

336427



UNIVERSIDAD DEL VALLE DE MÉXICO
CAMPUS CHAPULTEPEC

ESCUELA DE QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO
INCORPORADA A LA UNAM

"EFECTO DE LA BENFOTIAMINA EN MODELOS DE
DOLOR INFLAMATORIO Y NEUROPÁTICO"

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA:

GABRIELA MARÍA SÁNCHEZ RAMÍREZ

DIR. DE TESIS: Q.F.B. ESPERANZA HERNÁNDEZ KOELIG
DR. VINICIO GRANADOS SOTO

MÉXICO, D.F.

2005

0348670



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE: M. ISIDRO HINOJOSA LÓPEZ
VOCAL: Q.F.B. ESPERANZA HERNÁNDEZ KOELIG
SECRETARIO: Q.F.B. BENJAMIN FERNÁNDEZ FERNÁNDEZ
1er. SUPLENTE: M. JUAN ANTONIO GIMÉNEZ SCHERER
2º. SUPLENTE: Q.F.B. SANTIAGO AMADO SALAZAR LÓPEZ

La parte experimental de esta tesis se realizó en el laboratorio 12 del Departamento de Farmacobiología del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (Cinvestav-Coapa) bajo la dirección del Dr. Vinicio Granados Soto.



Q.F.B. Esperanza Hernández Koelig
Director de Tesis
Interno



Dr. Vinicio Granados Soto
Director de Tesis
Externo



Gabriela María Sánchez Ramírez
Sustentante

El dolor es como las nubes; cuando estamos dentro de él sólo vemos gris tedioso y trágico; pero en cuanto se aleja y lo dora el sol del recuerdo, ya es gloria, transfiguración y majestad.

Amado Nervo

AGRADECIMIENTOS

Hoy te doy gracias señor por el don de la vida, por la salud y una familia. Por un amanecer, porque todos los días puedo volver a empezar y continuar mi camino, ni el tiempo ni la distancia podrá hacerme olvidar todo el amor recibido.

A mis abuelos

Por enseñarme la disciplina que ha fundamentado la estructura de mi vida.

A mis padres

Por darme la fuente de la vida, por ser mis dos grandes pilares, por estar atrás de mi dándome la fuerza que necesito para seguir mi camino, por su apoyo, comprensión y amor, en todos mis proyectos y exigir mi fortaleza cuando ha sido necesario, por compartir sus vidas conmigo forjando mi educación con valores y conocimientos. Nunca podré pagar tanta riqueza recibida a lo largo de mi vida y siempre estaré profundamente agradecida.

Querido papá

Me alegro que hayas elegido a mamá, gracias por tu fortaleza, tu confianza, por todo el amor que me has dado en la vida, por cuidarme, protegerme, por estar ahí y motivarme continuamente a seguir adelante, te lo agradezco de todo corazón.

Eres un gran padre y te quiero mucho.

Querida mamá

Me alegro que hayas elegido a papá, a través de ti he recibido todo el amor, ternura, sensibilidad, que una madre puede darle a sus hijos ese amor que ha quedado firme en mi corazón, gracias por tus cuidados, desvelos, protección, dedicación, cariño, apoyo, confianza, por la fuerza recibida, que me alienta a ser mejor cada día. Por estar siempre que te necesito, por hacer que mi vida sea más fácil con tus sabios consejos y comprensión, gracias ma por ser una persona maravillosa, te quiero mucho.

A mis hermanos

Ivette, Claudia, Enrique y Elizabeth, por crecer a su lado, por ser un ejemplo de dedicación y perseverancia, por consentirme, cuidarme y protegerme, por jugar, reír y llorar, por que cada uno de ustedes a influido en mi vida, gracias por su amor y estar siempre presentes en cada faceta de mi vida.

A ti mi querido hermano Eduardo

Porque aunque ya no estas presente siempre tendrás un lugar en mi corazón por que no se me olvida que fuiste tu el que me enseñó mis primeras letras y las dinámicas de estudio que hacías para que yo aprendiera a leer, gracias por haber estado al pendiente de mi y por enseñarme la nobleza de la vida.

A mis queridos sobrinos

Diana, Luis Enrique, Anaid y Sofía, por esos maravillosos momentos que me han hecho pasar que llenan mi vida de emociones y satisfacción, por su ternura, inocencia y paz, por cada una de sus travesurillas, por dejarme ver que la vida es mucho más simple cuando se ve desde 1 m de altura, por tener siempre el entusiasmo de ver hacia delante, gracias por sus sonrisas.

Jazmín Palma Martínez

Gracias peke por compartir conmigo tu amistad, cariño, confianza, por defenderme y protegerme de la gente terrestre, por esas tantas cosas que vivimos y compartimos, por ser la única CC presente en mi vida.

Dr. Vinicio Granados Soto

Mi especial agradecimiento por permitirme realizar este trabajo en su laboratorio por sus aportaciones, sugerencias y observaciones que fueron especialmente útiles, que me inspiraron y desafiaron a reflexionar aun más profundamente sobre la dimensión de alcanzar nuevos objetivos, por su tiempo, paciencia y sobre todo mucha tolerancia. Gracias.

QFB Esperanza Fernández Koelig

Gracias por su apoyo, comentarios y amistad en la realización de este trabajo.

Guadalupe Vidal Cantú

Por estar en un inicio al pendiente de este trabajo por tu tiempo, comentarios y sugerencias.

Nadia Caram Salas

Por ofrecerme tú amistad, tu confianza, por tus sabios consejos que han enriquecido mi visión de ver la vida, y por estar presente cuando lo he necesitado, pero sobre todo por compartir esas kikosas que me han hecho sonreír.

Mónica Ambriz Tututi

Por ser tan tierna, darme tu confianza y amistad, por impulsarme a seguir adelante. Gracias.

Tere, Ivone, Deysi, Jair, Fernando, Héctor, Luis Joaquín, Carlos, Adrián, Modesto,
Mis compañeros de trabajo cotidiano en el Cinvestav, con quienes tuve la oportunidad de compartir mi vida gracias por su amistad y consejos.

Al Departamento de Farmacobiología del Cinvestav (Sede-Coapa) por las experiencias recibidas, por haber prestado sus instalaciones en la realización de este trabajo y a cada una de las personas que laboran en las diversas áreas.

Gracias.

A la Universidad del Valle de México (Campus Chapultepec) por que en tus aulas conocí a mis profesores, personas que me heredaron sus conocimientos que contribuyeron a mi formación profesional y personal. Agradezco a cada una de las personas que laboran en servicios escolares especialmente a Lic. Alejandro, Raúl, Alicia y Araceli.

A mis sinodales por haber tenido la atención y amabilidad de revisar este trabajo.

A mis amigos y todas las personas que han estado presentes en mi vida, les digo que cada encuentro con ustedes me nutre, me ayuda, me enseña, cada uno de ustedes ha sido como un libro, una lección de vida que me conduce a ser la persona que soy.

ÍNDICE

FIGURAS Y TABLAS.....	IV
JUSTIFICACIÓN.....	1
RESUMEN.....	2
ABSTRACT.....	3
1. ANTECEDENTES.....	4
2. MARCO TEÓRICO.....	6
2.1. DOLOR.....	6
2.1.1. Generalidades.....	6
2.2. CLASIFICACIÓN DEL DOLOR.....	7
2.3. NOCICEPCIÓN.....	10
2.3.1. Nociceptores.....	11
2.3.2. Clasificación de los nociceptores en función de su localización.....	12
2.4. FISIOLOGÍA DEL DOLOR.....	15
2.4.1. Vías ascendentes.....	16
2.4.2. Tálamo y corteza sensorial.....	19
2.4.3. Vías de modulación del dolor.....	20
2.5. INFLAMACIÓN.....	22
2.6. SENSIBILIZACIÓN.....	25
2.6.1. Sensibilización periférica.....	26
2.6.2. Sensibilización central.....	27
2.7. DOLOR NEUROPÁTICO.....	29
2.8. DIABETES.....	34
2.9. NEUROPATÍA DIABÉTICA.....	35
2.10. VITAMINAS.....	39
2.11. TIAMINA.....	40
2.11.1. Farmacocinética.....	42
2.12. BENFOTIAMINA.....	43

3. OBJETIVOS	46
3.1. Objetivo general.....	46
3.2. Objetivos particulares.....	46
4. HIPOTESIS	47
4.1. Hipótesis alternativa.....	47
4.2. Hipótesis nula.....	47
5. MATERIAL Y MÉTODOS	48
5.1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN.....	48
5.2. FÁRMACOS.....	48
5.3. MODELO DE FORMALINA.....	49
5.3.1. Formalina en ratas normales.....	50
5.3.2. Generalidades del formaldehído.....	50
5.4. INDUCCIÓN DE DIABETES.....	51
5.5. INDUCCIÓN QUIRÚRGICA DE NEUROPATÍA.....	51
5.5.1. Prueba de umbral táctil.....	52
5.6. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	53
5.7. ANÁLISIS DE DATOS EN EL MODELO DE FORMALINA.....	55
5.8. ANÁLISIS DE DATOS EN NEUROPATÍA.....	55
5.9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	56
6. RESULTADOS	58
6.1. ESTABLECIMIENTO DE MODELOS.....	58
6.1.1. Modelo de formalina en ratas normales.....	58
6.1.2. Modelo de formalina en ratas diabéticas (2 semanas).....	59
6.1.3. Alodinia en ratas diabéticas (4 semanas).....	60
6.1.4. Alodinia en ratas normales en el modelo de Chung.....	61
6.2. EFECTO DE LA BENFOTIAMINA EN LOS DIFERENTES MODELOS DE DOLOR.....	62
6.2.1. Modelo de formalina en ratas normales.....	62
6.2.2. Modelo de formalina en ratas diabéticas (2 semanas).....	65
6.2.3. Alodinia en ratas diabéticas (4 semanas).....	67

6.2.4. Alodinia en ratas normales en el modelo de Chung.....	69
7. DISCUSIÓN.....	71
7.1. MODELO DE FORMALINA.....	71
7.2. MODELO DE FORMALINA EN RATAS DIABÉTICAS.....	72
7.3. ALODINIA EN RATAS DIABÉTICAS.....	74
7.4. MODELO DE CHUNG.....	75
7.5. EFECTO DE LA BENFOTIAMINA.....	76
8. CONCLUSIONES.....	85
9. GLOSARIO.....	86
10. REFERENCIAS.....	90
11. ANEXOS.....	105

FIGURAS Y TABLAS

FIGURAS

Figura 1	Esquema de los procesos que participan en la percepción del dolor.....	10
Figura 2	Esquema de la inervación cutánea, muscular y visceral por fibras aferentes nociceptivas, su relevo en la médula espinal y origen del sistema ascendente anterolateral.....	15
Figura 3	Clasificación de la sustancia gris de la médula espinal a nivel de la quinta vértebra lumbar.....	17
Figura 4	Representación del sistema ascendente anterolateral.....	19
Figura 5	Sistemas de modulación nociceptiva.....	23
Figura 6	Representación esquemática de la modulación en las fibras aferentes primarias en inflamación.....	25
Figura 7	Proceso de degeneración Walleriana.....	33
Figura 8	Ramificación colateral después del daño al nervio.....	34
Figura 9	Estructura de la tiamina y tiaminapirfosfato.....	41
Figura 10	Estructura de la benfotiamina.....	43
Figura 11	Esquema que muestra la ligadura de los nervios espinales L5 y L6.....	52
Figura 12	Diagrama de flujo del diseño experimental.....	54
Figura 13	Gráfica que muestra el curso temporal del dolor en el modelo de formalina en ratas normales.....	58
Figura 14	Curso temporal del dolor en el modelo de formalina en ratas diabéticas (2 semanas).....	59
Figura 15	Curso temporal de la alodinia en ratas diabéticas (4 semanas).....	60
Figura 16	Curso temporal de la alodinia inducida por la ligadura de los nervios espinales L5 y L6 en la rata.....	61
Figura 17	Efecto de la administración oral de benfotiamina.....	62
Figura 18	Curso temporal del efecto analgésico de la benfotiamina en ratas normales.....	63
Figura 19	Efecto analgésico observado después del pretratamiento (2.5 h).....	64
Figura 20	Curso temporal del efecto analgésico de la benfotiamina.....	65
Figura 21	Efecto analgésico del pretratamiento (2.5 h) observado después de la administración oral de benfotiamina.....	66

Figura 22	Curso temporal del efecto antilodínico de benfotiamina.....	67
Figura 23	Efecto antialodínico observado después de la administración oral de la benfotiamina en ratas diabéticas.....	68
Figura 24	Curso temporal del efecto antialodínico de la benfotiamina en la neuropatía inducida por la ligadura de los nervios L5 y L6.....	69
Figura 25	Efecto antialodínico observado después de la administración oral de benfotiamina en ratas ligadas de los nervios L5 y L6.....	70

TABLAS

Tabla 1	Clasificación y características principales de las fibras nerviosas de nociceptores cutáneos.....	12
Tabla 2	Clasificación y características principales de los nociceptores cutáneos.....	14
Tabla 3	Características de la benfotiamina.....	43
Tabla 4	Características fisicoquímicas del formaldehído.....	50

JUSTIFICACIÓN

La benfotiamina, un análogo de la vitamina B₁ (tiamina), ha demostrado eficacia terapéutica en el tratamiento de dolor en neuropatía diabética en humanos. Sin embargo, hasta la fecha no hay evidencia de su eficacia en modelos preclínicos de neuropatía. El propósito de este estudio fue determinar el posible efecto analgésico y antialodínico de la benfotiamina en modelos preclínicos de dolor inflamatorio y neuropático en la rata.

RESUMEN

Recientemente se ha reportado que la benfotiamina, un análogo de la vitamina B₁ (tiamina), tiene efecto analgésico en el ser humano. Sin embargo, hasta la fecha no hay datos que soporten este uso en modelos establecidos de dolor en animales. Por lo tanto, el presente estudio se diseñó para analizar el efecto de la benfotiamina en modelos de dolor inflamatorio y neuropático en la rata. La inducción de la diabetes se realizó mediante la administración de estreptozotocina (STZ; 50 mg/kg), por vía intraperitoneal a ratas Wistar hembra. Primeramente se establecieron los modelos de dolor inflamatorio (modelo de formalina en ratas normales y en ratas diabéticas de 2 semanas) y neuropático (neuropatía en ratas diabéticas de 4 semanas y el modelo de Chung). Posteriormente se realizó la determinación del tiempo idóneo de administración para alcanzar el mejor efecto analgésico de la benfotiamina. Se observó que el mejor tiempo de pre-tratamiento fue a las 2.5 h, por lo que decidimos utilizar este tiempo en los siguientes estudios. Se evaluó el posible efecto analgésico de la benfotiamina oral en el modelo de formalina en ratas normales con formalina al 1% a dosis crecientes (10-300 mg/kg) y en ratas diabéticas (2 semanas) con formalina al 0.5% a dosis crecientes (10-300 mg/kg). En ambos grupos la reducción del número de sacudidas se consideró como efecto analgésico. Además, se evaluó el posible efecto antialodínico de la benfotiamina (75-300 mg/kg) en el modelo de la ligadura de los nervios espinales L5 y L6 en ratas normales (Modelo de Chung) y en ratas diabéticas de 4 semanas (modelo de neuropatía diabética). En ambos grupos la alodinia táctil se determinó midiendo el umbral de retiro de la pata izquierda en respuesta a estimulación con una serie de filamentos calibrados (filamentos de von Frey). La benfotiamina produjo un efecto analgésico significativo y dependiente de la dosis en la segunda fase del modelo de formalina en ratas normales y diabéticas de 2 semanas. Además, la benfotiamina redujo de manera dosis dependiente la alodinia táctil en el modelo de Chung y el de neuropatía diabética, siendo mayor el efecto antialodínico en las ratas diabéticas. Estos resultados muestran que la administración oral de benfotiamina reduce el dolor inflamatorio y neuropático aun cuando el origen del dolor sea diferente y sugieren que el uso de este fármaco podría reducir ambos tipos de dolor en humanos.

ABSTRACT

It has been recently reported that benfotiamine, an analogue of vitamin B₁ (thiamine), shows analgesic activity in human beings. However, so far there are no data to support this use in established pain models in animals. Therefore, this study was designed to analyze the possible effect of benfotiamine in models of inflammatory and neuropathic pain in rats. Diabetes induction was carried out through the administration of intraperitoneal streptozotocin (STZ; 50 mg/kg) to female Wistar rats. First, inflammatory (formalin test in normal rats and in diabetic rats of 2 weeks) and neuropathic (neuropathy in diabetic rats of 4 weeks and the Chung model) pain models were established. Then, determination of best time to get the maximum analgesic effect of benfotiamine was carried out. It was observed that the best time to get the analgesic effect was a pre-treatment of 2.5 h, thus we decided to use this time in the following experiments. The possible analgesic effect of oral benfotiamine (10-300 mg/kg) in the 1% formalin test (normal rats) and in diabetic rats (2 weeks) with 0.5% formalin (10-300 mg/kg) was assessed. In both groups reduction of the flinching behaviors was considered as antinociception. Moreover, the possible antiallodynic effect of oral benfotiamine (75-300 mg/kg) in the Chung model and in diabetic rats of 4 weeks was also assessed. In both groups tactile allodynia was determined by measuring the paw withdrawal threshold to stimulation with a series of calibrated von Frey filaments. Oral administration of benfotiamine significantly produced analgesic effect during the second phase of the formalin test in normal rats (1%) and in diabetic rats of 2 weeks (0.5%). Moreover, benfotiamine reduced in a dose-dependent manner tactile allodynia in the Chung model and in the diabetic neuropathy, being higher the antiallodynic effect in the diabetic rats. These results show that oral administration of benfotiamine significantly reduces inflammatory and neuropathic pain even though the genesis of pain is different. Results suggest that the use of this drug could be able to reduce both types of pain in human beings.

1. ANTECEDENTES

La progresión de defectos sensoriales en neuropatías diabéticas periféricas en el ser humano es enigmática. Esto ilustra que existan dolor e hipoestesia persistentes al tratamiento, culminando en una pérdida de sensación protectora en los pies, predisponiendo al paciente a las lesiones perjudiciales (Thomas y Tomlinson, 1997).

La neuropatía dolorosa es una de las complicaciones a largo plazo más comunes de la diabetes (Galer et al., 2000; Kapur, 2003; Krishnan et al., 2003). Los pacientes diabéticos exhiben con frecuencia uno o más tipos de dolor evocado ante estímulos, incluyendo sensibilidad creciente a estímulos nocivos (hiperalgesia) como también a los estímulos inofensivos (alodinia) (Kapur, 2003; Shuangson et al., 2004).

El tratamiento fármaco-terapéutico del dolor neuropático se está desarrollando constantemente. Sin embargo, la mayoría de las estrategias terapéuticas utilizadas para tratar el dolor neuropático han tenido éxito limitado.

Un número de agentes que son eficaces en la clínica han demostrado aliviar solo parcialmente la hiperalgesia mecánica en este modelo (Courteix et al., 1994). Sin embargo, algunos tratamientos clínicos eficaces como los antidepresivos tricíclicos son ineficaces en la rata diabética inducida por

estreptozotocina (STZ) y los agentes tales como morfina no alivian el dolor en el paciente neuropático (Courteix et al., 1994; Calcutt et al., 1996). A pesar de estas discrepancias, este modelo se utiliza comúnmente en la investigación del dolor de origen diabético.

En los comienzos de 1950 un grupo japonés desarrolló varios derivados de la tiamina (las alitiaminas). La benfotiamina fue sintetizada por primera vez en 1960 (Fujiwara, 1954). Ésta es un análogo de la vitamina B₁ liposoluble con capacidad de alcanzar varios órganos en los animales y los seres humanos (Woelk et al., 1998). La superioridad de las características farmacocinéticas de la benfotiamina a los del clorhidrato de tiamina fue demostrada en animales y seres humanos (Wada, 1961) y el mecanismo de captura y transporte de benfotiamina en la sangre fue documentado por Shindo (1976).

La benfotiamina ha demostrado tener eficacia terapéutica en el tratamiento de polineuropatía alcohólica (Woelk et al., 1998) y de la neuropatía diabética dolorosa (Winkler, 1999; Haupt et al, 2005) en seres humanos. Sin embargo, hasta ahora no hay evidencia sobre la eficacia de la benfotiamina en modelos preclínicos de dolor inflamatorio y neuropático. Por lo tanto, el propósito de este estudio fue determinar el posible efecto analgésico y antialodínico de la benfotiamina en modelos de dolor inflamatorio y neuropático en la rata.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. DOLOR

2.1.1. Generalidades

El dolor es una sensación desagradable localizada en una parte del cuerpo. A menudo se describe en términos de un proceso penetrante o destructor de tejidos (ej, en puñalada, quemante, retorcido, desgarrador, como una presión), de reacción emocional o corporal (ej, terrorífico, nauseabundo) o ambas. Estas propiedades ilustran la dualidad del dolor: es una sensación y una emoción. (Fields y Martín, 1994)

Cada individuo aprende el significado de la palabra dolor a través de la experiencia personal; tiene múltiples causas, diversas características anatómicas y fisiopatológicas y variadas interrelaciones con aspectos psicológicos y culturales. La "International Association for the Study of Pain" (IASP) define el dolor como una experiencia sensorial y emocional desagradable asociada con daño tisular real o potencial o descrito en términos de dicho daño. Esta definición incorpora varios elementos: el dolor es una experiencia individual, una sensación, evoca una emoción y ésta es desagradable. Por otra parte, muchas personas refieren dolor en ausencia de daño tisular o causa fisiopatológica conocida. Sin embargo, esta experiencia debe ser aceptada como dolor, puesto que no hay manera de distinguirla de aquella debida a un daño tisular efectivo; sin embargo, se puede ver como una relación o efecto psicosomático.

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

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

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

2.2. CLASIFICACIÓN DEL DOLOR

Existen muchos tipos de dolor debido a la gran cantidad de factores que influyen al presentarse la percepción dolorosa, entre los que se encuentran el estado emocional, estrés, sexo, edad, raza, experiencias previas, factores culturales, personalidad, condicionamiento del individuo, etc. (Forth et al., 1995), los cuales pueden agruparse en factores anatómicos, fisiológicos y psicológicos (Turk y Okifuji, 1999).

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

- 1) **Nocicepción:** la palabra nocicepción se deriva de la raíz latina "nocere" que significa daño o lesión y se define como la respuesta desencadenada por el sistema nervioso ante un estímulo nocivo (García y Herrero, 1998).
- 2) **Percepción del dolor:** se genera frecuentemente por lesión o enfermedad, así como por daños en el sistema nervioso central y periférico. En el dolor agudo la percepción del dolor se asocia a reflejos autonómicos y somáticos, pero estos desaparecen en el dolor crónico.
- 3) **Sufrimiento:** es un estado desagradable que se presenta cuando la integridad física o psicológica del individuo es amenazada (Cassell, 1982).
- 4) **Conductas del dolor:** son el resultado del dolor y el sufrimiento que experimenta la persona y se atribuyen al daño en el tejido. Ejemplos de estas conductas son el cojear, el hacer muecas, el decir "ouch", entre otras.

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

Björkman (1995) clasifica el dolor de acuerdo a la región anatómica donde se produce en:

- **Somatosensorial** (originado en la piel o tejido conectivo, hueso, músculo y membranas sinovial y articular).

