales (Basbaum 1974), lumbares (Saade et al. 1993; Vierck et al. 2000), plexo braquial (Rabin and Anderson 1985) o nervio ciático, la cual desencadena una manifestación conductual autolesiva cuantificable (Albe-Fessard et al. 1990; Wall et al. 1979) conocida como autotomía (Fig. 7).

Esta conducta consiste en un excesivo autocuidado o autolimpieza del sitio afectado expresado como lamido intenso, mordeduras y eventualmente la amputación del sitio denervado. La autotomía es un fenómeno que se ha observado en diferentes especies animales como en la rata, el ratón y el mono (Basbaum 1974; Levitt and Levitt 1981; Wall et al. 1979) pero no es exclusivo de éstas ya que se ha reportado autotomía en humanos con neuropatías (Mailis 1996; Procacci and Maresca 1990). Así mismo, la denervación genera un síndrome clínico conocido como “anestesia dolorosa” y es reportado como dolor en el sitio denervado o anestesiado (Wall et al. 1979).

**Figura 7.** Grado de autotomía.

- Un Punto por la lesión de una o todas las uñas.
- Un Punto por la lesión de la porción distal de cada dedo.
- Un Punto por la lesión de la porción proximal de cada dedo.
- Un Punto por la lesión de la porción distal de la pata.
- Un Punto por la porción proximal de la pata.



Por último, el modelo de “Foco Irritativo Central” consiste en generar un foco epileptógeno, a través de la inyección de gel de alumina y otras sustancias, en núcleos del SNC involucrados en la nocicepción como el ganglio del trigémino (Black 1974) o en la raíz dorsal de la médula espinal (Dyken 1965). El mecanismo propuesto para este modelo es el de la hiperestimulación de estos núcleos (Kryzhanovsky et al. 1974) lo cual desencadena una manifestación conductual de rascado en el sitio inervado por el núcleo previamente infiltrado.

Esta aproximación experimental apoya la hipótesis de que las conductas de autoagresión son el resultado de la disfunción de núcleos y vías centrales involucradas en la nocicepción.

En los trabajos presentados en esta tesis utilizamos el modelo de hiperestimulación a través de quimionocicepción o termonocicepción previa a la denervación del ciático ipsilateral a la estimulación. El motivo de combinar el modelo de hiperestimulación con el de deaferentación es que en la mayoría de las patologías dolorosas secundarias a deaferentación, antes de la deaferentación generalmente cursan con lesiones inflamatorias o térmicas dolorosas, como por ejemplo los pacientes que sufren un traumatismo por compresión o quemaduras y después son amputados. Este modelo nos ayuda a explicar, durante el presente trabajo, cómo el estado somatosensorial previo a la denervación es determinante en el desarrollo del dolor crónico y neuropático.

## **Dolor Neuropático.**

El dolor es la consecuencia de un daño tisular real o potencial como ya se ha mencionado. El dolor al igual que la hipersensibilidad (alodinia e hiperalgesia) disminuyen con el tiempo y ceden en el momento en que la lesión sana. Este es el curso temporal normal de la experiencia dolorosa (Fase 1 y Fase 2 de Cervero *vide supra*). Es importante mencionar que estas fases de dolor son fundamentales para la homeostasis del organismo ya que lo alerta de un daño posible o existente. El dolor promueve una mejor y más rápida recuperación. Este sistema de alarma se puede perder al lesionar el sistema nervioso, lo que genera una alteración en la percepción somatosensorial acompañada de dolor (Fase 3 de Cervero), el cual persiste durante días, meses e incluso años después de que la lesión desaparece.

Se define como dolor neuropático al dolor iniciado o causado por una lesión o disfunción del sistema nervioso (Merskey 1990). En la actualidad la clasificación del dolor neuropático se basa fundamentalmente en su etiología que puede ser inflamatoria, metabólica, tóxica o traumática (Zimmermann 2001; Baron 2001). A pesar de que el sitio de génesis del dolor neuropático así como su etiología desencadenante pueden ser diversas, todas ellas comparten mecanismos fisiopatológicos comunes (Baron 2001; Fields et al. 1998) y manifestaciones clínicas similares.

Es importante destacar que el sistema somatosensorial no es un sistema estático, al contrario, se caracteriza por ser un sistema dinámico en donde un mismo estímulo puede generar diferentes respuestas dependiendo del estado del sistema.

Experimentalmente, el dolor neuropático ha sido abordado a través de la lesión parcial o total de un nervio. Este nervio al ser seccionado desarrolla un proceso de cicatrización y regeneración del sitio dañado mediante la formación de un neuroma. Durante la formación del neuroma se ha encontrado que existe una sobre expresión de canales de sodio en las fibras C. El efecto de la acumulación de estos canales de sodio genera una descarga espontánea continua (Devor and Raber 1983), disminución del umbral de activación y un incremento en la respuesta neuronal (Bennett 1994), que de manera conjunta aumentan la sensibilidad a los estímulos químicos, térmicos y mecánicos (Cline et al. 1989).

Este incremento de la respuesta periférica espontánea induce un estado de hiperactividad central conocido como "sensibilización central" que continúa de una manera independiente al estímulo periférico. Al respecto, se ha demostrado que la estimulación eléctrica repetida de fibras C y ocasionalmente A $\delta$  (Price et al. 1971), con trenes de baja frecuencia (0.3 - 0.5 Hz) produce un incremento en la descarga de potenciales de acción lo cual generan una hiperactividad neuronal que puede durar varios segundos después del término del estímulo (Eide 2000; Eide 2000b). A este fenómeno caracterizado por la estimulación sincrónica artificial de manera experimental, principalmente de fibras C, se le conoce como "Wind Up". Cabe resaltar que el "Wind Up" es un fenómeno ligeramente diferente al de la sensibilización central ya que ésta es el resultado de la activación asincrónica de aferentes primarios que desencadena en actividad espontánea, hiperexcitabilidad e incremento del campo sensorial de las neuronas de amplio rango, secundario a lesión tisular o daño neural (Dougherty and Lenz 1994; Willis et al. 1996; Woolf 1996). Es importante señalar que esta es una definición muy precisa del fenómeno, ya que la estimulación periférica con estímulos inflamatorios o térmicos no producen exactamente el fenómeno de "Wind Up" pero los mecanismos fisiológicos subyacentes son muy similares, y ambos tienen la capacidad de generar sensibilización a nivel central.

Este incremento en la información sensorial por fibras C aumenta el disparo de las neuronas nociceptivas de la médula dorsal hacia centros superiores (sensibilización central) a través de liberación de neuropéptidos como la sustancia P y aminoácidos excitadores los cuales activan receptores NK (Qian et al. 1996), AMPA-KA y N-metil-D-aspartato (NMDA) respectivamente (Dickenson and Sullivan 1987).

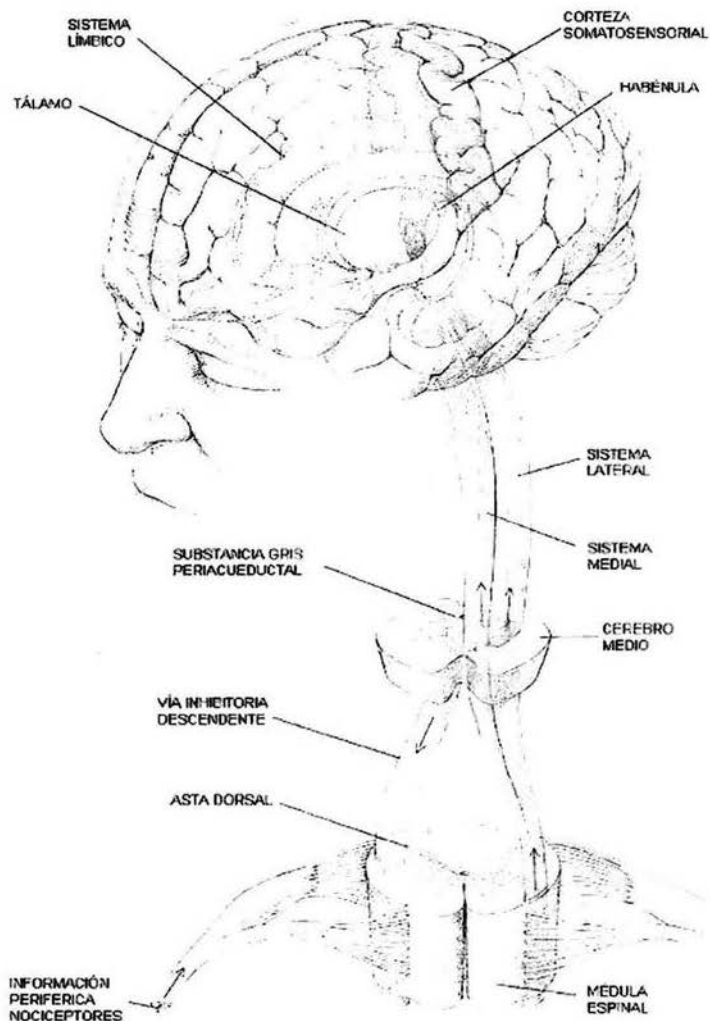
El receptor NMDA ha cobrado gran importancia en los últimos años debido al mecanismo de génesis del "Wind Up" y la sensibilización central. Este se caracteriza por ser un receptor ligando y voltaje dependiente. La activación del receptor NMDA sólo se puede llevar a cabo cuando la membrana esta parcialmente despolarizada por la activación de otro canal. En condiciones normales el canal NMDA esta bloqueado por una molécula de magnesio ( $Mg^{2+}$ ) y en el momento de la despolarización parcial, el  $Mg^{2+}$  se sale del canal permitiendo la entrada de  $Ca^{2+}$ . La entrada de calcio a la célula dispara una serie de mecanismos intracelulares que consisten en la fosforilación del receptor de membrana, activación de la enzima óxido nítrico sintasa, así como la activación de genes reguladores de la síntesis proteica (Eide 2000). Estas alteraciones bioquímicas celulares generan cambios persistentes en la excitabilidad neuronal y se han postulado como responsables del "Wind Up" y la sensibilización central. (Dickenson 1997).

El ganglio de la raíz dorsal, además de las alteraciones bioquímicas, también sufre de cambios degenerativos como consecuencia de la sección neural periférica. La denervación también genera cambios importantes a nivel medular caracterizados por alteraciones morfofuncionales de la lámina II (Arvidsson et al. 1986; Castro\_Lopes et al. 1990), que aunados a los cambios bioquímicos y anatómicos del ganglio de la raíz dorsal, dan como resultado una modificación dramática del procesamiento sensorial a nivel medular (Woolf 1994).

La transmisión del estímulo nociceptivo a lo largo del SNC es cada vez más compleja ya que se ha demostrado, a través de estudios anatómicos, electrofisiológicos y de imágenes funcionales, que el procesamiento de la experiencia dolorosa involucra una gran serie de estructuras cerebrales (Treede et al. 1999; Villanueva and Nathan 2000).

De acuerdo con Melzack y Casey 1968 (Melzack and Wall 1996) los procesos encefálicos involucrados en la experiencia dolorosa tiene tres componentes: 1) El componente sensorio discriminativo encargado de analizar el sitio, la intensidad y la duración del estímulo nociceptivo; 2) El componente afectivo, encargado de la carga de desagrado de la experiencia dolorosa, y; 3) El componente cognitivo encargado de la anticipación, atención y del análisis de experiencias nociceptivas pasadas.

Melzack (1990), al igual que Chapman (1996), propone una división anatomofuncional entre las vías encargadas del procesamiento cognitivo- afectivo y el sensorial. Esta división comienza a nivel medular. Postulan que la información sensorial viaja a través del tracto espinotalámico o también llamado vía lateral hacia núcleos intralaminares talámicos y por último a la corteza somatosensorial primaria. Por otro lado, la vía espinoreticular (Chapman 1996) o medial (Melzack 1990) es la encargada de la transmisión destinada a procesos afectivos. Este tracto medial contiene vías aferentes somatosensoriales y viscerosensoriales que llegan a diferentes niveles del tallo cerebral. Así mismo, dentro del cerebro existen áreas especializadas para el procesamiento de la información sensorio-discriminativa (Talamo-Parietal) y para el procesamiento del componente afectivo cognitivo (sistema límbico y corteza prefrontal) (Fig.8). Melzack sostiene que estos sistemas trabajan en paralelo y que interactúan con otras áreas cerebrales con el fin de integrar la experiencia dolorosa (Melzack and Wall 1996).



**Figura 8.** Principales sistemas neuronales del dolor. Sistema medial (espinotalámico medial). Sistema lateral (espinotalámico lateral). Sistema inhibidor descendente. Melzack 1990.

En los últimos años diversos autores han cuestionado la hipótesis que propone un procesamiento de la experiencia dolorosa por diferentes vías anatómicas y cada una con funciones específicas, ya que dicha hipótesis carece de sustento experimental sólido (Villanueva and Nathan 2000).



Evidencias experimentales morfofuncionales demuestran que la mayor cantidad de fibras C y A $\delta$  con información nociceptiva somática hacen sinapsis en las láminas I y II. El estímulo nociceptivo que viaja a través de estas láminas tiene importantes proyecciones hacia el área lateral parabraquial, la sustancia gris periacueductal y núcleos talámicos.

El área parabraquial proyecta hacia el área de la amígdala, la estría terminal y el núcleo hipotalámico ventromedial; estas tres estructuras se encuentran involucradas en reacciones de ansiedad, miedo y comportamiento defensivo agresivo (Villanueva and Nathan 2000). La sustancia gris periacueductal al recibir estimulación nociceptiva proveniente de la lámina I produce un comportamiento autónomo defensivo caracterizado por hipotensión, inmovilidad, comportamiento de evitación, vocalización así como miedo y ansiedad (Bandler et al. 1985; Depaulis et al. 1989). El tálamo, pero específicamente los núcleos medial dorsal, parafascicular y ventromedial, reciben aferencias de la lámina I. Las principales proyecciones del núcleo ventromedial y parafascicular son hacia la corteza insular media, así como a la corteza del cíngulo (Villanueva and Nathan 2000) y juegan un papel importante en el procesamiento de la respuesta conductual y emocional relacionada con el dolor.

Estudios electrofisiológicos en animales (Pellicer et al. 1999; Sikes and Vogt 1992; Vaccarino and Melzack 1989), en humanos (Tarkka and Treede 1993) así como estudios de imagen (Casey et al. 1994, Tuor et al. 2000), han demostrado que la corteza anterior del cíngulo (CAC) se encuentra involucrada en el procesamiento de la experiencia dolorosa, pero en especial en el componente desagradable de ésta (Casey 1999; Coghill et al. 1994; Rainville et al. 1997; Rainville et al. 1992). También se ha demostrado que la CAC tiene gran relevancia en la génesis y mantenimiento del dolor neuropático (Melzack 1990; Vaccarino and Melzack 1989; Pellicer et al. 1999).

Estos antecedentes indican que el dolor neuropático conlleva un proceso morfofuncional complejo ya que implica mecanismos periféricos y centrales que se modifican a lo largo del tiempo. Por ejemplo: después de una sección neural el inicio de la señal dolorosa comienza en el axón dañado, esta señal sensibiliza las neuronas del ganglio dorsal, quienes eventualmente activan neuronas de alto orden, tanto talámicas como corticales. Estas últimas se convierten al final del proceso en las principales responsables de la experiencia dolorosa.

En esta tesis se postula que el estímulo periférico es esencial para determinar las características de la sensación dolorosa, pero el mantenimiento de esta es un proceso encefálico en donde la corteza anterior del cíngulo juega un papel determinante.

## **PRIMERA PARTE**

### **Información Sensorial Previa a la Denervación en el Desarrollo del Dolor Crónico**

#### **Planteamiento del Problema.**

La lesión neural extensa genera dolor neuropático entre el 70 y el 100% de los pacientes (Katz and Melzack 1990). Un dato interesante en este tipo de pacientes es que a pesar de que el mecanismo de lesión neural sea similar, el dolor varía importantemente (Katz and Melzack 1990). Al respecto, diversos autores han observado que el estado somatosensorial previo a la lesión neural puede modificar el dolor que esta misma desencadena (Bach et al. 1988; Katz et al. 1991; Nikolajsen et al. 1997). Así mismo, existe evidencia experimental controvertida con respecto a la estimulación nociceptiva previa y su repercusión en el modelo de deaferentación (Bach et al. 1988; Seltzer et al. 1991). La intensidad, temporalidad y tipo de dolor a lo cual hemos denominado *qualia* parece modificar el estado somatosensorial posterior a la deaferentación (López-Avila et al. 1999).

#### **Hipótesis.**

La temporalidad y el tipo de estímulo nociceptivo previo a la denervación son factores determinantes e independientes que pueden modificar la nocicepción crónica en el modelo de deaferentación.

## **Experimento 1.**

### **Quimionocicepción y Temporalidad**

En este experimento evaluamos la repercusión de un estímulo quimionociceptivo aplicado 30 minutos y 24 horas antes de la denervación, en la nocicepción crónica medida a través de la conducta de autotomía.

#### **Material y Método**

Todos los procedimientos experimentales se realizaron bajo las consideraciones éticas de la Asociación Internacional para el Estudio del Dolor (Zimmermann 1983), y mediante la aprobación de los comités de proyectos y bioética del Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente.

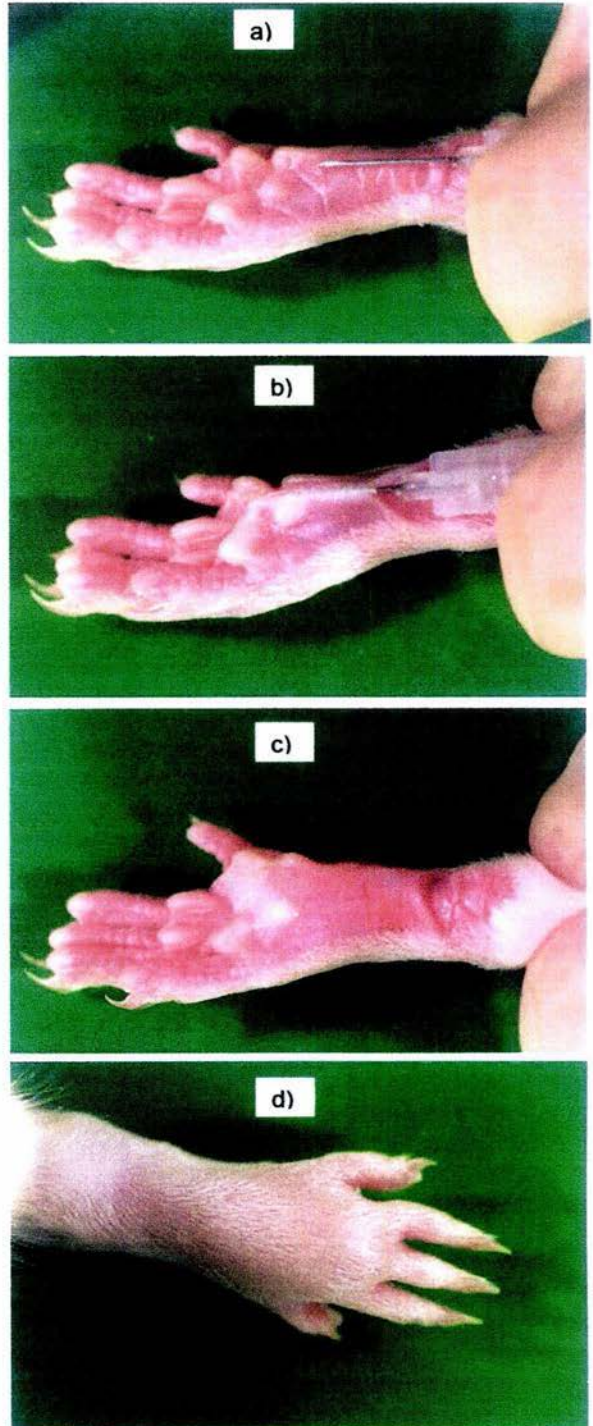
**Animales.** Se utilizaron ratas Wistar macho con un peso de 250-350 g al momento de la cirugía. Durante el período de observación las ratas se mantuvieron en cajas individuales de acrílico transparente con ciclos normales de luz oscuridad 12x12 h, y con alimentación e hidratación *ad libitum*.

**Diseño Experimental.** Para este experimento se formaron 3 grupos: grupo control (Con) (n = 20) únicamente denervado, grupo CAR 30 (n = 12) al cual se le aplicó un estímulo quimionociceptivo 30 minutos antes de la denervación y grupo CAR 24 (n = 10) al cual se le aplicó un estímulo quimionociceptivo 24 h antes de la denervación.

**Estímulo Quimionociceptivo.** La quimionocicepción se indujo mediante la infiltración intraplantar derecha de carragenina lambda (CAR 50 $\mu$ l al 1% en solución salina. Sigma Chemical Co. St. Louis MO, USA). (Fig. 9)

**Cirugía.** Bajo anestesia general (pentobarbital sódico 50 mg/kg ip.), el nervio ciático derecho fue expuesto. El nervio se cortó y se ligó con seda 3-0, 5 mm de la porción distal fueron removidos con el fin de evitar reinervación. La piel fue suturada con seda 3-0.

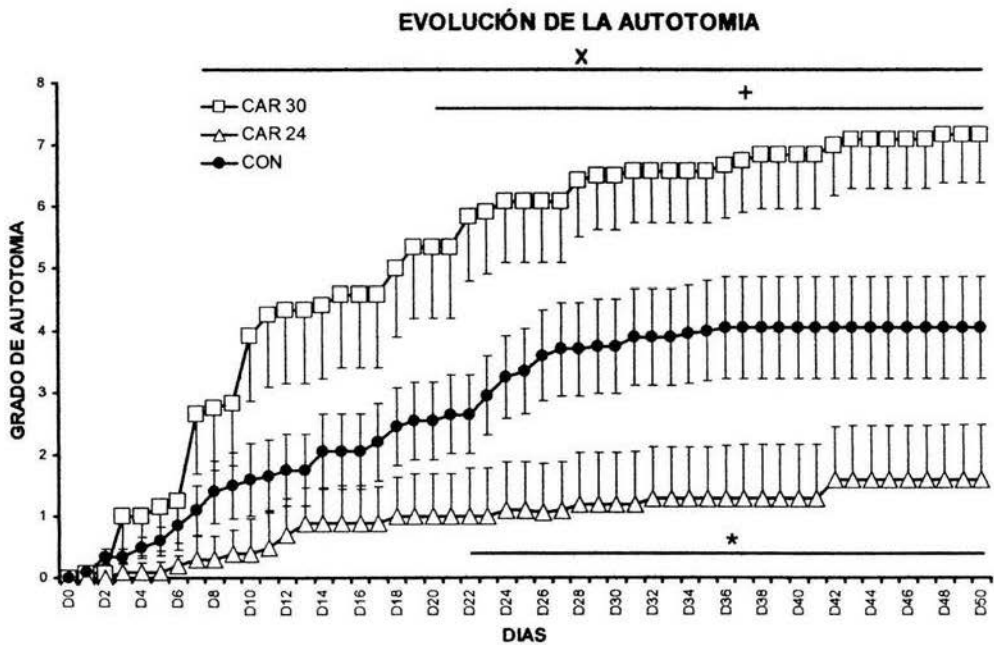
**Conducta de Autotomía.** Los grados de autotomía fueron observados diariamente utilizando la escala propuesta por Wall *et al* (1979) *vide supra* (Fig 7). Se registró el inicio de la autotomía y el número de animales que presentaron la conducta en cada grupo (incidencia). El día 50 los animales fueron sacrificados con una sobredosis de pentobarbital sódico y la denervación fue verificada.