- **Visceral** (dolor procedente de las distintas vísceras abdominales o torácicas).
- **Neurogénico** (se refiere al dolor que se produce debido al daño o irritación en el sistema nervioso).

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

- 1) **Dolor transitorio:** se activa por nociceptores cutáneos u otros tejidos del cuerpo en ausencia de daño tisular, su función es la de proteger al individuo de un posible daño físico provocado por el medio ambiente o estrés excesivo sobre el tejido.
- 2) **Dolor agudo:** funciona como señal de alarma del tejido lesionado, por lo que posee una función biológica protectora. Las secuelas psicológicas no son importantes y el dolor desaparece con la lesión que lo originó (Cerveró y Laird, 1995). El dolor agudo se activa por la estimulación de nociceptores presentes en el tejido dañado.
- 3) **Dolor crónico:** más que asociarse con una función protectora, es un síntoma de alguna enfermedad como neuralgia (Beric, 1997) o fibromialgia (Butler et al., 1997). Este tipo de dolor no es un proceso autolimitado por lo que puede persistir por meses o incluso años (Cerveró y Laird, 1995), se ha asociado a múltiples comportamientos frustrantes denominados con frecuencia conductas del dolor, entre las que destacan la ansiedad, depresión, insomnio, miedo, histeria, entre otros factores psicológicos y sociales (Hyman y Cassem, 1995).

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

- 1) **Dolor rápido o primario:** es una sensación corta que se percibe 0.1 segundos después del estímulo doloroso como un dolor punzante, repentino y bien localizado, se debe a la activación de fibras A δ (Zimmermann, 1984).
- 2) **Dolor lento o secundario:** es una sensación quemante, prolongada, difusa y de carácter desagradable que se presenta después de 1 segundo o más de haberse aplicado el estímulo y se debe a la activación de fibras C (Zimmermann, 1984).

2.3. NOCICEPCIÓN

El componente sensorial del dolor se denomina **nocicepción**. Es un término neurofisiológico que se refiere a los mecanismos neuronales por los cuales se detectan los estímulos nocivos (Hyman y Cassem, 1995). La nocicepción comprende 4 etapas (Figura 1).

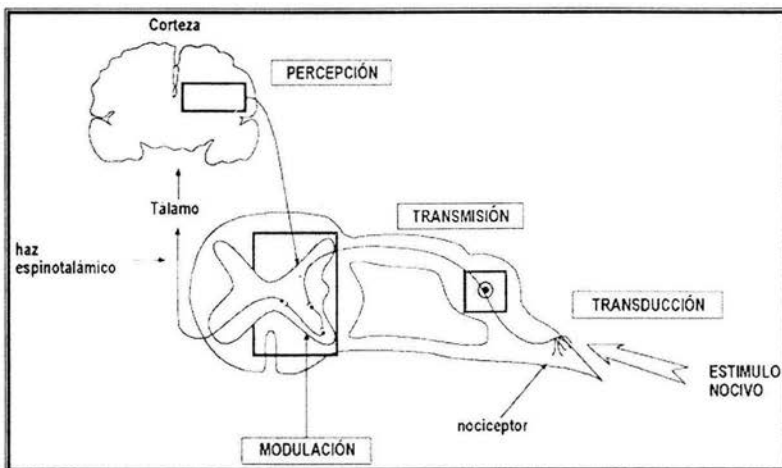


Figura 1. Esquema de los procesos que participan en la percepción del dolor.

- 1) **Transducción:** Es la conversión del estímulo nocivo en señales eléctricas o potenciales de acción a través de terminales nerviosas periféricas (nociceptores).
- 2) **Transmisión:** En este punto se lleva a cabo la propagación de las señales eléctricas a lo largo de las vías nociceptivas hasta el asta dorsal de la médula espinal.
- 3) **Modulación:** En esta etapa las señales se integran en el asta dorsal y en ella se entrecruzan diferentes tipos de terminales nerviosas donde se liberan neurotransmisores que inhiben, alteran o amplifican la señal sensorial.
- 4) **Percepción:** Es el proceso por el cual se integran los impulsos nociceptivos con factores cognoscitivos y emocionales para crear la experiencia subjetiva de dolor. Cuando la señal llega a este punto el individuo es capaz de detectar, localizar e identificar el origen del dolor.

2.3.1. Nociceptores

Los nociceptores se encuentran anatómicamente distribuidos en tres zonas principales: la piel, las estructuras músculo-esqueléticas y las vísceras. Estos receptores traducen los estímulos mecánicos, térmicos y químicos en una serie de potenciales de acción que transmiten a lo largo de sus axones hasta la médula espinal.

Debido a su capacidad de responder a estímulos dolorosos, los nociceptores también han sido llamados "receptores del dolor", lo cual no es estrictamente correcto, ya que no todas las sensaciones dolorosas son debidas a la activación de este grupo de receptores, ni toda estimulación de los nociceptores produce siempre una sensación

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

Los nociceptores se pueden clasificar en función de su respuesta a diferentes tipos de estímulos, propiedades y velocidad de conducción de sus axones periféricos, las diferentes respuestas que se presentan ante un estímulo (Srinivasa et al., 1988) y su localización. A continuación se presenta la clasificación de los nociceptores en función de sus propiedades y velocidad de conducción de sus axones periféricos (Tabla 1).

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

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

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

2.3.2. Clasificación de los nociceptores en función de su localización

Nociceptores cutáneos

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

Presentan tres propiedades fundamentales:

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

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

Nociceptores musculares

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

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

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

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

Nociceptores articulares

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

Nociceptores viscerales o silenciosos

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

Nociceptores óseo

Son fibras A δ o C localizadas alrededor del periostio.

Nociceptores dentales y de córnea

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

4.4. FISIOLÓGÍA DEL DOLOR

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

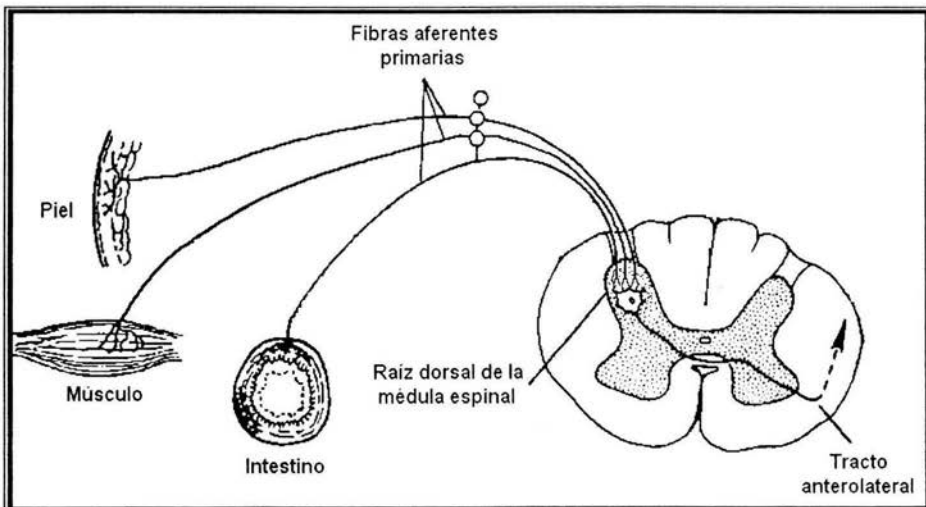


Figura 2. Esquema de la inervación cutánea, muscular y visceral por fibras aferentes nociceptivas, su relevo en la médula espinal y origen del sistema ascendente anterolateral. Modificado de Jesell y Kelly (1991).

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

Rexed (1952) divide la sustancia gris de la médula en 10 láminas (Figura 3), de las cuales tienen especial importancia la capa marginal de Waldeyer (lámina I), la sustancia gelatinosa (lámina II), el núcleo propio (láminas III-VI) y el área que rodea el conducto central (lámina X).

Los axones de la mayoría de las neuronas de dichas láminas constituyen el sistema espinotalámico (Sorkin, 1997). Las láminas del I-VI forman el asta dorsal de la medula espinal. Dentro del asta dorsal los nociceptores primarios terminan en neuronas de proyección y en interneuronas excitatorias e inhibitorias (Hyman y Cassem, 1995).

2.4.1. Vías ascendentes

Los axones procedentes de las neuronas de proyección forman las vías ascendentes que portan el mensaje nociceptivo a centros superiores. Las principales vías se agrupan en dos sistemas generales (García y Herrero, 1998):

- **El sistema de las columnas dorsales-lemnisco interno**
- **El sistema anterolateral**

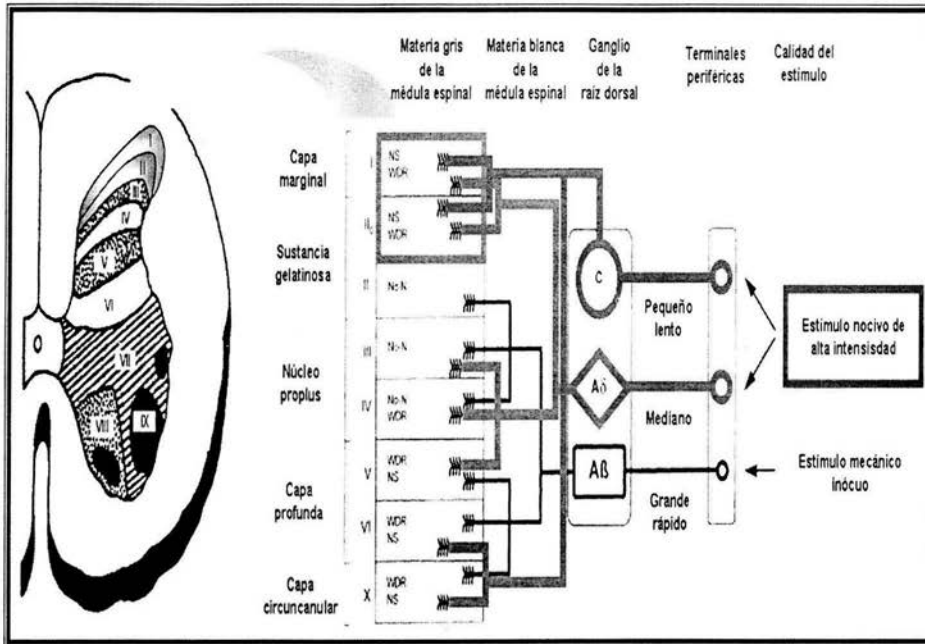


Figura 3. Clasificación de la sustancia gris de la médula espinal a nivel de la quinta vértebra lumbar según Rexed (1952) y proyección de las FAP hacia la médula espinal. Modificado de Millan (1999).

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

Las fibras del sistema anterolateral se originan principalmente en las láminas I, IV-VII y X del asta dorsal, las cuales reciben aferencias de fibras Aδ y C (García y Herrero, 1998). Al salir del asta dorsal se cruzan al lado opuesto y ascienden por las columnas laterales de la médula para terminar a distintas alturas del tronco encefálico y en el tálamo (Figura 4).

Se dividen filogenéticamente en dos ramas:

- 1) **El sistema neoespinotalámico** que comprende el haz espinotalámico lateral.
- 2) **El sistema paleoespinotalámico** que abarca el haz espinotalámico medio, el haz espinorreticular y el haz espinomesencefálico.

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

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

El haz espinorreticular se origina en las láminas VII, VIII y X. Es una vía directa de la médula espinal a la formación reticular y bulbo raquídeo. El haz espinomesencefálico sus fibras se originan de las láminas I, V, VII y X proyectándose hasta el subnúcleo lateral de la sustancia gris periacueductal y otras estructuras.

2.4.2. Tálamo y corteza sensorial

La sensación de dolor comprende dos componentes distintivos: el sensorial-discriminativo y el componente afectivo-motivacional.

El elemento sensorial-discriminativo está mediado principalmente por el complejo ventro-basal del tálamo y por la corteza somatosensorial.

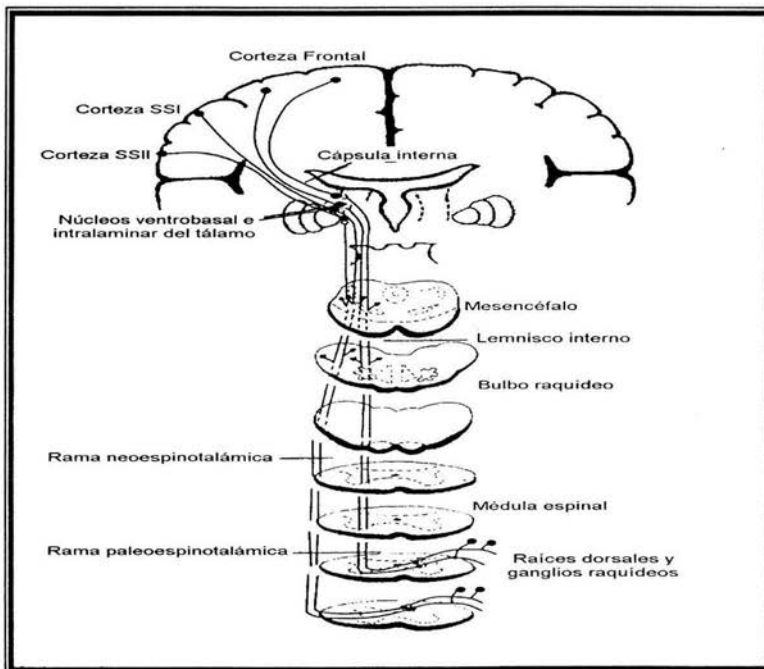


Figura 4. Representación del sistema ascendente anterolateral. Modificado de Guyton y Hall (1996).

El tálamo está constituido por los núcleos que forman el complejo ventroposterior: núcleo ventral posterolateral (que recibe aferencias del tronco y los miembros), núcleo ventral posteromedial (con aferencias de la cara) y partes parvocelulares (que reciben aferencias de las vísceras).

Es una zona de relevo con interneuronas y neuronas de proyección que envían sus axones a la corteza somatosensorial.

La corteza somatosensorial ocupa la circunvolución parietal ascendente (Figura 5), y se divide en la corteza somatosensorial primaria (SI) la cual recibe una gran cantidad de aferencias directas del tálamo y en la corteza somatosensorial secundaria (SII) que recibe la mayoría de sus aferencias de la corteza somatosensorial primaria (García y Herrero, 1998). Esta región es particularmente importante debido a que participa en el carácter discriminativo del dolor (Fields y Martin, 1994).

Los axones del haz espinotalámico conectan también con las regiones talámicas mediales unidas con la corteza frontal y el sistema límbico. Esta vía favorece la dimensión afectiva o desagradable del dolor (Fields y Martin, 1994). La corteza somestésica está conectada con ganglios basales, conexiones asociativas, conexiones callosas y con núcleos de relevo, formando así, algunas de las vías descendentes (García y Herrero, 1998).

2.4.3. Vías de modulación del dolor

El poderoso efecto de lo que se espera y otras variables sobre la intensidad percibida del dolor implican la existencia de circuitos cerebrales que pueden modular la actividad de las vías transmisoras del dolor. Este circuito une al hipotálamo, el mesencéfalo y el bulbo raquídeo y controla selectivamente las neuronas medulares que transmiten el dolor a través de una vía descendente.

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

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

Las estructuras mesencéfalicas contienen neuronas de encefalina, dinorfina, serotonina y neurotensina que proyectan al NRM y NGC. Estas neuronas hacen sinapsis con neuronas serotoninérgicas en el asta dorsal, las cuales descienden por el funículo dorsolateral y mandan sus terminales a las láminas I, II, V y IX de la médula espinal (Bonica, 1987).

Otros sistemas que funcionan como moduladores del dolor son: el sistema descendente hipotálamo-espinal que se origina en el núcleo hipotalámico paraventricular y medial, el cual se encuentra formado principalmente por neuronas de vasopresina y oxitocina, aunque también existen neuronas ricas en endorfinas.

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

2.5. INFLAMACIÓN

La inflamación es la expresión de las alteraciones que se producen en respuesta a una lesión o una agresión a un tejido. Se caracteriza según Cornelius Celsus (30 AC-38 DC) por dolor, rubor, calor y tumefacción. Estos signos aparecen como consecuencia de alteraciones locales de los vasos sanguíneos que conducen a vasodilatación, aumento de la permeabilidad vascular y aumento de la receptividad histica por los leucocitos, fenómenos que dan lugar a un acumulo de células inflamatorias en el lugar de la lesión. Por lo tanto, la inflamación es el resultado de la liberación de una mezcla compleja de citocinas y otros agentes neuroactivos (bradicinina e histamina entre otros) de células inflamatorias y no inflamatorias en el sitio donde se presenta daño tisular (Figura 6). Estos mediadores químicos se unen a receptores y canales iónicos específicos en las terminales periféricas de los nociceptores. Una vez que se unen a los receptores activan varias cascadas de transducción que resulta en una modulación

post-transduccional inmediata de moléculas efectoras, seguida de cambios en la transcripción de genes (Costigan y Wolf, 2000).

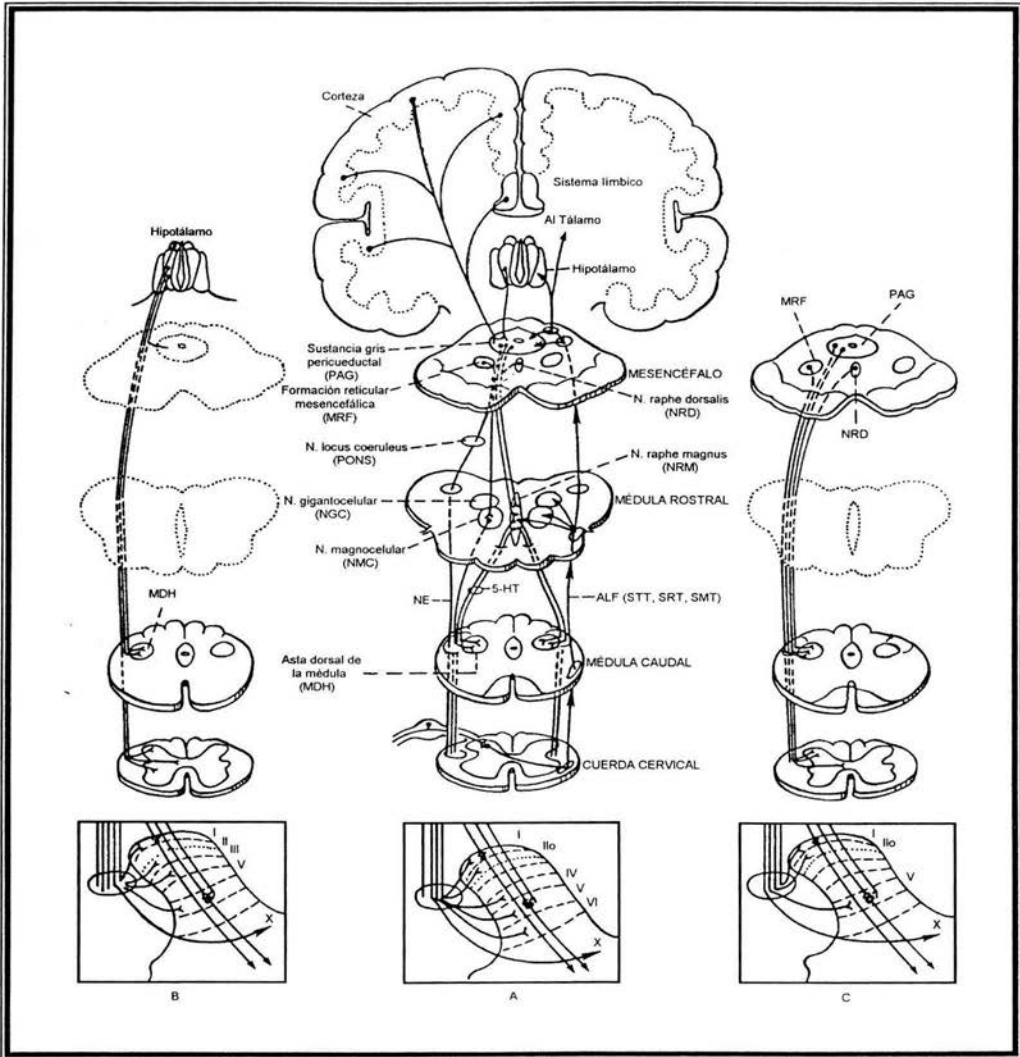


Figura 5. Sistemas de modulación nociceptiva: A) Sistema anterolateral ascendente (ALF); B) Sistema hipotálamo-espinal descendente y C) Sistema PAG-espinal. Modificado de Bonica (1987).

Como resultado del daño tisular, las células dañadas liberan ATP y protones en el sitio de lesión (Burnstock y Wood, 1996; Waldmann y Lazdunski, 1998). Los mastocitos liberan serotonina (5-HT), histamina y metabolitos del ácido araquidónico, incluyendo prostaglandinas (Dray, 1995; Bley et al., 1998). Los macrófagos mediadores inflamatorios como interleucina (IL1 e IL6), factor de necrosis tumoral α (TNF α), factores de crecimiento y factor inhibitorio de leucemia (LIF) (Dray, 1995; Levine y Reichling, 1999).

La bradicinina, sintetizada a partir de la fragmentación del cininógeno, se libera de múltiples tipos de células (Walker et al., 1995). La COX-2 se induce en el tejido inflamado (O'Banion, 1999) y produce prostaglandinas. Las fibras aferentes primarias contribuyen a la mezcla de mediadores inflamatorios liberando neuropéptidos como la sustancia P y el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP), las cuales inician una respuesta neurogénica a nivel periférico, así como en algunas células inflamatorias (Woolf et al., 1996).

Algunos de estos agentes inflamatorios como los protones y ATP pueden despolarizar directamente las fibras aferentes primarias a través de la activación de receptores ASICs (canales iónicos de sodio sensibles a ácido) y P2X3 (un subtipo específico de canal iónico sensible a ATP), respectivamente. Por consiguiente, el flujo sensorial que se genera puede percibirse como dolor. Existe una mayor cantidad de mediadores inflamatorios que sensibilizan las terminales nerviosas que aquellos que las activan directamente.

2.6. SENSIBILIZACIÓN

El umbral de activación de los nociceptores aferentes primarios se reduce cuando hay lesión o inflamación y la frecuencia de emisión de impulsos se eleva para todas las intensidades del estímulo (Fields y Martín, 1994). Por lo tanto, la sensibilización se refiere al aumento de la probabilidad de disparo de las neuronas en respuesta a un estímulo adicional.