**Figura 9.** Inducción del proceso quimionocectivo.

- a) Sitio de inserción de la aguja
- b) Sitio de infiltración
- c) Estado postinfiltración
- d) Estado 24 h postinfiltración.

**Análisis Estadístico.** Con el fin de analizar la evolución de la autotomía entre los grupos, se utilizó la prueba MANOVA. Las diferencias entre el inicio de la autotomía por grupos se establecieron con una la prueba de *t* Student. Para establecer diferencias entre la incidencia se utilizó la prueba exacta de Fisher. Las diferencias entre tratamientos por día fueron establecidas con la prueba de *t* Student como *post hoc*.



**Gráfica 1.** Se observa el curso temporal de la autotomía durante 50 días. Grupo Control (CON), únicamente denervado; grupo CAR 30 denervado 30 minutos después del proceso quimionocectivo; grupo CAR 24 denervado 24 h después del proceso quimionocectivo. Se encontraron diferencias significativas entre grupos por día utilizando la prueba *t* de Student ( $p < 0.05$ ) (líneas horizontales). Las diferentes comparaciones se señalan con símbolos: CON vs CAR 30 (+); CON vs CAR 24 (\*) y CAR 30 vs CAR 25 (x).

GRUPOS	INCIDENCIA		INICIO ± E.E.	GRADO DE AUTOTOMÍA AL DÍA 50.
CON	13/20	65%	6.71 +/- 1.73	4.05
CAR 24	5/10	50%	9.6 +/- 2.48	1.60
CAR 30	11/12	91 % *	9.8 +/- 2.22	7.17

**Tabla 1.** La incidencia se calculó como el número de animales que presentaron la conducta sobre los que no la presentan. Se encontró diferencia estadística entre la incidencia del grupo CAR 24 vs CAR 30 utilizando la prueba exacta de Fisher (\*). El inicio se calculó como el día promedio de cada grupo en iniciar la conducta. El grado de autotomía se calculó utilizando la escala de Wall *et al.*

## Resultados.

Los resultados muestran un incremento significativo en el grado de autotomía en el grupo CAR 30 así como una disminución en el grupo CAR 24 al compararlos con el grupo control (Gráfica 1). La incidencia mostró diferencias significativas entre el grupo CAR 30 vs CAR 24 (Tabla 1).



## Discusión.

Existe evidencia clínica que propone que estados nociceptivos previos a la amputación o denervación, incrementan la probabilidad de génesis del miembro fantasma doloroso (Bach et al. 1988; Jensen et al. 1985; Katz and Melzack 1990; Katz et al. 1991; Nikolajsen et al. 1997). Se ha reportado en el modelo de denervación que estímulos quimionociceptivos (Pellicer et al. 1999), termonociceptivos (Coderre and Melzack 1986) y la estimulación eléctrica nociceptiva periférica (Seltzer et al. 1991), aplicada antes, incrementan el grado de autotomía. En estos trabajos no se tomó en cuenta el tiempo transcurrido entre el estímulo doloroso y la denervación, en todos ellos el lapso máximo entre estos dos estímulos es de 1 h, de tal manera que los resultados en todos los casos es el de potenciación del efecto nociceptivo medido a través del incremento de la conducta de autotomía.

Los resultados de este trabajo así como los expresados por Abad *et al* (Abad et al. 1998) examinan la repercusión de un estímulo quimionociceptivo aplicado 24 h antes de la denervación. El grupo de Abad también reportó que la infiltración de formalina 24 h, 3, 7 y 14 días antes de la denervación disminuye la conducta de autotomía. Estos resultados apoyan el hecho de que una ventana temporal mayor (al menos 24 h) entre el estímulo nociceptivo y la denervación, desencadena mecanismos inhibitorios capaces de disminuir la nocicepción crónica evaluada como la conducta de autotomía. Si bien nuestros procedimientos y resultados no desentrañan la naturaleza del mecanismo, posiblemente la inhibición está dada por un sistema, previamente descrito (Le Bars et al. 1986), en el cual un estímulo nociceptivo es capaz de inhibir otro estímulo doloroso mediante la activación de un control inhibitorio difuso descendente (DNIC). Otro posible mecanismo operando en la inhibición es el relacionado con la liberación de opioides endógenos después de un estímulo doloroso (Ruda 1982 ;Yaksh 1978).

La liberación de opioides por un estímulo nociceptivo primario (quimionocicepción) condiciona un estado de antialgesia, el cual disminuye la repercusión de un dolor secundario, en este caso la denervación.

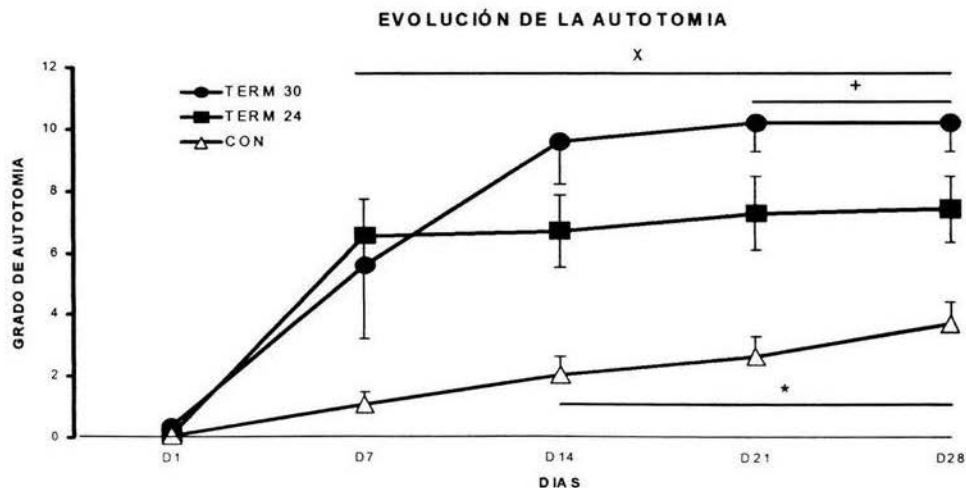
El hecho de que un estímulo doloroso, en una ventana temporal corta (30 minutos) antes de la denervación incremente la conducta de autotomía, sugiere la activación de mecanismos que potencian la sensibilización dolorosa. En este contexto existe evidencia experimental de diversos autores que apoyan los fenómenos de sensibilización producidos por liberación de aminoácidos excitadores y activación de receptores NMDA (Dickenson 1994; Woolf and Thompson 1991), los cuales se encuentran involucrados en la génesis del dolor neuropático (Eide 2000).

## Experimento 2.

### Termonocicepción y Temporalidad

En este experimento evaluamos la repercusión de un estímulo termonociceptivo aplicado 30 minutos y 24 horas antes de la denervación, en la nocicepción crónica medida a través de la conducta de autotomía.

**Diseño Experimental.** Para este experimento se formaron 3 grupos: grupo Control (CON) (n = 20) únicamente denervado, grupo TERM 30 (n = 5) al cual se le aplicó un estímulo termonociceptivo 30 minutos antes de la denervación y grupo TERM 24 (n = 7) al cual se le aplicó un estímulo termonociceptivo 24 horas antes de la denervación. La termonocicepción se indujo mediante inmersión de la pata derecha en agua a 55 °C durante 20 segundos (Coderre and Melzack 1986). El grado de autotomía se midió 1 vez cada 7 días por 28 días. El resto de la metodología es exactamente igual al experimento 1.



**Gráfica 2.** Se observa el curso temporal de la autotomía durante 28 días. Grupo Control (CON), únicamente denervado; grupo TERM 30 denervado 30 min después del proceso termonociceptivo; grupo CAR 24 denervado 24 h después del proceso termonociceptivo. Se encontraron diferencias significativas entre grupos por día utilizando la prueba *t* de Student ( $p < 0.05$ ) (líneas horizontales). Las diferentes comparaciones se señalan con símbolos: CON vs TERM 30 (\*); CON vs TERM 24 (x) y TERM 30 vs TERM 25 (+).

GRUPOS	INCIDENCIA	GRADO DE AUTOTOMÍA AL DÍA 28.
CON	13/20 65%	4.05
TERM 24	7/7 100% *	7.42
TERM 30	5/5 100 % *	10.2

**Tabla 2.** La incidencia se calculó como el número de animales que presentaron la conducta sobre los que no la presentan. Se encontró diferencia estadística entre la incidencia del grupo TERM 24 y TERM 30 vs CON utilizando la prueba exacta de Fisher (\*). El inicio se calculó como el día promedio de cada grupo en iniciar la conducta. El grado de autotomía se calculó utilizando la escala de Wall *et al.*

## Resultados.

Los resultados muestran un incremento significativo de la conducta de autotomía en los grupos TERM 30 y TERM 24 al compararlos con el grupo control (Gráfica 2). Así mismo se encontró diferencia significativa entre el grupo TERM 30 vs TERM 24. La incidencia mostró diferencias significativas entre el grupo TERM 30 y TERM 24 vs CON (tabla 2).

## Discusión.

Este experimento muestra que un estímulo termonociceptivo aplicado 30 minutos o 24 h previas a la denervación incrementa de manera significativa la conducta de autotomía con respecto al control, también observamos una diferencia significativa en el grado de autotomía del grupo TERM 30 comparado con el grupo TERM 24. Sugerimos que los mecanismos por los cuales el grupo TERM 24 presenta menor grado de autotomía con respecto a grupo TERM 30 son los mismos que los propuestos en el experimento 1, pero dada las características de este estímulo (55 °C durante 20 seg.), el cual se considera de mayor intensidad que el quimionociceptivo (Coderre and Melzack 1986), observamos que la inhibición que presenta el grupo de TERM 24 es menor que la observada en el grupo control. Esto puede deberse a que los mecanismos inhibitorios activados son insuficientes para disminuir el proceso nociceptivo crónico en este experimento.

Este experimento nos demuestra que el tipo de estímulo, así como la ventana temporal entre el estímulo y la nocicepción, son factores independientes y determinantes en el desarrollo del dolor crónico.

El incremento en la conducta de autotomía, y el aumento de la percepción dolorosa del miembro fantasma no son el resultado únicamente de la estimulación nociceptiva previa a la lesión neural. Las características o *qualia* de esta estimulación son determinantes en la repercusión nociceptiva. En el presente trabajo mostramos directamente que la ventana temporal entre el estímulo nociceptivo y la denervación es determinante en el desarrollo de la conducta de autotomía, dado que una estimulación dolorosa inducida 30 minutos antes de la denervación incrementa de manera significativa la conducta de autotomía comprada con el estímulo aplicado 24 h antes. Así mismo, un estímulo diferente aun aplicado con la misma temporalidad cambia de manera sustancial la respuesta conductual nociceptiva crónica.

El grupo con un estímulo doloroso quimionociceptivo aplicado 24 h antes de la denervación presentó una conducta de autotomía inhibida con respecto al control, motivo por el cual decidimos evaluar si esta inhibición era debida a un mecanismo endógeno presumiblemente descendente (Le Bars et al. 1986; Villanueva et al. 1986) en el cual estuvieran involucrados los péptidos opiodes. Con este fin se diseñó el experimento 3.

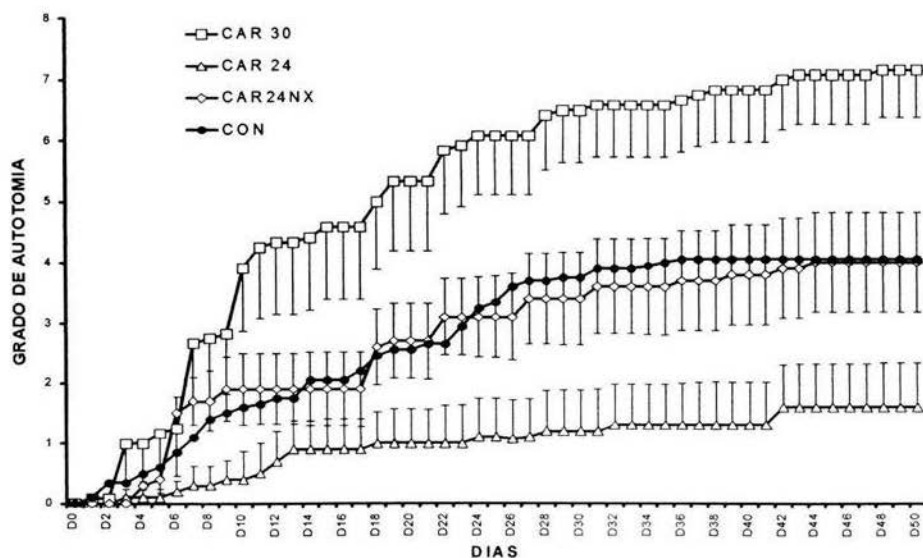
### Experimento 3.

#### Quimionocicepción, Temporalidad y Naltrexona

Determinar el efecto de los opioides endógenos en la evolución de la autotomía, en la ventana temporal que transcurre entre la inducción del proceso inflamatorio por y la denervación del ciático ipsilateral 24 h después.

**Diseño Experimental.** En este experimento se formó un grupo: CAR24NX (n = 10) al cual se le aplicó naltrexona (1mg/kg ip.) inmediatamente después de la inducción del proceso quimionociceptivo y se repitió la dosis a las 12 h; 24 h después de la quimionocicepción se denervó. Este grupo se comparó con los datos obtenidos en el experimento 1.

#### EVOLUCIÓN DE LA AUTOTOMIA



**Gráfica 3.** Se observa el curso temporal de la autotomía durante 50 días. Grupo Control (CON), únicamente denervado; grupo CAR 30 denervado 30 minutos después del proceso quimionociceptivo; grupo CAR 24 denervado 24 h después del proceso quimionociceptivo y grupo CAR24NX al cual se le aplicó naltrexona 1mg/kg ip. después del proceso quimionociceptivo y se repitió la dosis a las 12 h, 24 h después de la quimionocicepción se denervó.

GRUPOS	INCIDENCIA (%)		INICIO ± E.E.	GRADO DE AUTOTOMÍA AL DÍA 50.
CON	13/20	65%	6.71 ± 1.73	4.05
CAR 24	5/10	50%	9.6 ± 2.48	1.60
CAR24NX	6/10	60%	7.4 ± 2.73	4.0
CAR 30	11/12	91 %	9.8 ± 2.22	7.17

**Tabla 3.** No se encontraron diferencias significativas en la incidencia y el inicio de la conducta al comparar el grupo CAR24NX con el resto de los grupos. El grado de autotomía se calculó utilizando la escala de Wall *et al* (1979).

## Resultados.

Los resultados muestran un incremento significativo del grado de autotomía en el grupo CAR24NX al compararlos con el grupo CAR 24, así como una disminución al compararlo con el grupo CAR 30 (gráfica 3). No hubo diferencias al comparar el grupo CAR24NX con el control (tabla 3).



## Discusión.

Los resultados de este experimento nos muestran que la inducción del proceso nociceptivo con carragenina, 24 h previas a la denervación, desencadena mecanismos opioides que participan en la inhibición de la conducta nociceptiva, susceptibles de ser bloqueados a través de la inyección peritoneal de naltrexona.

Existe evidencia experimental que sugieren que el dolor persistente, desencadenado por modelos de neuropatía o inflamatorios generan una activación compensatoria de vías inhibitorias de la nocicepción. A este respecto se ha propuesto que al menos cuatro sistemas están involucrados en dicha inhibición: los opioides endógenos (Ruda 1982 ;Yaksh 1978), los cannabinoides (Monhemius et al. 2001), los aminoácidos excitadores (Terayama et al. 2000) y el sistema gabaérgico (Le Bars et al. 1986; Villanueva et al. 1986). Con lo que al sistema opioide respecta, existe evidencia directa e indirecta de que la nocicepción por inflamación incrementa la síntesis y liberación de péptidos afines a los receptores  $\mu$  (Wu et al. 2001).

Nuestros resultados muestran que el bloqueo del receptor  $\mu$ , mediante la inyección de naltrexona, revierte parcialmente la analgesia desencadenada por el proceso inflamatorio durante las primeras 24 h.

Estos datos al igual que los resultados de los experimentos anteriores apoyan nuestra hipótesis en donde la *cualia* juega un papel importante en el desarrollo del dolor crónico ya que al menos el tipo de estímulo, la intensidad del mismo y la ventana temporal entre el estímulo nociceptivo y la denervación modifican de manera radical la nocicepción crónica evaluada a través de la conducta de autotomía.

## SEGUNDA PARTE

### **Papel de los Sistemas Glutamatérgicos y Dopaminérgicos en el Desarrollo del Dolor en la Rata**

En la actualidad el tratamiento del dolor crónico se ha constituido en uno de los mayores retos terapéuticos, la aproximación farmacológica en este tipo de padecimientos ha presentado numerosas fallas terapéuticas, dada la complejidad de los diferentes sistemas algésicos y antialgésicos involucrados.

Un gran número de trabajos recientes relacionan a los aminoácidos excitadores (AE) con procesos nociceptivos. En particular los que reportan la existencia de glutamato (GLU) y aspartato (ASP), tanto en aferentes primarios de grueso calibre, como en los delgados (C y A delta). Se ha descrito que estos AE se liberan tanto con estímulos nocivos agudos (Kangrga and Randic 1990) como crónicos (Skilling et al. 1988). Hay también evidencia del papel diferencial que juegan los receptores N-metil-D-aspartato (NMDA), en modelos de termonocicepción aguda y en la fase tónica tardía (Lutfy et al. 1997). Estos resultados sugieren que el receptor NMDA tiene poca relevancia en los mecanismos algésicos agudos, en cambio, parecen jugar un papel importante en la fase tónica tardía.

La eficacia de los antagonistas NMDA en la disminución del dolor ha sido ampliamente demostrada (Davar et al. 1991; Eisenberg et al. 1994; Eisenberg et al. 1995; Mao et al. 1992; Neugebauer et al. 1993; Suzuki et al. 2001; Tseng 1998), pero su administración crónica causa efectos secundarios los cuales impiden un tratamiento prolongado con este tipo de fármacos. Igualmente existe evidencia experimental que muestra que agentes antagonistas NMDA bloquean la transmisión nociceptiva a nivel dorsal (Davies and Lodge 1987) y reducen la nocicepción en animales (Dickenson and Sullivan 1987).

Recientemente se ha reportado la eficacia de la dosis única de amantadina (l-amino-adamantane) en el tratamiento de ciertos tipos de dolor crónico, no relacionados con la deafferentación (Eisenberg and Pud 1998; Pud et al. 1998). Este fármaco es un antagonista no competitivo de baja afinidad al receptor NMDA, que presenta una cinética rápida de bloqueo y desbloqueo (Kornhuber et al. 1991; Kornhuber et al. 1995).

La amantadina también actúa induce la liberación de dopamina (Gordon et al. 1996; Stone 1976; Takahashi et al. 1996). Esta doble condición del fármaco, antagonista NMDA, por un lado y de facilitador dopaminérgico por el otro, ha resultado un buen candidato para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson y se ha observado que los efectos farmacológicos secundarios son menores.

Se ha puesto de manifiesto tanto por otros grupos como el nuestro, el papel de la dopamina como posible mediador inhibitorio central de procesos dolorosos (Saadé et al. 1997; Sotres Bayón et al. 2001; Sotres Bayón et al. 2001). La administración de L-dopa disminuye las respuestas conductuales nociceptivas en animales (Paalzow 1992) así como la percepción dolorosa en el humano (Ertas et al. 1998). La microinyección intracerebral de dopamina en modelos de dolor inflamatorio (prueba de formalina) y dolor neuropático (deafferentación nerviosa) disminuye la respuesta antinociceptiva de forma dosis dependiente (Franklin 1989; Lyerly et al. 1988; Morgan and Franklin 1991) .

Nuestro grupo ha demostrado que la lesión y la estimulación eléctrica del área tegmental ventral (núcleo dopaminérgico) modifica la conducta nociceptiva crónica en la rata (Sotres Bayón et al. 2001). Con estos antecedentes decidimos investigar si la amantadina a diferentes dosis (3, 30 y 90 mg/kg dosis única ip) es capaz de reducir la respuesta nociceptiva en tres modelos: hiperalgesia secundaria a un proceso inflamatorio, termonocicepción aguda y nocicepción crónica por denervación.

## Experimento 1.

### Hiperalgnesia secundaria a un proceso inflamatorio

Con esta serie experimental se evaluó la respuesta antialgésica termnociceptiva (reflejo de flexión) con diferentes dosis de amantadina 1 h y 24 h después de la inducción de un proceso inflamatorio.

### Material y Método.

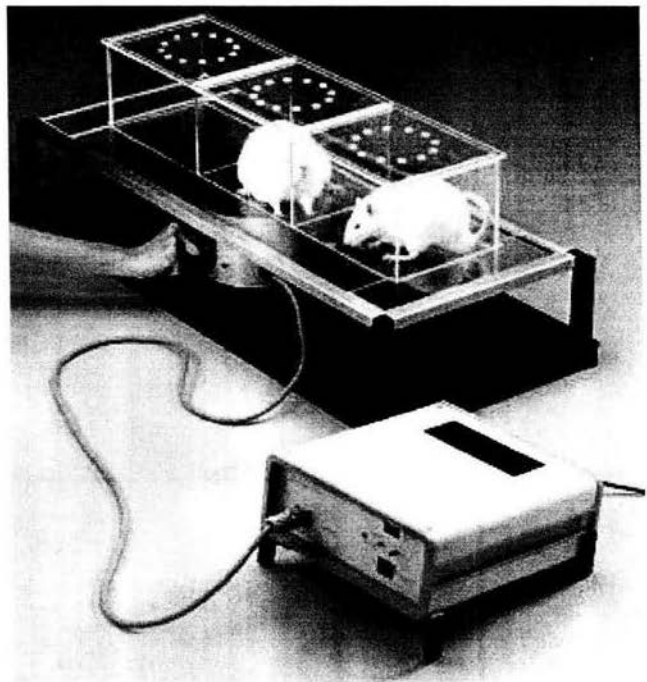
**Animales.** Se utilizaron ratas Wistar machos con un peso de 250 a 350 g. Los animales se mantuvieron en grupos de 5 dentro de cajas de acrílico transparentes, con un ciclo de luz oscuridad de 12x12 h y con alimentación e hidratación *ad libitum*.

**Diseño Experimental.** Para este experimento se utilizaron 6 grupos: un grupo control (n = 25); un vehículo (n = 15) inyectado con solución salina (NaCl 0.9%) 1ml/kg ip. más inyección intraplantar de 50 µl de solución salina; un grupo carragenina (CAR) (n=15) inyectados con solución salina 1ml/kg ip. más inducción del proceso inflamatorio; y 3 grupos de amantadina (n = 15 cada uno), inyectados con amantadina (clorhidrato de adamantanamina, Sigma Chemical Co. St. Louis MO, USA), 3, 30 y 90 mg/kg ip. respectivamente, más la inducción del proceso inflamatorio.

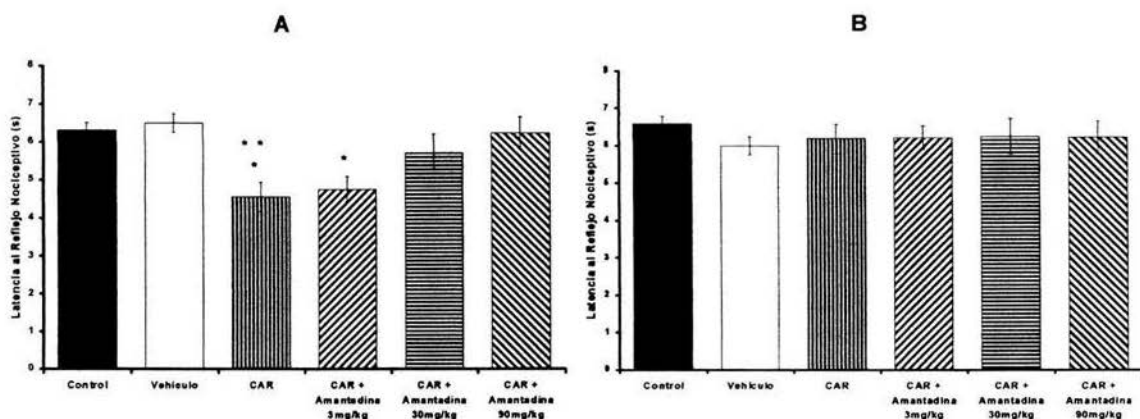
**Inducción del Proceso Inflamatorio.** El proceso inflamatorio se indujo mediante la infiltración intraplantar derecha de carragenina lambda (CAR 50µl al 1% en solución salina. Sigma Chemical Co. St. Louis MO, USA).

**Prueba de Termonocicepción.** Con el fin de disminuir el estrés de los animales en experimentación, se sometieron a un período de habituación tanto al equipo como al personal a lo largo de 7 días consistentes en sesiones diarias de 10 minutos en las cajas de experimentación. El séptimo día los animales fueron pesados y marcados apropiadamente. La respuesta conductual nociceptiva se midió por medio de un aparato de termonocicepción plantar que evoca un reflejo flexor antialgésico (Hugo Basile mod. 7370) (Fig. 10). Las ratas permanecieron en cajas de acrílico (17 x 22 x 13cm), con piso de vidrio. Después del periodo de habituación, la fuente de calor radiante se posicionó debajo de la región plantar derecha trasera. La latencia al reflejo de nocicepción (LRN) se determinó con una exactitud de 0.1 seg. mediante un dispositivo electrónico de tiempo. Todos los grupos exceptuando el control se probaron 1h y 24 h después de la inyección ip. El grupo control se probó sin ninguna inyección.

**Figura 10.**  
Aparato de termonocicepción



**Análisis Estadístico.** Para determinar las diferencias entre el reflejo de flexión antalgésico por prueba (1h y 24 h) entre los grupos se aplicó una análisis de varianza (ANOVA) y una prueba de Tuckey como pos-hoc. Con el fin de determinar las diferencias de las latencias al reflejo de flexión a lo largo del tiempo entre grupos utilizamos una análisis múltiple de varianza (MANOVA).



**Gráfica 4.** Respuesta conductual antalgésica evaluada como la latencia al reflejo nociceptivo (LRN) en segundos, desencadenada por una fuente termonociceptiva (Ugo Basile. Prueba Plantar. Mod. 7370). A) LRN probada una hora después de la infiltración intraplantar. Control (n=25) sin tratamiento; vehículo (n=15) con 50 µl de salina 0.9% intraplantar más 1 ml/kg de salina 0.9% ip.; CAR (n=15) con 50 µl de carragenina intraplantar al 1% más 1 ml/kg de salina al 0.9% ip.; grupos amantadina (n = 15 cada uno) con 50 µl de carragenina intraplantar al 1% más 3, 30 y 90 mg/kg ip. de amantadina respectivamente. Se encontró una disminución significativa entre el grupo CAR comparado con el grupo control (\*\*), vehículo (\*\*) y amantadina 90 mg/kg (\*). El grupo amantadina 3 mg/kg muestra una LRN disminuida al comparar con control (\*) y vehículo (\*). Los grupos amantadina presentan una tendencia dosis dependiente, con diferencias estadísticas al comparar el grupo 90 mg/kg con el grupo 3 mg/kg (\*). El análisis estadístico se realizó utilizando la prueba de análisis de varianza (ANOVA) y una prueba Tukey como post hoc (\* p < 0.05, \*\* p = 0.004). B) Mismos grupos y parámetros probados 24 h después de la infiltración intraplantar. No se encontraron diferencias entre grupos (ANOVA NS)

## Resultados.

Una hora después de la infiltración de CAR se midió la LRN (segundos  $\pm$  error estándar). El grupo control ( $6.32 \pm 0.18$ ) y vehículo ( $6.48 \pm 0.24$ ) presentaron LRN similares ( $p = 0.99$ ). El grupo CAR ( $4.54 \pm 0.39$ ) muestra una disminución significativa de la LRN comparado con el grupo control, vehículo y amantadina 90 mg/kg ( $6.22 \pm 0.43$ ). En el grupo amantadina 3 mg/kg ( $4.76 \pm 0.32$ ) se observa una disminución significativa de la LRN comparado con el control ( $p = 0.016$ ) y el vehículo ( $p = 0.014$ ). Los grupos de amantadina 30 ( $5.72 \pm 0.48$ ) y 90mg/kg muestran LRN similares cuando son comparados con los grupos control y vehículo. Los grupos de amantadina presentan una tendencia dosis dependiente, siendo estadísticamente significativos cuando se compara el grupo de amantadina 90 mg/kg con el de 3 mg/kg ( $p = 0.045$ ) (Gráfica 4A).

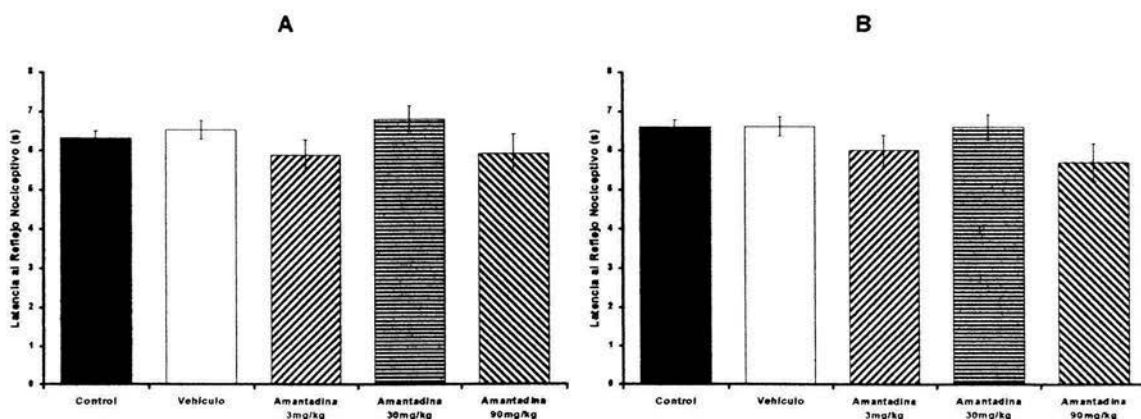
No hubo diferencias estadísticamente significativas en la LRN entre grupos a las 24 h del inicio del proceso inflamatorio. (Control  $6.59 \pm 0.15$ ; vehículo  $6.0 \pm 0.32$ ; CAR  $6.18 \pm 0.45$ ; amantadina 3 mg/kg  $6.21 \pm 0.41$ ; 30 mg/kg  $6.24 \pm 0.5$ ; 90 mg/kg  $6.22 \pm 0.5$ ). No se encontraron diferencias estadísticas al comparar la evolución de la LRN 1h vs 24 h posterior al inicio del proceso inflamatorio (Gráfica 4B).

## Experimento 2.

### Termonocicepción Aguda

En este experimento se evaluó el efecto de la amantadina sobre la respuesta termonociceptiva aguda.

**Diseño Experimental.** Para este experimento se utilizaron 5 grupos: un grupo control (n = 25); un vehículo (n = 15) inyectado con solución salina (NaCl 9%) 1ml/kg ip.; y 3 grupos de amantadina (n = 15 cada uno), inyectados con amantadina (clorhidrato de adamantanamina, Sigma Chemical Co. St. Louis MO, USA), 3, 30 y 90 mg/kg ip. respectivamente. Es decir mismo diseño que el experimento anterior, pero, sin la inducción del proceso inflamatorio.



**Gráfica 5.** Respuesta conductal antialgésica evaluada como la latencia al reflejo nociceptivo (LRN) en segundos, desencadenada por una fuente termonociceptiva (Ugo Basile. Prueba Plantar. Mod. 7370). A) LRN probada una hora después de la infiltración intraplantar. Control (n=25) sin tratamiento; vehículo (n=15) 1ml/kg de salina 0.9% ip.; grupos amantadina (n = 15 cada uno) inyectados con 3, 30 y 90 mg/kg ip. de amantadina respectivamente. El análisis estadístico se realizó utilizando la prueba de análisis de varianza (ANOVA) B) Se observan los mismos grupos y parámetros probados 24 h después de la infiltración intraperitoneal. No se encontraron diferencias entre grupos en ninguna de las dos pruebas (ANOVA NS)



## Resultados.

No hubo diferencias significativas entre grupos probados a la hora (Control  $6.32 \pm 0.18$ ; vehículo  $6.53 \pm 0.36$ ; amantadina 3 mg/kg  $5.88 \pm 0.41$ ; 30 mg/kg  $6.80 \pm 0.42$ ; 90 mg/kg  $5.93 \pm 0.33$ ) ni a las 24 h (Control  $6.59 \pm 0.15$ ; vehículo  $6.62 \pm 0.49$ ; amantadina 3 mg/kg  $5.99 \pm 0.25$ ; 30 mg/kg  $5.59 \pm 0.28$ ; 90 mg/kg  $5.70 \pm 0.17$ ) del inicio del proceso inflamatorio (gráficas 5 A y B), tampoco hubo diferencias al comparar la evolución de la LRN 1 h vs 24 h después del proceso inflamatorio.

### **Experimento 3.**

#### **Nocicepción Crónica**

Este experimento evaluó el efecto de la administración de amantadina ip. en el desarrollo de un proceso nociceptivo crónico evaluado mediante la conducta de autotomía.

**Animales.** Se utilizaron ratas Wistar macho con un peso de 250-350 g al momento de la cirugía. Durante el período de observación las ratas se mantuvieron en cajas individuales de acrílico transparente con ciclos normales de luz oscuridad 12x12 h, y con alimentación e hidratación *ad libitum*.

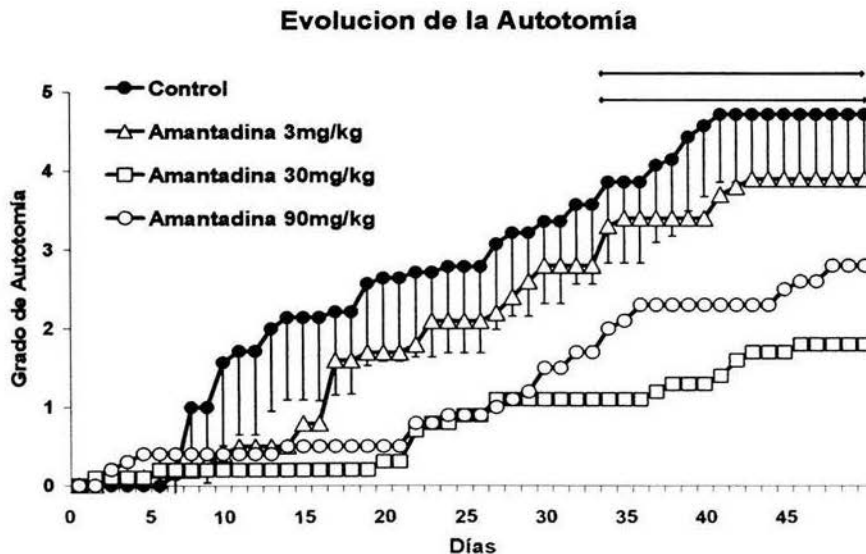
**Diseño Experimental.** Se utilizaron cuatro grupos en este experimento: vehículo (n = 14) con inducción del proceso inflamatorio 30 min previos a la denervación mas inyección única de salina 1 ml/kg inmediatamente después de la denervación; grupos amantadina (n = 10 cada uno), con la inducción del proceso inflamatorio 30 minutos antes de la inyección de amantadina 3, 30 y 90 mg/kg respectivamente, inmediatamente después de la denervación.

**Proceso Inflamatorio.** Se indujo un proceso inflamatorio 30 minutos antes de la denervación por medio de la inyección intraplantar derecha de 250 µl de CAR lambda al 1% en solución salina.

**Cirugía.** Bajo anestesia general (pentobarbital sódico 50 mg/kg), el nervio ciático derecho fue expuesto cuidadosamente. El nervio se cortó y se ligo con seda 3-0, 5 mm de la porción distal fueron removidos con el fin de evitar reinervación. La piel fue suturada con seda 3-0.

**Conducta de Autotomía.** Los grados de autotomía fueron evaluados diariamente utilizando la escala propuesta por Wall *et al* (1979). Se registró el inicio de la autotomía y el número de animales que presentaron la conducta por grupo (incidencia). El día 49 los animales fueron sacrificados con una sobredosis de pentobarbital y la denervación fue verificada.

**Análisis Estadístico.** Para el análisis de la evolución de la autotomía entre los grupos, se utilizó una prueba MANOVA. Diferencias entre el inicio de la autotomía por grupos se establecieron con la prueba de *t* Student. Para establecer diferencias entre la incidencia se utilizó la prueba exacta de Fisher. Diferencias entre tratamientos por día fueron establecidas con una prueba de *t* Student como *post hoc*. La significancia para todos los análisis estadísticos fue de  $p < 0.05$ .



**Gráfica 6.-** Respuesta nociceptiva medida a través de la conducta autotomía durante 50 días. Todos los grupos se denervaron 30 minutos después de la infiltración intraplantar de carragenina 250  $\mu$ l al 1%. El grupo control se inyectó con salina 0.9% inmediatamente después de la denervación. Grupos Amantadina con mismo procedimiento que el control pero con inyección de amantadina 3, 30 y 90mg/kg ip. Las dosis de amantadina 30 y 90 mg/kg disminuyeron significativamente el grado de autotomía (MANOVA  $p < 0.05$ ). Las diferencias significativas entre grupos por día (30 y 90 mg/kg vs. control) se establecieron mediante una T de Student ( $p < 0.05$ ) (barras horizontales).

GRUPOS	INCIDENCIA	INICIO ± E.E.	GRADO DE AUTOTOMÍA AL DÍA 50.
Vehículo	13/14 (92%)	22.7 ± 3.2	4.71
Amantadina 3mg/kg	8/10 (80%)	22.9 ± 4.5	3.9
Amantadina 30 mg/kg	4/10 ** (40%)	35.6 ± 10.4	1.8
Amantadina 90 mg/kg	5/10 * (50%)	26.9 ± 10.3	2.8

**Tabla 4.** Características de la conducta de autotomía en los grupos experimentales. La incidencia se calculó para cada grupo como el porcentaje de animales que mostraron la conducta por grupo. Las diferencias en la incidencia entre grupos se determinó por la prueba exacta de Fisher (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.005$  comparada contra el grupo control). El inicio de la autotomía se calculó con el promedio de inicio de cada grupo. El grado de autotomía fue determinado utilizando la escala de Wall *et al* (1979).

## Resultados.

La inyección única de amantadina disminuyó la conducta de autotomía en todos los grupos, con diferencias estadísticamente significativas en los grupos amantadina 30 y 90 mg/kg comparados con el vehículo (MANOVA  $p < 0.05$ ) (gráfica 6). Se obtuvieron diferencias significativas al comparar la incidencia de los grupos 30 y 90 mg/kg contra el vehículo. No se encontraron diferencias en el inicio de la autotomía) (tabla 4).

## Discusión.

En este estudio se muestra que la dosis única, intraperitoneal de amantadina (agonista dopaminérgico y antagonista NMDA), disminuye de forma dosis dependiente la respuesta conductual hiperalgésica inducida por carragenina, probada mediante termnocicepción. Con esta misma prueba sin la inducción de un proceso hiperalgésico previo, la administración de amantadina ip., no mostró efecto en la latencia de la respuesta antialgésica. Así también disminuyó la conducta nociceptiva crónica (autotomía), inducida por denervación.

Se ha utilizado a la inyección de carragenina en tejidos blandos como un modelo de dolor crónico por hiperestimulación (Albe-Fessard et al. 1990) el cual induce un proceso inflamatorio que produce hiperalgesia (Hargreaves et al. 1988). Por otro lado, se ha reportado que la activación repetitiva del receptor NMDA, mediante estímulos nociceptivos, desencadenan un proceso de "Wind Up" y sensibilización central relacionados con el desarrollo de alodinia e hiperalgesia (Dickenson 1994; Dickenson and Sullivan 1987; Eide 2000; Woolf and Thompson 1991). Los resultados muestran que un estímulo térmico nociceptivo aplicado 1 h después de la infiltración de 50  $\mu$ l de carragenina al 1% produce una disminución en la latencia del reflejo de evitación, con respecto al control y al vehículo. A este hecho es al que denominamos respuesta conductual hiperalgésica.

La administración de amantadina aumenta la latencia a la respuesta conductual hiperalgésica de manera dosis dependiente, revirtiéndola completamente en la dosis de 90mg/kg. Esto sugiere que este fármaco disminuye el proceso de hiperalgesia inducido por la carragenina.

En los experimentos en los que se evaluó la latencia al reflejo de flexión a las 24 h de la inyección de CAR no se observaron diferencias al compararse con los grupos control y vehículo. Consideramos que esto podría deberse a la cantidad de CAR infiltrada (50  $\mu$ l al 1%), la cual no representa un estímulo doloroso lo suficientemente potente para ser detectado como hiperalgesia 24 h después.

Un punto importante a documentar en este trabajo es la acción de la amantadina en una prueba de nocicepción aguda (termonocicepción) sin ningún procedimiento nocivo previo. La mayoría de la evidencia experimental relaciona al receptor NMDA con procesos de sensibilización que conllevan tiempos largos de estimulación con patrones de ritmo específico (bajas frecuencias). En sí, la génesis del dolor tónico (Haley et al. 1990; Schouenborg and Dickenson 1988; Woolf and Thompson 1991). Si bien se ha documentado la acción de antagonistas del receptor NMDA (AP5, AP7 y CPP) en pruebas de nocicepción tónica (tail flick), al parecer los resultados no son claros dado que las dosis de los antagonistas, que operan como antinociceptivos, inducen también disfunción motora (Lutfy et al. 1997). Este hecho dificulta el análisis de la antinocicepción. Por otro lado el efecto dopaminérgico a nivel del SNC se ha asociado predominantemente con antinocicepción tónica y crónica (Saadé et al. 1997).

Dado que la amantadina presenta los dos efectos farmacológicos anteriormente descritos, la posibilidad de que modifique la nocicepción aguda es baja; hecho que se comprobó con los resultados obtenidos en este experimento.

Está ampliamente documentado que la transección nerviosa en la rata produce una conducta de autotomía (Basbaum 1974; Wall et al. 1979) asociada a un proceso de nocicepción crónica (Albe-Fessard et al. 1990; Coderre et al. 1986; Kauppila and Pertovaara 1991). Se ha documentado también que un estímulo nociceptivo previo a la denervación incrementa importantemente la conducta de autotomía (Coderre and Melzack 1986). La activación de receptores y vías relacionadas con estímulos nociceptivos previo a la denervación, en una ventana temporal del orden de minutos (López-Avila et al. 1999), produce cambios centrales relacionados con procesos de sensibilización que incrementan el nivel de nocicepción o disestesia.

En este experimento utilizamos, como estímulo nociceptivo previo a la denervación, la infiltración de carragenina en la pata, con el que se obtiene un incremento de la conducta de autotomía. Este modelo nos parece adecuado para probar el efecto de la amantadina, ya que mimetiza patologías similares en el hombre, asociadas al miembro fantasma doloroso y al dolor por denervación entre otras.

Nuestros resultados muestran que dosis únicas de amantadina producen una disminución en la conducta de autotomía. Se observa que el efecto de la amantadina no presenta una respuesta dosis dependiente. Es probable que la dosis de 30 mg/kg, de este fármaco, sea una dosis cercana a la de mayor efecto sobre la conducta de autotomía ya que una dosis 3 veces mayor (90 mg/kg) no reduce dicha conducta.

## CONCLUSIÓN

La amantadina presenta dos características farmacológicas relacionadas estrechamente con la inhibición de los mecanismos de génesis del dolor patológico o neuropático, como lo muestran los resultados de este trabajo.

La primera característica, ampliamente descrita, es el bloqueo de los canales NMDA, lo cual disminuye el proceso de "Wind Up" y sensibilización central. Con relación a este hecho sugerimos que el bloqueo de los canales NMDA y su papel en la sensibilización central está determinada por una ventana temporal. Existe evidencia experimental de que la administración de antagonistas NMDA previa o inmediatamente después del inicio de un proceso nociceptivo que produce hiperalgesia es capaz de reducir de manera dosis dependiente el desarrollo de la nocicepción tónica o crónica (Davar et al. 1991; Eisenberg et al. 1994; Eisenberg et al. 1995; Mao et al. 1992; Neugebauer et al. 1993; Suzuki et al. 2001; Tseng 1998). En cambio la aplicación de antagonistas NMDA, después de haberse establecido el proceso hiperalgésico, tiene poco efecto en la disminución de la hiperalgesia y las dosis que lo revierten solo son eficaces en períodos cortos o producen efectos secundarios adversos importantes, (Bennett et al. 2000; Eisenberg et al. 1995; Herrero et al. 1994; Khandwala et al. 1997; Kristensen et al. 1992; Lutfy et al. 1997; Nikolajsen et al. 2000; Nikolajsen et al. 1996; Ren et al. 1992; Takahashi et al. 1996).



La segunda característica está dada por la acción dopaminérgica a nivel central. Se ha reportado que la administración de amantadina induce un incremento en la liberación de dopamina (DA) (Brown and Redfern 1976; Quack et al. 1995; Stromberg et al. 1970). Takahasi y cols. (Takahashi et al. 1996) reportaron que la administración de dosis únicas de amantadina (100 mg/kg ip.) incrementa la liberación de DA en el núcleo estriado, un 40% a la hora de la inyección. Así mismo, se ha reportado que este fármaco es un agonista DA (Karobath 1974; Vernier et al. 1969) e inhibidor de su recaptura (Fletcher and Redfern 1970; Heikkila and Cohen 1972).