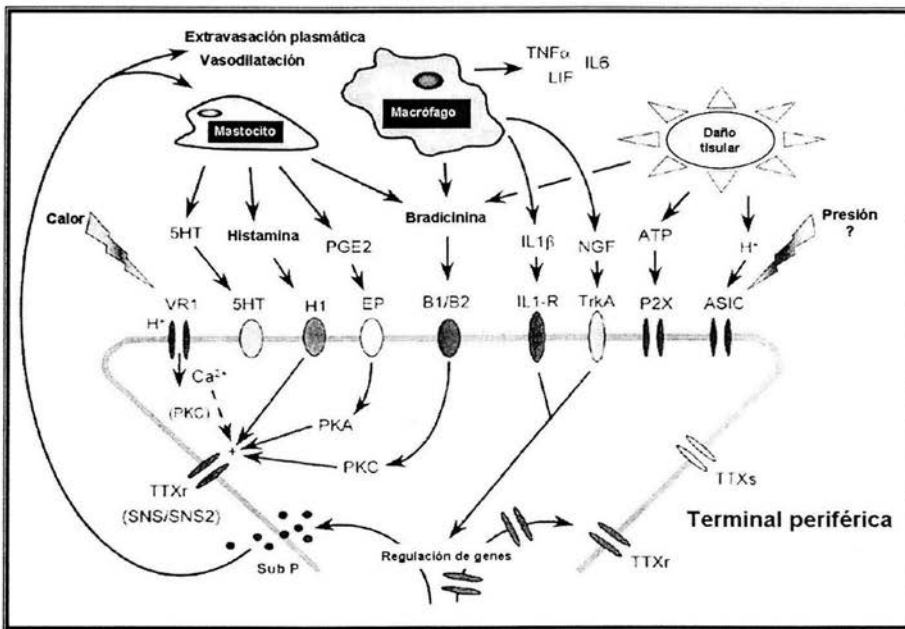


Figura 6. Representación esquemática de la modulación en las fibras aferentes primarias en inflamación. Los múltiples mediadores inflamatorios liberados por células inflamatorias y no inflamatorias en el sitio de lesión actúan en las terminales periféricas iniciando cambios post-transduccionales (sensibilización periférica) y transcripcionales en moléculas de señalización. Los mastocitos, los macrófagos, y las células dañadas en el sitio de lesión liberan múltiples mediadores neuroactivos, disminuyendo el umbral de activación de las neuronas, a través de la fosforilación de canales de sodio TTX-r mediada por PKA y PKC. La regulación a la alta de sustancia P y canales de sodio TTX-r también ocurren por la activación de receptores TrkA por moléculas de señalización neuroactivas como el NGF y la IL-1 β . La sustancia P liberada de las terminales periféricas produce la extravasación del plasma, un incremento en los niveles de canales de sodio TTX-r y un aumento en la capacidad de la célula para ser despolarizada.

Esta hipersensibilidad se manifiesta como una respuesta exagerada y una disminución en la latencia de la respuesta a un estímulo nocivo o inocuo. En contraste, la excitabilidad es una despolarización rápida y directa del nociceptor, seguido por un pico de actividad y la inducción de potenciales de acción.

La sensibilización es un proceso clínicamente importante que contribuye a la inflamación y a la hiperalgesia. El daño provocado en un tejido por agentes irritantes, calor, estimulación eléctrica o mecánica produce dos zonas principales de dolor:

- 1) **Zona de hiperalgesia primaria:** que comprende la región del tejido dañado y que se caracteriza por dolor espontáneo y aumento de la sensibilidad al calor o a estímulos mecánicos y químicos. Alrededor de esta área se encuentra la zona de hiperalgesia secundaria.
- 2) **Zona de hiperalgesia secundaria:** la cual se despliega un aumento de la sensibilidad a los estímulos mecánicos, pero no térmicos.

2.6.1. Sensibilización periférica

La hiperalgesia primaria que se origina después del daño al tejido y es el resultado de cambios en la sensibilidad, la transducción, la respuesta y la actividad de los nociceptores periféricos.

La sensibilización periférica produce un proceso inflamatorio generado por la pérdida del contenido intracelular que invita al reclutamiento de células inflamatorias que intervienen en la producción y liberación de agentes neuroactivos. Estos agentes son iones K^+ e H^+ (Woolf et al., 1996), aminas (5-hidroxitriptamina, histamina) (Dray,

1995; Bley et al., 1998), cininas (bradicinina) (Bley et al., 1998), prostaglandinas (prostaglandina E₂) (Woolf et al., 1996), purinas (adenosin trifosfato) (Dray, 1995), óxido nítrico, citocinas (interleucinas-1 y 8), factores de crecimiento (factor de crecimiento neuronal) (Dray, 1995) y factor de necrosis tumoral α (Dray, 1995). Es importante destacar que algunos de estos agentes por si solos pueden ser suficientes para activar receptores específicos de la terminal periférica (aferente primaria o nociceptor) (Woolf et al., 1999).

Estas sustancias pueden originar la liberación de más agentes inflamatorios, aumentando las corrientes entrantes de sodio y calcio produciendo disparos despolarizantes y por lo tanto un aumento de la excitabilidad neuronal. La baja afinidad de los receptores AMPA incrementa cuando existe entrada de calcio y sodio, produciendo despolarización de las células del asta dorsal de la medula espinal. Esto se manifiesta como potenciales postsinápticos excitatorios rápidos y como la sensación de estímulos nociceptivos periféricos desagradables localizados, de corta duración e intensidad (Yoshimura y Nishi, 1993). Una estimulación más intensa o prolongada de las fibras C da como resultado la liberación adicional de péptidos y proteínas neuromoduladoras que contribuyen a la generación de una despolarización sostenida.

2.6.2. Sensibilización central

Se caracteriza por un incremento progresivo de la excitabilidad durante y después de un estímulo repetitivo (Silvotti et al., 1993; Miller y Woolf, 1996). La sensibilización central se inicia por la liberación de neurotransmisores y

neuromoduladores (glutamato, sustancia P y el factor neurotrófico derivado de cerebro, BDNF) después de un tren de disparos repetidos. La estimulación de las fibras A δ y C produce la liberación de glutamato en las terminales centrales de estas fibras. El glutamato se une a un gran número de subtipos de receptores con diferente afinidad. Dentro de estos receptores se encuentran los receptores ionotrópicos NMDA y AMPA, así como los receptores de glutamato metabotrópicos. El glutamato se une con mayor afinidad a los receptores de NMDA, pero en condiciones normales (potencial de membrana en reposo), este canal iónico se encuentra bloqueado por el ión magnesio que se sitúa en el poro del receptor. El glutamato liberado activa canales AMPA que generan una despolarización suficiente provocando la remoción del tapón de magnesio del receptor NMDA. Esto produce la activación de un número considerable de vías de transducción en el asta dorsal que dan como resultado una corriente entrante de calcio que se suma al calcio liberado de los depósitos intracelulares. El calcio intracelular es capaz de activar proteínas cinasas (C, A, cinasas calcio-calmodulina y tirosinas cinasas) encargadas de fosforilar canales y a otras cinasas como *src* (Zirrgiebel et al., 1995; Iwasaki et al., 1998) que a su vez participan en la activación de receptores de canales iónicos de membrana de tipo NMDA y AMPA, provocando una mayor concentración de calcio intracelular. Este fenómeno produce un aumento en la transcripción de genes (Heath et al., 1994) para ciclooxigenasa y sintasa de óxido nítrico (Bley et al., 1998) que van actuar sintetizando prostaglandinas y óxido nítrico (Wang y Salter, 1994; Yu et al., 1997). El conjunto de todos los eventos provoca un aumento de las respuestas a glutamato, incrementando la frecuencia y fuerza de disparos ante un estímulo previo (Costigan y Woolf, 2000) facilitando la sensibilización central.

2.7. DOLOR NEUROPÁTICO

El dolor neuropático es uno de los problemas más importantes en el campo del dolor crónico y es un tipo de dolor frecuentemente encontrado en la práctica clínica. El éxito en su tratamiento permanece aún distante en muchas ocasiones. Su reconocimiento como un factor importante en el campo del dolor ha sido tardío y el diagnóstico es complicado frecuentemente por el hecho de que ese dolor puede comenzar como un problema sobre todo nociceptivo y luego progresivamente puede convertirse en algunos casos en una mezcla de dolor nociceptivo y neuropático.

El dolor neuropático puede ser debido al daño primario al sistema nervioso periférico o central, y por lo tanto, las clasificaciones clínicas distinguen entre las neuralgias de los nervios periféricos (neuralgia del trigémino) o del dolor neuropático central (síndrome talámico) (Zimmermann, 2001). El dolor neuropático se define como una experiencia sensorial y emocional desagradable asociada con la disfunción o lesión del sistema nervioso central o periférico (Tremont-Lukats et al, 2000).

La presencia del dolor neuropático puede deberse a una neuropatía la cual es un disturbo de la función o un cambio patológico:

- Mononeuropatía: un nervio
- Mononeuropatía múltiple: varios nervios
- Polineuropatía: difusa o bilateral

Las lesiones periféricas del nervio pueden generar un síndrome que abarca, además de dolor espontáneo, respuestas exageradas al tacto ligero (alodinia táctil) y a

los estímulos de la temperatura (hiperalgesia térmica) (Chaplan, 1994). Diversos estudios comentan que de los diferentes tipos de dolor que se acompañan de procesos neuropáticos, la alodinia que deriva de la palabra griega "allo" que significa otro y "odyne" que significa dolor puede ser el síntoma más común y su intensidad se correlaciona con la gravedad del dolor de fondo. La alodinia táctil es probablemente la más común de las respuestas evocadas ante un estímulo y este signo sirve como un marcador de dolor neuropático.

La IASP la define como dolor producido por un estímulo que normalmente no produce dolor, es decir sensibilidad táctil aumentada con dolor. Una clasificación fenomenológica se relaciona con el tipo de daño o de fisiopatología relacionada que causa un desorden neuropático doloroso (Zimmermann, 2001):

- Neuropatías por compresión (lesión mecánica del nervio como el síndrome del túnel de Carpio).
- **Neuropatías periféricas dolorosas** (algunos casos de neuropatías diabéticas periféricas, una complicación de la diabetes que afecta el tejido nervioso, neuropatías asociadas al VIH).
- Neuropatía postherpética - dolor persistente o recurrente en la zona de la erupción del herpes zoster (culebrilla).
- Mecanismos inmunológicos (Esclerosis múltiple, dolor en varios lugares de los miembros inferiores y superiores).
- Neuralgia del trigémino (periodos de dolor facial agudo y punzante cerca de la nariz, la boca, los ojos y las orejas, intercalados con períodos sin dolor).

- Dolor del miembro fantasma (una sensación de dolor que se origina de una zona de un miembro amputado).
- Dolor posterior al accidente cerebrovascular.
- Dolor neuropático relacionado con el cáncer (inducido por el tumor o la quimioterapia).

Los síntomas clínicos que se presentan en los pacientes con dolor neuropático son:

- a) Dolor espontáneo de tipo ardoroso, intermitente, agudo, en puñalada fulgurante o lancinante, típicamente tiene un carácter quemante con hormigueo o parecido a una descarga eléctrica y puede desencadenarse por contacto ligero.
- b) Parestesias: son sensaciones anormales espontáneas o evocadas.
- c) Hiperalgesia térmica: aumento de la sensibilidad a estímulos térmicos tanto por calor como por frío.
- d) Hiperestesia: una respuesta excesiva al tacto, por ejemplo el roce de las sábanas.

Los modelos parciales de transección del nervio en animales de laboratorio han ayudado a identificar mecanismos neuropáticos del dolor. Estos mecanismos incluyen (Koltzenburg, 1998):

- a) Generación de la actividad ectópica espontánea como resultado de la expresión o de la redistribución creciente de los canales de sodio.
- b) Un interruptor fenotípico del perfil funcional de neuronas sensoriales por la expresión alterada de los canales de sodio y potasio, de los receptores

adrenérgicos y de los transmisores (sustancia P, péptido intestinal vasoactivo, BDNF).

- c) Ramificación de las fibras simpáticas al ganglio de la raíz dorsal.
- d) Ramificación de las fibras A β -aférentes mielínicas de bajo umbral en el asta dorsal que entran en contacto con las neuronas inervadas normalmente por las fibras C.
- e) Una pérdida del mecanismo inhibitorio en el asta dorsal como resultado de la desinhibición central.

Después de la lesión y transcurrido un intervalo de varios días a semanas surgen descargas espontáneas persistentes de fibras aferentes pequeñas en el sitio lesionado, el ganglio de la raíz dorsal (DRG) del nervio lesionado y de neuronas en el asta dorsal ipsilateral. Esta actividad espontánea no se observa en axones no lesionados.

La lesión del axón origina degeneración Walleriana (Figura 7). El axón lesionado comienza a rearborizar y envía un cono de crecimiento que intenta regenerarlo siguiendo la vaina neural original. Por lo que si se ha alterado la integridad de la vaina, se frustrará el nuevo crecimiento satisfactorio y se originarán acumulaciones locales de arborizaciones llamadas neuomas que están constituidos no sólo por los axones en brote, sino también están vascularizados y desarrollan inervación simpática importante.

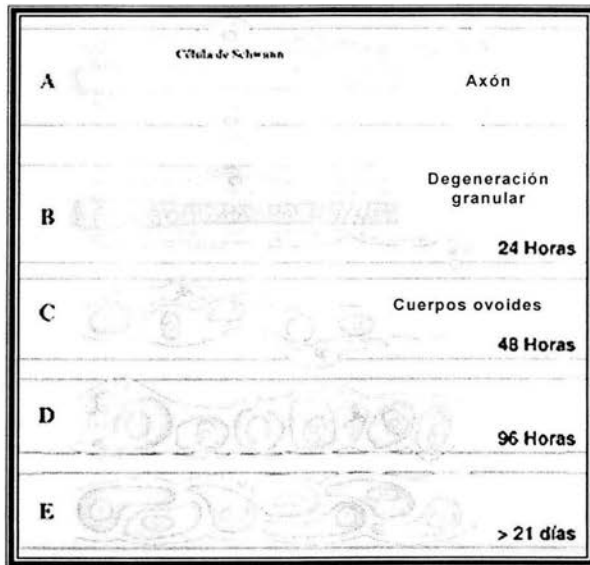


Figura 7. Proceso de degeneración Walleriana que se inicia con la degeneración granular y la infiltración de macrófagos y continúa con la pérdida de la vaina mielínica y la proliferación de células de Schwann.

El cono de crecimiento posee propiedades de transducción que no tenía el axón original y que consisten en sensibilidad mecánica y química importantes. En el axón en regeneración se expresan nuevos canales iónicos o receptores que no se encuentran en nervios normales.

En condiciones fisiológicas normales, las aferentes primarias tienen sus terminales en láminas específicas de la médula espinal. Las fibras nociceptivas de diámetro pequeño mielinizadas (fibras A δ) y fibras no mielinizadas (fibras C) que conducen estímulos de alto umbral (nociceptivos) tienen sus terminales en las láminas superiores de la médula, mientras que las neuronas de diámetro grande mielinizadas (fibras A β) que conducen impulsos de bajo umbral (no nociceptivos) tienen sus

terminales en láminas inferiores. Cuando hay una axotomía, las fibras grandes mielínicas ramifican en zonas de las láminas superiores (Figura 8).

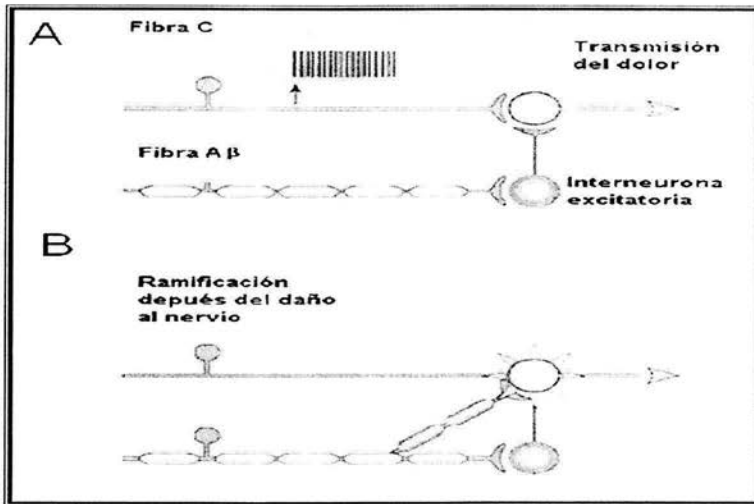


Figura 8. (A) Después del daño al nervio, las fibras nociceptivas A β hacen contacto con interneuronas excitatorias y éstas a su vez con fibras C a nivel del asta dorsal de la médula espinal. (B) Este reajuste forma nuevas conexiones con neuronas nociceptivas (fibras C) en las láminas I y II que contribuyen a una hipersensibilidad persistente caracterizada en dolor neuropático. Modificado de Scholz y Woolf (2002).

2.8. DIABETES

La diabetes mellitus es un grupo de síndromes caracterizados por hiperglucemia, alteración del metabolismo de lípidos, carbohidratos y proteínas; y un incremento de complicaciones vasculares. Algunos pacientes pueden clasificarse de acuerdo a las manifestaciones clínicas que presentan en diabetes mellitus tipo I (insulino dependientes) o diabetes mellitus tipo II (no insulino dependientes) (Alberti y Zimmet, 1998).

La incidencia de cada uno de los tipos de diabetes varía en el mundo. En Estados Unidos cerca del 5-10% de todos los pacientes diabéticos tienen diabetes tipo I. En contraste, cerca del 90% presentan diabetes tipo II. Hoy en día en el mundo hay más de 125 millones de personas con diabetes y para el 2010 se espera acercarse a 220 millones (Amos et al., 1997).

Virtualmente todas las formas de diabetes mellitus son causadas por un decremento en la concentración de insulina (deficiencia de insulina) y un decremento en la respuesta periférica de tejidos finos a insulina (resistencia de insulina). Estas anomalías conducen a alteraciones en el metabolismo de carbohidratos, lípidos, cetonas y aminoácidos, la característica principal de este síndrome es la hiperglucemia.

La diabetes acelera el proceso de envejecimiento y conduce a complicaciones que incluyen ceguera, falla renal, daño del nervio y enfermedad cardiovascular (Obrenovich et al., 2003). La enfermedad microvascular específica de la diabetes conduce a nefropatía, retinopatía y neuropatía diabética (Karachalias et al., 2003).

2.9. NEUROPATÍA DIABÉTICA

El dolor neuropático se considera generalmente una de las complicaciones más comunes y más molestas que afligen a pacientes diabéticos (Vinik et al., 1992; Clark y Lee, 1995). La neuropatía diabética es un espectro del daño a los nervios periféricos, se presenta como resultado de daño progresivo a los sistemas nerviosos sensoriales y autonómicos periféricos (Babaei-Jadidi et al., 2003).

La neuropatía diabética es una anomalía acompañada por dolor y causa importante de morbilidad y mortalidad asociada a la enfermedad. Sin embargo resulta, ser una de las complicaciones más frecuentes de la diabetes mellitus tipo I (dependiente de insulina) (Guy et al., 1985; Le Quesne y Fowler 1986; Ziegler et al., 1988; Watkins, 1990).

El dolor puede ser agudo en un inicio y alrededor de 6 meses o más convertirse en un dolor crónico con síntomas que duran muchos años (Thomas y Scadding, 1987).

El dolor del paciente diabético se manifiesta como dolor muscular profundo, lancinante, quemante y una sensación persistente de ardor o punzadas, generalmente en las piernas y los pies. Otros síntomas encontrados son una inhabilidad al cambio en la temperatura (calor ó frío), sensibilidad extrema al tacto (alodinia), pérdida de sensación de vibración y paradójicamente pérdida de la percepción del dolor (Fox et al., 1999). Si bien la hiperglucemia y la deficiencia de insulina son considerados importantes promotores de la neuropatía diabética, probablemente también resulte de una serie compleja de interacciones metabólicas, vasculares y neurotróficas. Como consecuencia se observa una disminución de la glucosa en los tejidos periféricos y un aumento en la producción hepática de la misma (Bogardus et al., 1984). La elevación crónica de la glucemia (azúcar en sangre) está asociada con incrementos moderados de los ácidos grasos libres (Hawkins et al., 2002; Reaven et al., 1988) los que generan resistencia a la insulina y a la glucosa en el tejido adiposo interfiriendo con sus funciones de lipólisis y acumulación de los triglicéridos (Lewis et al., 2002).

El modelo de dolor en ratas con administración de STZ reproduce los síntomas de la diabetes tipo I en la rata (Courteix et al., 1993). Los animales diabéticos presentan:

- Polidipsia: sed excesiva.
- Poliuria: secreción y emisión abundante de orina.
- Polifagia: mucho apetito.
- Cierta grado de amiotrofia: atrofia muscular.
- Hipotermia: descenso de la temperatura corporal.
- Hiper glucemia: altos niveles de glucosa en la sangre.
- Pérdida de peso.

Los estudios realizados hasta ahora muestran que la diabetes produce disminución de la velocidad de conducción del nervio (Sharma y Thomas, 1974; Moore et al., 1980, Tuck et al., 1984; Tomlinson et al., 1989), modificaciones estructurales a las fibras aferentes mielinizadas y no mielinizadas (Narama y Kino 1989; Triban et al., 1989; Dockery y Sharma, 1990; Thomas et al., 1990) y modificaciones neurobioquímicas: aumento (Forman et al., 1986), disminución (Tang, 1989) o ningún cambio (Locatelli et al., 1985) en los niveles de β -endorfinas en la glándula pituitaria anterior o hipotálamo (Locatelli et al., 1985; Tang et al., 1989).

Los pacientes diabéticos exhiben con frecuencia uno o más tipos de dolor evocado ante un estímulo, incluyendo una alta sensibilidad en presencia de estímulos nocivos (hiperalgesia) como también a estímulos inocuos (alodinia) (Kapur et al., 2003, Shuang song et al., 2004).

Se ha propuesto que la alodinia está mediada por fibras mielinizadas aferentes (Huang et al., 2002; Hudson et al., 2001), mientras que la hiperalgesia térmica se transmite principalmente a través de fibras no mielinizadas (fibra C) en el dolor neuropático (Ossipov et. al., 1999).

Los mecanismos subyacentes de dolor de la neuropatía diabética son complejos. Sin embargo, los componentes periféricos y centrales de los sistemas sensoriales probablemente están implicados. Además de anomalías de nervios aferentes periféricos, el proceso sensorial alterado en la médula espinal puede contribuir al desarrollo del dolor neuropático en el diabético (Shao-Rui y Hui-Lin, 2002).

En un estudio electrofisiológico se reporta sobre la sensibilidad alterada de las neuronas del tracto espinotalámico (STT) y de su papel potencial en el desarrollo del dolor crónico causado por neuropatía diabética (Shao-Rui y Hui-Lin, 2002). Es probable que la actividad aberrante generada en los nervios aferentes contribuya al estado de la hipersensibilidad de las neuronas dorsales espinales desarrollada en diabetes. Las neuronas espinales pueden también contribuir a los síntomas sensoriales alterados en ratas diabéticas (Burchiel et al., 1985; Chen y Levine, 2001).

Tomlinson et al., 1989 y Lindberger et al., 1989 reportaron una reducción de los niveles de sustancia P en el nervio ciático en ratas diabéticas y una disminución de la misma en fibras de piel humana, respectivamente. Sin embargo, algunos autores reportaron un aumento de estos mismos niveles en el nervio vago (Mac-Lean, 1987) o ninguna variación en los niveles de sustancia P en fibras de la piel en ratas diabéticas

(Karanth et al., 1990). Además, el transporte de sustancia P se aumenta (Mac-Lean, 1987) o se reduce en el nervio ciático en ratas diabéticas (Tomlison et al., 1989; Calcutt et al., 1990) lo cuál evidencia una anomalía funcional de nervios periféricos en el curso de la diabetes.

2.10. VITAMINAS

Las vitaminas son compuestos orgánicos presentes en los alimentos naturales y necesarios en cantidades muy pequeñas para el mantenimiento y la reproducción normal, esto es para mantener la nutrición y la salud. Son esenciales en el metabolismo y necesarios para el crecimiento y, en general, para el buen funcionamiento del organismo. Las vitaminas participan en la formación de hormonas, células sanguíneas, sustancias químicas del sistema nervioso y material genético. Las diversas vitaminas no están relacionadas químicamente y la mayoría de ellas tiene una acción fisiológica distinta. Por lo general actúan como catalizadores, combinándose con las proteínas para crear enzimas metabólicamente activas que a su vez producen importantes reacciones químicas en todo el cuerpo. Sin las vitaminas muchas de estas reacciones tardarían más en producirse o cesarían por completo.

Las vitaminas del complejo B son moléculas orgánicas que sirven como coenzimas para reacciones enzimáticas diversas. Estas vitaminas son hidrosolubles, solo se almacenan en una cantidad limitada y se requiere el consumo frecuente para conservar la saturación de los tejidos y por ello deben ser obtenidas por la dieta (Marcus y Coulston, 2001).

Dentro de las vitaminas del complejo B se encuentra a la **tiamina (B₁)**, riboflavina (B₂), nicotinamida (B₃), piridoxina (B₆) y cianocobalamina (B₁₂). También se encuentra el ácido fólico, ácido pantoténico, ácido paraaminobenzoico, inositol, entre otros (Marcus y Coulston, 2001).

Los antiguos médicos las administraban para revertir diversas enfermedades neurológicas como beri-beri, anemia aplásica, convulsiones epilépticas, entre otras, por tal motivo comenzó el uso de estas vitaminas y su comercialización a nivel mundial. Hay reportes que muestran que el complejo B tiene actividad antinociceptiva y anti-inflamatoria (Fu et al., 1988; Bartoszyk y Wild, 1989; Wild et al., 1990; Jurna et al., 1990) en modelos de dolor inflamatorio y neuropático. Además, estudios en humanos indican que las vitaminas B atenúan o disminuyen diversos dolores agudos e inflamatorios (Denner et al., 1985).

2.11. TIAMINA

La tiamina o vitamina B₁, primer miembro del complejo B, tiene derivados solubles en agua y lipofílicos llamados alitiaminas. La tiamina es una molécula orgánica hidrosoluble que contiene una pirimidina y un núcleo de tiazol enlazados por un puente metileno. La tiamina funciona en el cuerpo en forma de coenzima, el pirofosfato de tiamina (TPP) (Figura 9).

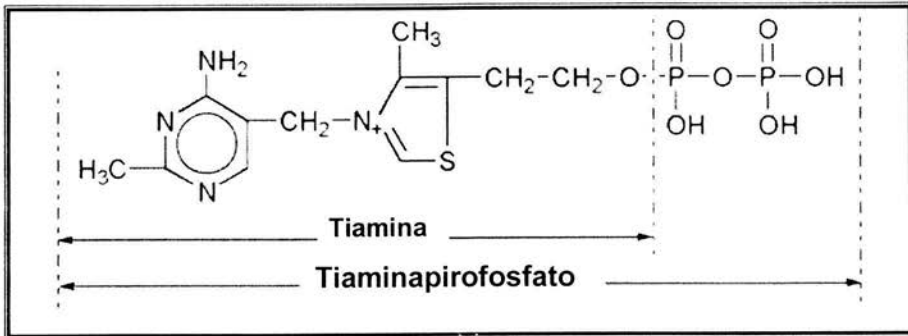


Figura 9. Estructura de la tiamina y tiaminapirofosfato (TPP).

El TPP, la forma activa de la tiamina, funciona en el metabolismo de los hidratos de carbono, en la descarboxilación oxidativa de los α -cetoácidos como piruvato y α -cetoglutarato, es un catalizador en el ciclo de las pentosas y en la síntesis de sustancias que regulan el sistema nervioso como acetilcolina (mediador químico neuronal). Como la tiamina es esencial para el metabolismo energético se recomienda suministrar 0.5 mg/1000 kcal de alimentos ingeridos.

Los síntomas principales de su deficiencia se relacionan con el sistema nervioso y cardiovascular. Muchos de los signos y síntomas neurológicos se caracterizan por neuritis periférica con alteraciones sensitivas en las extremidades, incluso áreas localizadas de hiperestesia o anestesia. Hay pérdida gradual de la fuerza muscular y puede originar caída de la muñeca o parálisis completa de una extremidad (Marcus y Coulston, 2001).

La deficiencia severa de la vitamina causa beri-beri, padecimiento neurológico, caracterizado por neuritis periférica, insuficiencia cardíaca y alteraciones cerebrales con

encefalopatía de Wernicke. También causa polineuropatía, acompañada por una degeneración axonal. Por el contrario, dosis altas de tiamina producen bloqueo ganglionar (De Castro, 1965) y supresión de la transmisión del estímulo neuronal (Boissier et al., 1966). La relación entre la vitamina B₁ y el sistema nervioso fue la base para utilizar esta vitamina a dosis altas por diversas rutas con el propósito de aliviar el dolor ya que prácticamente carece de acciones farmacológicas a dosis bajas en humanos (Bermond, 1989).

2.11.1. Farmacocinética

La absorción de las cantidades habituales de tiamina en la dieta a partir del tubo digestivo (en la porción proximal del intestino delgado) ocurre por medio de transporte activo dependiente de Na⁺; a concentraciones más altas, la difusión pasiva también es importante (Rindi y Ventura, 1972).

La tiamina y sus derivados, que ingresan por vía digestiva natural o por vía parenteral, se depositan rápidamente en el hígado, músculo, cerebro y en menor grado en otros tejidos. Los estudios *in vitro* con radioactividad marcando la tiamina con ¹⁴C indicaron que la tiamina tiene una absorción más grande en el yeyuno, seguido por el duodeno y el ileon. La absorción menor fue encontrada en el estómago y colon (Rindi y Ventura, 1972; Rindi, 1984). Su excreción tanto de la vitamina, como de su metabolito activo, se realiza a través de la orina y de las heces.

2.12. BENFOTIAMINA

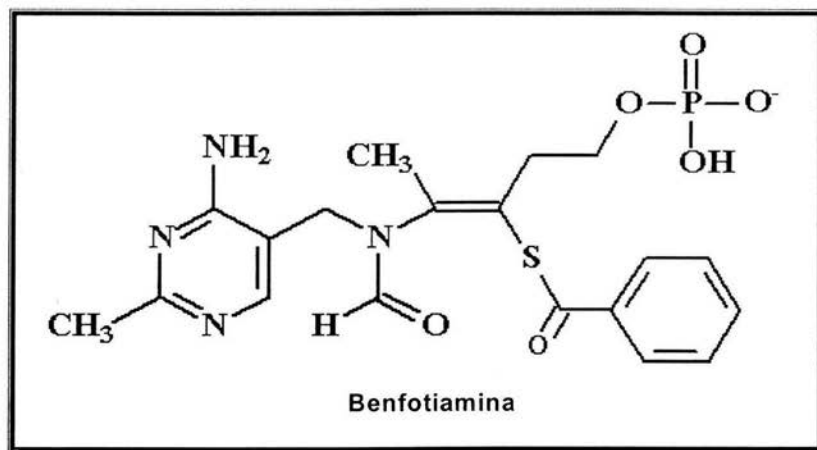


Figura 10. Estructura de la Benfotiamina.

Tabla 3. Características de la benfotiamina.

Nombre:	S-benzoylthiamina-O-monofosfato
Fórmula química:	C ₁₉ H ₂₃ N ₄ O ₆ PS
Peso molecular:	466.45
Forma:	Cristales
Solubilidad:	Disuelve mal en agua, etanol y cloroformo

Tabla elaborada a partir de datos tomados del Index Merck (2001).

La benfotiamina es un análogo lipofílico de la tiamina (tabla 3), contiene un anillo abierto de tiazol que es cerrado por la reducción dentro del organismo produciendo la tiamina fisiológica, es decir una alitiamina que se convierte en coenzima biológicamente activa dentro del organismo (Figura 10). Las alitiaminas se diferencian de los derivados solubles en agua de la vitamina B₁ por sus características fisicoquímicas y su estructura, específicamente en el anillo abierto de tiazol. Las alitiaminas son convertidas a la tiamina fisiológicamente activa dentro del organismo por el cierre del anillo de tiazol (Loew, 1996).

Varios estudios han demostrado que la administración oral de los análogos de la tiamina es mejor que las sales solubles en agua de la vitamina B₁ y alcanzan concentraciones más altas en sangre y tejidos finos (Fujiwara, 1967; Baker y Frank, 1976; Baker et al., 1976; Shindo et al., 1976). Además, se ha demostrado que las alitiaminas pueden absorberse mejor, conducen a niveles más altos de la tiamina en eritrocitos y líquido cerebroespinal y se conservan más tiempo en el cuerpo que otros derivados solubles en agua de la vitamina B₁ (Fujiwara, 1954; Thomson et al., 1972; Baker, 1974).

La absorción de benfotiamina es por difusión pasiva y es desproporcionada, durante el paso por los compuestos por la mucosa, conteniendo grupos sulfhidrilo tales como cisteína y glutatión, esto causa la reducción intracelular rápida de alitiamina a la tiamina fisiológicamente activa (Loew, 1996). La benfotiamina se metaboliza a vitamina B₁ en el organismo después de absorberse rápida y completamente por el tracto digestivo.

En experimentos con ratas y ratones la absorción de benfotiamina marcada radioactivamente muestra índices de incorporación claramente más altos en corazón, hígado, cerebro y diafragma (Mizuhira, 1968). Estos resultados fueron corroborados por otros estudios autoradiográficos en la incorporación de benfotiamina en órganos de ratón. Además, estudios de biodisponibilidad en humanos sanos han demostrado que la absorción de benfotiamina es varias veces mejor que el de la vitamina B₁ y que hay un aumento del difosfato metabólico activo de la tiamina en eritrocitos (Bitsch et al., 1991).

Se ha determinado la actividad dependiente de transcetolasa de tiamina en la sangre y la capacidad de TPP (α_{ETK}) de activarla como estándares relevantes de la actividad fisiológica de la tiamina. Por el contrario, la actividad de transcetolasa incrementa perceptiblemente después de la administración de benfotiamina.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

- Evaluar el efecto de la benfotiamina en modelos de dolor inflamatorio y neuropático en ratas normales y diabéticas.

3.2. Objetivos particulares

- Establecer los modelos de dolor.
- Establecer el tiempo idóneo de administración para alcanzar el mejor efecto analgésico de la benfotiamina.
- Analizar el efecto analgésico de la benfotiamina en ratas con dolor inflamatorio.
- Evaluar el efecto antialodínico de la benfotiamina en dos modelos de neuropatía en la rata.

4. HIPÓTESIS

4.1. Hipótesis alternativa

- La administración oral de benfotiamina produce un efecto analgésico y antialodínico en ratas con dolor inflamatorio y neuropático, respectivamente.

4.2. Hipótesis nula

- La administración oral de benfotiamina no produce un efecto analgésico y antialodínico en ratas con dolor inflamatorio y neuropático, respectivamente.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Se emplearon un total de 132 ratas Wistar hembras, con un rango de peso corporal de 120-140 g y de 200-230 g, provenientes del Bioterio del CINVESTAV-Coapa. Doce h antes del experimento se les retiró el alimento y se mantuvieron con libre acceso al agua.

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

5.2. FÁRMACOS

La benfotiamina fue donada por Merck S. A. de C.V. (México, D.F.) la cual fue disuelta en carboximetilcelulosa al 1% y se administró en un volumen de 4 ml/kg. La estreptozotocina (STZ) fue adquirida en Sigma-Aldrich y disuelta en agua desionizada.

5.3. MODELO DE FORMALINA

El efecto analgésico de la benfotiamina se evaluó con la prueba de formalina (Dubuisson y Dennis, 1977). Las ratas se colocaron en un cilindro transparente de acrílico (Plexiglas) de 20 cm de diámetro y 30 cm de altura el cual fue utilizado como cámara de observación con el objetivo de facilitar la observación. En la parte trasera de estos cilindros se colocaron dos espejos de 30 x 30 cm cada uno formando un ángulo de 45° entre ellos. En todos los experimentos se siguió un protocolo de ambientación para tal fin se colocó a la rata en el interior de la cámara de observación durante al menos 30 minutos, lo cuál le permitió acostumbrarse al nuevo ambiente y de esta manera disminuir su estrés. Lo anterior es importante ya se ha asociado al estrés con la analgesia (Gagliese y Melzack, 2000). Después de este período, la rata se retiró de la cámara de observación para realizar la administración oral de benfotiamina. Posteriormente se administró vía subcutánea 50 μ L de formalina al 0.5 ó 1% (diluida con solución salina 0.9%) en el dorso de la pata posterior derecha utilizando una aguja del No. 30. Luego de la administración, las ratas se colocaron nuevamente en los cilindros de acrílico y se cuantificó la conducta dolorosa como el número de sacudidas de la pata inyectada en intervalos de 1 minuto cada 5 minutos por 60 minutos.

5.3.1. Formalina en ratas normales

Se determinó el tiempo idóneo de pretratamiento (2.5 h) en ratas normales y se evaluó el efecto analgésico de la benfotiamina con formalina al 1% a dosis crecientes (10, 30, 100, 300 mg/kg) vía oral en el modelo de formalina.

5.3.2. Generalidades del formaldehído

El formaldehído (tabla 4) es un aldehído simple de la serie alifática, su grupo funcional está asociado con un átomo de hidrógeno. Es metabolizado a ácido fórmico por la acción de la enzima alcohol deshidrogenasa y posteriormente a CO₂ y agua por la vía de los folatos (Peña Acevedo, 2000). El formaldehído reacciona químicamente con la mayoría de las sustancias en el interior de las células y por esta razón deprime todas las funciones celulares y conduce a la muerte de las mismas.

Tabla 4. Características fisicoquímicas del formaldehído.

Fórmula química:	CH ₂ O
Peso molecular:	30.03
Gravedad específica:	Gas: 0.815 (a 20°C); Líquido: 1.08 (a 25°C).
Densidad	Gas:1.08 Líquido: 1.03 g/ml
pH:	2.8-4.0
Solubilidad:	Es altamente soluble en agua, acetona, benceno, alcohol y éter
Olor:	Pungente, penetrante
Color:	Ambar
DL ₅₀ oral en ratas	0.80 g/kg

Tabla elaborada a partir de datos tomados del Index Merck (2001) y Pena Acevedo (2000).

La última parte del efecto tóxico aparentemente es el resultado de la conversión de formaldehído en ácido fórmico, por lo que el formaldehído es un carcinógeno en animales.

5.4. INDUCCIÓN DE DIABETES

Las ratas recibieron una inyección intraperitoneal de estreptozotocina (STZ; 50 mg/kg) para inducir la diabetes. Una semana después de la inyección de estreptozotocina la diabetes se confirmó haciendo una medición de la concentración de glucosa en una muestra de sangre obtenida por extracción de la vena caudal de la cola de la rata con tiras reactivas para glucosa en un glucómetro Ascencia Elite (Bayer, México, D.F.). Antes de cada estudio se realizó la medición, los animales con un nivel de glucosa en sangre ≥ 300 mg/dL fueron considerados diabéticos.

5.5. INDUCCIÓN QUIRÚRGICA DE NEUROPATÍA

Para la inducción de la neuropatía se realizó el procedimiento quirúrgico descrito por Kim y Chung (1992). Para ello, los animales se anestesiaron con una mezcla de xilazina/ketamina (45/12 mg/kg, i.p.). Después de la anestesia y exposición de la columna vertebral, se ligaron los nervios espinales izquierdos L5 y L6 con una sutura de seda 6-0 en la parte distal del ganglio de la raíz dorsal (grupo de ratas ligadas). Para las ratas falsamente operadas (grupo de ratas no ligadas), los nervios se expusieron pero no se ligaron. La incisión se cerró y los animales se mantuvieron en recuperación durante 12 días. Los animales que

mostraron deficiencia motora (arrastrar la pata izquierda) se descartaron del experimento.

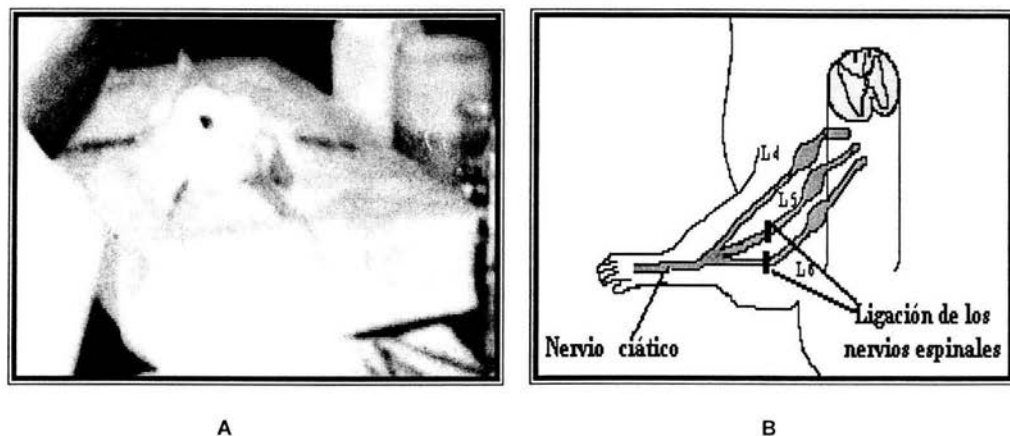


Figura 11. Esquema que muestra la ligadura de los nervios espinales L5 y L6.

5.5.1. Prueba de umbral táctil

La alodinia táctil se determinó midiendo el retiro de la pata en respuesta a un estímulo mecánico producido por la aplicación de una serie de filamentos calibrados (filamentos de von Frey). La fuerza de los filamentos de von Frey abarca un rango de 0.4 a 15 g, dependiendo del grosor del filamento es la fuerza del estímulo aplicado. El umbral de retiro se determinó por el incremento y decremento de la fuerza del estímulo aplicado en la pata izquierda de la rata (Chaplan et al., 1994). La intensidad del estímulo requerido para producir una respuesta en 50% de las aplicaciones para cada animal se determinó como el "50% de umbral de retiro". Todos los animales con ligadura de los nervios

espinales, se les verificó la presencia de alodinia (respondieron a un estímulo menor a 4 g). Las ratas que no mostraron alodinia se descartaron del estudio.

5.6. DISEÑO EXPERIMENTAL

Para determinar el posible efecto analgésico de la benfotiamina se evaluaron tres grupos de ratas ($n = 6$) en el modelo de formalina. El primero de ellos se utilizó para establecer el tiempo en el cual la benfotiamina tenía un mejor efecto analgésico. El segundo y tercer grupo se utilizó para determinar el efecto analgésico de la benfotiamina tanto en ratas normales con formalina al 1% a dosis crecientes (10, 30, 100, 300 mg/kg), como en ratas diabéticas (2 semanas) con formalina al 0.5% a dosis crecientes (10, 30, 100, 300 mg/kg). El fármaco se administró vía oral.

Asimismo, se evaluó el posible efecto antialodínico de la benfotiamina en dos grupos. En el primero se utilizaron ratas diabéticas con alodinia (4 semanas). En el segundo grupo se utilizaron ratas normales sometidas al procedimiento quirúrgico descrito por Kim y Chung (1992). En ambos grupos se administraron dosis crecientes de benfotiamina (75, 150, 300 mg/kg) vía oral y se evaluó el 50% del umbral de retiro durante 5 h, según se explico en el punto 5.5.1.

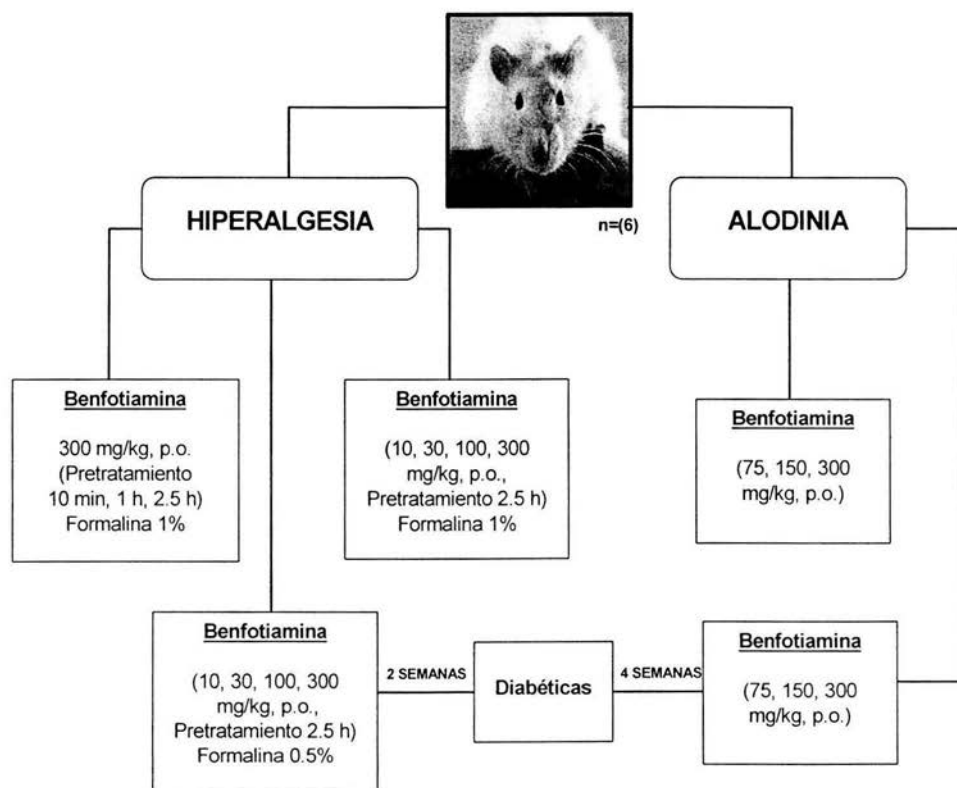


Figura 12. Diagrama de flujo del diseño experimental.

Nota p.o. = Vía oral

5.7. ANÁLISIS DE DATOS EN EL MODELO DE FORMALINA

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

5.8. ANÁLISIS DE DATOS EN NEUROPATÍA

Los resultados se expresan como el promedio \pm el error estándar (e.e.) de cada grupo experimental de 6 animales. De los datos obtenidos de ratas neuropáticas se realizaron gráficas del 50% de umbral de retiro (g) en función del tiempo (min). El 50% del umbral de retiro se calculó con la siguiente ecuación:

$$50\% \text{ Umbral de retiro (g)} = (10^{[Xf + K\delta]}) / 10,000$$

Donde:

Xf: es el valor del último filamento de von Frey utilizado (unidades log).

K: es el factor de corrección basado en los patrones de respuestas de una tabla de calibración y al valor tabulado en base al valor tabulado de respuestas positivas y negativas.

δ : es la diferencia de promedio entre estímulos (unidades log).

Se calculó el área bajo la curva (ABC) del % del umbral de retiro contra el tiempo por el método de trapezoides. A partir del ABC se calculó el porcentaje de máximo efecto posible (%MEP) por medio de la siguiente ecuación:

$$\%MEP = \frac{(ABCx) - (ABCrl)}{(ABCnl) - (ABCrl)} \times 100$$

Donde:

ABCx: área bajo la curva del fármaco "x"

ABCrl: área bajo la curva de ratas ligadas

ABCnl: área bajo la curva de ratas no ligadas

De los datos del curso temporal se construyeron gráficas de barras y curvas dosis respuesta del % de antialodinia (%MEP) versus el logaritmo de las diferentes dosis, a partir de una regresión lineal. Un valor de %MEP de 0 indica que el grupo tratado es igual al grupo de ratas ligadas, es decir el fármaco administrado no tiene un efecto antialodínico. Un valor de %MEP de 100 significa que los animales no presentan alodinia o presentan el efecto máximo antialodínico alcanzable.