Con estos resultados proponemos que los efectos dopaminérgicos de la amantadina en la nocicepción tónica o crónica se ejercen a través del sistema mesolímbico dopaminérgico, ya que la activación de este sistema incrementa la liberación de DA y disminuye la nocicepción (Saadé et al. 1997).

Es importante mencionar que la dosis única de amantadina (200mg iv) ha resultado ser altamente eficaz en la reducción de dolor neuropático por cicatriz quirúrgica (Pud et al. 1998) y de dolor crónico no por deaferentación neural (Eisenberg and Pud 1998) por periodos mucho mayores a la vida media del fármaco y con mínimos efectos secundarios. Hasta el momento no existe reporte de algún otro antagonista NMDA con efectos similares. Nuestros resultados muestran que la amantadina es eficaz en la reducción de la nocicepción por deaferentación, por lo cual sugerimos que pueda ser una alternativa terapéutica en el tratamiento y la prevención del dolor por deaferentación como el miembro fantasma doloroso.

## BIBLIOGRAFÍA

- Abad, F., Feria, M., Sánchez, A. and González Mora, J.L., Autotomy in rats following peripheral nerve transection is attenuated by preceding formalin injections into the same limb, *Neuroscience Letters*, 243 (1998) 125-128.
- Albe-Fessard, D., Giamberardino, M.A. and Rampin, O., Comparison of Different Animal Models of Chronic Pain. In: L. S. (Ed.), *Advances in Pain Research and Therapy*, Vol. 13, Raven Press, New York, 1990, pp. 11-27.
- Arvidsson, J., Ygge, J. and Grant, G., Cell loss in lumbar dorsal root ganglia and transganglionic degeneration after sciatic nerve resection in the rat, *Brain Research*, 373 (1986) 15-21.
- Bach, S., Noreng, M.F. and Tjellden, N.U., Phantom limb pain in amputees during the first 12 months following limb amputation, after preoperative lumbar epidural blockade, *Pain*, 33 (1988) 297-301.
- Bandler, R., Depaulis, A. and Vergnes, M., Identification of midbrain neurones mediating defensive behaviour in the rat by microinjections of excitatory amino acids., *Behavioural Brain Research*, 15 (1985) 107-19.
- Baron, R., Peripheral neuropathic pain: from mechanisms to symptoms., *Clinical Journal of Pain*, 16 (2001) S12-20.
- Basbaum, A.I., Effects of central lesions on disorders produced by multiple dorsal rhizotomy in rats., *Experimental Neurology*, 42 (1974) 490-501.
- Bennett, A.D., Everhart, A.W. and Hulsebosch, C.E., Intrathecal administration of an NMDA or a non-NMDA receptor antagonist reduces mechanical but not thermal allodynia in a rodent model of chronic central pain after spinal cord injury., *Brain Research*, 859 (2000) 72-82.
- Bennett, G.F., Neuropathic pain. In: P. Wall and R. Melzack (Eds.), *Textbook of pain*, Churchill Livingstone, Edinburgh, 1994, pp. 201-224.
- Black, R.G., A laboratory model for trigeminal neuralgia. In: B. J.J. (Ed.), *Advances in neurology*, Vol. 4, Raven Press, New York, 1974, pp. 651-658.
- Bonica, J.J. and Loeser, J.D., History of pain concepts and therapies. In: J.D. Loeser (Ed.), *Bonica's Management of pain*, Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, 2001, pp. 2178.
- Brown, F. and Redfern, P.H., Studies on the mechanism of action of amantadine., *B. J. Pharmacology*, 58 (1976) 561-7.
- Casey, K., Minoshima, S., Berger, K., Koeppe, R., Morrow, T. and Frey, K., Positron emission tomographic analysis of cerebral structures activated specifically by repetitive noxious heat stimuli, *Journal of Neurophysiology*, 71 (1994) 802-807.
- Casey, K.L., Forebrain mechanisms of nociception and pain: analysis through imaging., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96 (1999) 7668-74.
- Castro\_Lopes, J.M., Coimbra, A., Grant, G. and Arvidsson, J., Ultrastructural changes of the central scalloped (C1) primary afferent endings of synaptic glomeruli in the substantia gelatinosa Rolandi of the rat after peripheral neurotomy., *Journal of Neurocytology*, 19 (1990) 329-37.

- Cervero, F. and Laird, J.M., From acute to chronic pain: mechanisms and hypotheses. In: G. Carli and M. Zimmermann (Eds.), *Towards the neurobiology of chronic pain*, Vol. 110, Elsevier Science B.V., Amsterdam, 1999, pp. 3-16.
- Cervero, F. and Laird, J.M.A., One pain or many pains? A new look at pain mechanisms, *News In Physiological Sciences*, 6 (1991) 268-273.
- Chapman, C.R., Limbic processes and the affective dimension of pain, *Progress in Brain Research*, 110 (1996) 63-81.
- Cline, M.A., Ochoa, J. and Torebjork, H.E., Chronic hyperalgesia and skin warming caused by sensitized C nociceptors., *Brain*, 112 ( Pt 3) (1989) 621-47.
- Coderre, T.J., Grimes, R.W. and Melzack, R., Deafferentation and chronic pain in animals: an evaluation of evidence suggesting autotomy is related to pain, *Pain*, 26 (1986) 61-84.
- Coderre, T.J. and Melzack, R., Procedures which increase acute pain sensitivity also increase autotomy, *Experimental Neurology*, 92 (1986) 713-22.
- Coghill, R.C., Talbot, J.D., Evans, A.C., Meyer, E., Gjedde, A., Bushnell, M.C. and Duncan, G.H., Distributed processing of pain and vibration by the human brain, *Journal of Neuroscience*, 14 (1994) 4095-108.
- Colpaert, F., Meert, T., De Witte, P. and Schmitt, P., Further evidence validating adjuvant arthritis as an experimental model of chronic pain in the rat. *Life Science*, 31 (1982) 67-75.
- Damasio, A.R., *El error de descartes. La razon de las emociones*, Santiago de Chile, 1994, 335 pp.
- Davar, G., Hama, A., Deykin, A., Vos, B. and Maciewicz, R., MK-801 blocks the development of thermal hyperalgesia in a rat model of experimental painful neuropathy., *Brain Research*, 553 (1991) 327-30.
- Davies, S.N. and Lodge, D., Evidence for involvement of N-methylaspartate receptors in 'wind-up' of class 2 neurones in the dorsal horn of the rat., *Brain Research*, 424 (1987) 402-6.
- Depaulis, A., Bandler, R. and Vergnes, M., Characterization of pretentorial periaqueductal gray matter neurons mediating intraspecific defensive behaviors in the rat by microinjections of kainic acid., *Brain Research*, 486 (1989) 121-32.
- Devor, M. and Raber, P., Autotomy after nerve injury and its relation to spontaneous discharge originating in nerve-end neuromas, *Behavioral Neural Biology*, 37 (1983) 276-83.
- Diaz-Reval, M.I., Ventura-Martinez, R., Hernandez-Delgadillo, G.P., Dominguez-Ramirez, A.M. and Lopez-Muñoz, F.J., Effect of caffeine on antinociceptive action of ketoprofen in rats., *Archives of Medical Research*, 32 (2001) 13-20.
- Dickenson, A., A mechanism of central hypersensitivity. In: A. Dickenson and J.M. Besson (Eds.), *The pharmacology of pain*, Springer Verlag, Berlin, 1997, pp. 167-210.
- Dickenson, A.H., NMDA Receptor Antagonists as Analgesics. In: H.L. Fields and J.C. Liebeskind (Eds.), *Pharmacological Approaches to the Treatment of Chronic Pain: New Concepts and Critical Issues*, Vol. 1, IASP Press, Seattle, 1994, pp. 173-187.
- Dickenson, A.H. and Sullivan, A.F., Evidence for a role of the NMDA receptor in the frequency dependent potentiation of deep rat dorsal horn nociceptive neurones following C fibre stimulation., *Neuropharmacology*, 26 (1987) 1235-8.

- Dougherty, P.M. and Lenz, F.A., Plasticity of the somatosensory system following neural injury. In: J. Boivie, P. Hansson and U. Lindblom (Eds.), *Touch, temperature and pain in health and disease*, IASP Press, Seattle, 1994, pp. 439-460.
- Dubuisson, D. and Dennis, S.G., The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats., *Pain*, 4 (1977) 161-74.
- Dyken, P.R., Hyperpathic disorder from intrathecal alumina gel injection, *Archives Neurology*, 11 (1965) 521-528.
- Eide, P.K., Clinical Trials of NMDA-Receptor Antagonists as Analgesics. In: M. Devor, M.C. Rowbotham and Z. Weisenfeld-Hallin (Eds.), *Proceedings of the 9th World Congress on Pain.*, Vol. 16, IASP Press, Seattle, 2000, pp. 817-832.
- Eide, P.K., Wind-up and the NMDA receptor complex from a clinical perspective., *European Journal of Pain*, 4 (2000) 5-17.
- Eisenberg, E., LaCross, S. and Strassman, A.M., The effects of the clinically tested NMDA receptor antagonist memantine on carrageenan-induced thermal hyperalgesia in rats., *European Journal of Pharmacology*, 255 (1994) 123-9.
- Eisenberg, E., LaCross, S. and Strassman, A.M., The clinically tested N-methyl-D-aspartate receptor antagonist memantine blocks and reverses thermal hyperalgesia in a rat model of painful mononeuropathy., *Neuroscience Letters*, 187 (1995) 17-20.
- Eisenberg, E. and Pud, D., Can patients with chronic neuropathic pain be cured by acute administration of the NMDA receptor antagonist amantadine?, *Pain*, 74 (1998) 337-9.
- Ertas, M., Sagduyu, A., Arac, N., Uludag, B. and Ertekin, C., Use of levodopa to relieve pain from painful symmetrical diabetic polyneuropathy, *Pain*, 75 (1998) 257-9.
- Fields, H.L., Rowbotham, M. and Baron, R., Postherpetic neuralgia: irritable nociceptors and deafferentation., *Neurobiology of Disease*, 5 (1998) 209-27.
- Fletcher, E.A. and Redfern, P.H., The effect of amantadine on the uptake of dopamine and noradrenaline by rat brain homogenates, *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 22 (1970) 957-9.
- Franklin, K.B., Analgesia and the neural substrate of reward, *Neuroscience Biobehavioral Review*, 13 (1989) 149-54.
- Gordon, I., Weizman, R. and Rehavi, M., Modulatory effect of agents active in the presynaptic dopaminergic system on the striatal dopamine transporter, *European Journal of Pharmacology*, 298 (1996) 27-30.
- Haley, J.E., Sullivan, A.F. and Dickenson, A.H., Evidence for spinal N-methyl-D-aspartate receptor involvement in prolonged chemical nociception in the rat., *Brain Research*, 518 (1990) 218-26.
- Hargreaves, K., Dubner, R., Brown, F., Flores, C. and Joris, J., A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia., *Pain*, 32 (1988) 77-88.
- Heikkila, R.E. and Cohen, G., Evaluation of amantadine as a releasing agent or uptake blocker for H 3 -dopamine in rat brain slices., *European Journal of Pharmacology*, 20 (1972) 156-60.
- Herrero, J.F., Headley, P.M. and Parsons, C.G., Memantine selectively depresses NMDA receptor-mediated responses of ratspinal neurones in vivo., *Neuroscience Letters*, 165 (1994) 37-40.

- Jensen, T.S., B., K., J., N. and P., R., Immediate and long-term phantom limb pain in amputees: incidence, clinical characteristics and relationship to pre-amputation limb pain, *Pain*, 21 (1985) 267-78.
- Kangrga, I. and Randic, M., Tachykinins and calcitonin gene-related peptide enhance release of endogenous glutamate and aspartate from the rat spinal dorsal horn slice., *Journal of Neuroscience*, 10 (1990) 2026-38.
- Karobath, M.E., Amantadine and D-145, an amantadine derivative, do not effect dopamine sensitive adenylate cyclase from the caudate-putamen of the rat brain., *European Journal of Pharmacology*, 28 (1974) 376-8.
- Katz, J. and Melzack, R., Pain 'memories' in phantom limbs: review and clinical observations, *Pain*, 43 (1990) 319-36.
- Katz, J., Vaccarino, A.L., Coderre, T.J. and Melzack, R., Injury prior to neurectomy alters the pattern of autotomy in rats. Behavioral evidence of central neural plasticity., *Anesthesiology*, 75 (1991) 876-83.
- Kauppila, T. and Pertovaara, A., Effects of different sensory and behavioral manipulations on autotomy caused by a sciatic lesion in rats, *Experimental Neurology*, 111 (1991) 128-30.
- Khandwala, H., Hodge, E. and Loomis, C.W., Comparable dose-dependent inhibition of AP-7 sensitive strychnine-induced allodynia and paw pinch-induced nociception by mexiletine in the rat., *Pain*, 72 (1997) 299-308.
- Kornhuber, J., Bomann, J., Hubers, M., Rusche, K. and Riederer, P., Effects of the 1-amino-adamantanes at the MK-801-binding site of the NMDA-receptor-gated ion channel: a human postmortem brain study., *European Journal of Pharmacology*, 206 (1991) 297-300.
- Kornhuber, J., Quack, G., Danysz, W., Jellinger, K., Danielczyk, W., Gsell, W. and Riederer, P., Therapeutic brain concentration of the NMDA receptor antagonist amantadine, *Neuropharmacology*, 34 (1995) 713-21.
- Kristensen, J.D., Svensson, B. and Gordh, T., The NMDA-receptor antagonist CPP abolishes neurogenic 'wind-up pain' after intrathecal administration in humans., *Pain*, 51 (1992) 249-53.
- Kryzhanovsky, G.N., Igonkina, S.I., Grafova, V.N. and Danelova, E.I., Experimental trigeminal neuralgia; on the conception of the generator mechanism of the pain syndrome, *Byull Eksp Biol Med*, 78 (1974) 16-26.
- LaMotte, R.H., Shain, C.N., Simone, D.A. and Tsai, E.F., Neurogenic hyperalgesia: psychophysical studies of underlying mechanisms., *Journal of Neurophysiology*, 66 (1991) 190-211.
- Le Bars, D., Dickenson, A.H., Besson, J.M. and Villanueva, F., Aspects of sensory processing through convergent neurons. In: T.L. Yaksh (Ed.), *Spinal afferent processing*, Plenum Press, New York, 1986, pp. 467-504.
- Levitt, M., Dysesthesias and self-mutilation in humans and subhumans: a review of clinical and experimental studies, *Brain Research*, 357 (1985) 247-90.
- Levitt, M. and Levitt, J.H., The deafferentation syndrome in monkeys: dysesthesias of spinal origin., *Pain*, 10 (1981) 129-47.

- Lombard, M., Nashold, B.J., Albe-Fessard, D., Salman, N. and Sakr, C., Deafferentation hypersensitivity in the rat after dorsal rhizotomy: a possible animal model of chronic pain, *Pain*, 6 (1979) 163-174.
- López-Avila, A., Sotres-Bayón, F., Pellicer, F. and Del Angel, R., Time Span Between Nociceptive Stimulus and Denervation Modifies Autotomy Behavior in the Rat., *Analgesia*, 4 (1999) 475-478.
- López-Avila, A., Rodríguez-Manzo, G., Coffeen, U., del Angel, R. and Pellicer, F., Self-injury behaviour induced by intraplantar carrageenan infiltration: a model of tonic nociception., *Brain Research. Brain Research Protocols*, 13 (2004) 37-44.
- Lutfy, K., Cai, S.X., Woodward, R.M. and Weber, E., Antinociceptive effects of NMDA and non-NMDA receptor antagonists in the tail flick test in mice., *Pain*, 70 (1997) 31-40.
- Lyerly, M.A., Rossitch E, J.r., Ovelmen-Levitt, J. and Nashold BS, J.r., The deafferentation syndrome in the rat: effects of intraventricular apomorphine, *Experimental Neurology*, 100 (1988) 188-202.
- Mailis, A., Compulsive targeted self-injurious behaviour in humans with neuropathic pain: a counterpart of animal autotomy? Four case reports and literature review., *Pain*, 64 (1996) 569-78.
- Mao, J., Price, D.D., Mayer, D.J., Lu, J. and Hayes, R.L., Intrathecal MK-801 and local nerve anesthesia synergistically reduce nociceptive behaviors in rats with experimental peripheral mononeuropathy., *Brain Research*, 576 (1992) 254-62.
- Melzack, R., Phantom limbs and the concept of a neuromatrix, *Trends in Neuroscience*, 13 (1990) 88-92.
- Melzack, R., The Tragedy of Needless Pain, *Scientific American*, 262 (1990) 19-25.
- Melzack, R. and Wall, P.D., Pain mechanisms: a new theory. *Science*, 150 (1965) 971-979.
- Melzack, R. and Wall, P.D., The challenge of pain, Penguin books, London, 1996, 339 pp.
- Merskey, H. and Bogduk, N., Classification of chronic pain: description of chronic pain syndromes and definitions of pain terms, IASP Press, Seattle, 1990, pp. 210.
- Monhemius, R., Azami, J., Green, D.L. and Roberts, M.H., CB1 receptor mediated analgesia from the Nucleus Reticularis Gigantocellularis pars alpha is activated in an animal model of neuropathic pain., *Brain Research*, 908 (2001) 67-74.
- Morgan, M.J. and Franklin, K.B., Dopamine receptor subtypes and formalin test analgesia, *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 40 (1991) 317-22.
- Neugebauer, V., Kornhuber, J., Lucke, T. and Schaible, H.G., The clinically available NMDA receptor antagonist memantine is antinociceptive on rat spinal neurones., *Neuroreport*, 4 (1993) 1259-62.
- Nikolajsen, L., Gottrup, H., Kristensen, A.G. and Jensen, T.S., Memantine (a N-methyl-D-aspartate receptor antagonist) in the treatment of neuropathic pain after amputation or surgery: a randomized, double-blinded, cross-over study., *Anesthesia and Analgesia*, 91 (2000) 960-6.
- Nikolajsen, L., Hansen, C.L., Nielsen, J., Keller, J., Arendt-Nielsen, L. and Jensen, T.S., The effect of ketamine on phantom pain: a central neuropathic disorder maintained by peripheral input., *Pain*, 67 (1996) 69-77.
- Nikolajsen, L., Ilkjær, S., Krøner, K., Christensen, J.H. and Jensen, T.S., The influence of preamputation pain on postamputation stump and phantom pain, *Pain*, 72 (1997) 393-405.
- Paalzow, G.H., L-dopa induces opposing effects on pain in intact rats: (-)-sulpiride, SCH 23390 or alpha-methyl-DL-p-tyrosine methylester hydrochloride reveals profound hyperalgesia in large

- antinociceptive doses, *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 263 (1992) 470-9.
- Pellicer, F., Lopez-Avila, A. and Torres-Lopez, E., Electrical stimulation of the cingulum bundle precipitates onset of autotomy induced by inflammation in rat, *Eur J of Pain*, 3 (1999) 287-293.
- Price, D.D., Hull, C.D. and Buchwald, N.A., Intracellular responses of dorsal horn cells to cutaneous and sural nerve A and C fiber stimuli., *Experimental Neurology*, 33 (1971) 291-309.
- Procacci, P. and Maresca, M., *Autotomy*, *Pain*, 43 (1990) 394.
- Pud, D., Eisenberg, E., Spitzer, A., Adler, R., Fried, G. and Yamitsky, D., The NMDA receptor antagonist amantadine reduces surgical neuropathic pain in cancer patients: a double blind, randomized, placebo controlled trial., *Pain*, 75 (1998) 349-54.
- Qian, Y., Chao, D.S., Santillano, D.R., Cornwell, T.L., Nairn, A.C., Greengard, P., Lincoln, T.M. and Brecht, D.S., cGMP-dependent protein kinase in dorsal root ganglion: relationship with nitric oxide synthase and nociceptive neurons., *Journal of Neuroscience*, 16 (1996) 3130-8.
- Quack, G., Hesselink, M., Danysz, W. and Spanagel, R., Microdialysis studies with amantadine and memantine on pharmacokinetics and effects on dopamine turnover., *Journal of Neural Transmission. Supplementum*, 46 (1995) 97-105.
- Rabin, A.G. and Anderson, E.G., Autotomy following limb denervation: effects of previous exposure to neurectomy., *Pain*, 21 (1985) 105-15.
- Rainville, P., Duncan, G.H., Price, D.D., Carrier, B. and Bushnell, M.C., Pain affect encoded in human anterior cingulate but not somatosensory cortex, *Science*, 277 (1997) 968-71.
- Rainville, P., Feine, J.S., Bushnell, M.C. and Duncan, G.H., A psychophysical comparison of sensory and affective responses to four modalities of experimental pain, *Somatosensory and Motor Research*, 9 (1992) 265-77.
- Raja, S.N., Campbell, J.N. and Meyer, R.A., Evidence for different mechanisms of primary and secondary hyperalgesia following heat injury to the glabrous skin., *Brain*, 107 ( Pt 4) (1984) 1179-88.
- Ren, K., Williams, G.M., Hylden, J.L., Ruda, M.A. and Dubner, R., The intrathecal administration of excitatory amino acid receptor antagonists selectively attenuated carrageenan-induced behavioral hyperalgesia in rats., *European Journal of Pharmacology*, 219 (1992) 235-43.
- Rey, R., *The history of pain*, The history of pain, Harvard University Press, London, 1995, pp. 394.
- Ruda, M.A., Opiates and pain pathways: demonstration of enkephalin synapses on dorsal horn projection neurons, *Science*, 215 (1982) 1523-5.
- Saadé, N.E., Atweh, S.F., Bahuth, N.B. and Jabbur, S.J., Augmentation of nociceptive reflexes and chronic deafferentation pain by chemical lesions of either dopaminergic terminals or midbrain dopaminergic neurons, *Brain Research*, 751 (1997) 1-12.
- Saade, N.E., Ibrahim, M.Z., Atweh, S.F. and Jabbur, S.J., Explosive autotomy induced by simultaneous dorsal column lesion and limb denervation: a possible model for acute deafferentation pain., *Experimental Neurology*, 119 (1993) 272-9.