5.9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

En todos los modelos los datos de ABC se analizaron mediante análisis de varianza de una vía (ANOVA) seguidos por la prueba de Tukey para comparar tres o más grupos. Una $p < 0.05$ se consideró significativa.

El análisis de varianza es una técnica mediante la cual la variación total presente en un conjunto de datos se distribuye en varios componentes. Asociada con cada uno de estos componentes hay una fuente específica de variación, de modo que en el análisis es posible averiguar la magnitud de las contribuciones de cada una de estas fuentes a la variación total (Daniel, 1989). Este análisis se utiliza cuando se tienen tres o más grupos experimentales. El análisis de varianza de una vía permite analizar el efecto del tratamiento con las diferentes dosis de benfotiamina. El resultado de este análisis permite al experimentador saber si hay diferencias significativas debidas al tratamiento. Sin embargo, no permite identificar entre que grupos existen esas diferencias. Para poder determinar esto es necesario realizar un prueba "post – hoc" que permitirá definir entre cuales grupos existe diferencia significativa. Dentro de estas pruebas se encuentra la prueba de Tukey, Dunnet y Bonferroni. De éstas nosotros utilizamos la prueba de Tukey que permite comparar todos los grupos experimentales. Para que exista diferencia significativa entre grupos se debe alcanzar un nivel de significancia (p) de 0.05. Este dato indica que se tiene un 95% de certeza de que el efecto observado se debe al tratamiento y un 5% se podría deber al azar.

6. RESULTADOS

6.1. ESTABLECIMIENTO DE MODELOS

6.1.1. Modelo de formalina en ratas normales

La inyección intraplantar de formalina al 1% produjo la conducta típica de sacudidas caracterizada por el retiro breve y rápido o la flexión de la pata inyectada (Lázaro-Ibáñez et al., 2001). Cuando se graficó el número de sacudidas en función del tiempo se distinguió la conducta bifásica característica de este modelo (Tjølsten 1992; Figura 13).

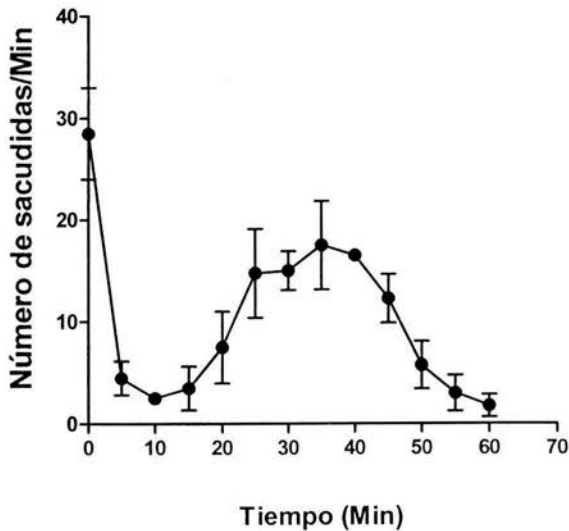


Figura 13. Gráfica que muestra el curso temporal del dolor en el modelo de formalina en ratas normales. Se administró formalina al 1%. La conducta dolorosa observada es bifásica, la primera fase abarca de los 0 a los 10 min, en tanto que la segunda fase comienza a los 15 min y se prolonga hasta los 60 min. Los datos son expresados como el número de sacudidas promedio de 6 ratas \pm error estándar.

6.1.2. Modelo de formalina en ratas diabéticas (2 semanas)

La inyección intraplantar de formalina al 0.5% en ratas diabéticas (2 semanas) también produjo la conducta típica de sacudidas en la pata inyectada. (Figura 14). La conducta observada en estas ratas fue similar a la observada con formalina al 1% en ratas normales, sugiriendo un estado hiperalgésico en ratas diabéticas.

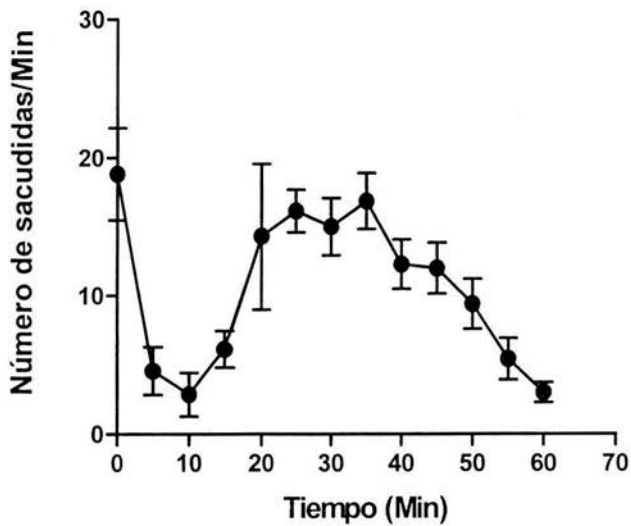


Figura 14. Curso temporal del dolor en el modelo de formalina en ratas diabéticas (2 semanas). Se administró formalina al 0.5%. La conducta dolorosa observada es bifásica, la primera abarca de los 0 a los 10 min, en tanto que la segunda fase comienza a los 15 min y se prolonga hasta los 60 min. Los datos son expresados como el número de sacudidas promedio de 6 ratas \pm error estándar.

6.1.3. Alodinia en ratas diabéticas (4 semanas)

Cuatro semanas después de la administración de estreptozotocina se observó la presencia de alodinia en las ratas (Figura 15) al estimular con los filamentos de von Frey.

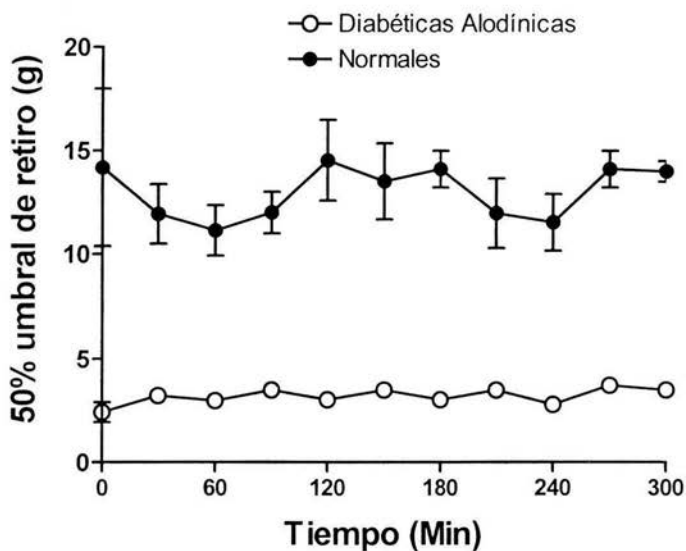


Figura 15. Curso temporal de la alodinia en ratas diabéticas (4 semanas). Se evaluaron 2 diferentes grupos: el grupo control el cual consistía en la evaluación de ratas normales y el tratado, que consistía en ratas que presentaban neuropatía diabética (alodinia). Los datos están representados como el 50% del umbral de retiro y son el promedio de 6 ratas \pm error estándar.

6.1.4. Alodinia en ratas normales en el modelo de Chung

La ligadura de las raíces espinales izquierda L5 y L6 produjo una disminución en el umbral de retiro (alodinia) doce días después de la cirugía (Figura 16).

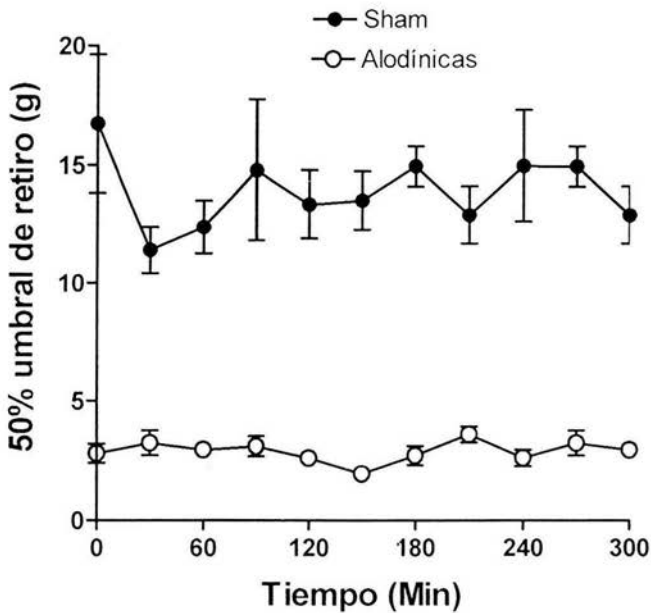


Figura 16. Curso temporal de la alodinia inducida por la ligadura de los nervios espinales L5 y L6 en la rata. Se evaluaron 2 diferentes grupos: el grupo control, en el cual se sometió a ratas a cirugía sin ligadura de los nervios espinales (Sham) y el tratado, el cual corresponde a ratas sometidas a cirugía con ligadura de los nervios espinales izquierdos L5 y L6. Los datos están representados como el 50% del umbral de retiro y son el promedio de 6 ratas \pm error estándar.

6.2. EFECTO DE LA BENFOTIAMINA EN LOS DIFERENTES MODELOS DE DOLOR

6.2.1. Modelo de formalina en ratas normales

La administración oral de benfotiamina se realizó a diferentes tiempos previos a la producción del dolor para determinar el tiempo idóneo de administración para alcanzar el mejor efecto analgésico (Figura 17).

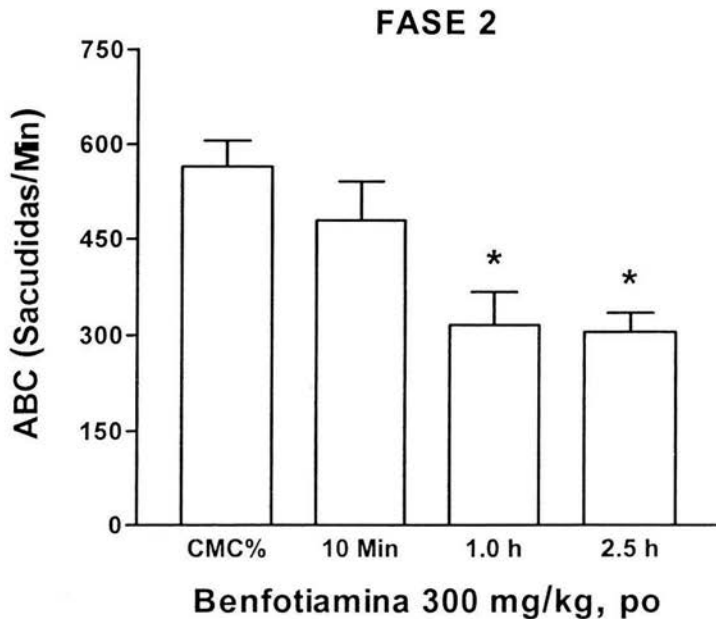


Figura 17. Efecto de la administración oral (p.o.) de benfotiamina (300 mg/kg) con un pretratamiento a diferentes tiempos (10 min, 1.0 y 2.5 h) evaluado durante la segunda fase de la prueba de formalina. Los datos son el promedio de 6 ratas \pm error estándar expresados en barras que corresponden al área bajo la curva (ABC). * Significativamente diferente con respecto al grupo control tratado con carboximetilcelulosa 1% (CMC; vehículo) ($p < 0.05$) y determinado por análisis de varianza de una vía (ANOVA) seguido por la prueba de Tukey.

De la figura anterior se apreció que el mejor tiempo para administrar a la benfotiamina fue de 2.5 h. Por lo tanto, se decidió utilizar este tiempo como pretratamiento en los siguientes estudios. La administración oral de benfotiamina redujo número de sacudidas (Figura 18) durante la segunda fase de la prueba de formalina en ratas normales. En la figura 19 se muestra el efecto analgésico de la benfotiamina en ratas normales inyectadas con formalina al 1%. La benfotiamina redujo de manera dosis dependiente y significativa ($p < 0.05$) las sacudidas inducidas por formalina.

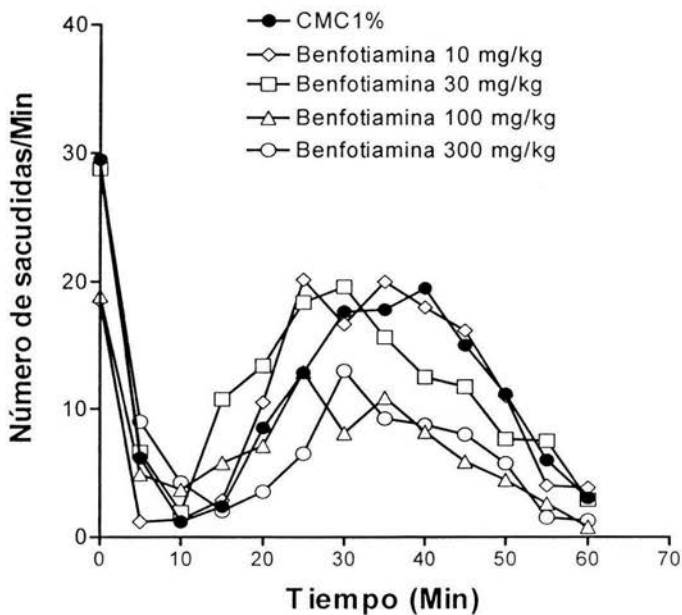


Figura 18. Curso temporal del efecto analgésico de la benfotiamina (10, 30, 100, 300 mg/kg) vía oral (p.o.) en el modelo de formalina en ratas normales. Los datos son el promedio de 6 ratas. El error estándar fue omitido por claridad.

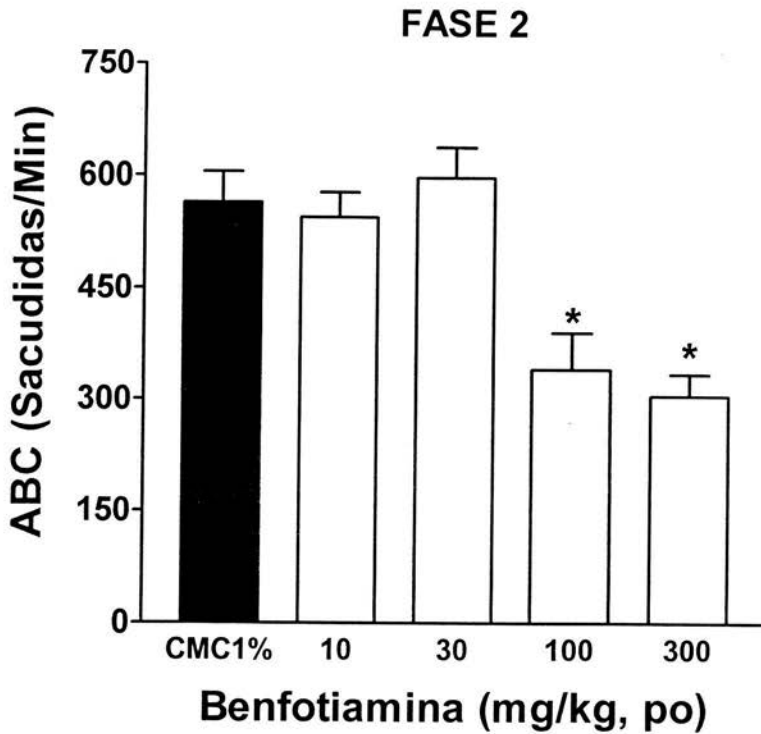


Figura 19. Efecto analgésico observado después del pretratamiento (2.5 h) oral (p.o.) con benfotiamina (10, 30, 100, 300 mg/kg) evaluado durante la segunda fase en la prueba de formalina. Los datos son el promedio de 6 ratas \pm error estándar expresados en barras que corresponden al área bajo la curva (ABC). * Significativamente diferente con respecto al grupo control tratado con carboximetilcelulosa 1% (CMC; vehículo) ($p < 0.05$) y determinado por análisis de varianza de una vía (ANOVA) seguido por la prueba de Tukey.

6.2.2. Modelo de formalina en ratas diabéticas (2 semanas)

La administración oral de benfotiamina redujo de manera dependiente de la dosis el número de sacudidas (Figura 20) durante la segunda fase de la prueba de formalina en ratas diabéticas. Se observó diferencia significativa a una dosis de 100 mg/kg y un máximo de analgesia a la dosis de 300 mg/kg (Figura 21, pag 66).

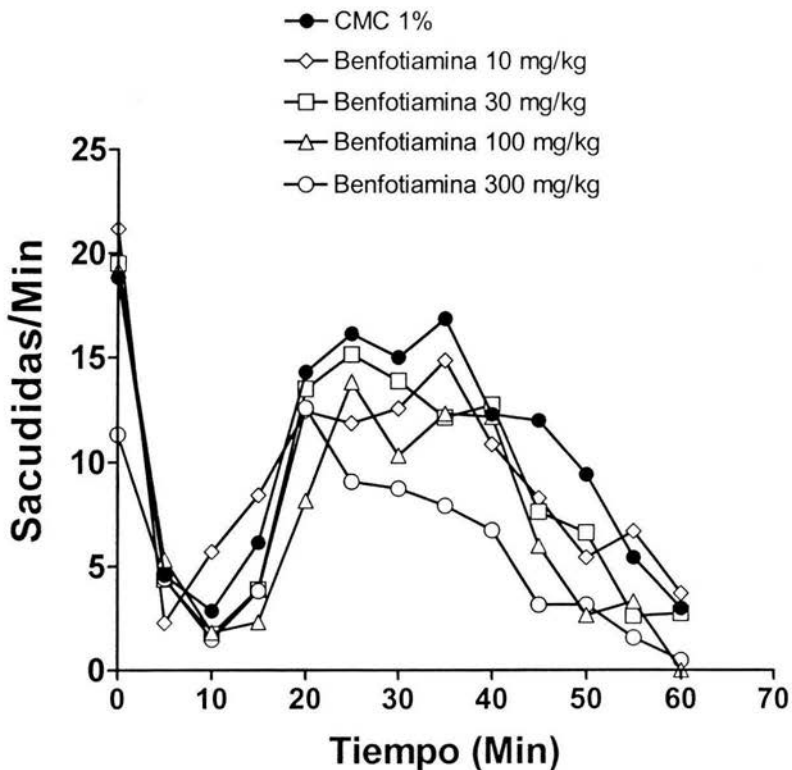


Figura 20. Curso temporal del efecto analgésico de la benfotiamina (10, 30, 100, 300 mg/kg) vía oral (p.o.) en el modelo de formalina en ratas diabéticas de dos semanas después de su inducción. Los datos son el promedio de 6 ratas. El error estándar fue omitido por claridad.

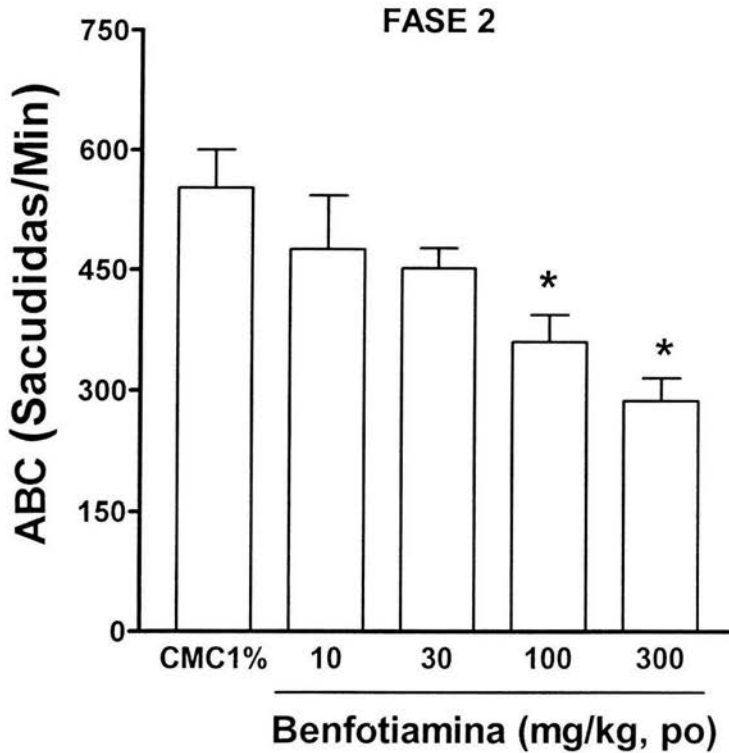


Figura 21. Efecto analgésico del pretratamiento (2.5 h) observado después de la administración oral (p.o.) de benfotiamina (10, 30, 100, 300 mg/kg) durante la fase 2 en la prueba de formalina en ratas diabéticas de dos semanas después de su inducción. Los datos son el promedio de 6 ratas \pm error estándar expresados en barras que corresponden al área bajo la curva (ABC). * Significativamente diferente con respecto al grupo control tratado con carboximetilcelulosa 1% (CMC; vehículo) ($p < 0.05$) y determinado por análisis de varianza de una vía (ANOVA) seguido por la prueba de Tukey.

6.2.3. Alodinia en ratas diabéticas (4 semanas)

En la figura 22 se muestra el curso temporal del umbral de retiro al estímulo mecánico en ratas hembras de 4 semanas después de la inducción de la diabetes. La administración oral de benfotiamina (75, 150, 300, mg/kg) produjo un efecto antialodínico de manera dependiente de la dosis al estímulo mecánico con los filamentos de von Frey en ratas hembras de 4 semanas después de la inducción de la diabetes. Como se puede observar existen diferencias significativas ($p < 0.05$) después de la administración oral de benfotiamina (75, 150, 300 mg/kg) (Figura 23; pag. 68).

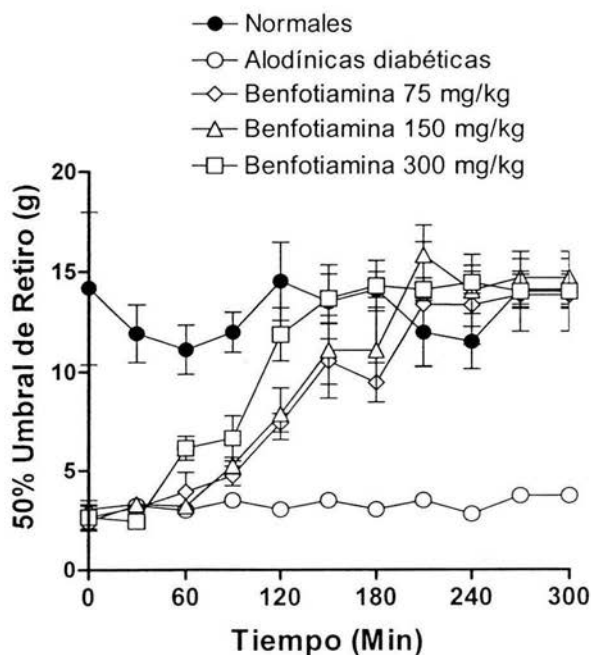


Figura 22. Curso temporal del efecto antialodínico de benfotiamina (75, 150, 300 mg/kg) por vía oral en neuropatía diabética. Los datos están representados como el 50% del umbral de retiro y son el promedio de 6 ratas ± error estándar.