- Schouenborg, J. and Dickenson, A., Long-lasting neuronal activity in rat dorsal horn evoked by impulses in cutaneous C fibres during noxious mechanical stimulation., *Brain Research*, 439 (1988) 56-63.
- Seltzer, Z., Beilin, B., Ginzburg, R., Paran, Y. and Shimko, T., The role of injury discharge in the induction of neuropathic pain behavior in rats, *Pain*, 46 (1991) 327-36.
- Sikes, R.W. and Vogt, B.A., Nociceptive neurons in area 24 of rabbit cingulate cortex., *Journal of Neurophysiology*, 68 (1992) 1720-32.
- Skilling, S.R., Smullin, D.H., Beitz, A.J. and Larson, A.A., Extracellular amino acid concentrations in the dorsal spinal cord of freely moving rats following veratridine and nociceptive stimulation., *Journal of Neurochemistry*, 51 (1988) 127-32.
- Sotres-Bayon, F., Lopez-Avila, A., Torres-Lopez, E., del Angel, R. and Pellicer, F., Dopamine microinjection into the anterior cingulate cortex and ventral tegmental area electrical stimulation delays persistent nociceptive behavior onset in the rat., *Enviado para su publicación a Brain Research* (2001).
- Sotres-Bayon, F., Torres-Lopez, E., Lopez-Avila, A., del Angel, R. and Pellicer, F., Lesion and electrical stimulation of the ventral tegmental area modify persistent nociceptive behavior in the rat., *Brain Research*, 898 (2001) 342-9.
- Stone, T.W., Responses of neurones in the cerebral cortex and caudate nucleus to amantadine, amphetamine and dopamine., *British Journal of Pharmacology*, 56 (1976) 101-10.
- Stromberg, U., Svensson, T.H. and Waldeck, B., On the mode of action of amantadine., *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 22 (1970) 959-62.
- Suzuki, R., Matthews, E.A. and Dickenson, A.H., Comparison of the effects of MK-801, ketamine and memantine on responses of spinal dorsal horn neurones in a rat model of mononeuropathy, *Pain*, 91 (2001) 101-109.
- Takahashi, T., Yamashita, H., Zhang, Y.X. and Nakamura, S., Inhibitory effect of MK-801 on amantadine-induced dopamine release in the rat striatum, *Brain Research Bulletin*, 41 (1996) 363-7.
- Tarkka, I.M. and Treede, R.D., Equivalent electrical source analysis of pain-related somatosensory evoked potentials elicited by a CO2 laser., *Journal of Clinical Neurophysiology*, 10 (1993) 513-9.
- Terayama, R., Guan, Y., Dubner, R. and Ren, K., Activity-induced plasticity in brain stem pain modulatory circuitry after inflammation., *Neuroreport*, 11 (2000) 1915-9.
- Torebjork, H.E., Lundberg, L.E. and LaMotte, R.H., Central changes in processing of mechanoreceptive input in capsaicin-induced secondary hyperalgesia in humans. *Journal of Physiology*, 448 (1992) 765-80.
- Treede, R.-D., Kenshalo, D.R., Gracely, R.H. and Jones, A.K.P., The cortical representation of pain, *Pain*, 79 (1999) 105-111.
- Tseng, S.H., Suppression of autotomy by N-methyl-D-aspartate receptor antagonist (MK-801) in the rat., *Neuroscience Letters*, 240 (1998) 17-20.
- Tu, W., A religio-physiological perspective on pain. In: H.W. Kosterlitz and L.V. Tenerius (Eds.), *Pain and Society*, Verlag Chemie, Berlin, 1980, pp. 3-12.



- Tuor, U.I., Maliszka, K., Foniok, T., Papadimitropoulos, R., Jarmasz, M., Somorjai, R. and Kozlowski, P., Functional magnetic resonance imaging in rats subjected to intense electrical and noxious chemical stimulation of the forepaw., *Pain*, 87 (2000) 315-24.
- Vaccarino, A.L. and Melzack, R., Analgesia produced by injection of lidocaine into the anterior cingulum bundle of the rat, *Pain*, 39 (1989) 213-9.
- Vaccarino, A.L. and Melzack, R., Temporal processes of formalin pain: differential role of the cingulum bundle, fornix pathway and medial bulboreticular formation., *Pain*, 49 (1992) 257-71.
- Vernier, V.G., Harmon, J.B., Stump, J.M., Lynes, T.E., Marvel, J.P. and Smith, D.H., The toxicologic and pharmacologic properties of amantadine hydrochloride., *Toxicology and Applied Pharmacology*, 15 (1969) 642-65.
- Vierck, C.J., Siddall, P. and Yeziarski, R.P., Pain following spinal cord injury: animal models and mechanistic studies., *Pain*, 89 (2000) 1-5.
- Viesca, T., *Medicina prehispánica de México*, México D.F., 1998.
- Villanueva, L., Chitour, D. and Le Bars, D., Involvement of the dorsolateral funiculus in the descending spinal projections responsible for diffuse noxious inhibitory controls in the rat, *Journal of neurophysiology*, 56 (1986) 1185-1193.
- Villanueva, L. and Nathan, P.W., Multiple pain pathways. In: M. Devor, M.C. Rowbotham and Z. Wiesenfeld-Hallin (Eds.), *Proceedings of the 9th world congress on pain*, Vol. 16, IASP press, Seattle, 2000, pp. 371-386.
- Wall, P.D., Devor, M., Inbal, R., Scadding, J.W., Schonfeld, D., Seltzer, Z. and Tomkiewicz, M.M., Autotomy following peripheral nerve lesions: experimental anaesthesia dolorosa., *Pain*, 7 (1979) 103-11.
- Willis, W.D., Sluka, K.A., Rees, H. and Westlund, K.N., Cooperative mechanisms of neurotransmitter action in central nervous sensitization., *Progress in Brain Research*, 110 (1996) 151-66.
- Woolf, C., The dorsal horn: state-dependent sensory processing and the generation of pain. In: P. Wall and R. Melzack (Eds.), *Textbook of pain*, IASP press, Seattle, 1994, pp. 101-112.
- Woolf, C.J., Windup and central sensitization are not equivalent., *Pain*, 66 (1996) 105-8.
- Woolf, C.J. and Thompson, S.W., The induction and maintenance of central sensitization is dependent on N-methyl-D-aspartic acid receptor activation; implications for the treatment of post-injury pain hypersensitivity states., *Pain*, 44 (1991) 293-9.
- Wu, H., Hung, K., Ohsawa, M., Mizoguchi, H. and Tseng, L.F., Antisera against endogenous opioids increase the nocifensive response to formalin: demonstration of inhibitory beta-endorphinergic control., *European Journal of Pharmacology*, 421 (2001) 39-43.
- Yaksh, T.L., Inhibition by etorphine of the discharge of dorsal horn neurons: effects on the neuronal response to both high- and low-threshold sensory input in the decerebrate spinal cat, *Experimental Neurology*, 60 (1978) 23-40.
- Zimmermann, M., Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals., *Pain*, 16 (1983) 109-10.
- Zimmermann, M., Pathobiology of neuropathic pain, *European Journal of Pharmacology*, 429 (2001) 23- 37.

## ANEXOS

- López-Avila A., Sotres Bayón F., del Ángel R., Pellicer F. Time span between nociceptive stimulus and denervation modifies autotomy behavior in rat. *Analgesia*. 4: 475-478, 1999.

- López-Avila A., Rodríguez-Manzo G., Coffeen U., del Ángel R., Pellicer F. Self-injury behaviour induced by intraplantar carrageenan infiltration: a model of tonic nociception. *Brain Research Protocols*. 13:1: 37-44, 2004.

- López-Avila A., Coffeen U., Ortega-Legaspi JM., del Angel R., Pellicer F. Dopamine and NMDA systems modulate long-term nociception in the rat anterior cingulate cortex. *Pain*. 111: 136-143, 2004.

## Time Span Between Nociceptive Stimulus and Denervation Modifies Autotomy Behavior in the Rat<sup>1</sup>

ALBERTO LÓPEZ-AVILA,\*† FRANCISCO SOTRES-BAYÓN,\* ROSENDO DEL ANGEL,\*  
AND FRANCISCO PELLICER\*

\*Departamento de Neurofisiología, División de Neurociencias, Instituto Mexicano de Psiquiatría, México D.F.

†Facultad Mexicana de Medicina, Universidad La Salle, México D.F.

Submitted: December 10, 1999

Final revision: February 2, 2000

Accepted: February 8, 2000

Thermal nociceptive stimulus prior to denervation increases the intensity of autotomy behavior. However, experimental evidence provided by formalin infiltration as a chemonociceptive stimulus previous to denervation shows contradictory results in autotomy behavior. Based on this framework, we explored the effect of a peripheral nociceptive inflammatory process [carrageenan (CAR) 250  $\mu$ l at 1%, intraplantar] induced 30 min (CAR 30) or 24 h (CAR 24) before denervation, on the development of autotomy behavior. Male adult Wistar rats were used. The control group (CON) was only denervated. The results showed a significant enhancement of autotomy score in the CAR 30 group and a decreased autotomy score in the CAR 24 group when compared with the CON group. These results show that the time span between a noxious stimulation and denervation is an important factor in determining the intensity of autotomy.

Autotomy    Denervation    Inflammation    Nociception    Carrageenan    Rat

### Introduction

It has been reported that sensory nociceptive activity previous to peripheral deafferentation conditions somatosensory states, particularly painful ones. Clinical evidence shows that the referred pain after amputation (phantom limb pain) exhibits topological and sensory characteristics similar to the pain experienced previous to amputation. The timing, localization, and type of pain previous to amputation seem to play an important role in the development of phantom limb pain (9,12).

The term "anesthesia dolorosa" (18) has been related to an unpleasant perceptual state named disesthesia (11). Anesthesia dolorosa can be produced by a peripheral neural denervation, which triggers autotomy behavior in animals. This procedure is considered as an animal model of phantom limb pain (18). Several explanations have been proposed for the development of autotomy behavior, such as the presence of spontaneous activity and a peripheral neuronal hyperactivity state produced by neurectomy (4,18). This abnormal activity has also been related with the reor-

ganization of neurectomized axons and the creation of neuroma (5). Autotomy behavior can be observed in men with central or peripheral neuropathic pain (12,15), although it has also been reported without pain in humans (17).

Experimental evidence (6) has shown that the application of a thermonociceptive stimulus 30 min prior to denervation increases the intensity of autotomy. It also has been reported that infiltration of formalin, as a chemonociceptive stimuli prior to denervation, shortens the onset of autotomy behavior (7). By contrast, Abad et al. (1) found that formalin infiltration, as a nociceptive event (60 min, 1, 3, 7, and 14 days prior to denervation), diminishes autotomy behavior. With this framework we were interested in exploring the role played by the time span between a chemonociceptive stimulus and denervation in relation to autotomy behavior. With this aim, a painful stimulus was applied either 24 h or 30 min prior to denervation.

### Methods

For this study we used a model of neuronal hyperexcitability (2) consisting of the intraplantar infiltration of carrageenan (CAR)

Address correspondence and reprint requests to Francisco Pellicer, Instituto Mexicano de Psiquiatría, Camino a Xochimilco 101, San Lorenzo Huipulco, Tlalpan, México D.F., CP 14370. Fax: +655 99 80; E-mail: pellicer@neuroserver.imp-neuro.edu.mx

<sup>1</sup>A preliminary report of the data was presented at the Annual Meeting for Neuroscience, Miami Beach, 1999.

as a chemociceptive stimulus prior to ipsilateral denervation of the infiltrated limb.

The experiment was carried out in accordance to the regulations of the Ethics Committee of the International Association for the Study of Pain (IASP) (19), and was approved by the Project's Commission at the Instituto Mexicano de Psiquiatría.

The experiments were carried out in male Wistar rats, weighing 250–300 g. The animals were housed in individual cages, under normal light–dark cycles 12/12 h, with water and food ad libitum. The inflammatory process was induced by subcutaneous infiltration of the sole of the right hindpaw with CAR lambda (250  $\mu$ l, at 1% in saline solution) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO).

Under pentobarbital anesthesia (60 mg/kg, IP) the sciatic nerve was exposed and transected; the proximal end of the nerve was ligated with 3-0 silk, and a 5-mm portion of the distal nerve was removed to prevent reinnervation. The groups were: control (CON) ( $n = 20$ ), only denervated; CAR 30 ( $n = 12$ ), in which an inflammatory process was induced 30 min prior to denervation; and CAR 24 ( $n = 10$ ), in which an inflammatory process was induced 24 h prior to denervation. Daily autotomy scores were computed for 50 days, using a scale devised by Wall et al. (18). We also recorded the autotomy onset time and the number of animals that presented autotomy behavior by group (incidence). On day

50, animals were sacrificed by an overdose of pentobarbital anesthesia and denervation was verified.

In order to analyze the autotomy score between groups we used MANOVA. Differences between treatments per day were established by a Student's *t*-test ( $p < 0.05$ ). Differences in the onset of autotomy between groups were established by a Fisher's exact probability test ( $p < 0.05$ ).

## Results

Our results showed a significant enhancement of autotomy score in the CAR 30 group and a decrease in autotomy score in the CAR 24 group when compared with the CON group (Fig. 1). On day 50, the maximum score for each group was: CAR 30, 7.17; CAR 24, 1.60; and CON, 4.05. Significant differences in incidence were found between CAR 30 and CAR 24 (Table 1).

## Discussion

Clinical evidence has shown that the nociceptive state prior to denervation influences the genesis of phantom limb pain (3,8,9,14). It has also been demonstrated that thermo-

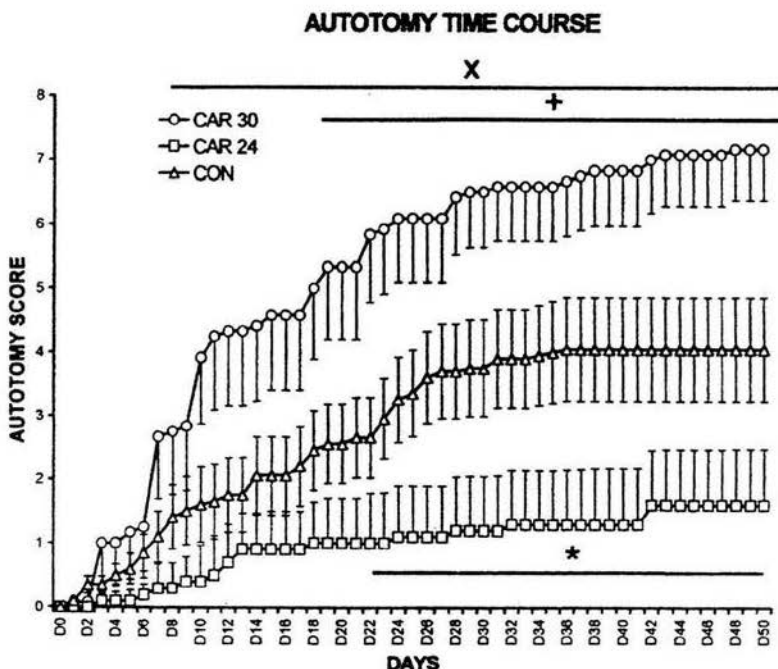


Figure 1. The temporal course of autotomy during 50 days. Control group (CON), only denervated; CAR 30 group, denervated 30 min after the infiltration with CAR; and CAR 24 denervated 24 h after the infiltration of CAR. We used a MANOVA to establish the differences of autotomy score between groups. There were significant differences between groups per day, established by a Student's *t*-test ( $p < 0.05$ ) (horizontal bars). The different comparisons are indicated by symbols: CON vs. CAR 30 (+); CON vs. CAR 24 (\*), and CAR 30 vs. CAR 24 (X).

**Table 1**  
Autotomy Behavior

Group	Incidence	Onset Day $\pm$ SEM	Autotomy Score at Day 50
CON	13/20 (65%)	6.71 $\pm$ 1.73	4.05
CAR 24	5/10 (50%)	9.6 $\pm$ 2.48	1.60
CAR 30	11/12 (91%)	9.8 $\pm$ 2.22	7.17

The incidence was calculated for each group as the percentage of the number of animals that displayed the autotomy behavior, divided by the number of animals that did not show it. A Fisher's exact probability test was used to determine the statistical differences on incidence between groups. The onset was calculated as the mean day, for each group, in which the autotomy initiated. Autotomy score was carried out using a scale devised by Wall et al. (18).

nociceptive (6), chemonociceptive (7), and peripheral electrical nociceptive stimuli (16), applied 30 min prior to denervation, increase autotomy behavior. Recent experimental data, together with the results reported in this work, show that chemonociceptive stimuli applied 24 h prior to denervation diminish autotomy behavior. Abad et al. (1) have reported that the infiltration of formalin 24 h and 3, 7, and 14 days before denervation diminishes autotomy; nevertheless, in the same study animals injected 30 and 60 min prior to denervation did not show autotomy score changes compared to the control group.

In the present work we observed that the intensity of autotomy behavior is determined by the time span that elapses between nociceptive stimulation and denervation. Injection of CAR 30 min prior to denervation causes a significant increase in autotomy behavior. By contrast, the injection of CAR 24 h prior to denervation causes a significant decrease in autotomy.

The results suggest that different mechanisms underlie the somatosensory algesic processes observed. These mechanisms depend on the time span elapsing between application of the painful stimulation and neurectomy. Thus, for the case of a "short period" (30 min), we propose that an additive somatosensory algesic phenomenon enhances the autotomy behavior. This supports the "pain memory" theory established by Katz and Melzack (9), which proposes that pain states before denervation will condition the pain states after denervation. On the other hand, the results obtained when the painful stimulation was applied 24 h before denervation suggest the activation of an inhibitory phenomenon such as the one proposed by Le Bars et al. (10), in which a nociceptive stimulus is capable of diminishing another painful stimulus by the activation of the diffuse noxious inhibitory control (DNIC).

Further experiments should be done in order to clarify the relationship between carrageenan infiltration prior to denervation and the DNIC phenomena.

## Acknowledgments

A.L.-A. was supported by a CONACyT scholarship, and by DGEP, UNAM. F.S.-B. was supported by a CONACyT scholarship. This work was partially supported by CONACyT grant number 28696M and IMP grant 3230 to F.P.

## References

- Abad, F.; Feria, M.; Sánchez, A.; González, J. Autotomy in rats following peripheral nerve transection is attenuated by preceding formalin injections into the same limb. *Neurosci. Lett.* 243:125-128; 1998.
- Albe-Fessard, D.; Giambardino, M. A.; Rampin, O. Comparison of different animal models of chronic pain. In: Lipton, S.; Tunks, E.; Zoppi, M., eds. *Advances in pain research and therapy*. New York: Raven Press; 1992:11-27.
- Bach, S.; Noreng, M. F.; Tjelliden, N. U. Phantom limb pain in amputees during the first 12 months following limb amputation, after preoperative lumbar epidural blockade. *Pain* 33:297-301; 1988.
- Basbaum, A. I. Effects of central lesions on disorders produced by multiple dorsal rhizotomy in rats. *Exp. Neurol.* 42:490-501; 1974.
- Chen, Y.; Devor, M. Ectopic mechanosensitivity in injured sensory axons arises from the site of spontaneous electrogenesis. *Eur. J. Pain* 2:165-178; 1998.
- Coderre, T. J.; Melzack, R. Procedures which increase acute pain sensitivity also increase autotomy. *Exp. Neurol.* 92:713-722; 1986.
- Dennis, S. G.; Melzack, R. Self-mutilation after dorsal rhizotomy in rats: Effects of prior pain and pattern of root lesions. *Exp. Neurol.* 65:412-421; 1979.
- Jensen, T. S.; Krebs, B.; Nielsen, J.; Rasmussen, P. Immediate and long-term phantom limb pain in amputees: Incidence, clinical characteristics and relationship to pre-amputation limb pain. *Pain* 21:267-278; 1985.
- Katz, J.; Melzack, R. Pain 'memories' in phantom limbs: Review and clinical observations. *Pain* 43:319-336; 1990.
- Le Bars, D.; Dickenson, A. H.; Besson, J. M.; Villanueva, F. Aspects of sensory processing through convergent neurons. In: Yaksh, T. L., ed. *Spinal afferent processing*. New York: Plenum Press; 1986:467-504.
- Levit, M. Dysesthesias and self-mutilation in humans and subhumans: A review of clinical and experimental studies. *Brain Res. Rev.* 10:247-290; 1985.
- Mailis, A. Compulsive targeted self-injurious behaviour in humans with neuropathic pain: A counterpart of animal autotomy? Four case report and literature review. *Pain* 64:569-578; 1996.
- Melzack, R. Phantom limb pain: Implications for treatment of pathologic pain. *Anesthesiology* 35:409-419; 1971.
- Nikolajsen, L.; Ilkjaer, S.; Kroner, K.; Christensen, J. H.; Jensen, T. S. The influence of preamputation pain on postamputation stump and phantom pain. *Pain* 72:393-405; 1997.
- Procacci, P.; Maresca, M. Autotomy. *Pain* 43:394; 1990.
- Seltzer, Z.; Beilin, B. Z.; Ginzburg, R.; Paran, Y.; Shimko, T. The role of injury discharge in the induction of neuropathic pain behavior in rats. *Pain* 46:327-336; 1991.
- Sweet, W. H. Animal models of chronic pain: Their possible validation from human experience with posterior rhizotomy

- and congenital analgesia (Part I of The Second John J. Bonica Lecture). *Pain* 10:275-329; 1981.
18. Wall, P. D.; Devor, M.; Inbal, R.; Scadding, J. W.; Schonfeld, D.; Seltzer, Z.; Tomkiewicz, M. M. Autotomy following peripheral nerve lesions: Experimental anaesthesia dolorosa. *Pain* 7:103-113; 1979.
19. Zimmermann, M. Ethical guidelines for investigation of experimental pain in conscious animals. *Pain* 16:109-110; 1983.

Protocols

## Self-injury behaviour induced by intraplantar carrageenan infiltration: a model of tonic nociception

Alberto López-Avila<sup>a</sup>, Gabriela Rodríguez-Manzo<sup>b</sup>, Ulises Coffeen<sup>a</sup>,  
Rosendo del Ángel<sup>a</sup>, Francisco Pellicer<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>Subdirección de Investigaciones en Neurociencias, Instituto Nacional de Psiquiatría, Ramón de la Fuente, Camino a Xochimilco 101, San Lorenzo Huipulco, Tlalpan D.F. cp: 14370, Mexico

<sup>b</sup>Departamento de Farmacobiología, Centro de Investigación y Estudios Avanzados, Mexico

Accepted 29 January 2004

### Abstract

The research of chronic nociception using whole animals is an approach plagued with methodological drawbacks within the ethical realm, as well as difficulties in the analysis and interpretation of time dependent results. On this work, we propose an experimental model that displays tonic nociception measured as a quantifiable self-injury behaviour (SIB) produced by the inflammation of soft tissue located in the paw of the rat elicited by carrageenan 1% (CAR) infiltration. We established five categories or levels for the analysis of the self-injury behaviour reflecting the intensity of rat nociception triggered by CAR infiltration. In addition, we determine that this model does not induce inescapable pain by noticing no significant differences when measuring weight gain and sexual behaviour. We propose this nociception model as physiologically and ethically appropriate for the study of long-lasting nociception.

© 2004 Elsevier B.V. All rights reserved.

*Theme:* Sensory systems

*Topic:* Pain modulation: anatomy and physiology

*Keywords:* Animal model; Chronic nociception; Inflammation; Self-injury behaviour; Rat; Pain

### 1. Type of research

Experimental research in chronic nociception using whole animals is an approach plagued with methodological drawbacks within the ethical realm, as well as difficulties in the analysis and interpretation of time dependent results [1,14,24]. In relation to this matter, we believe that an experimental model for the study of chronic nociception must comply with the following criteria:

- The experimental model must be reasonably similar to the human phenomenon.
- The model should provide the intrinsic mechanisms to gain some insight in the phenomenon under study.
- The experiments must fulfil the norms and ethical standard criteria established for pain research [25].

In this sense, numerous models of peripheral neuropathy have been created in rat that achieve this aim either by neurocompression at different nerve levels [2,13,17] or denervation [23]. These models produce chronic nociception manifested as spontaneous pain, allodynia, hyperalgesia and in the case of the denervation model, quantifiable autotomy behaviour towards the limb associated to the neuropathy. These procedures have made the study of the putative role of brain structures possible [22], as well as that of peripheral and central mechanisms of the nervous system involved in the development of chronic nociception.