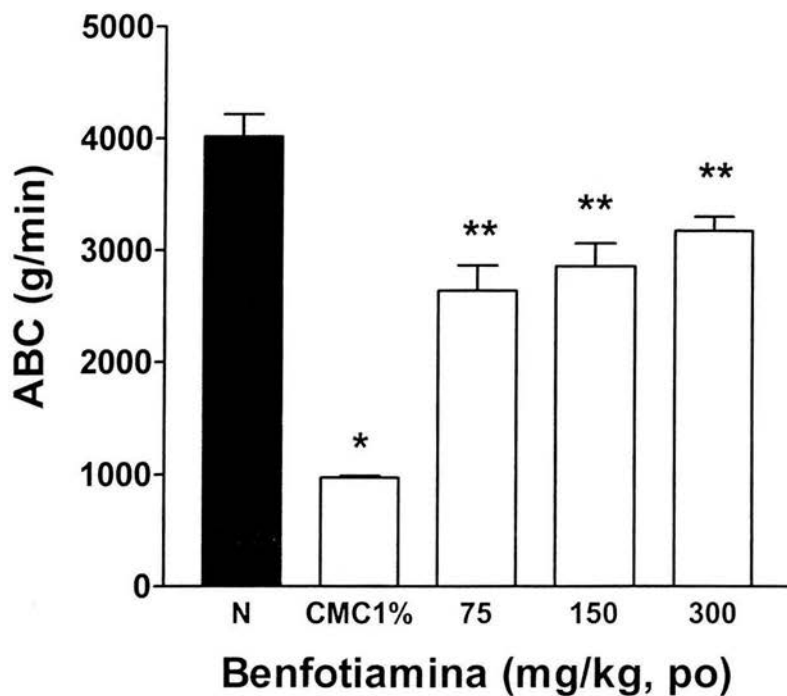


Figura 23. Efecto antialodínico observado después de la administración oral (p.o.) de la benfotiamina (75, 150, 300 mg/kg) en ratas diabéticas. Los datos son el promedio de 6 ratas \pm error estándar expresados en barras que corresponden al área bajo la curva (ABC). * Significativamente diferente con respecto al grupo de ratas normales (N) ($p < 0.05$) y ** significativamente diferente con respecto al vehículo (CMC; carboximetilcelulosa 1%) ($p < 0.05$) determinado por análisis de varianza de una vía (ANOVA), seguido por la prueba de Tukey.

6.2.4. Alodinia en ratas normales en el modelo de Chung

En la figura 24 se muestra el curso temporal del umbral de retiro al estímulo mecánico de ratas hembras 12 días después de la cirugía. La administración oral de benfotiamina (75, 150, 300, mg/kg) disminuyó la alodinia táctil producida por la aplicación de los filamentos de von Frey en la pata izquierda de la rata (Figura 25; pag. 70).

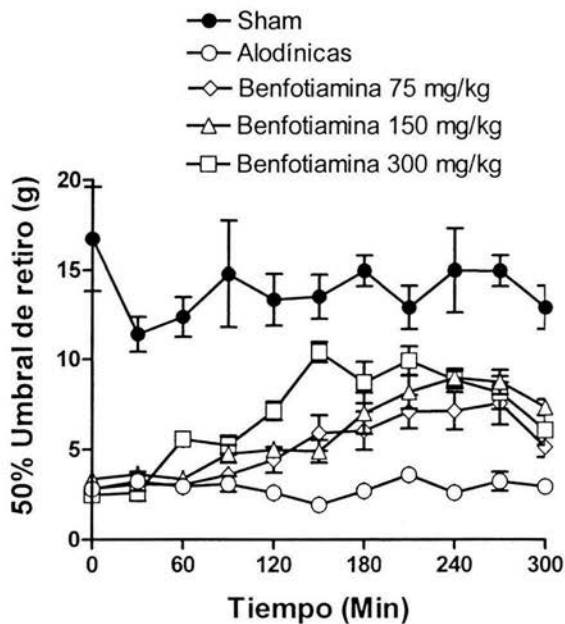


Figura 24. Curso temporal del efecto antialodínico de la benfotiamina en la neuropatía inducida por la ligadura de los nervios L5 y L6. Los datos están representados como el 50% del umbral de retiro y son el promedio de 6 ratas \pm error estándar.

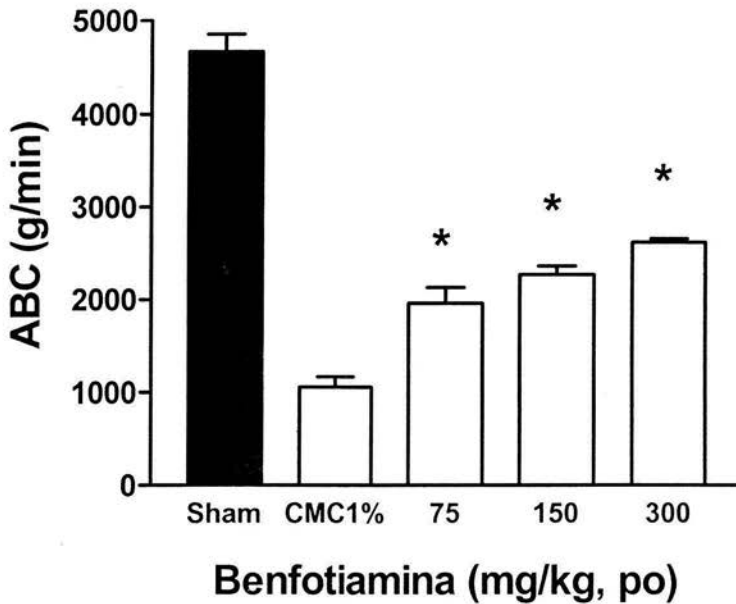


Figura 25. Efecto antialodínico observado después de la administración oral (p.o.) de benfotiamina (75, 150, 300 mg/kg) en ratas ligadas de los nervios L5 y L6. Los datos son el promedio de 6 ratas \pm error estándar expresados en barras que corresponden al área bajo la curva (ABC). * Significativamente diferente con respecto al grupo control tratado con carboximetilcelulosa 1% (CMC; vehículo) ($p < 0.05$) y determinado por análisis de varianza de una vía (ANOVA) seguido por la prueba de Tukey. Sham (grupo de ratas falsamente ligadas).

7. DISCUSIÓN

7.1. MODELO DE FORMALINA

Un número de modelos de dolor se han desarrollado para estudiar la nocicepción en animales. La respuesta de los animales en estas pruebas se integra en el sistema nervioso central, dando información principal sobre el umbral del dolor (Rosland et al., 1990).

La prueba de formalina es un modelo de dolor inflamatorio tónico (Dubuisson y Dennis, 1977) comúnmente usado pues es un modelo propuesto del dolor persistente que depende de la sensibilización del asta dorsal de la médula espinal (Coderre et al., 1990, 1994) y cerebro (Vaccarino y Melzack, 1989, 1992; Coderre et al., 1993).

La formalina inyectada vía intraplantar en roedores produce una respuesta del comportamiento bifásica característica de dolor: la fase 1 inició inmediatamente después de la inyección del irritante 0-10 minutos, mientras que la fase 2 comenzó después de los 10-20 minutos, con una respuesta máxima entre los 20-35 minutos (Dubuisson y Dennis, 1977; Wheeler-Aceto et al., 1990). La inyección del irritante produce algunas conductas características que pueden cuantificarse. Estas conductas son: la sacudida, la lamida, la mordida y la duración de la flexión de la pata (Teng y Abbott, 1998; Ceccarelli et al., 2003). La duración de estas conductas es dependiente de la concentración del irritante (Abbott et al., 1999).

La primera fase es por la activación directa de neuronas nociceptivas producida por formalina y la segunda fase por un dolor más largo debido a una respuesta inflamatoria del tejido (Hunnskaar y Hole 1987; Abbott et al., 1995; Hong y Abbot 1995). Varios mediadores químicos se liberan de las células dañadas como histamina, serotonina y prostaglandinas (Dubuisson y Dennis, 1977). Estos mediadores participan en la respuesta inflamatoria y pueden también estimular nociceptores e inducir así dolor (Rosland et al., 1990). El dolor producido por formalina es solamente un componente de una reacción inflamatoria local inducida por este irritante. De hecho, la inyección de formalina también produce un edema y un aumento de la permeabilidad vascular (Hong y Abbott 1995). Además, varios investigadores han encontrado que la formalina produce la activación bifásica de las fibras C, aunque la última fase la actividad de la fibra C es considerablemente menor con concentraciones bajas de formalina (Abram et al., 1996; McCall et al., 1996) que para concentraciones más altas (Taylor et al., 1995; Puig y Sorkin, 1996).

7.2. MODELO DE FORMALINA EN RATAS DIABÉTICAS

En años recientes se ha utilizado cada vez más el modelo de la diabetes inducida por STZ en la rata como la tentativa de proporcionar información y evaluar terapias potenciales. La STZ destruye las células β pancreáticas, disminuyendo la producción de insulina a un corto plazo (Courteix et al., 1993).

Hay evidencia que la hiperalgesia y la alodinia, dos síntomas encontrados en pacientes con neuropatía diabética, se observan en este modelo en la rata. La hiperalgesia se presenta en la segunda semana después de la inducción con una tendencia a empeorarse en función de la duración del síndrome diabético a duraciones más largas (Courteix et al., 1993). Se ha reportado una hipersensibilidad a los estímulos químicos nocivos en animales diabéticos ya que exhiben respuestas crecientes a las inyecciones de formalina (Courteix et al., 1993; Calcutt et al., 1994).

Nuestros datos concuerdan con estos reportes ya que observamos un estado hiperalgésico en ratas diabéticas. La administración de formalina al 0.5% produjo un nivel de dolor similar al observado con la administración de formalina al 1% en ratas normales.

Se ha observado que la variación más grande en ratas diabéticas mediante un estímulo químico es la posición de la pata inyectada debido a que se mantiene más tiempo sin el contacto en tierra que las ratas normales. Este comportamiento de la evitación sugiere una sensibilidad elevada a la formalina. La lamida de la pata inyectada, observada en roedores, puede corresponder a una respuesta instintiva al dolor inducido por formalina (Courteix et al., 1993). Además, el aumento significativo de lamida y del número de sacudidas en ratas diabéticas con respecto al grupo control (Calcutt et al., 1996) también sugieren un efecto hiperalgésico producido por la diabetes experimental. Por lo tanto, los resultados

obtenidos aquí con la prueba de formalina son evidencia de la hiperalgesia en ratas diabéticas (Courteix et al., 1993).

El curso temporal de dolor descrito por Dubuisson y Dennis (1992) para la prueba de formalina corresponde al obtenido en nuestros resultados. En las figuras 13 y 14 se observa las dos fases de comportamiento que presentaron las ratas.

7.3. ALODINIA EN RATAS DIABÉTICAS

En este estudio observamos que la administración de STZ indujo una clara diabetes experimental. Cuatro a seis semanas después de la inducción se observó una clara alodinia táctil.

Se ha demostrado que la inducción de la diabetes por medio de STZ en la rata exhibe una hiperalgesia mecánica profunda en estos animales. De acuerdo con informes anteriores esta hiperalgesia es evidente después de la inyección de STZ y dura por lo menos 4 semanas (Ahlgren y Levine, 1993; Courteix et al., 1993; Malcangio y Tomlinson, 1998). Además de la hiperalgesia, después de 4 semanas se empieza a observar alodinia (Fox et al., 1999; Ulugol et al., 2002). La alodinia táctil está mediada predominante por fibras aferentes mielinizadas (Ossipov et al., 1999). Khan et al. (2002) demostraron que las fibras aferentes mielinizadas A δ y A β de ratas diabéticas responden exageradamente a la estimulación mecánica con filamentos de von Frey. Otros autores han sugerido que el dolor producido por

neuropatía diabética parece deberse al daño de las fibras C no mielinizadas (Chen y Levine, 2001; Burchiel et al., 1985). Estudios electrofisiológicos han demostrado una incidencia perceptiblemente más alta de descargas espontáneas en comparación a los nervios normales y esta hiperactividad espontánea ocurre casi exclusivamente en fibras C (Burchiel et al., 1985; Chen y Levine, 2001). Además, las descargas espontáneas de la fibra C, mediadas en parte por actividad de la protein-cinasa C (PKC), contribuyen a la hiperalgesia causada por la diabetes (Ahlgren y Levine, 1994).

7.4. MODELO DE CHUNG

Las lesiones periféricas del nervio pueden generar un síndrome que abarca, además de dolor espontáneo, respuestas exageradas al tacto ligero (alodinia táctil) y a los estímulos de la temperatura (hiperalgesia térmica). La alodinia táctil es probable la más común de las respuestas evocadas al estímulo (Meyer et al., 1985; Wahern y Torebjörk, 1992).

En un esfuerzo por encontrar los mecanismos neuropáticos subyacentes del dolor, se han desarrollado varios modelos en la rata. Algunos modelos implican la exposición quirúrgica del nervio ciático en una localización relativamente superficial en la extremidad más baja con la ventaja de la facilidad y de la rapidez de la preparación quirúrgica (Chaplan et al. 1994). Kim y Chung (1992) han descrito un modelo en el cual ligan los nervios espinales L5 y L6 antes de su entrada en el nervio ciático. Después de 24 h estos animales comienzan a exhibir un estado hiperestésico duradero (Chaplan et al. 1994). En este modelo la

estimulación de la pata de la rata con los filamentos de von Frey produce la conducta típica dolorosa de retiro de la pata evaluada ante estímulos normalmente inocuos (alodinia táctil), observando un patrón similar al reportado por otros autores (Chaplan et al., 1994). Las medidas de umbral de retiro con filamentos de von Frey en el paradigma arriba-abajo, cuando se combina con el modelo de dolor neuropático, representan una herramienta poderosa para analizar los efectos de las manipulaciones del estado de dolor neuropático (Chaplan et al., 1994). En nuestro estudio observamos una conducta alodínica similar a la reportada por otros autores.

7.5. EFECTO DE LA BENFOTIAMINA

Las vitaminas del complejo B se han utilizado principalmente en el tratamiento y profilaxis de los desórdenes que resultan de su deficiencia. Sin embargo, se han evaluado recientemente como fármacos potencialmente útiles para tratar las condiciones patológicas, particularmente del desorden doloroso, asociado no necesariamente a su deficiencia.

La deficiencia de alguna vitamina B puede dar lugar a condiciones patológicas que incluyen dolor crónico, indicando que éstas son esenciales para el organismo principalmente para la función normal del sistema nervioso (Claus et al., 1984; Shaeffer, 1987; Marcus y Coulston, 2001).

Hay evidencia fisiopatológica y bioquímica que demuestra que ciertas vitaminas del complejo B intervienen directamente en el metabolismo de fibras

aferentes periféricas. La vitamina B₁ desempeña un papel dominante en el metabolismo de carbohidratos, la fuente preferida de la energía para las fibras del nervio. Entre otras funciones, la energía se requiere para el proceso de transporte axonal, que proporciona las proteínas y las enzimas estructurales necesitadas para la regeneración. La tiamina también hace una parte importante como modulador de la transmisión neuromuscular (Zimmermann, 1988).

Hay evidencia para postular que las vitaminas del complejo B tienen un efecto antinociceptivo, aunque el mecanismo neurofisiológico es desconocido. Se ha evaluado la actividad analgésica del complejo de vitaminas B en el dolor inflamatorio inducido por formalina y se ha sugerido que el sitio de acción de las vitaminas del complejo B no está situado en la periferia, pero pudiera ser en el nivel espinal o supraespinal (Reyes-García et al., 2001). Esta sugerencia está apoyada por el hecho de que la médula espinal y el tálamo desempeñan un papel importante en el efecto antinociceptivo del complejo B (Fu et al., 1988; Dakshinamurti et al., 1990).

Varios estudios clínicos han demostrado que el dolor y la disestesia se pueden mejorar o eliminar por las vitaminas B. Además, la medicación conduce a la mejora de la sensación a la vibración, temperatura y al aumento de la velocidad de la conducción del nervio (Loew, 1996).

La tiamina molecular no se administra para los propósitos terapéuticos, en lugar de ello se administra uno de sus derivados solubles en agua (clorhidrato,

disulfuro o nitrato de tiamina) o de los análogos lipofílicos de la tiamina, las alitiaminas (acetiamina, benfotiamina, o fursultiamina) que se convierten a las coenzimas activas dentro del organismo (Loew, 1996).

Los experimentos han demostrado que las vitaminas B, dadas en dosis grandes, tienen características analgésicas y antineuralgias. Esto es debido a su influencia en los mediadores, que ejercen probablemente un efecto analgésico directamente sobre los nervios (Jurna et al., 1990).

La forma activa de la tiamina es un compuesto orgánico necesario para el organismo en sus funciones vitales. Solo se requieren cantidades pequeñas de la tiamina para sus funciones catalíticas como coenzimas, mientras que se requieren cantidades mucho más grandes para los efectos farmacodinámicos en el metabolismo del sistema nervioso. Las alitiaminas atraviesan la barrera intestinal, su absorción es más rápida y más fácilmente, conduciendo a concentraciones más altas de la sangre y en tejidos incluso cuando se dan dosis comparativamente bajas (Loew, 1996).

En estudios clínicos se ha mostrado que la aplicación terapéutica del complejo de vitaminas B que contienen benfotiamina es efectiva en diabetes y polineuropatía alcohólica (Kretschmar et al., 1996; Stracke et al., 1996; Stracke et al., 2001). Asimismo, se ha reportado que la benfotiamina es eficaz en el tratamiento de nefropatía diabética (Babaei-Jadidi et al., 2003).

Los resultados reportados en las investigaciones han demostrado la eficacia de la monoterapia con la benfotiamina en polineuropatía alcohólica. Dentro del período del estudio de 8 semanas, la benfotiamina condujo a una mejora significativa del umbral de vibración, función motora y de la cuenta total de síntomas (Woelk et al, 1998).

Recientemente se ha publicado que la benfotiamina en el tratamiento de polineuropatía diabética en un estudio experimental seleccionado al azar, controlado durante 3 semanas, ha proporcionado evidencia de los efectos benéficos de la benfotiamina en pacientes con neuropatía diabética. El efecto más pronunciado sobre quejas era una disminución del dolor, en pacientes tratados con benfotiamina (Haupt et al., 2005).

A nuestro conocimiento no hay estudios en ratas que hayan determinado el efecto antinociceptivo de la benfotiamina en el modelo de formalina en la rata por lo tanto, nuestros datos son los primeros en este sentido. Sin embargo, se ha reportado que la benfotiamina bloquea tres caminos importantes del daño hiperglucémico y previene la retinopatía diabética experimental en ratas (Hammes et al., 2003).

La acumulación de productos finales de glicación avanzada ha estado implicado en la disfunción bioquímica asociada al desarrollo crónico de complicaciones microvasculares de la diabetes (Karachalias et al., 2003). Las altas concentraciones de glucosa en plasma son responsables de la producción

mitocondrial creciente de radicales libres e inactivación subsecuente de gliceraldehído fosfato deshidrogenasa (GAPDH) en células endoteliales vasculares y otras células implicadas en estas complicaciones. Como resultado de la capacidad disminuida de GAPDH a los metabolitos por contracorriente del proceso, se activan tres caminos que han estado implicados en el daño metabólico en la diabetes (Obrenovich et al., 2003). Las concentraciones crecientes de los intermedios glicolíticos de triosa fosfato, gliceraldehído-3-fosfato (GA3P) y dihidroxiacetonafosfato (DHAP) son el disparador para la disfunción bioquímica en la hiperglucemia (Tilton et al., 1992; Nishikawa et al., 2000).

Se ha descubierto que la benfotiamina puede inhibir tres de los caminos bioquímicos principales implicados en la patogénesis de la hiperglucemia que inducen daño vascular; el camino de la hexosamina, el camino de la formación de productos de glicación avanzada y el camino de diacilglicerol (DAG)-protein cinasa C (PKC), que son activados por la disponibilidad creciente de los metabolitos glicolíticos gliceraldehído-3-fosfato y fructuosa-6-fosfato. La benfotiamina también previene la activación de NF- κ B por hiperglucemia, activando la enzima transcetolasa del camino de pentosa fosfato, que convierte el gliceraldehído-3-fosfato y fructosa-6-fosfato en pentosa-5-fosfato y otros azúcares. En retinas de animales diabéticos, el tratamiento de benfotiamina inhibe estos tres caminos y previene la retinopatía diabética experimental (Hammes et al., 2003).

La tiamina no previene la formación de productos finales de glicación avanzada *in vivo*, en los nervios periféricos de ratas diabéticas, mientras que si lo hace la benfotiamina (Stracke et. al., 2001). El mecanismo responsable de estos efectos no se sabe.

La hiperglucemia induce aumentos en concentración de fructosa-6-fosfato y gliceraldehído-3-fosfato, podría así desviar estos metabolitos a pentosa-5-fosfato y eritrosa-4-fosfato bajo condiciones donde la transcetolasa es activada completamente por su cofactor tiamina. Se ha reportado previamente que los pacientes diabéticos tienen una actividad subnormal de transcetolasa en los eritrocitos (Saito et al., 1987). Los niveles de los substratos fructosa-6-fosfato y triosa fosfato se elevan en los eritrocitos de pacientes diabéticos (Stevens et al., 1977). La hiperglucemia induce las especies reactivas de oxígeno que hacen inactivo a la enzima glicolítica GAPDH no son producidas por la mitocondria en eritrocitos mientras que están en células endoteliales vasculares (Hammes et al., 2003).

El mecanismo por el cual la hiperglucemia puede inducir deficiencia funcional de la tiamina en células endoteliales vasculares todavía no se sabe. Sin embargo, ¿porque los pacientes diabéticos no exhiben claramente las manifestaciones clínicas clásicas de la deficiencia de tiamina?, esto parece muy probablemente, que un mecanismo específico de la célula vascular está implicado. Las células endoteliales vasculares y otros tipos de célula dañadas por hiperglucemia son únicamente incapaces de regular el transporte de glucosa

cuando están expuestas a hiperglucemia extracelular (Kaiser et al., 1993). Como resultado, estas células desarrollan hiperglucemia intracelular que causa la producción excesiva de superóxido por la cadena de transporte de electrones mitocondrial (Nishikawa et al., 2000; Brownlee, 2001). El superóxido y la especie reactiva superóxido derivada del oxígeno pueden oxidar la tiamina a productos biológicos no funcionales tiocromo y oxodihidrotiocromo (Stepuro et al., 1997).

Los datos indican que el tratamiento de pacientes diabéticos con benfotiamina u otros derivados liposolubles de tiamina pudo prevenir o retrasar el desarrollo de complicaciones diabéticas (Hammes et al., 2003). La inhibición de la activación de PKC por hiperglucemia previene anomalías funcionales y estructurales en la retina y el glomerulo renal de animales diabéticos (Ishii et al., 1996; Koya et al., 2000). De manera similar, los inhibidores de productos finales de glicación avanzada previenen varias manifestaciones funcionales y estructurales de la enfermedad vascular diabética en retina, riñón, nervio y arteria (Hammes et al., 1991; Soulis-Liparota et al., 1991; Park et al., 1998). La capacidad de la benfotiamina de inhibir los caminos que causan daño vascular puede ser clínicamente útil en la prevención del desarrollo y progresión de complicaciones diabéticas. Se ha demostrado que la benfotiamina bloquea los caminos del daño hiperglucémico aumentando la actividad de transacetolasa (Hammes et al., 2003).