The experimental model that we propose displays a quantifiable self-injury behaviour (SIB) produced by the inflammation of soft tissue located in the paw of the rat elicited by carrageenan infiltration and presents an ad integrum behavioural recovery response. [15,19,21].

Self-injury behaviour is a spontaneous animal behaviour response triggered by noxious stimuli that may be manifested through excessive grooming, liking, biting or partial or total amputation of the affected limb (autotomy) [14].

\* Corresponding author. Fax: +52-56-55-99-80.

E-mail address: [pellicer@imp.edu.mx](mailto:pellicer@imp.edu.mx) (F. Pellicer).



Despite the fact that SIB has been questioned in terms of its correlation to the nociceptive stimulus intensity [12,14,20], several authors have cleared the fact that in a variety of experiments the increase of the nociceptive process causes a SIB increase and vice versa. [5,18,19,21].

This protocol is appropriate for investigating the following aspects:

- (a) Nociceptive behaviour assessed by SIB, taking into account its intensity, incidence, and onset.
- (b) Evaluation of the involved sites and anatomic pathways related to SIB by means of the following approaches: lesion, stimulation and electrophysiological recording of the nervous system (NS).
- (c) Assessment of neurotransmitters and pharmacological agents related to SIB administered either systemically or locally.

With the purpose of evaluating a series of parameters indicative of the well being of the animal during the chronic nociceptive process, growth and weight curves were taken into consideration by the daily recording of body weight. In addition, the performance of sexual behaviour was assessed since on the one side, it is a motivated behaviour and on the other implies the display of stereotyped motor responses involving motor co-ordination, both characteristics sensitive to detrimental physiological conditions [16].

## 2. Time required

The time required from the induction of the inflammatory process, followed by SIB evolution to the resolution of the inflammation is about 10 days. The experimental model is intended to explore SIB development, as well as the inflammatory process, so that the experimental interventions could increase or diminish the total procedure time.

## 3. Materials

- 0.9% saline solution
- Carrageenan Lambda (Sigma, St. Louis, MO, USA)
- 1 ml syringe and 27G × 12 mm needle (Henke Sass Wolf, Germany)
- 10 cm of cotton thread
- Standard ruler with mm accuracy
- Individual rat acrylic cages
- Protocol sheet

### 3.1. Animals

Adult male Wistar rats (250–350 g) were used. Rats were raised, housed and maintained at the National Institute of Psychiatry Ramón de la Fuente (INPRF). During the observation period they were kept in transparent

acrylic individual cages under laboratory conditions with a 12/12 h light–dark cycle and with free access to food and water.

Experiments were conducted in agreement with the ethics committee regulations of the International Association for the Study of Pain and with the approval of INPRF Project Commission [25].

We consider that the minimum number of subjects per group liable to an adequate statistical analysis is between 10 and 15 animals.

Rats were maintained in individual cages in order to avoid aggressions among them and also to insure that the lesions present in the inflamed paw were self-inflicted and not due to social interactions.

## 4. Procedure

### 4.1. Carrageenan solution preparation

Heat up 0.9% saline solution to 35 °C and maintain this temperature. Pour carrageenan (CAR) in a 1:100 proportion (1% CAR solution) and stir until homogenised. Keep carrageenan solution in a sterile bottle.

### 4.2. Inflammatory procedure

Immobilise gently the rat. Measure the plantar perimeter of the hind paw at metatarsal level with a cotton thread to the nearest millimetre [10] (Fig. 1). Infiltrate by inserting the needle in the proximal portion of the paw in order to deliver the carrageenan solution into the paw. Immediately after injection measure the plantar perimeter again. All data should be recorded on the protocol sheet.

### 4.3. Inflammatory evolution

Three different volumes (50, 100, and 250 µl,  $n=15$  each group) of the CAR solution as well as vehicle (250 µl 0.9% saline solution,  $n=15$ ) were tested in order to determine the degree of inflammation. SIB development was also recorded for each of them.

Plantar perimeter was daily measured, at the same hour, with the purpose of evaluating inflammation evolution.

### 4.4. SIB evaluation

Our group established five categories or levels for the analysis of the self-injury behaviour reflecting the intensity of rat nociception triggered by CAR infiltration. The levels were established based on the extension and multiplicity of lesions that the rat inflicts upon its own swollen paw as follows: grade 0, without lesion; grade 1, one lesion of less than 3 mm long in the major longitudinal axis; grade 2, multiple lesions less than 3 mm long in the major longitudinal axis; grade 3, one lesion larger than 3 mm long in the major



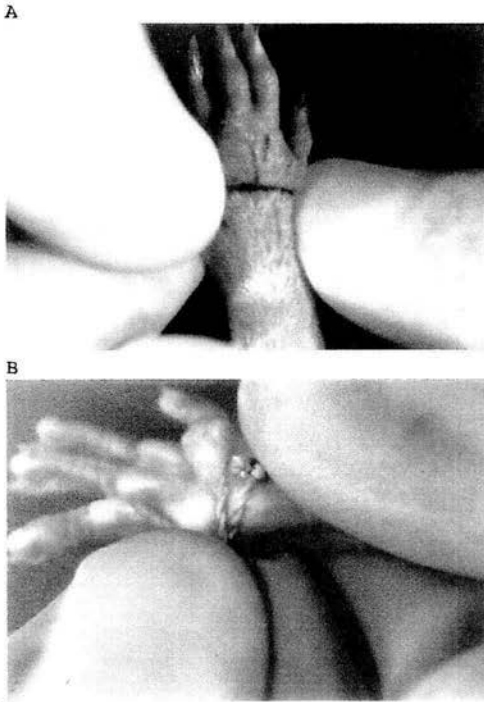


Fig. 1. Measure of the Plantar Perimeter. (A) Shows the procedure to measure the plantar perimeter. Thread is used to surround the metatarsal region and its length is measured in millimetres. (B) Shows the plantar view of the procedure.

longitudinal axis, with or without multiple lesions of less than 3 mm long; and finally, grade 4, multiple lesions larger than 3 mm long in the major longitudinal axis (Fig. 2).

SIB must be recorded daily to establish onset, grade and progression of the lesions.

SIB onset is defined as the mean day per group when SIB behaviour is initiated, regardless of its degree. If the animal does not present SIB behaviour, then the last day of the experimental recording is considered as the onset day.

It is important to have a record sheet with a schematic drawing of both sides of the rat paw to keep a daily register of the lesions in order to avoid confusion of a new lesion with a pre-existent one.

Incidence is calculated as the number of rats that show the behaviour in relation to the total number of animals for each group.

#### 4.5. Weight evolution

Weight is registered daily, at the same time of the day during 14 days, for all the animals within a group. This

record is initiated 4 days previous to the intraplantar infiltration of either CAR or vehicle. The first weight recorded was measured prior to the infiltration day. In order to plot the increment (percentage) of the weight gain per group, 0% is assigned to the weight recorded on the day of the experiment.

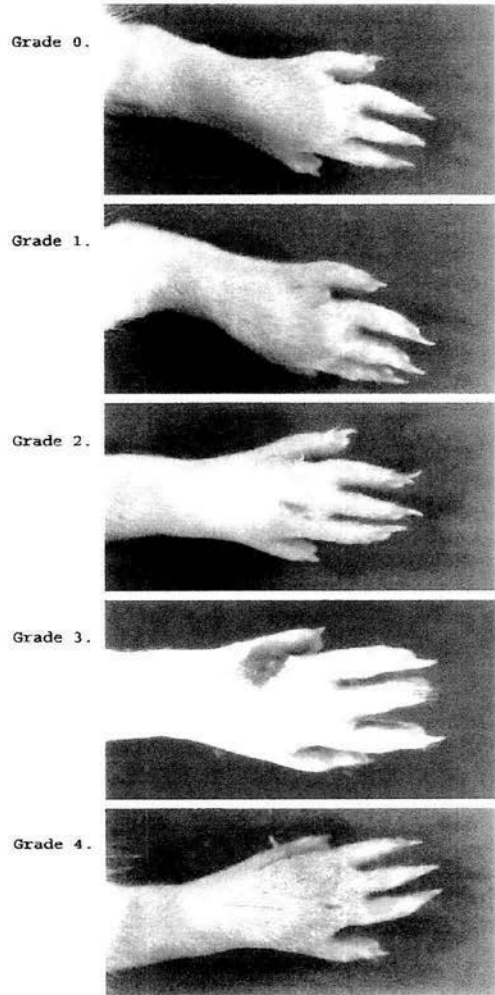


Fig. 2. Self-injury behaviour grades. This figure depicts the self-injury behaviour induced by intraplantar infiltration of CAR 1% 250 µl. Grade 0, without lesion; grade 1, one lesion of less than 3 mm long in the major longitudinal axis; grade 2, multiple lesions less than 3 mm long in the major longitudinal axis; grade 3, one lesion larger than 3 mm long in the major longitudinal axis, with or without multiple lesions of less than 3 mm long; and finally, grade 4, multiple lesions larger than 3 mm long in the major longitudinal axis.

#### 4.6. Sexual behaviour

To evaluate the sexual behaviour of animals subjected to an inflammatory process due to carrageenan, as previously described, two groups were tested. The experimental group was infiltrated with 250 µl CAR 24 h before the assessment of sexual behaviour performance ( $n=6$ ). The control group followed the same protocol with the difference that the infiltration consisted of vehicle ( $n=7$ ). All rats received three sexual behaviour tests, and the sexually active males (those showing ejaculation latencies shorter than 15 min in the last of these tests) were selected for the study. Receptive female rats were used as stimulus. Receptivity was induced in intact females by the sequential subcutaneous administration of oestradiol valerianate (4 µg/rat, Schering, Berlin, Germany) followed 44 h later by progesterone (2 mg/rat, 4-pregnane-3, 20-dione, Sigma). These drugs were dissolved in sesame oil for subcutaneous administration.

Sexual behaviour tests were conducted in a room under a dim red light, 3 h after the onset of darkness and 4 h after progesterone injection to the females. Male rats were introduced into a cylindrical observation cage (1 male per cage) and a 5-min adaptation period was allowed before the introduction of a single receptive female rat. Thereafter, sexual behaviour was recorded. The following parameters were registered: (a) intromission latency, time taken from the introduction of the female into the observation cage to the first intromission (mount with vaginal penetration); (b) number of mounts (mount with pelvic thrusting); (c) number of intromissions; (d) ejaculation latency, time from the first intromission of a series to ejaculation; (e) post-ejaculatory interval, time from ejaculation to the first intromission of the next series; (f) number of ejaculations; and (g) percentage of rats achieving mount, intromission, and ejaculation and resuming copulation after ejaculation.

#### 4.7. Statistical analyses

SIB index, inflammation and weight during the experimental period were analysed by a repeated measures ANOVA (treatments being the between subjects effect and days of treatment the within subjects effect). Differences between treatments per day were assessed by means of a post hoc Tukey test. Inflammation data were transformed, after the statistical analysis, into the percentage planter perimeter increment induced by the CAR injection. SIB onset data were analysed by means of a one-way ANOVA, treatment being the independent variable and day of SIB onset per animal within treatment the independent one. A post hoc Tukey test was used to contrast mean day of SIB onset between treatments. Differences in the number of subjects showing SIB per treatment (incidence) were assessed by means of the Fisher exact probability test. The significance for all statistical analyses was established at  $p < 0.05$ .

Sexual behaviour parameters were statistically compared between vehicle and experimental groups by means of a

Mann–Whitney  $U$ -test. The proportion of rats showing the different sexual behaviour components (mounts, intromission, ejaculation, resumed copulation) was compared by the Fisher exact probability test.

### 5. Results

#### 5.1. SIB

Our results showed that increasing doses of CAR induced dose-dependent inflammatory processes that correlated with SIB degrees. We found a dose dependent significant difference in SIB degree between groups (ANOVA  $F 19.97$ ,  $df 3$ ,  $p < 0.000$ ). The CAR 250 group presented the highest SIB degree ( $2.5 \pm 0.42$ ) followed by CAR 100 group ( $1.6 \pm 0.42$ ). SIB was not present in either the CAR 50 or control groups.

Significant differences were found when comparing groups CAR 250 and CAR 100 vs. CAR 50 and controls ( $p < 0.001$ , Tukey test) (see Fig. 3).

#### 5.2. Inflammation

The inflammatory process showed dose dependent significant differences among all groups (ANOVA  $F 121.42$ ,  $df 3$ ,  $p < 0.000$ , Tukey  $p < 0.003$ ). The inflammation peak was produced 24 h after CAR injection (Fig. 4). The inflammatory process was resolved in an 8 to 14 day interval depending on the injected volume.

#### 5.3. SIB onset

Onset of SIB behaviour exhibited significant differences among groups. Groups CAR 100 and CAR 250 showed 2.8 days as the mean time for the behaviour onset. Meanwhile, groups CAR 50 and control displayed no SIB behaviour during the time-period analysed (ANOVA  $F 32.58$ ,  $df 2$ ,  $p < 0.000$ ).

#### 5.4. SIB incidence

A 100%, 80% and 0% incidence was found in CAR 250, CAR 100 and CAR 50 groups, respectively. The control group also presented 0% incidence. Statistically significant differences were found when groups CAR 250 and CAR 100 were compared with groups CAR 50 and control. (Fisher  $p < 0.000$ ).

#### 5.5. Weight gain

No significant differences were found in weight gain for all groups during the experimental process, however, a diminution in weight gain was evident, depending on the infiltration dosage, 24 h after the induction inflammatory process (Fig. 5).

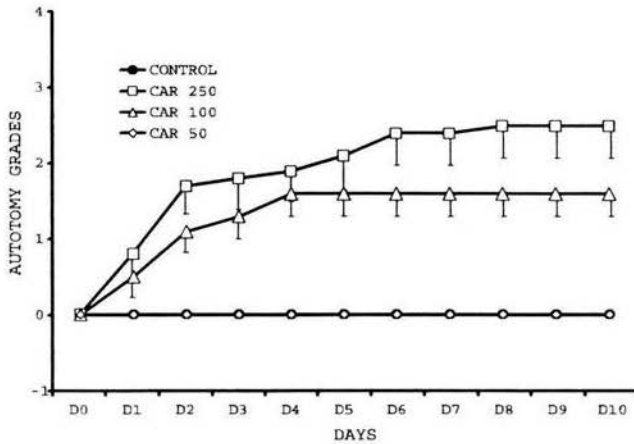


Fig. 3. Effect of the injection of three different volumes of carrageenan 1% in the self-injury behaviour grade average. The CAR 250 group presented the highest SIB degree ( $2.5 \pm 0.42$ ) followed by CAR 100 group ( $1.6 \pm 0.42$ ) (ANOVA 0.000). Groups CAR 50 and control did not show SIB. Significant differences were found when comparing groups CAR 250 and CAR 100 vs. CAR 50 and control (Tukey  $<0.001$ ).

### 5.6. Sexual behaviour

Data obtained for male sexual activity revealed that the nociceptive procedure did not significantly alter the proportion of male rats that exhibited sexual behaviour. All animals (100%,  $n=7$ ) presenting nociceptive inflammatory processes were able to mount, intromit and all but one (85.7%,  $n=6$ ) achieved ejaculation (Fig. 6, % Copulating Rats). When analysing specific sexual behaviour parameters, statistically significant increases were found in the number of mounts ( $p<0.01$ ; Fig. 6, M) and ejaculation

latency ( $p<0.02$ ; Fig. 6, EL) in animals with nociception (CAR 250) as compared to control rats (Con). No other sexual behaviour parameter was affected in animals subjected to the nociceptive procedure.

## 6. Discussion

This model consisted of the induction of a nociceptive process by means of the infiltration of an inflammatory agent (carrageenan) into the soft tissue of the paw. This procedure

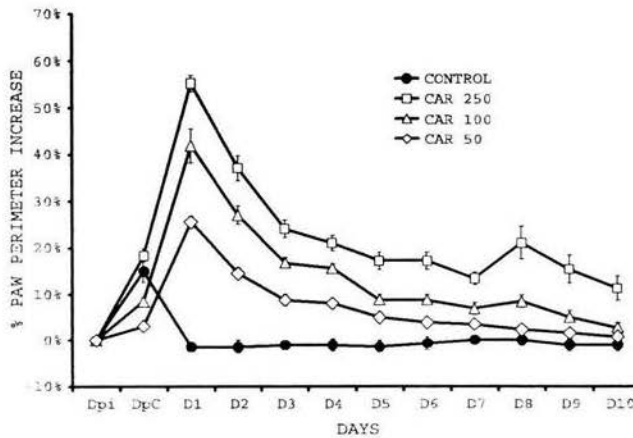


Fig. 4. Inflammation temporal course. The inflammatory process showed a dose dependent significant difference among all groups (ANOVA 0.000, Tukey  $p<0.003$ ). The maximum inflammation peak was produced 24 h after CAR injection.

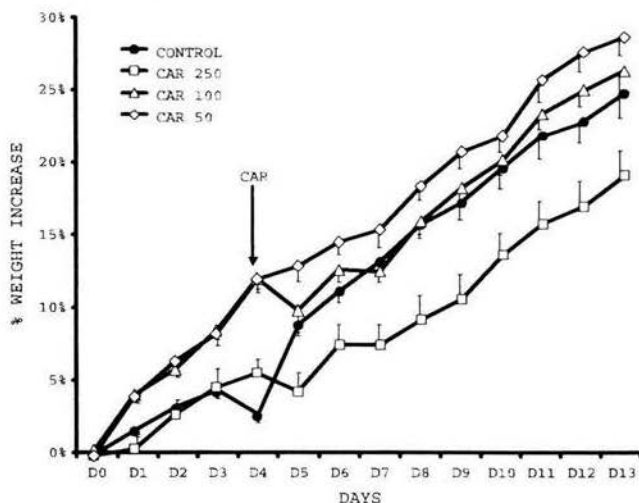


Fig. 5. Weight evolution. No significant differences were found in weight gain for all groups during the experimental process.

unchained a reversible inflammation that triggered a self-injury behaviour characterised by skin lesions quantifiable with regard to their onset, intensity and duration.

At the present moment there are various models for the study of nociception in animals. They can be classified by their temporality into acute models, lasting from minutes to hours such as the ones produced by thermociception [8], mechanociception [3] and chemociception [6,9]. In this

context, the intraplantar injection of CAR, with similar doses as used in the present article, is a model that has been used, for several years, to induce mechanic and thermal hyperalgesia [1]. Moreover, intraplantar microinjection of 200  $\mu$ l of CAR 1% has been used to analyse the increased trigger frequency in neurons involved in nociceptive processing, such as those located in the thalamic nuclei, the prefrontal cortex and the somatosensory cortex [7,11].

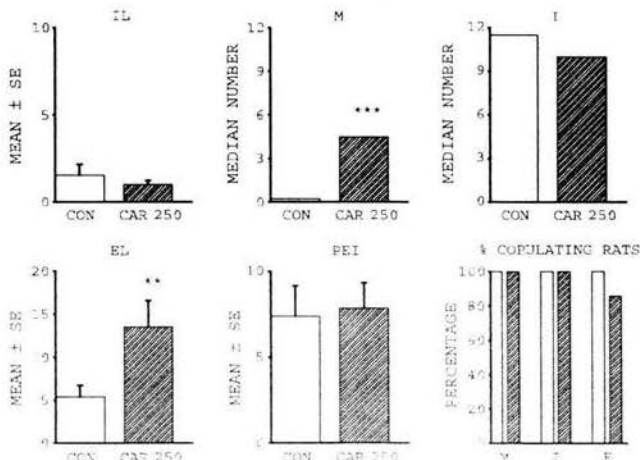


Fig. 6. Sexual behaviour. Specific sexual behaviour parameters of sexually-experienced *Meriones* (CON; white bars;  $n = 6$ ) and under a persistent inflammatory process (CAR 250; dashed bars;  $n = 6$ ). Rats that executed one copulatory series (intrusion latency (IL), intromission latency (I) and postejaculatory interval (PEI)) values are expressed in min as mean  $\pm$  S.E.M. Mounts (M) and intromissions (I) are expressed as median number. Equally, a percentage of control (white bars) and under a persistent inflammatory process (dashed bars) copulating rats showing mounts (M), intromissions (I) and ejaculations (E) are shown in the last panel (bottom, right). \*\*\* $p < 0.001$ ; \*\* $p < 0.02$ ; Mann-Whitney  $U$ -test.

On the other hand, there are chronic models, which can be obtained by the ligation [2,4] or severance [23] of peripheral nerves. The latter procedures originate autotomy behaviour. Such behaviour is characterised by the partial or total self-amputation of the denervated extremity, provoked by biting. The autotomy score, which quantifies the extension that has been self amputated, is related to the degree of nociception and may be developed in the course of weeks to months [1,24].

Not only does the here introduced model allow the observation of the development of nociception under a window that has a temporality located in the middle of the above mentioned models, but also it presents additional advantages such as the fact that the induction of the process does not require surgery, that is, it is less invasive and consequently soft tissues suffer less damage. Besides, the inflammatory process may be induced gradually and in a dose-dependent manner. Given the temporality for the establishment of the inflammation and SIB, the model allows pharmacological intervention or prophylactic and therapeutic procedures, which may vary in their temporal scheme.

## 7. Bioethical considerations

It is relevant to emphasise that the model did not confer animals an inescapable pain condition meaning that this condition was not fatal per se or produced significant alterations in vital spheres such as reproductive, feeding or motor behaviours or important impairments related to sleep and wakefulness. To this respect, our model allowed the assessment of the sexual behaviour of those animals subjected to a high carrageenan dose (250  $\mu$ l). We observed on the one side that all subjects were able to copulate and on the other that only two specific parameters indicative of the ability to copulate were affected, i.e., sexual performance was altered in the animals that underwent the nociceptive procedure. However, those parameters reflecting sexual motivation were not altered by the procedure.

Altogether, the data suggest that the nociceptive procedure did not induce an important behavioural despair and, therefore, did not interfere with the ability of the animals to interact with the environment. Moreover, CAR 250 animals were still able to experience sexual drive and execute copulation, although with a small deficit evidenced by the greater number of mounts and the longer time required to achieve the ejaculatory threshold. One other assessed parameter was the weight gain previous to (4 days) and during (10 days) the inflammatory process, as well as during the development of the self-injury behaviour. During this whole period, it was found that even though the differences were not statistically significant among the groups, a diminution in weight gain was evident depending on the infiltration dosage.

With these results in mind, we propose this nociceptive model as physiologically and ethically appropriate for the study of medium term nociception.

## Acknowledgements

This research was partially supported by CONACyT FP-28696M; IMP 3230; Scholarship CONACyT-DGEP UNAM for ALA. We thank J. Manuel Ortega-Legaspi for valuable suggestions and support.