Se ha reportado que en ratas diabéticas el efecto del nitrato de tiamina (hidrosoluble) y de la benfotiamina (liposoluble) en la función periférica del nervio

(velocidad de conducción del nervio motor) así como en la formación de productos finales de glicación avanzada en nervios periféricos y tejidos finos (Stracke et al., 2001). La velocidad de conducción del nervio motor decae en ratas diabéticas y la formación de productos finales de glicación avanzada incrementa, por lo que se observó que la administración de befortiamina indujo una inhibición importante de los nervios, de la formación de productos finales de glicación avanzada y de los productos de glicoxidación (CML) inducidos por diabetes son prevenidos totalmente. El tratamiento con tiamina no afectó perceptiblemente productos finales de glicación avanzada o los niveles de CML (Stracke et al., 2001).

Los resultados obtenidos en este estudio indican que el análogo de la tiamina, la befortiamina, puede reducir la alodinia inducida por la ligadura de los nervios espinales L5 y L6 o la administración de STZ en la rata. Según la investigación documentada efectuada por nosotros, éste es el primer informe sobre el efecto antialodínico de la befortiamina en dos modelos bien aceptados de dolor neuropático en la rata. Estos resultados, además confirman la eficacia de las vitaminas del complejo B en este tipo de dolor (Reyes-García et al., 2003).

Por otra parte, nuestros datos están de acuerdo con las observaciones clínicas que demuestran que la cianocobalamina (Kuwabara et al., 1999), la combinación de la tiamina y piridoxina (Abbas et al., 1997) o la mezcla de tiamina, piridoxina y cianocobalamina (Tong, 1980; Eckert y Schejbal, 1992) reduce la neuropatía periférica dolorosa. Además, nuestros resultados apoyan las observaciones clínicas que demuestran que la befortiamina puede reducir

perceptiblemente el dolor neuropático producido por el alcoholismo (Woelk et. al., 1998) o la diabetes (Winkler et al., 1999).

El efecto antialodínico producido por la benfotiamina podría resultar de la activación de diversos sistemas. El efecto antinociceptivo de las vitaminas B se ha asociado a un aumento del control inhibitorio aferente de neuronas nociceptivas en la médula espinal (Fu et al., 1988) y una reducción de la respuesta de neuronas talámicas al estímulo nociceptivo (Sharma et al., 1990; Jurna et al., 1990). Puesto que la benfotiamina es un análogo de la tiamina; su efecto antialodínico podría resultar de la activación de los mismos mecanismos, lo cual lo convierte en un profármaco con ventajas terapéuticas sobre la tiamina.

8. CONCLUSIONES

- La benfotiamina (pretratamiento de 2.5 horas) produjo efecto analgésico durante la segunda fase de la prueba de la formalina.
- La benfotiamina redujo la hiperalgesia de manera dependiente de la dosis en ratas diabéticas en la segunda fase de la prueba de la formalina.
- La benfotiamina redujo de manera dependiente de la dosis la alodinia táctil inducida por STZ.
- La benfotiamina redujo la alodinia táctil producida por la ligadura de los nervios espinales L5 y L6.
- La benfotiamina podría ser un candidato para ser utilizado como analgésico en el dolor inflamatorio y neuropático en seres humanos.

9. GLOSARIO

Allitiaminas: clase única de derivados de la tiamina (vitamina B₁) con una estructura muy específica que le permite atravesar las membranas celulares con mucha facilidad.

Alodinia: dolor producido por un estímulo que normalmente no produce dolor, es decir sensibilidad táctil aumentada con dolor.

Anémia aplástica: insuficiencia de la médula ósea que origina una producción insuficiente de los elementos formes de la sangre.

Antialodínico: reducción de la alodinia táctil.

Antinociceptivo: reducción del dolor inflamatorio.

Axotomía: sección del axón a través de la lesión del nervio.

Benfotiamina: es un análogo lipofílico de la tiamina, es decir una allitiamina que se convierte en coenzima biológicamente activa dentro del organismo.

Beri-beri: es una enfermedad causada por la deficiencia de la tiamina. Los síntomas incluyen dolor, pérdida de sensación en manos y los pies (neuropatía periférica). El músculo presenta pérdida de la función o de parálisis de las extremidades más bajas, además se presenta ritmo cardíaco creciente, congestión del pulmón, y el corazón agrandado relacionado con paro cardíaco congestivo.

Bradicinina: pertenece al grupo de las cininas. Participa en la liberación de otros mediadores del dolor como neurocininas, neuropéptidos, citocinas, óxido nítrico, histamina y serotonina. Estos mediadores participan en procesos como la vasodilatación, incremento de la permeabilidad vascular, extravasación plasmática, migración celular e hiperalgesia.

Cuerpo mamilar: par de pequeñas masas esféricas de sustancia gris detrás del tuber cinéreo, entre éste y el espacio perforado posterior.

Degeneración Walleriana: degeneración adiposa de una fibra nerviosa separada o seccionada. Dentro de los primeros minutos de producida la lesión, la membrana plasmática del axón se cierra. En el segmento proximal se acumula contenido axonal (neurofilamentos, vesículas, mitocondrias) debido a la interrupción del flujo axoplásmico. El segmento distal al sitio de la lesión degenera. Los fenómenos más tempranos de la degeneración walleriana se visualizan a las 24 horas de producida la lesión. El evento crucial en la degeneración del segmento distal del axón lesionado es la desintegración granular del citoesqueleto y el axoplasma. La lesión estructural del axón se correlaciona con la pérdida de la capacidad para generar y conducir el potencial de acción.

Disestesia (o parestesia): es cualquier alteración cualitativa de la sensibilidad consecutiva al sistema nervioso, por irrigación sanguínea insuficiente del mismo o simplemente de origen psíquico. Son parestesias las sensaciones espontáneas o provocadas de hormigueo, quemazón, entorpecimiento, picazón, prurito etc.

Distensión: estiramiento de los tejidos y partes ligamentosas de una articulación.

Dolor neurogénico: dolor iniciado o causado por una lesión primaria, que libera moléculas de las terminales nociceptivas que producen dolor.

Dolor neuropático: dolor iniciado o causado por una lesión o una disfunción primaria en el sistema nervioso periférico o central, se produce como consecuencia de un daño a traumatismos, trastornos metabólicos o vasculares, deficiencias nutricionales, cáncer, diabetes, artritis, infecciones, infarto, esclerosis múltiple, tumores o lesiones en la médula espinal.

Dolor nociceptivo: se debe a la estimulación de nociceptores periféricos y es transmitido al sistema nervioso central por fibras nerviosas nociceptivas normales (por ejemplo, por traumatismo o quemadura).

β -endorfinas: son consideradas opioides endógenos. La proopiometanocortina es el precursor de las β -endorfinas, son particularmente abundantes en el hipotálamo, el *locus coeruleus*, tálamo y glándula pituitaria.

Encefalopatía: enfermedad o trastorno del encéfalo.

Encefalopatía de Wernicke: encefalopatía con lesiones degenerativas de los cuerpos mamilares por intoxicación alcohólica.

Estimulación eléctrica: se utilizan descargas eléctricas largas o pruebas que utilizan choques eléctricos o descargas eléctricas cortas en el animal.

Estímulos mecánicos: se basan en la aplicación de una presión constante ya sea en la cola o en la pata posterior del animal (filamentos de von Frey).

Estímulo nociceptivo: aquellos estímulos que dañan tejidos normales.

Estímulo nocivo: es un estímulo que es perjudicial a los tejidos finos normales.

Estímulos químicos: es aplicar una sustancia química que produce dolor (formalina).

Estímulos térmicos: consiste en aplicar calor radiante a la pata del animal.

Estreptozotocina (STZ): es un diabético debido a una acción citotóxica selectiva sobre las células β pancreáticas.

Factor de crecimiento neural: es sintetizado en respuesta al proceso de inflamación o por daño tisular, se une al receptor Trk A, el cual está expresado principalmente en nociceptores viscerales, estimula la liberación y regulación de diversos péptidos como la sustancia P y al péptido relacionado con el gen de calcitonina.

Fibras A: fibras nerviosas sensitivas mielinizadas presentes en la piel.

Fibras A β : fibras de mayor diámetro 5-15 μm , velocidad de conducción 30-120 m/s, mielinizadas, responden al máximo ante estímulos suaves móviles; están presentes en los nervios que integran la piel. En sujetos normales la actividad de estas fibras no produce dolor.

Fibras A δ : fibras de pequeño diámetro 1-5 μm , velocidad de conducción 6-30 m/s, poco mielinizadas, están presentes en la piel y estructuras viscerales y somáticas profundas, responden al máximo sólo a estímulos intensos (dolorosos).

Fibras C: fibras con un diámetro de 0.5-2 μm , velocidad de conducción 0.5-2 m/s, amielinica, responde al máximo ante estímulos mecánicos, térmicos y químicos dolorosos.

Fibras aferentes primarias: se clasifican por su diámetro, grado de mielinización y velocidad de conducción (ver nociceptor).

Fibromialgia: es una forma común de fatiga y dolor muscular generalizado. La palabra fibromialgia significa dolor en los músculos y en los tejidos que conectan los huesos, ligamentos y tendones, por lo que es una forma de reumatismo de los tejidos blandos.

Formalina: formaldehído preparado al 0.5% y 1%.

Glutamato: es un aminoácido excitatorio debido a que se relacionan con una neurotransmisión excitatoria rápida entre nociceptores y neuronas de la médula espinal

Hiperalgnesia: respuesta anormalmente aumentada ante un estímulo doloroso.

Hiperestesia: sensibilidad aumentada a la estimulación, excluyendo los sentidos especiales.

Hipersensibilidad: sensibilidad exagerada; estado anafiláctico o alérgico en el que el organismo reacciona a los agentes extraños más enérgicamente que lo ordinario.

Hipoestesia: sensibilidad disminuida al estímulo, excepto los sentidos especiales.

Histamina: es sintetizada a partir de histidina por la histidina descarboxilasa y puede encontrarse libre o almacenada en vesículas sinápticas. Es liberada en el proceso de desgranulación de mastocitos por mediadores de la inflamación, la cual activa receptores H_1 , que producen un aumento en la entrada de calcio a la célula, lo que libera neuropéptidos y cininas que ocasionan la amplificación de la señal dolorosa.

Neuralgia: dolor en la distribución de un nervio o de nervios.

Neuromoduladores: aumentan o disminuyen la actividad: afectando la síntesis, recaptura, biotransformación o unión al receptor de los neurotransmisores.

Neuropatía: un disturbio de la función o cambio patológico en un nervio.

Neuropatía diabética: es una anomalía acompañada por dolor. Es una de las complicaciones más frecuentes de la diabetes mellitus tipo I, se manifiesta como dolores musculares profundos, dolor lancinante, quemante y una sensación persistente de ardor o punzadas, generalmente en las piernas y los pies.

Neurotransmisores: sustancias químicas que llevan información entre células nerviosas adyacentes.

Nocicepción: mecanismos neuronales por los cuales se detectan los estímulos nocivos.

Nociceptor: un receptor preferencial sensible a un estímulo nocivo o a un estímulo que llegó a ser nocivo si estuvo prolongado.

Polineuropatía alcohólica: es un desorden de los nervios periféricos que interfiere con la actividad sensorial y de la función autonómica del nervio, causa principalmente dolor y disestesia, las formas severas pueden implicar parálisis. La progresión del desorden puede causar inhabilidad de caminar.

Prostaglandinas: pertenecen al grupo de los prostanoides. Son moléculas que se sintetizan a partir de fosfolípidos de membrana por activación de la lipólisis mediante la acción de la fosfolipasa A_2 y fosfolipasa C, que dan como resultado la liberación de ácido araquidónico, el más abundante precursor de prostaglandinas en mamíferos, por sí solas no causan dolor, sin embargo, su función consiste en sensibilizar los nociceptores mediante la liberación de diversos mediadores.

Reflejos autonómicos: se integran a nivel de médula o tronco cerebral, pero las vías pertenecen a la división simpática o parasimpática del sistema nervioso autónomo.

Reflejos somáticos: son reacciones reflejas que intervienen, individualmente o en conjunto, en el mantenimiento y recuperación del equilibrio, pertenece al sistema propioceptivo.

Serotonina: la 5-hidroxitriptamina (5-HT) es liberada por neuronas serotoninérgicas que se proyectan de la sustancia gris periacueductal (PAG) al núcleo del raquí magno (NRM) y de ahí a las láminas I, II, IV y V del asta dorsal.

Sustancia P: es un polipéptido perteneciente a la familia de las neurocininas. Es un neurotransmisor aferente primario liberado por la activación de fibras C, está involucrado en reacciones inflamatorias debidas a un daño tisular químico o térmico que produce vasodilatación, aumento en la permeabilidad plasmática, liberación de histamina por mastocitos e incremento en la actividad fagocitaria de neutrófilos y macrófagos. Todos estos efectos provocan que la sustancia P tenga un efecto hiperalgésico

Tiamina: primer miembro del complejo B por lo que se le conoce como vitamina B₁, es una molécula orgánica hidrosoluble que contiene una pirimidina y un núcleo de tiazol enlazados por un puente metileno, funciona en el cuerpo en forma de coenzima pirofosfato de tiamina (TPP).

Umbral de dolor: intensidad del estímulo en la cual se percibe dolor, el umbral es realmente la experiencia del paciente, mientras que la intensidad medida es un acontecimiento externo, el umbral del dolor sería el nivel en el cual el 50% de estímulos serían reconocidos como dolorosos.

10. REFERENCIAS

- Abbas ZG, Swai AB: Evaluation of the efficacy of thiamine and pyridoxine in the treatment of symptomatic diabetic peripheral neuropathy. *East Afr Med J* 74(12): 803-8, 1997.
- Abbott FV, Franklin KB, Westbrook RF: The formalin test: scoring properties of the first and second phases of the pain response in rats. *Pain* 60(1): 91-102, 1995.
- Abbott FV, Ocvirk R, Najafee R, Franklin KB: Improving the efficiency of the formalin test. *Pain* 83: 561-569 1999.
- Abram SE, Dean C, O'Connor TC: Peroneal afferent nerve discharges underlying the behavioral response to the formalin test. *Reg Anesth* 21(3): 226-33, 1996.
- Ahlgren SC, Levine JD: Mechanical hyperalgesia in streptozotocin-diabetic rats is not sympathetically maintained. *Brain Res* 616 (1-2): 171-5, 1993.
- Ahlgren SC, Levine JD: Protein kinase C inhibitors decrease hyperalgesia and C-fiber hyperexcitability in the streptozotocin-diabetic rat. *J Neurophysiol* 72(2): 684-92, 1994.
- Ahlgren SC, White DM, Levine JD: Increased responsiveness of sensory neurons in the saphenous nerve of the streptozotocin-diabetic rat. *J Neurophysiol* 68(6): 2077-85, 1992.
- Akil H, Mayer DJ, Liebeskind JC: Antagonism of stimulation-produced analgesia by naloxone, a narcotic antagonist. *Science* 191: 961-967, 1976.
- Alberti KG, Zimmet PZ: Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. *Diabet Med* 15(7): 539-53, 1998.
- Amos CI, Krushkal J, Thiel TJ, Young A, Zhu DK, Boerwinkle E, de Andrade M: Comparison of model-free linkage mapping strategies for the study of a complex trait. *Genet Epidemiol* 14(6):743-8, 1997.
- Babaei-Jadidi R, Karachalias N, Ahmed N, Battah S, Thornalley: Prevention of incipient diabetic nephropathy by high-dose thiamine and benfotiamine. *Diabetes*. 52(8): 2110-20, 2003.
- Baker H, Frank O: Absorption, utilization and clinical effectiveness of allithiamines compared to water-soluble thiamines. *J Nutr Sci Vitaminol* 22 Suppl: 63-8, 1976.

Baker H, Thomson AD, Frank O, Leevy CM: Absorption and passage of fat and water-soluble thiamine derivatives into erythrocytes and cerebrospinal fluid of man. *Am J Clin Nutr* 27: 676-680, 1976.

Baker H: Absorption and passage of fat and water-soluble thiamine derivatives into erythrocytes and cerebrospinal fluid of man. *Am J Clin Nutr* 27: 676-680 1974.

Barstosky GD, Wild A: Additive antinociceptive effects of vitamins B₁, B₆ and B₁₂ in the writhing test and antinociception in the heat at coil test. *Neurosci Lett* 101: 95-100, 1989.

Bellush LL, Reid SG: Altered behavior and neurochemistry during short-term insulin withdrawal in streptozocin-induced diabetic rats. *Diabetes* 40(2): 217-22, 1991.

Beric: Estados dolorosos después de una lesión de la médula espinal. En: *clínicas de anestesiología de Norteamérica*. Ed. Mc Graw Hill. Wallace MS, Dunn JS, Yaksh TL. Pag 295-314, 1997.

Bermond P: Analgesic and antiinflammatory properties of vitamins. *Int J Vitam Nutr Res Suppl* 30: 153-60, 1989.

Beurman RW, Tanelian DL: Corneal pain evoked by thermal stimulation. *Pain* 7: 1-4, 1979.

Bitsch R, Wolf M, Moller J, Heuzeroth, Gruneklee D: Bioavailability assessment of the lipophilic benfotiamine as compared to water-soluble thiamine derivative. *Ann Nutr Metab* 35: 292-296, 1991.

Björkman R: Central antinociceptive effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs and paracetamol. *Acta Anaesthesiol Scand* 103: 9-44, 1995.

Bley KR, Hunter JC, Eglen RM, Smith JA: The role of IP prostanoid receptors in inflammatory pain. *Trends Pharmacol Sci* 19 : 141-147, 1998.

Bogardus C, Lillioja S, Howard BV, Reaven G, Mott D: Relationships between insulin secretion, insulin action, and fasting plasma glucose concentration in nondiabetic and noninsulin-dependent diabetic subjects. *J Clin Invest* 74(4):1238-46, 1984.

Boissier JR, Tillement JPO, Merlin L : Fluorimetric titration of large quantities of free and bound thiamine in tissues. *Ann Pharm Fr* 24: 633-638, 1966.

Bonica JJ: Evolution and current status of pain programs. *J Pain Syptom Manage* 5: 347-368, 1990.

- Bonica JJ: Importance of effective pain control. *Acta Anaesthesiol Scand Suppl* 85:1-16, 1987.
- Bowman WC, Rand MJ: Farmacología. En: Bases bioquímicas y patológicas. Aplicaciones clínicas. 2ª Ed. Interamericana. Pag 1-36, 1984.
- Brownlee M: Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* 414(6865): 813-20, 2001.
- Burchiel KJ, Russell LC, Lee RP, Sima AA: Spontaneous activity of primary afferent neurons in diabetic BB/Wistar rats. A possible mechanism of chronic diabetic neuropathic pain. *Diabetes* 34(11): 1210-3, 1985.
- Burnstock G, Wood JN. Purigenic receptors: Their role in nociception and primary afferent neurotransmission. *Curr Opin Neurobiol* 6: 526-532, 1996.
- Butler MJ: Artritis y dolor musculoesquelético. En: Clínicas de Anestesiología de Norteamérica. Wallace MS, Dunn JS, Yarsh TL. Mc Graw Hill Pag: 459-477, 1997.
- Calcutt NA, Jorge MC, Yaksh TL, Chaplan SR: Tactile allodynia and formalin hyperalgesia in streptozotocin-diabetic rats: effects of insulin, aldose reductase inhibition and lidocaine. *Pain* 68(2-3): 293-9, 1996.
- Calcutt NA, Malmberg AB, Yamamoto T, Yaksh TL. Tolrestat treatment prevents modification of the formalin test model of prolonged pain in hyperglycemic rats. *Pain* 58(3): 413-20, 1994.
- Calcutt NA, Tomlinson DR, Willars GB, Keen P: Axonal transport of substance P-like immunoreactivity in ganglioside-treated diabetic rats. *J Neurol Sci* 96(2-3): 283-91, 1990.
- Cameron NE, Cotter MA : Effects of a nonpeptide endothelin-1 ET_A antagonist on neurovascular function in diabetic rats: interaction with the renin-angiotensin system. *J Pharmacol Exp Ther* 278: 1262-1268, 1996.
- Cassell EJ: The nature of suffering and the goals of medicine. *N Engl J Med* 306: 639-645, 1982.
- Ceccarelli I, Fiorenzani P, Massafra C, Aloisi AM: Long-term ovariectomy changes formalin-induced licking in female rats: the role of estrogens. *Reprod Biol Endocrinol* 1: 24, 2003.
- Cerveró F, Laird JMA: Fisiología del Dolor. En: Tratamiento del Dolor: Teoría y Práctica Aliaga L. Baños JE, Barutell C, et al., MCR. Barcelona Pag 9-25, 1995.
- Clark CM, Lee, DA: Prevention and treatment of the complications of diabetes mellitus. *N Engl J Med* 332: 1210-1217, 1995.

- Claus D, Neundorfer B, Warecka K: The influence of vitamin B6 deficiency on somatosensory stimulus conduction in the rat. *Eur Arch Psychiatry Neurol Sci* 234(2): 102-5, 1984.
- Coderre TJ, Katz J, Vaccarino AL, Melzack R: Contribution of central neuroplasticity to pathological pain: review of clinical and experimental evidence. *Pain* 52(3): 259-85, 1993.
- Coderre TJ, Vaccarino AL, Melzack R: Central nervous system plasticity in the tonic pain response to subcutaneous formalin injection. *Brain Res* 535(1): 155-8, 1990.
- Coderre TJ, Yashpal K: Intracellular messengers contributing to persistent nociception and hyperalgesia induced by L-glutamate and substance P in the rat formalin pain model. *Eur J Neurosci* 6(8): 1328-34, 1994.
- Costigan M, Woolf CJ: Pain: molecular mechanisms. *J Pain* 1(3 Suppl): 35-44, 2000.
- Courteix C, Bardin M, Chantelauze C, Lavarenne J, Eschalier A: Study of the sensitivity of the diabetes-induced pain model in rats to a range of analgesics. *Pain* 57(2): 153-60, 1994.
- Courteix C, Eschalier A, Lavarenne J: Streptozocin-induced diabetic rats: behavioural evidence for a model of chronic pain. *Pain* 53(1): 81-8, 1993.
- Chaplan SR, Bach FW, Pogrel JW, Chung JM, Yaksh TL: Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. *J Neurosci Meth* 53: 55-63, 1994.
- Chen X, Levine JD: Hyper-responsivity in a subset of C-fiber nociceptors in a model of painful diabetic neuropathy in the rat. *Neurosci* 102: 185-195, 2001.
- Chu PC, Lin MT, Shian LR, Leu SY: Alterations in physiologic functions and in brain monoamine content in streptozocin-diabetic rats. *Diabetes* 35(4): 481-5, 1986.
- Dakshinamurti K, Sharma SK, Bonke D: Influence of B vitamins on binding properties of serotonin receptors in the CNS of rats. *Klin Wochenschr* 68(2): 142-5, 1990.
- Daniel WW: Análisis de varianza. En: *Bioestadística. Base para el análisis de las ciencias de la salud*. Editorial Limusa, pag 283-311, 1989.
- De Castro J, Gasparetto A, Giron G: On the curarizing action of large doses of thiamine. *Acta Anaesthesiol* 16 (Suppl 3): 33-50, 1965.