## References

- [1] D. Albe-Fessard, M.A. Giamberardino, O. Rampin, Comparison of different animal models of chronic pain, in: R. Press (Ed.), *Advances in Pain Research and Therapy*, vol. 13, S. Lipton et al., New York, 1990, pp. 11–27.
- [2] G.J. Bennett, Y.-K. Xie, A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man, *Pain* 33 (1988) 87–107.
- [3] K.J. Burchiel, Effects of electrical and mechanical stimulation on two foci of spontaneous activity which develop in primary afferent neurons after peripheral axotomy, *Pain* 18 (1984) 249–265.
- [4] J.M. Chung, J.W. Leem, S.H. Kim, Somatic afferent fibers which continuously discharge after being isolated from their receptors, *Brain Research* 599 (1992) 29–33.
- [5] T.J. Coderre, R. Melzack, Procedures which increase acute pain sensitivity also increase autotomy, *Experimental Neurology* 92 (1986) 713–722.
- [6] F.C. Colpaert, T. Meert, P. De-Witte, P. Schmitt, Further evidence validating adjuvant arthritis as an experimental model of chronic pain in the rat, *Life Sciences* 31 (1982) 67–75.
- [7] M. Condes-Lara, R.M. Sanchez-Moreno, I. Omana-Zapata, Cortical facilitatory action on centralis lateralis thalamic activity during the development of carrageenin-produced inflammation, *Archives of Medical Research* 27 (1996) 265–273.
- [8] S.L. Cruz, N. Paez-Martinez, F. Pellicer, L.A. Salazar, C. Lopez-Rubalcava, Toluene increases acute thermociception in mice, *Behavioural Brain Research* 120 (2001) 213–220.
- [9] M.I. Diaz-Reval, R. Ventura-Martinez, G.P. Hernandez-Delgado, A.M. Dominguez-Ramirez, F.J. Lopez-Munoz, Effect of caffeine on antinociceptive action of ketoprofen in rats, *Archives of Medical Research* 32 (2001) 13–20.
- [10] D. Fletcher, V. Kayser, G. Guilbaud, Influence of timing of administration on the analgesic effect of bupivacaine infiltration in carrageenin-injected rats, *Anesthesiology* 84 (1996) 1129–1137.
- [11] G. Guilbaud, J.M. Benoist, M. Condes-Lara, M. Gautron, Further evidence for the involvement of Sml cortical neurons in nociception: their responsiveness at 24 hr after carrageenin-induced hyperalgesic inflammation in the rat, *Somatosensory and Motor Research* 10 (1993) 229–244.
- [12] T. Kaupilla, Correlation between autotomy-behavior and current theories of neuropathic pain, *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 23 (1998) 111–129.
- [13] S.H. Kim, J.M. Chung, An experimental model for peripheral neuropathy produced by segmental spinal nerve ligation in the rat, *Pain* 50 (1992) 355–363.
- [14] M. Levitt, Dysesthesias and self-mutilation in humans and subhumans: a review of clinical and experimental studies, *Brain Research* 357 (1985) 247–290.
- [15] F. Pellicer, A. Lopez-Avila, E. Torres-Lopez, Electric stimulation of the cingulum bundle precipitates onset of autotomy induced by inflammation in rat, *European Journal of Pain* 3 (1999) 28793.
- [16] D.W. Pfaff, *Drive: Neurobiological and Molecular Mechanisms of Sexual Motivation*, MIT Press, Cambridge, MA, 1999, 312 pp.
- [17] Z. Seltzer, R. Dubner, Y. Shir, A novel behavioral model of neuropathic pain disorders produced in rats by partial sciatic nerve injury, *Pain* 43 (1990) 205–218.

- [18] Z. Seltzer, B.Z. Beilin, R. Ginzburg, Y. Paran, T. Shimko, The role of injury discharge in the induction of neuropathic pain behavior in rats. *Pain* 46 (1991) 327–336.
- [19] F. Sotres-Bayón, E. Torres-López, A. López-Ávila, R. del-Ángel, F. Pellicer, Lesion and electrical stimulation of the ventral tegmental area modify persistent nociceptive behavior in the rat. *Brain Research* 898 (2001) 342–349.
- [20] W.H. Sweet, Animal models of chronic pain: their possible validation from human experience with posterior rhizotomy and congenital analgesia. *Pain* 10 (1981) 275–295.
- [21] E. Torres-Lopez, R. del-Angel, F. Pellicer, Stimulation of the thalamic anteromedial and mediodorsal nuclei stimulation enhances the self-injury behaviour induced by an inflammatory process in the rat. *Anaesthesia* 5 (2000) 67–73.
- [22] A.I. Vaccarino, R. Melzack, The role of the cingulum bundle in self-mutilation following peripheral neurectomy in the rat. *Experimental Neurology* 111 (1991) 131–134.
- [23] P. Wall, M. Devor, R. Inbal, J. Scadding, D. Schonfeld, Z. Seltzer, M. Tomkiewicz, Autotomy following peripheral nerve lesions: experimental anaesthesia dolorosa. *Pain* 7 (1979) 103–111.
- [24] R. Zeltser, Z. Seltzer, A practical guide for the use of animal models in the study of neuropathic pain. in: U. Lindblom (Ed.), *Touch, Temperature, and Pain in Health and Disease: Mechanisms and Assessments*, vol. 3. IASP Press, Seattle, 1994, pp. 295–338.
- [25] M. Zimmermann, Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain* 16 (1983) 109–110.



## Dopamine and NMDA systems modulate long-term nociception in the rat anterior cingulate cortex

Alberto López-Avila, Ulises Coffeen, J. Manuel Ortega-Legaspi, Rosendo del Ángel, Francisco Pellicer\*

Laboratorio de Neurofisiología Integrativa, Subdirección de Investigaciones en Neurociencias, Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente, Camino a Xochimilco, 101 San Lorenzo Huipulco Talpan, México DF cp 14370, Mexico

Received 13 January 2004; received in revised form 21 May 2004; accepted 7 June 2004

### Abstract

The anterior cingulate cortex (ACC) plays a key role in pain processing. It has been reported that increased activity of glutamatergic projections into the ACC intensifies nociception; whereas dopaminergic projections inhibit it. The aim of this study was to evaluate the role of dopaminergic and NMDA systems of the ACC in the modulation of long-term nociception elicited by sciatic denervation in the rat. Score, onset and incidence of long-term nociception were measured by the autotomy behavior. The effects of a single microinjection into the ACC of different doses of dopamine (100 nM, 100  $\mu$ M and 100 mM), a NMDA receptor antagonist (MK801 200 nM and 9.34 mM) and amantadine, a dopamine agonist and NMDA receptor antagonist (10, 100 and 1000  $\mu$ M) were tested on long-term nociception. Dopamine diminished autotomy behavior in an inverse dose-dependent manner, with dopamine 100 nM as most effective concentration. MK801 and amantadine elicited a significant reduction on autotomy score. Prior injections of D1 and D2 receptor antagonists blocked the antinociceptive effects of amantadine on long-term nociceptive behavior. The present study suggests an interaction between dopaminergic and glutamatergic systems within the ACC in the genesis and maintenance of long-term nociception.

© 2004 International Association for the Study of Pain. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

**Keywords:** Nociception; Anterior cingulate cortex; Amantadine; Dopamine; Mk 801; Autotomy; Pain; Rat

### 1. Introduction

A number of animal studies have shown that the anterior cingulate cortex (ACC) plays a relevant role in the processing of affective and cognitive aspects of nociception (Abbott and Melzack, 1978; Devinsky et al., 1995; Johansen et al., 2001). Moreover, it has been reported that the ablation of the ACC or the interruption of the cingulum bundle relieves the unpleasant painful sensation in patients with intractable pain (Foltz and White, 1962; Hassenbusch et al., 1990; Hurt and Ballantine, 1974). More recently, functional imaging techniques have shown that modifications of the activity of the ACC are related with the affective-emotional component of pain (Ploghaus et al., 2003; Rainville et al., 1997). Functional magnetic resonance imaging in rats, showed that the ACC is activated by nociceptive electrical

or chemical stimuli in an analogous way to humans (Chang and Shyu, 2001; Tuor et al., 2000).

ACC activity is also dependent on dopaminergic modulation via the ventral tegmental area (VTA) (Fuster, 1997; Oades and Halliday, 1987; Sotres-Bayon et al., 2001). Indeed, the electrical stimulation of the VTA inhibits the ACC neurons that respond to noxious stimuli (Mantz et al., 1988, 1989; Pirot et al., 1996). Accordingly, our group demonstrated that nociceptive reactions in the rat are either enhanced by lesions or inhibited by the electrical stimulation of the VTA (Sotres-Bayon et al., 2001). These data suggest that long-term nociception processing in the ACC could be modulated by at least two systems, an excitatory one activated through NMDA receptors; and an inhibitory one activated by the dopaminergic system.

The aim of this work was to investigate the role that dopaminergic and glutamatergic systems might play within the ACC in the onset and evolution of chronic nociception. Sciatic neurectomy was employed as a trigger for neuropathic pain expressed as autotomy behavior (AB) in the rat

\* Corresponding author. Tel.: +52-56-55-28-11x250; fax: +52-56-55-99-80.

E-mail address: pellicer@imp.edu.mx (F. Pellicer).



(Wall et al., 1979). The nociceptive process was increased by a painful stimulation applied prior to denervation in order to enhance the AB (Coderre and Melzack, 1986; López-Avila et al., 1999).

ACC microinjections of dopamine, a NMDA receptor antagonist and amantadine, a NMDA receptor antagonist (Kornhuber et al., 1991, 1995) with dopaminergic releasing properties (Gordon et al., 1996; Stone, 1976; Takahashi et al., 1996; Toide, 1990) were tested on long-term, AB.

## 2. Material and methods

The experiments were conducted in agreement with the ethics committee regulations of the International Association for the Study of Pain (Zimmermann, 1983) and with the project's commission approval of the Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente (INPRF).

Male Wistar rats (250–350 g) were raised, housed and maintained in the INPRF. During the observation period the animals were maintained in transparent acrylic individual cages with light–dark cycles of 12 × 12 h, and with ad libitum feeding and hydration.

### 2.1. Experimental design

For all surgical and nociceptive procedures, the rats were anaesthetized with halothane 2% mixed with 98% O<sub>2</sub>. The nociceptive process was induced 30 min prior to sciatic denervation. Either the drugs or the vehicle were microinjected into the ACC immediately after denervation, except for amantadine pre-denervation group (vide infra). AB was evaluated throughout 25 days.

### 2.2. Nociceptive process induction

The nociceptive process was induced by immersing the rat's right hind paw in hot water at 55 °C during 20 s, 30 min prior to denervation (Coderre and Melzack, 1986).

### 2.3. Denervation

The right sciatic nerve was exposed. The nerve was cut and ligated with silk 3-0 suture. Five millimeters of the distal end were removed in order to avoid reinnervation. Skin was closed with silk 3-0 suture.

### 2.4. Microinjection

A unilateral cannula (28 gauge, Small Parts, USA) was stereotaxically positioned into the left ACC. The cannula tip was placed 2 mm underneath the meningeal tissue (A, 1 mm from Bregma; L, –0.6 mm from mid line). The cannula was connected by polyethylene tubing (PE-10, 20 cm length) to a 10 µl syringe (Hamilton, Reno, NV). Either the drug or the vehicle were microinjected by means of a syringe pump

at a rate of 0.5 µl/min (Harvard Apparatus, MA, USA), during 4 min. These microinjection parameters have been reported not to induce any tissular damage (Peterson, 1998). The cannula was left in place for additional 60 s to reduce the chance of reflux. The cannula was removed and the skull skin was closed with silk 3-0 suture.

### 2.5. Autotomy behavior (AB)

Daily autotomy scores were computed for 25 days, using a scale devised by Wall et al. (1979). This scale gives a score of 1 for the removal of one or more nails; an additional score of 1 was added for each distal half digit attacked and further score of 1 was added for each proximal half digit attacked. If the distal or proximal half of the paw was attacked an additional score of 1 was added for each one. We also recorded the AB onset as the mean day, within each group, in which autotomy initiated. The number of animals that presented AB per group was measured (incidence). On day 25, animals were sacrificed by an overdose of pentobarbital and denervation was verified.

### 2.6. Statistical analysis

The following variables were calculated from the raw data obtained from daily registration of the autotomy scores, incidence of the behavior (calculated as the number of rats that showed the behavior in relation to the total number of animals in that group), the onset of the behavior (calculated as the mean day of onset of the behavior for every group) and its maximum score (calculated as the sum of the autotomy scores for every group considering the autotomy 13 score categorization (Wall et al., 1979)). In order to analyze the evolution of autotomy index a repeated measures ANOVA was run. Differences between treatments per day were assessed by means of a post hoc Tukey test. AB onset data were analyzed by means of a one-way ANOVA. A Student *t*-test was used as a post hoc to contrast mean day of AB onset between treatments. Differences in the percentage of subjects showing AB per treatment (incidence) were assessed by means of a Fisher exact probability test. The significance for all statistical analyses was established at  $P < 0.05$ .

### 2.7. Experimental groups

Control ( $n = 10$ ), the nociceptive process and the denervation were carried out. Vehicle ( $n = 14$ ), same procedure as the control, but with a microinjection of 2 µl saline solution (0.9%) immediately after denervation.

#### 2.7.1. Dopamine groups

Dopa ( $n = 10$  each), same procedure as vehicle, but dopamine (3-hydroxytyramine hydrochloride, Sigma Chemicals, St Louis, MO) was microinjected at 100 nM, 100 µM and 100 mM, respectively, for each group.



### 2.7.2. NMDA receptor antagonists groups

MK801 ( $n = 10$  each), the same procedure as vehicle was conducted except that the microinjected agent was MK801 ((+)-MK-801 hydrogen maleate, Sigma Chemicals, St Louis, MO) at 200 nM and 9.34 mM, respectively, for each group.

### 2.7.3. Amantadine groups

Amant post-denervation, the experiment was precisely the same as with the vehicle group, but with the microinjection of amantadine (adamantan-1-amine, Sigma Chemicals, St Louis, MO) 10  $\mu\text{M}$  ( $n = 10$ ), 100  $\mu\text{M}$  ( $n = 10$ ) and 1000  $\mu\text{M}$  ( $n = 9$ ), respectively, for each group. Amant pre-denervation ( $n = 10$  each), the procedure and the doses were the same as in the previously explained group, but the microinjection into the ACC was performed immediately after the induction of the nociceptive process (that is 30 min before denervation).

### 2.7.4. D1 and D2 antagonists prior to amantadine group

D1–D2 antagonist + amant 1000  $\mu\text{M}$  ( $n = 10$ ), the procedure was the same as the vehicle, but there was a microinjection of a mixture (1  $\mu\text{l}$ ) of SCH23390 hydrochloride, D1 receptor antagonist, 30 nM (R-(+)-SCH-23390 hydrochloride, Sigma Chemicals, St Louis, MO)

and spiperone, D2 receptor antagonist, 300 nM (spiperone hydrochloride, Sigma Chemicals, St Louis, MO); immediately after the microinjection of the mentioned mixture 1  $\mu\text{l}$  of amantadine 2 mM was administered into the ACC in the same place by the same cannula. The concentration of amantadine was doubled due to the fact that the volume needed to be divided in half in order to allow the administration of the D1–D2 antagonists diluted in the 1  $\mu\text{l}$  left, therefore, although the amantadine concentration was doubled, the actual quantity of amantadine was the same as the maximum dosage used in the previous experiment.

## 3. Results

### 3.1. Dopamine groups

The results show that the administration of dopamine, 100 nM and 100  $\mu\text{M}$  (Repeated measures ANOVA  $P < 0.05$ ), significantly diminish the autotomy score as compared to control and vehicle (repeated measures ANOVA  $P = 0.00$ ) (Fig. 1). A significant difference was found from day 6 to 25 when comparing groups dopa 100 nM vs. control and vehicle and group dopa 100  $\mu\text{M}$

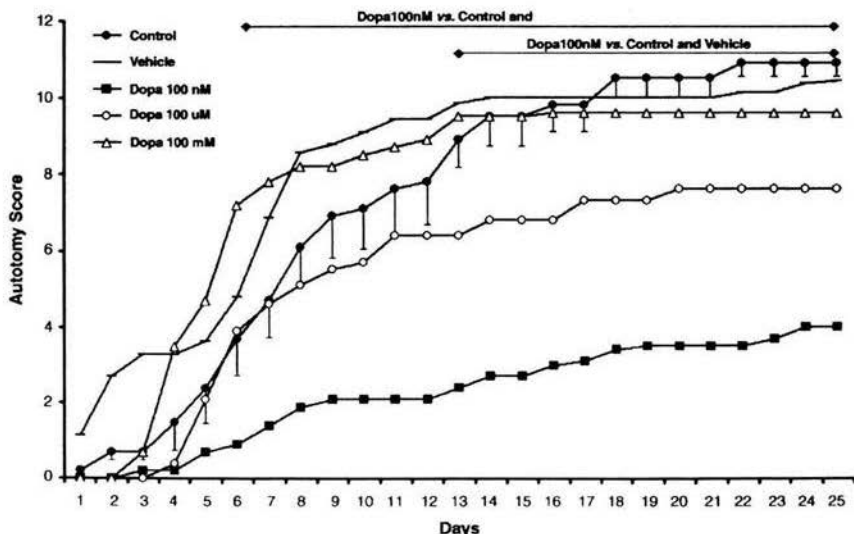


Fig. 1. Long-term nociceptive response measured through autotomy score for 25 days. Control group ( $n = 10$ ) with the induction of a nociceptive process (rat's right hind paw immersed in water at 55 °C for 20 s) and denervation 30 min afterwards; Vehicle ( $n = 14$ ), same procedure, but with 2  $\mu\text{l}$  saline solution after denervation. Dopa ( $n = 10$  each) with the microinjection of 2  $\mu\text{l}$  of dopamine 100 nM, 100  $\mu\text{M}$  and 100 mM, respectively. A significant decrease in autotomy score in groups dopa 100 nM and 100  $\mu\text{M}$  is observed when compared to groups control and vehicle (repeated measures ANOVA  $P < 0.05$ ). The significance between groups per day was established by a Tukey test as a post hoc ( $P < 0.05$ ) (horizontal bars).

Table 1  
Characteristics of autotomy behavior in the different experimental groups

Group	Incidence (%)	Onset	Maximum score (day 25)
Control	10/10 (100)	3.6 ± 0.8	10.9
Vehicle	14/14 (100)	3.3 ± 0.7	10.4
Dopa, 100 nM	10/10 (100)	6.6 ± 0.9	4
Dopa, 100 μM	10/10 (100)	5.8 ± 0.6	7.6
Dopa, 100 mM	10/10 (100)	4.3 ± 0.7	9.6
MK801, 200 nM	9/10 (90)	8.3 ± 2.0	6.6
MK801, 9.34 mM	10/10 (100)	7.5 ± 1.0	6.7
Amant pre-denervation, 10 μM	8/10 (80)	12.3 ± 2.6*	4.3
Amant pre-denervation, 100 μM	8/10 (80)	10.2 ± 2.5*	5.4
Amant pre-denervation, 1000 μM	7/9 (77)	10.8 ± 3.1*	4.11
Amant post-denervation, 10 μM	10/10 (100)	6.8 ± 0.8	6.2
Amant post-denervation, 100 μM	10/10 (100)	7.5 ± 1.9	5.9
Amant post-denervation, 1000 μM	8/10 (80)	11.3 ± 2.7*	4.8
D1–D2 antagonist + amant, 1000 μM	10/10 (100)	5.8 ± 0.66	9.5

The incidence was calculated for each group as the percentage of the number of animals that displayed autotomy behavior, divided by the total number of animals in the group. The onset was calculated as the mean day, within each group, in which autotomy initiated. A one-way ANOVA test was used to determine statistically significant differences in the onset of AB between groups (Student *t*-test as post hoc significant level, \* $P < 0.05$ ). Autotomy score was determined using the scale devised by Wall et al. (1979).

vs. control and vehicle from day 13 to 25 (post hoc Tukey test,  $P < 0.05$ ). By comparing all dopa groups between them there were also significant differences (nM vs. mM, nM vs. μM, mM vs. μM, repeated measures ANOVA  $P < 0.05$ ). There were no significant differences found in neither incidence nor AB onset. Group dopa 100 mM did not show any difference when compared to control and vehicle (Table 1).

### 3.2. NMDA receptor antagonists groups

The results show that the administration of MK801 200 nM and 9.34 mM diminish the autotomy score in a significant way as compared to control and vehicle (repeated measures ANOVA  $P < 0.05$ ) (Fig. 2). There was a significant difference per day when comparing MK801 200 nM vs. control and vehicle and 9.34 mM vs. control and vehicle from day 13 to 25 in both comparisons (post hoc Tukey test,  $P < 0.05$ ). There were no significant differences when comparing groups MK801 200 nM vs. 9.34 mM. Also, we did not find any differences neither in incidence nor in onset of AB in any of the groups (Table 1).

### 3.3. Amantadine groups

Results show that the administration of amantadine 10, 100 and 1000 μM pre- and post-diminishes the autotomy score in a significant way as compared to control and vehicle (Repeated measures ANOVA  $P < 0.05$ ) (Fig. 3).

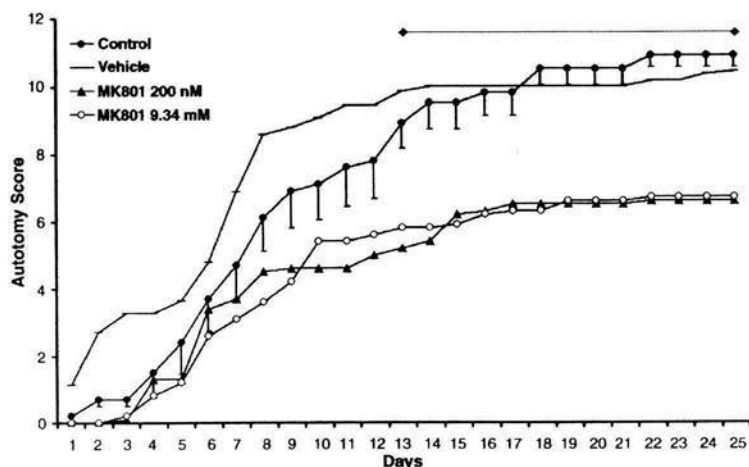


Fig. 2. Long-term nociceptive response measured through autotomy score for 25 days. Control ( $n = 10$ ) and vehicle ( $n = 14$ ). Groups MK 801, microinjected with 2 μl of MK 801 200 nM ( $n = 9$ ) and 9.34 mM ( $n = 10$ ). A significant decrease in autotomy score in both MK 801 groups is observed when compared to control and vehicle (repeated measures ANOVA  $P < 0.05$ ). The difference between MK801 groups vs. control and vehicle per day was established by a Tukey test as a post hoc ( $P < 0.05$ ) (horizontal bar).

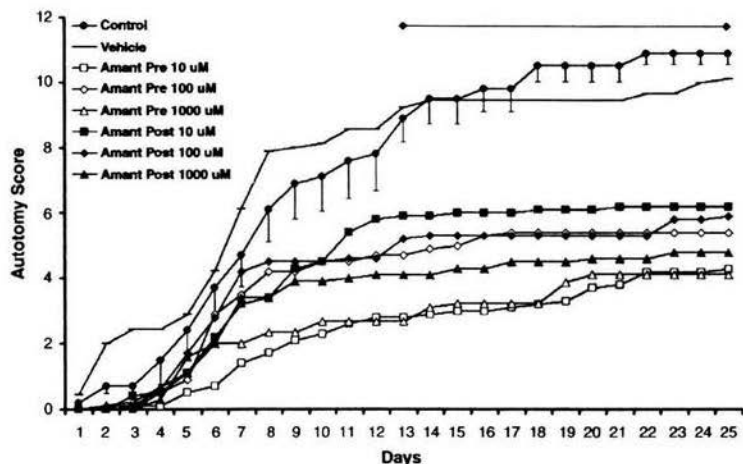


Fig. 3. Long-term nociceptive response measured through autotomy score for 25 days. Control ( $n = 10$ ) and vehicle ( $n = 14$ ). Groups amant pre-, microinjected with  $2 \mu\text{l}$  of amantadine 10 ( $n = 10$ ), 100 ( $n = 10$ ) and 1000  $\mu\text{M}$  ( $n = 9$ ), 30 min prior to denervation; amant post-, microinjected with  $2 \mu\text{l}$  of amantadine 10, 100 and 1000  $\mu\text{M}$  ( $n = 10$  each), immediately after denervation. A significant decrease in autotomy score in all amantadine groups is observed when compared to control and vehicle (repeated measures ANOVA  $P < 0.05$ ). The difference between the amantadine groups vs. control and vehicle per day was established by a Tukey test as a post hoc ( $P < 0.05$ ) (horizontal bar).

There was a significant difference per day when comparing the amantadine groups (each one of the doses pre- and post-) vs. control and vehicle from day 13 to 25 (post hoc Tukey test,  $P < 0.05$ ). The onset showed a significant difference between groups (one way ANOVA 0.007). The Student  $t$ -test used as a post hoc showed differences ( $P < 0.05$ ) when comparing control and vehicle vs. amant post-1000  $\mu\text{M}$  and the three pre-amant groups. When comparing autotomy score between amantadine groups we did not find any differences, neither did the incidence in any of the groups (Table 1).

#### 3.4. D1 and D2 antagonists prior to amantadine group

This group showed no differences in neither autotomy score incidence nor AB onset as compared to control and vehicle (Table 1; Fig. 4).

## 4. Discussion

Our results show that NMDA and dopaminergic systems may modulate long-term nociception in the ACC, measured through AB.

Previous experimental evidence demonstrates that electrical stimulation of the cingulum bundle of the rat self-injury behavior (Pellicer et al., 1999) and the ablation of this cortex diminishes it (Saade et al., 1996). In addition to its stimulus-induced antinociceptive effects, dopamine may also tonically inhibit nociception in the mesolimbic/

mesocortical circuits, because lesion of the dopaminergic neurons of the VTA results in hyperalgesic responses and increased AB after deafferentation (Saade et al., 1997). In the same line of evidence, our group found that the VTA electrical stimulation diminishes AB and has, therefore, proposed that this could be due to an increase of dopamine release in the ACC (Sotres-Bayon et al., 2001).

The neuropathic pain model induced by denervation procedure triggers both a peripheral and central sensitization states, that have been related to AB in animals (Wall et al., 1979). In the present work such sensitization was increased by a thermocociceptive stimulus applied to the denervated zone, prior to denervation, in order to enhance AB (Coderre and Melzack, 1986; López-Avila et al., 1999). This model is fairly correlated with clinical reports in patients showing that a painful focus previous to amputation elicits a high incidence of phantom limb pain (Katz and Melzack, 1990).

#### 4.1. Dopamine and the ACC

Our findings suggest that dopaminergic mesocortical circuits within the ACC are able to inhibit long-term nociception related to mesocortical pathways. Such a role is not limited to the ACC since dopamine is an important inhibitor of nociception throughout the cerebral cortex (Burkey et al., 1999).

As far as the dopamine dose is concerned, we found that microinjections of nanomolar doses of dopamine were the most effective in diminishing the autotomy score, whereas

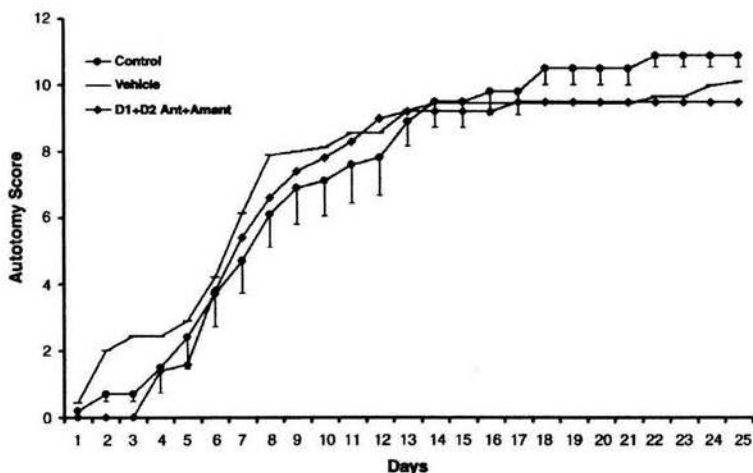


Fig. 4. Long-term nociceptive response measured through autotomy score for 25 days. Control ( $n = 10$ ) and vehicle ( $n = 14$ ). Group D1–D2 ant + amant 1000  $\mu\text{M}$  ( $n = 10$ ), with a microinjection of a mixture (1  $\mu\text{l}$ ) of SCH23390 hydrochloride, D1 receptor antagonist 30 nM (SCH-23390) and a D2 receptor antagonist 300 nM (spiperone); immediately after the microinjection of the mentioned mixture 1  $\mu\text{l}$  of amantadine 2 mM was administered into the ACC. There were no differences found between groups.

micro and millimolar doses were less effective. This is in agreement with previous evidence showing that dopamine release within the ACC and the striatum induced by chemical noxious stimulation of the rat's hind paw, or stress induced by an electrical tail shock is in the order of pico to nanomoles (Abercrombie et al., 1989; Gao et al., 2001). However, our results show an inverse dose dependent effect. The micro and millimolar doses are less effective in antinociception than the nanomolar concentration. Based on the data obtained in the present work, we are unable to support the lack of effect on autotomy score when using higher doses of dopamine. Nevertheless, it seems possible that, as reported by Fuster, the lack of pre-synaptic dopamine receptors in the mesolimbic system prevents a regulation of dopamine action through this mechanism (Fuster, 1997). Moreover, since extracellular dopamine increase can reduce post-synaptic receptor expression (Morelli et al., 1993), the subsequent desensitization would be sufficient to reduce the effect of dopamine on ACC neurons.

#### 4.2. NMDA receptor and the ACC

Antinociceptive effects of NMDA receptor antagonists in the CNS have been shown following several routes of administration (Carpenter and Dickenson, 1999; Dickenson, 1997; Eide, 2000a,b; Lutfy et al., 1997; Nikolajsen et al., 1996). Our results showed a significant decrease in nociception following the microinjection of MK801 within the ACC at both nanomolar and millimolar concentrations. Such doses have been shown to elicit antinociceptive effects

in other CNS areas (Luger et al., 1995; Nasstrom et al., 1993). These results suggest the participation of NMDA receptors in the ACC in the genesis of long-term nociception mediated through AB.

#### 4.3. Amantadine and the ACC

Our findings show that a single microinjection of amantadine into the ACC reduces significantly long-term nociception measured as AB. The 10  $\mu\text{M}$  dose was chosen because this concentration has been proven to be effective in the treatment of Parkinson disease (Kornhuber et al., 1995). The two remaining doses were increased in case there was a mayor effect on diminishing AB.

The aim of microinjecting amantadine at two different times was to investigate whether it has a prophylactic, therapeutic or both actions. Our results suggest a similar prophylactic and therapeutic effect of amantadine within a time lapse of 30 min prior to denervation to immediately after it. Despite not being a significant difference between groups, the experiments in which amantadine was administered prior to denervation showed a lower autotomy score than its post-denervation counterparts.

The antinociceptive effects of amantadine into the ACC could be related to its dual pharmacological properties. The first one relates to its capability of blocking NMDA receptors. A number of studies have shown that NMDA receptor blockade diminishes central sensitization (Eide, 2000a,b). Moreover, the administration of NMDA antagonists prior or during the induction of a nociceptive process, as seen in the above discussed experiment, is able

to reduce nociception (Bennett, 1994; Davar et al., 1991; Dickenson, 1997; Eisenberg et al., 1994; Herrero et al., 1994; Khandwala et al., 1997; Kristensen et al., 1992; Lutfy et al., 1997; Mao et al., 1992; Neugebauer et al., 1993; Nikolajsen et al., 1996, 2000; Ren et al., 1992; Suzuki et al., 2001; Takahashi et al., 1996; Tseng, 1998).

The second feature is the dopaminergic agonist action of amantadine (Karobath, 1974; Vernier et al., 1969) as illustrated by the inhibition of its uptake (Fletcher and Redfern, 1970; Heikkilä and Cohen, 1972) and an increase of its release (Brown and Redfern, 1976; Quack et al., 1995; Stromberg et al., 1970). Our results further support the possibility that the activation of the mesolimbic dopaminergic system increases dopamine release within the ACC and diminishes nociception (Saade et al., 1997; Sotres-Bayon et al., 2001).

Our findings suggest that the main inhibitory effect of amantadine in the ACC is mediated by an interaction with the mesolimbic dopaminergic system. D1 and D2 receptor antagonists block the long-term antinociceptive effect produced by the highest dose of amantadine (1000  $\mu$ M). Nevertheless, an additional antinociceptive action through the glutamatergic system cannot be discarded.

To our knowledge, this is the first study that shows both prophylactic and therapeutic antinociceptive effects of amantadine microinjections into the ACC. It is important to note that a unique dose of amantadine (200 mg IV) reduced chronic pain (Eisenberg and Pud, 1998; Pud et al., 1998) for time periods far longer than the drug's mean life and with minimal secondary effects. Our results suggest that amantadine could be efficient in the reduction of pain by deafferentation.

## 5. Conclusion

The present study suggests an interaction between dopaminergic and glutamatergic systems within the ACC in the genesis and maintenance of long-term nociception. Our results illustrate that the microinjection of dopaminergic agonists into the ACC has a greater antinociceptive effect than the NMDA receptor blockade, as far as long-term nociception measured through AB is concerned.

## Acknowledgements

This research was partially supported by CONACyT FP-28696M; IMP 3230; Scholarship CONACyT-DGEP UNAM for A.L.-A. and Fundación Miguel Alemán. We thank Ana Cecilia Estefan Torricellas for valuable suggestions and support.

## References

- Abbott FV, Melzack R. Analgesia produced by stimulation of limbic structures and its relation to epileptiform after-discharges. *Exp Neurol* 1978;62:720–34.
- Abercrombie ED, Keefe KA, DiFriscia DS, Zigmond MJ. Differential effect of stress on in vivo dopamine release in striatum, nucleus accumbens, and medial frontal cortex. *J Neurochem* 1989;52:1655–8.
- Bennett GF. Neuropathic pain. In: Melzack PWR, editor. *Textbook of pain*. Edinburgh: Churchill Livingstone; 1994. p. 201–24.
- Brown F, Redfern PH. Studies on the mechanism of action of amantadine. *Br J Pharmacol* 1976;58:561–7.
- Burkey AR, Carstens E, Jansin L. Dopamine reuptake inhibition in the rostral agranular insular cortex produces antinociception. *J Neurosci* 1999;19:4169–79.
- Carpenter KJ, Dickenson AH. NMDA receptors and pain—hopes for novel analgesics. *Reg Anesth Pain Med* 1999;24:506–8.
- Chang C, Shyu BC. A fMRI study of brain activations during non-noxious and noxious electrical stimulation of the sciatic nerve of rats. *Brain Res* 2001;897:71–81.
- Coderre TJ, Melzack R. Procedures which increase acute pain sensitivity also increase autotomy. *Exptl Neurol* 1986;92:713–22.
- Davar G, Hama A, Deykin A, Vos B, Maciewicz R. MK-801 blocks the development of thermal hyperalgesia in a rat model of experimental painful neuropathy. *Brain Res* 1991;553:327–30.
- Devinsky O, Morrell MJ, Vogt BA. Contributions of anterior cingulate cortex to behaviour. *Brain* 1995;118(Pt1):279–306.
- Dickenson AH. A mechanism of central hypersensitivity. Berlin: Springer; 1997. pp. 167–210.
- Eide PK. Clinical trials of NMDA-receptor antagonists as analgesics. In: Devor MCRaZW-HM, editor. *Proceedings of the Ninth World Congress on Pain*. Seattle, WA: ASP Press; 2000a. p. 817–32.
- Eide PK. Wind-up and the NMDA receptor complex from a clinical perspective. *Eur J Pain (London, England)* 2000b;4:5–15.
- Eisenberg E, Pud D. Can patients with chronic neuropathic pain be cured by acute administration of the NMDA receptor antagonist amantadine? *Pain* 1998;74:337–9.
- Eisenberg E, LaCross S, Strassman AM. The effects of the clinically tested NMDA receptor antagonist memantine on carrageenan-induced thermal hyperalgesia in rats. *Eur J Pharmacol* 1994;255:123–9.
- Fletcher EA, Redfern PH. The effect of amantadine on the uptake of dopamine and noradrenaline by rat brain homogenates. *J Pharm Pharmacol* 1970;22:957–9.
- Foltz E, White L. Pain 'relief' by frontal cingulotomy. *J Neurosurg* 1962; 19:98–100.
- Fuster JM. *The prefrontal cortex: anatomy, physiology and neuropsychology of the frontal lobe*. Philadelphia, PA: Lippincott; 1997.
- Gao X, Zhang YQ, Zhang LM, Wu GC. Effects of intraplantar injection of carrageenan on central dopamine release. *Brain Res Bull* 2001;54: 391–4.
- Gordon I, Weizman R, Rehavi M. Modulatory effect of agents active in the presynaptic dopaminergic system on the striatal dopamine transporter. *Eur J Pharmacol* 1996;298:27–30.
- Hassenbusch SJ, Pillay PK, Barnett GH. Radiofrequency cingulotomy for intractable cancer pain using stereotaxis guided by magnetic resonance imaging. *Neurosurgery* 1990;27:220–3.
- Heikkilä RE, Cohen G. Evaluation of amantadine as a releasing agent or uptake blocker for H3-dopamine in rat brain slices. *Eur J Pharmacol* 1972;20:156–60.
- Herrero JF, Headley PM, Parsons CG. Memantine selectively depresses NMDA receptor-mediated responses of rat spinal neurons in vivo. *Neurosci Lett* 1994;165:37–40.
- Hurt RW, Ballantine HT. Stereotactic anterior cingulate lesions for persistent pain: a report on 68 cases. *Clin Neurosurg* 1974;21:334–51.
- Johansen JP, Fields HL, Manning BH. The affective component of pain in rodents: direct evidence for a contribution of the anterior cingulate

- cortex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2001;98:8077–82.
- Karobath ME. Amantadine and D-145, an amantadine derivative, do not effect dopamine sensitive adenylate cyclase from the caudate-putamen of the rat brain. *Eur J Pharmacol* 1974;28:376–8.
- Katz J, Melzack R. Pain 'memories' in phantom limbs: review and clinical observations. *Pain* 1990;43:319–36.
- Khandwala H, Hodge E, Loomis CW. Comparable dose-dependent inhibition of AP-7 sensitive strychnine-induced allodynia and paw pinch-induced nociception by mexiletine in the rat. *Pain* 1997;72:299–308.
- Kornhuber J, Bornmann J, Hubers M, Rusche K, Riederer P. Effects of the 1-amino-adamantanes at the MK-801-binding site of the NMDA-receptor-gated ion channel: a human postmortem brain study. *Eur J Pharmacol* 1991;206:297–300.
- Kornhuber J, Quack G, Danysz W, Jellinger K, Danielczyk W, Gaell W, Riederer P. Therapeutic brain concentration of the NMDA receptor antagonist amantadine. *Neuropharmacology* 1995;34:713–21.
- Kristensen JD, Svensson B, Gordh T. The NMDA-receptor antagonist CPP abolishes neurogenic 'wind-up pain' after intrathecal administration in humans. *Pain* 1992;51:249–53.
- López-Avila A, Sotres-Bayon F, DelAngel R, Pellicer F. Time span between nociceptive stimulus and denervation modifies autotomy behavior in rat. *Analgesia* 1999;4:475–8.
- Luger TJ, Lorenz IH, Grabner-Weiss C, Hayashi T. Effect of the NMDA-antagonist, MK 801, on benzodiazepine-opioid interactions at the spinal and supraspinal level in rats. *Br J Pharmacol* 1995;114:1097–103.
- Lutty K, Cai SX, Woodward RM, Weber E. Antinociceptive effects of NMDA and non-NMDA receptor antagonists in the tail flick test in mice. *Pain* 1997;70:31–40.
- Mantz J, Milla C, Glowinski J, Thierry AM. Differential effects of ascending neurons containing dopamine and noradrenaline in the control of spontaneous activity and of evoked responses in the rat prefrontal cortex. *Neuroscience* 1988;27:517–26.
- Mantz J, Thierry AM, Glowinski J. Effect of noxious tail pinch on the discharge rate of mesocortical and mesolimbic dopamine neurons: selective activation of the mesocortical system. *Brain Res* 1989;476:377–81.
- Mao J, Price DD, Mayer DJ, Lu J, Hayes RL. Intrathecal MK-801 and local nerve anesthesia synergistically reduce nociceptive behaviors in rats with experimental peripheral mono neuropathy. *Brain Res* 1992;576:254–62.
- Morelli M, Fenu S, Pinna A, Cozzolino A, Carta A, Di Chiara G. 'Priming' to dopamine agonist-induced contralateral turning as a model of non-associative sensitization to the expression of the post-synaptic dopamine message. *Behav Pharmacol* 1993;4:389–97.
- Nasstrom J, Karlsson U, Berge OG. Systemic or intracerebroventricular injection of NMDA receptor antagonists attenuates the antinociceptive activity of intrathecally administered NMDA receptor antagonists. *Brain Res* 1993;623:47–55.
- Neugebauer V, Kornhuber J, Lucke T, Schaible HG. The clinically available NMDA receptor antagonist memantine is antinociceptive on rat spinal neurons. *Neuroreport* 1993;4:1259–62.
- Nikolajsen L, Hansen CL, Nielsen J, Keller J, Arendt-Nielsen L, Jensen TS. The effect of ketamine on phantom pain: a central neuropathic disorder maintained by peripheral input. *Pain* 1996;67:69–77.
- Nikolajsen L, Gottrup H, Kristensen AG, Jensen TS. Memantine (a *N*-methyl-D-aspartate receptor antagonist) in the treatment of neuropathic pain after amputation or surgery: a randomized, double-blinded, cross-over study. *Anesth Analg* 2000;91:960–6.
- Oades RD, Halliday GM. Ventral tegmental (A10) system: neurobiology. I. Anatomy and connectivity. *Brain Res* 1987;434:117–65.
- Pellicer F, López-Avila A, Torres-López E. Electric stimulation of the cingulum bundle precipitates onset of autotomy induced by inflammation in rat. *Eur J Pain* 1999;3:287–93.
- Peterson S. Drug microinjection in discrete brain regions, Tujunga, CA. 1998.
- Pirot S, Glowinski J, Thierry AM. Mediodorsal thalamic evoked responses in the rat prefrontal cortex: influence of the mesocortical DA system. *Neuroreport* 1996;7:1437–41.
- Ploghaus A, Becerra L, Borras C, Borsosk D. Neural circuitry underlying pain modulation: expectation, hypnosis, placebo. *Trends Cogn Sci* 2003;7:197–200.
- Pud D, Eisenberg E, Spitzer A, Adler R, Fried G, Yarnitsky D. The NMDA receptor antagonist amantadine reduces surgical neuropathic pain in cancer patients: a double blind, randomized, placebo controlled trial. *Pain* 1998;75:349–54.
- Quack G, Heselink M, Danysz W, Spanagel R. Microdialysis studies with amantadine and memantine on pharmacokinetics and effects on dopamine turnover. *J Neural Transm Suppl* 1995;46:97–105.
- Rainville P, Duncan GH, Price DD, Carrier B, Bushnell MC. Pain affect encoded in human anterior cingulate but not somatosensory cortex. *Science* 1997;277:968–71.
- Ren K, Hyldean JL, Williams GM, Ruda MA, Dubner R. The effects of a non-competitive NMDA receptor antagonist, MK-801, on behavioral hyperalgesia and dorsal horn neuronal activity in rats with unilateral inflammation. *Pain* 1992;50:331–44.
- Saade NE, Shbeir SA, Atweh SF, Jabbur SJ. Effects of cerebral cortical and striatal lesions on autotomy following peripheral neurectomy in rats. *Physiol Behav* 1996;60:559–66.
- Saade NE, Atweh SF, Babuth NB, Jabbur SJ. Augmentation of nociceptive reflexes and chronic deafferentation pain by chemical lesions of either dopaminergic terminals or midbrain dopaminergic neurons. *Brain Res* 1997;751:1–12.
- Sotres-Bayon F, Torres-Lopez E, Lopez-Avila A, del-Angel R, Pellicer F. Lesion and electrical stimulation of the ventral tegmental area modify persistent nociceptive behavior in the rat. *Brain Res* 2001;898:342–9.
- Stone TW. Responses of neurons in the cerebral cortex and caudate nucleus to amantadine, amphetamine and dopamine. *Br J Pharmacol* 1976;56:101–10.
- Stromberg U, Svensson TH, Waldeck B. On the mode of action of amantadine. *J Pharm Pharmacol* 1970;22:959–62.
- Suzuki R, Matthews EA, Dickenson AH. Comparison of the effects of MK-801, ketamine and memantine on responses of spinal dorsal horn neurons in a rat model of mono neuropathy. *Pain* 2001;91:101–9.
- Takahashi T, Yamashita H, Zhang YX, Nakamura S. Inhibitory effect of MK-801 on amantadine-induced dopamine release in the rat striatum. *Brain Res Bull* 1996;41:363–7.
- Toide K. Effects of amantadine on dopaminergic neurons in discrete regions of the rat brain. *Pharm Res* 1990;7:670–2.
- Tseng SH. Suppression of autotomy by *N*-methyl-D-aspartate receptor antagonist (MK-801) in the rat. *Neurosci Lett* 1998;240:17–20.
- Tuor UI, Malizia K, Foniok T, Papadimitropoulos R, Jarmasz M, Somorjai R, Kozlowski P. Functional magnetic resonance imaging in rats subjected to intense electrical and noxious chemical stimulation of the forepaw. *Pain* 2000;87:315–24.
- Vernier VG, Harmon JB, Stump JM, Lynes TE, Marvel JP, Smith DH. The toxicologic and pharmacologic properties of amantadine hydrochloride. *Toxicol Appl Pharmacol* 1969;15:642–65.
- Wall PD, Devor M, Inbal R, Scadding JW, Schonfeld D, Seltzer Z, Tomkiewicz MM. Autotomy following peripheral nerve lesions: experimental anaesthesia dolorosa. *Pain* 1979;7:103–11.
- Zimmermann M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain* 1983;16:109–10.