- Denner LA, Wu JY : Two forms of rat brain glutamic acid decarboxylase differ in their dependence on free pyridoxal phosphate. *J Neurochem* 44(3): 957-65, 1985.
- Dockery P, Sharma AK: Ultrastructural abnormalities of myelinated fibres in the tibial nerve of streptozotocin-diabetic rats. *J Neurol Sci* 98(2-3): 327-45, 1990.
- Dray A: Inflammatory mediators of pain. *Br J Anaesth* 75: 125-131, 1995.
- Dubner R, Bennett GJ: Spinal and trigeminal mechanisms of nociception. *Ann Rev Neurosci* 6: 381-418, 1983.
- Dubuisson D, Dennis SG : The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats. *Pain* 4(2): 161-74, 1977.
- Eckert M, Schejbal P: Therapy of neuropathies with a vitamin B combination. Symptomatic treatment of painful diseases of the peripheral nervous system with a combination preparation of thiamine, pyridoxine and cyanocobalamin. *Fortschr Med* 20; 110(29): 544-8, 1992.
- Fields HL, Martin JB: Dolor: Fisiopatología y tratamiento. En: Harrison. Principios de medicina interna. 13ª Ed. Mc Graw Hill-Interamericana Pag 57-63, 1994.
- Forman LJ, Lewis S, Vasilenko P: Streptozotocin diabetes alters immunoreactive β -endorphin levels and pain perception after 8 weeks in femal rats. *Diabetes* 35 1309-1313, 1986.
- Forth W, Martin E, Peter K: Dolor. En: El alivio del dolor. Hoechst SA. Pag 1-20, 1995.
- Fox A, Eastwood C, Gentry C, Manning D, Urban L: Critical evaluation of the streptozotocin model of painful diabetic neuropathy in the rat. *Pain* 81: 307-316, 1999.
- Fu QG, Carstens E, Stelzer B, Zimmermann M: B vitamins suppress spinal dorsal horn nociceptive neurons in the cat. *Neurosci Lett* 95(1-3): 192-7, 1988.
- Fujiwara M, Watanabe H, Matsui K: Allithiamine, a newly found derivative of vitamin B1. I: Discovery of allithiamine. *J Biochem* 41: 29-39, 1954.
- Fujiwara M: Allithiamine and its properties. *J Nutr Sci Vitaminol* 22: 57-62, 1967.
- Gagliese L, Melzack R: Age differences in nociception and pain behaviours in the rat. *Neurosci Biobehav Rev* 24(8): 843-54, 2000.
- Galer BS, Gianas A, Jensen MP: Painful diabetic polyneuropathy: epidemiology, pain description, and quality of life. *Diabetes Res Clin Pract* 47(2): 123-8, 2000.

- García JA, Herrero JF: Somestesia: mecanorrecepción, termorrecepción y nocicepción. En: Manual de Neurociencia. Ed. Síntesis 18 Pag 457-481, 1998.
- Guy RJC, Clark CA, Malcolm PN, Watkins PJ: Evaluation of thermal and vibration sensation in diabetic neuropathy. *Diabetología* 28: 131-137, 1985.
- Guyton AC, Hall JE: Dolor, cefalea y sensaciones de temperatura. En: Tratado de Fisiología Médica. Interamericana-Mc Graw-Hill Pag 661-674, 1996.
- Hammes HP, Du X, Edelstein D, Taguchi T, Matsumura T, Ju Q, Lin J, Bierhaus A, Nawroth P, Hannak D, Neumaier M, Bergfeld R, Giardino I, Brownlee M: Benfotiamine blocks three major pathways of hyperglycemic damage and prevents experimental diabetic retinopathy. *Nat Med* 9(3):294-9, 2003.
- Hammes HP, Martin S, Federlin K, Geisen K, Brownlee M: Aminoguanidine treatment inhibits the development of experimental diabetic retinopathy. *Proc Natl Acad Sci* 88(24):11555-8, 1991.
- Haupt E, Ledermann H, Kopcke W: Benfotiamine in the treatment of diabetic polyneuropathy--a three-week randomized, controlled pilot study (BEDIP study). *Int J Clin Pharmacol Ther* 43(2): 71-7, 2005.
- Hawkins M, Gabriely I, Wozniak R, Reddy K, Rossetti L, Shamon H: Glycemic control determines hepatic and peripheral glucose effectiveness in type 2 diabetes mellitus. *Diabetes* 51: 2179 -2189, 2002.
- Heath M J, Womack MD, MacDermott ABJ: *Neurphysiol* 72: 1992-1998, 1994.
- Hong Y, Abbott FV: Peripheral opioid modulation of pain and inflammation in the formalin test. *Eur J Pharmacol* 277(1): 21-8, 1995.
- Huang HS, Zhang QH, Bao FX, Lu L, Guo YJC, Yang L, Huang WJ, Fu G, Xu SH, Cheng XP, Yan Q, Zhu ZD, Zhang X, Chen Z, Han ZG, Zhang X: Identification of gene expression profile of dorsal root ganglion in the rat peripheral axotomy model of neuropathic pain. *Proc Natl Acad Sci* 99: 8360-8365, 2002.
- Hudson LJ, Bevan S, Wotherspoon G, Gentry C, Fox A, Winter J: VR1 protein expression increase in undamaged DRG neurons after partial nerve injury. *Eur J Neurosci* 13: 2105-2114, 2001.
- Hunskar S, Hole K: The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. *Pain* 30(1): 103-14, 1987.
- Hyman SE, Cassem NH: Dolor. En: Neurología. Ed. Científica médica latinoamericana. Pag 1-20, 1995.

- Ishii H, Jirousek MR, Koya D, Takagi C, Xia P, Clermont A, Bursell SE, Kern TS, Ballas LM, Heath WF, Stramm LE, Feener EP, King GL: Amelioration of vascular dysfunctions in diabetic rats by an oral PKC beta inhibitor. *Science* 272(5262): 728-31, 1996.
- Iwasaki Y, Gay B, Wada K, Koizumi S: Association of the Src family tyrosine kinase Fyn with TrkB. *J Neurochem* 71(1): 106-11, 1998.
- Jesell TM, Kelly DD: Pain and Analgesia. En: *Principles of Neural science*. Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM. 3rd Ed. Elsevier. Pag 385-399, 1991.
- Jurna I, Carlsson KH, Komen W, Bonke D: Acute effects of vitamin B6 and fixed combinations of vitamin B1, B6 and B12 on nociceptive activity evoked in the rat thalamus: dose-response relationship and combinations with morphine and paracetamol. *Klin Wochenschr* 19; 68(2): 129-35, 1990.
- Kaiser N, Sasson S, Feener EP, Boukobza-Vardi N, Higashi S, Moller DE, Davidheiser S, Przybylski RJ, King GL: Differential regulation of glucose transport and transporters by glucose in vascular endothelial and smooth muscle cells. *Diabetes* 42(1): 80-9, 1993.
- Kapur D: Neuropathic pain and diabetes. *Diabetes Metab Res Rev Suppl* 1: S9-S15, 2003.
- Karachalias N, Babaei-Jadidi R, Ahmed N, Thornalley: Accumulation of fructosyl-lysine and advanced glycation end products in the kidney, retina and peripheral nerve of streptozotocin-induced diabetic rats. *Biochem Soc Trans* 31(Pt 6): 1423-5, 2003.
- Karanth SS, Springall DR, Francavilla S, Mirrlees DJ, Polak JM: Early increase in CGRP- and VIP-immunoreactive nerves in the skin of streptozotocin-induced diabetic rats. *Histochemistry* 94(6): 659-66, 1990.
- Khan GM, Chen SR, Pan HL: Role of primary afferent nerves in allodynia caused by diabetic neuropathy in rats. *Neurosci* 114(2): 291-9, 2002.
- Kim SH, Chung JM: An experimental model for peripheral neuropathy produced by segmental spinal nerve ligation in the rat. *Pain* 50: 355-363, 1992.
- Koltzenburg M: Painful neuropathies. *Curr Opin Neurol* 11(5): 515-21, 1998.
- Koya D, Haneda M, Nakagawa H, Isshiki K, Sato H, Maeda S, Sugimoto T, Yasuda H, Kashiwagi A, Wada DK, King GL, Kikkawa R: Amelioration of accelerated diabetic mesangial expansion by treatment with a PKC beta inhibitor in diabetic db/db mice, a rodent model for type 2 diabetes. *FASEB J* 14(3): 439-47, 2000.

Krishnan ST, Rayman G: New treatments for diabetic neuropathy: symptomatic treatments. *Curr Diab Rep* 3(6): 459-67, 2003.

Kretschmar C, Kaumeier S, Haase W: Medicamentous therapy of alcoholic polyneuropathy. Randomized double-blind study comparing 2 vitamin B preparations and a nucleotide preparation. *Fortschr Med* 20; 114(32): 439-43, 1996.

Kuwabara S, Nakazawa R, Azuma N, Suzuki M, Miyajima K, Fukutake T, Hattori T: Intravenous methylcobalamin treatment for uremic and diabetic neuropathy in chronic hemodialysis patients. *Intern Med* 38(6): 472-475, 1999.

Lázaro-Ibáñez GG, Torres-López JE, Granados-Soto V: Participation of the nitric oxide-cyclic GMP-ATP-sensitive K⁺ channel pathway in the antinociceptive action of ketorolac. *Eur J Pharmacol* 426: 41-46, 2001.

Lee JH, McCarty R: Glycemic control of pain threshold in diabetic and control rats. *Physiol Behav* 47(2):225-30, 1990.

LeQuesne PM, Fowler CJ: A study of pain threshold in diabetics with neuropathic foot lesions. *J Neurol Neurosurg Psychiat* 49: 1191-1194, 1986.

Levine JD, Reichling DB: Peripheral mechanisms of inflammatory pain. En: Wall PD, Melzack R. Ed. *Textbook of Pain* 4^a Ed. London, Churchill Livingstone. Pag 59-84, 1999.

Lewis GF, Carpentier A, Adeli K, Giacca A: Disordered fat storage and mobilization in the pathogenesis of insulin resistance and type 2 diabetes. *Endocr Rev* 23: 201-229, 2002.

Lim RK: Pain mechanisms. *Anesthesiology* 28(1): 106-10, 1967.

Lindberger M, Schroder HD, Schultzberg M, Kristensson K, Persson A, Ostman J, Link H: Nerve fibre studies in skin biopsies in peripheral neuropathies. I. Immunohistochemical analysis of neuropeptides in diabetes mellitus. *J Neurol Sci* 93(2-3): 289-96, 1989.

Link H: Nerve fibre studies in skin biopsies in peripheral neuropathies. I. Immunohistochemical analysis of neuropeptides in diabetes mellitus. *J Neurol Sci* 93(2-3): 289-96, 1989.

Locatelli V, Petraglia F, Tironi N, Müller EE: β -endorphin concentrations in the hypothalamus pituitary and plasma of streptozotocin-diabetic rats with and without insulin substitution therapy. *Life Sci* 38: 379-386, 1985.

Loeser JD, Melzack R: Pain an overview. *Pain* 353: 1607-1609, 1999.

- Loew D: Pharmacokinetics of thiamine derivatives especially of benfotiamine. *Int J Clin Pharmacol Ther* 34(2): 47-50, 1996.
- MacLean DB: Substance P and somatostatin content and transport in vagus and sciatic nerves of the streptozocin-induced diabetic rat. *Diabetes* 36(3): 390-395, 1987.
- Malcangio M, Tomlinson DR: A pharmacologic analysis of mechanical hyperalgesia in streptozotocin/diabetic rats. *Pain* 76(1-2): 151-157, 1998.
- Marcus R, Coulston AM: The vitamins. En: *The Pharmacological Basis of Therapeutics* 10ª Ed. Editado por Goodman Gilman A, Hardman JH and Limbird L E McGraw-Hill Companies. Pag 1745-1788, 2001.
- Mayer DJ, Wolfle TL, Akil H, Carder B, Liebeskind JC: Analgesia from electrical stimulation in the brain stem of the rat. *Science* 174: 1351-1354, 1971.
- McCall WD, Tanner KD, Levine JD: Formalin induces biphasic activity in C-fibers in the rat. *Neurosci Lett* 208(1): 45-8, 1996.
- Melzack R, Casey KL: Sensory, motivational and central control determinants of pain: a new conceptual model. En: Kenshalo D. *The skin senses*. Ed por Charles C Thomas Springfield III. Pag 423-443, 1968.
- Melzack R, Wall PD: Pain mechanism: A new theory. *Science* 150: 971-979, 1965.
- Merskey H: Pain terms: a current list with definitions and notes on usage. *Pain Suppl* 3: S215-S221, 1986.
- Meyer RA, Campbell JN, Raja SN: Peripheral neural mechanisms of cutaneous hyperalgesia. En: HL. Fields and R. Dubner Eds, *Advance in Pain research and therapy*, vol 9 Raven Press, New York. Pag 53-71, 1985.
- Millan MJ: The induction of pain: an integrative review. *Prog Neurobiol* 57: 1-164, 1999.
- Miller BA, Woolf CJ: Glutamate-mediated slow synaptic currents in neonatal rat deep dorsal horn neurons in vitro. *J Neurophysiol* 76: 1465-1476, 1996.
- Mizuhira B: Studies on the absorption of S-benzoylthiamine o-monophosphate. *Vitamins* 5: 334-346, 1968.
- Moore SA, Peterson RG, Felten DL, O'Connor BL: A quantitative comparison of motor and sensory conduction velocities in short and long term streptozotocin and alloxan diabetic rats. *J Neurol Sci* 48: 133-152, 1980.

- Mumford J, Bower D: Pain and prothopatic sensibility: A review with particular reference to the teeth. *Pain* 2: 223-243, 1976.
- Narama I, Kinol: Peripheral motor neuropathy in spontaneously diabetic WBN/Kob rats: a morphometric and electron morphometric study. *Acta Neuropathol* 79: 52-60, 1989.
- Nishikawa T, Edelstein D, Du XL, Yamagishi S, Matsumura T, Kaneda Y, Yorek MA, Beebe D, Oates PJ, Hammes HP, Giardino I, Brownlee M: Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature* 404(6779): 787-90, 2000.
- O'Banion MK: Cyclooxygenase-2: Molecular biology, pharmacology, and neurobiology. *Crit Rev Neurobiol* 13: 45-82, 1999.
- Obrenovich ME, Monnier VM: Vitamin B1 blocks damage caused by hyperglycemia. *Sci Aging Knowledge Environ* 12; 2003(10): PE6, 2003.
- Ossipov MH, Bian D, Malan TP, Lai J, Porreca F: Lack of involvement of capsaicin-sensitive primary afferents in nerve ligation injury induced tactile allodynia in rats. *Pain* 79: 127-133, 1999.
- Park L, Raman KG, Lee KJ, Lu Y, Ferran LJ Jr, Chow WS, Stern D, Schmidt AM: Suppression of accelerated diabetic atherosclerosis by the soluble receptor for advanced glycation endproducts. *Nat Med* 4(9): 1025-31, 1998.
- Peña Acevedo Lina María: Formaldehído. Intoxicación aguda. En: *Toxicología* 4ª Ed. Editado por Darío Cordoba Manual Moderno. Pag 402-404, 2000.
- Pertovaara A, Wei H, Kalmari J, Ruotsalainen M: Pain behavior and response properties of spinal dorsal horn neurons following experimental diabetic neuropathy in the rat: modulation by nitecapone, a COMT inhibitor with antioxidant properties. *Exp Neurol* 167(2): 425-34, 2001.
- Puig S, Sorkin LS: Formalin-evoked activity in identified primary afferent fibers: systemic lidocaine suppresses phase-2 activity. *Pain* 64(2): 345-55, 1996.
- Reaven GM, Hollenbeck C, Jeng CY, Wu MS, Chen YD: Measurement of plasma glucose, free fatty acid, lactate, and insulin for 24 h in patients with NIDDM. *Diabetes* 37: 1020 -1024, 1988.
- Rexed B: Cytoarchitectonic atlas of the spinal cord in the cat. *J Comp Neurol* 96: 415-466, 1952.
- Reyes-García G, Medina-Santillán R, Rocha-González HI, Granados-Soto V: Synergistic interaction between spinal gabapentin and oral B vitamins in a neuropathic pain model. *Proc West Pharmacol Soc* 46: 91-94, 2003.

Reyes-García G, Medina-Santillán R, Terán-Rosales F, Castillo-Henkel C, Rodríguez-Silverio J, Torres-López JE, Ochoa-Cetina L, Medina-Tato DA, Granados-Soto V: Analgesic effect of B vitamins in formalin-induced inflammatory pain. *Proc West Pharmacol Soc* 44: 139-140. 2001.

Reynolds DV: Surgery in the rat during electrical analgesia induced by focal brain stimulation. *Sci* 164: 444-445, 1969.

Rindi G, Ventura U: Thiamine intestinal transport. *Physiol Rev* 52(4): 821-827, 1972.

Rindi G: Thiamin absorption by small intestine. *Acta Vitaminol Enzymol* 6(1): 47-55, 1984.

Rosland JH, Tjolsen A, Maehle B, Hole K: The formalin test in mice: effect of formalin concentration. *Pain* 42(2): 235-242, 1990.

Saito N, Kimura M, Kuchiba A, Itokawa Y: Blood thiamine levels in outpatients with diabetes mellitus. *J Nutr Sci Vitaminol* 33(6):421-30, 1987.

Schaeffer MC: Attenuation of acoustic and tactile startle responses of vitamin B-6 deficient rats. *Physiol Behav* 40(4): 473-8, 1987.

Scholz J, Woolf CJ: Can we conquer pain. *Nat Neurosci Suppl*:106-107, 2002.

Shao-Rui Chen, Hui Lin Pan: Hypersensitivity of spinothalamic tract neurons associated with diabetic neuropathic pain in rats. *J Neurophysiol* 87: 2726-2733, 2002.

Sharma AK, Thomas PK, Peripheral nerve structure and function in experimental diabetes. *J Neurol Sci* 23: 1-15, 1974.

Shindo H, Okamoto K, Totsu J: Transport of organic compounds through biological membranes. I. Accumulative uptake of S-benzoylthiamine by human erythrocytes. *Chem Pharm Bull* 15: 295-302, 1976.

Shuangsong H, Morrow TJ, Paulson PE, Isom LL, Wiley JW: Early diabetic neuropathy is associated with differential changes in tetrodotoxin-sensitive and resistant sodium channels in dorsal root ganglion neurons in the rat. *J Biol Chem* in press, 2004.

Siddall PJ, Cousins MJ: Introduction to pain mechanisms. En: *Neural blockade in clinical anesthesia and management of pain*. Lippincott-Raven Publishers. 3^a Ed. Vol 23. Pag 675-699, 1998.

Silvotti LG, Thompson SWN, Woolf CJ: The rate of rise of the cumulative depolarization evoked by repetitive stimulation of small-caliber afferents is a predictor of action potential windup in rats spinal neurons in vitro. *J Neurophysiol* 69: 1621-1631, 1993.

Simon GS, Dewey WL: Narcotics and diabetes. I. The effects of streptozotocin-induced diabetes on the antinociceptive potency of morphine. *J Pharmacol Exp Ther* 218(2): 318-23, 1981.

Sorkin LS: Farmacología y fisiología básicas del proceso del dolor agudo. En: *Clínicas de Anestesiología de Norteamérica*. Wallace MS, Dunn JS, Yaksh TL. Mc Graw Hill Pag 245-259, 1997.

Soulis-Liparota T, Cooper M, Papazoglou D, Clarke B, Jerums G: Retardation by aminoguanidine of development of albuminuria, mesangial expansion, and tissue fluorescence in streptozotocin-induced diabetic rat. *Diabetes* 40(10): 1328-34, 1991.

Srinivasa NR, Richard AM, James NC: Peripheral mechanism of somatic pain. *Anesthesiol* 68: 571-590, 1988.

Stevens VJ, Vlassara H, Abati A, Cerami A: Nonenzymatic glycosylation of hemoglobin. *J Biol Chem* 252(9): 2998-3002, 1977.

Stepuro II, Piletskaya TP, Stepuro VI: Thiamine oxidative transformations catalyzed by copper ions and ascorbic acid. *Biochemistry* 62: 1409-1414, 1997.

Stracke H, Lindemann A, Federlin K: A benfotiamine-vitamin B combination in treatment of diabetic polyneuropathy. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 104(4): 311-6, 1996.

Stracke H, Hammes HP, Werkmann D, Mavrakis K, Bitsch I, Netzel M, Geyer J, Kopcke W, Sauerland C, Bretzel RG, Federlin KF: Efficacy of benfotiamine versus thiamine on function and glycation products of peripheral nerves in diabetic rats. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 109(6): 330-6, 2001.

Tallarida TJ, Murray RB: *Manual of pharmacologic calculations with computer programs*. Springer-Verlag. New York. Heidelberg, Berlin, 1981.

Tang F: Changes in Met-enkephalin and β -endorphin contents in the hypothalamus and the pituitary in diabetic-rats: effect of insulin therapy. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 16: 65-75, 1989.

Taylor BK, Peterson MA, Basbaum AI: Persistent cardiovascular and behavioral nociceptive responses to subcutaneous formalin require peripheral nerve input. *J Neurosci* 15(11): 7575-84, 1995.

- Teng CJ, Abbott FV: The formalin test: a dose-response analysis at three developmental stages. *Pain* 76: 337-347, 1998.
- Thomas PK, Fraher JP, O'Leary D, Mooran MA, Cole M, King RHM: Relative growth maturation of axon size and myelin thickness in the tibial nerve of the rat. *Acta Neuropathol* 79: 375-396, 1990.
- Thomas PK, Scadding JW: Treatment of pain in diabetic neuropathy. En: *Diabetic Neuropathy*, PJ Dyck, PK Thomas, AK Asbury, Al Winegrand and D. Porter Eds., Pag 216-222, 1987.
- Thomas PK, Tomlinson DR: Diabetic and hypoglycemic neuropathy. En: *Peripheral Neuropathy in rats and its mechanism*. PJ Dyck, PK Thomas, JW Griffin, PA, Low and JF. Poduslo Eds, *Life Sci Vol* 59. Pag 105-110, 1997.
- Thompson SW, Bennet DL, Kerr BJ, Bradbury EJ, McMahan SB: Brain-derived neurotrophic factor is an endogenous modulator of nociceptive responses in the spinal cord. *Proc Natl Acad Sci* 96(14): 714-8, 1999.
- Thomson AD, Leevy CM: Observations on the mechanism of thiamine hydrochlorid absorption man. *Clin Sci* 43: 153-163, 1972.
- Tilton RG, Baier LD, Harlow JE, Smith SR, Ostrow E, Williamson JR: Diabetes-induced glomerular dysfunction: links to a more reduced cytosolic ratio of NADH/NAD⁺. *Kidney Int.* 41(4): 778-88, 1992.
- Tjölse A, Berge O-G, Hunskaar S, Rosland JH, Hole K: The formalin test: an evaluation of the method. *Pain* 51: 5-17, 1992.
- Tomlinson DR, Robinson JP, Compton AM, Keen P: Essential fatty acid treatment effect on nerve conduction, polyol pathway and axonal transport in streptozotocin-diabetic rats. *Diabetologia* 32: 655-659, 1989.
- Tong HI: Influence of neurotropic vitamins on the nerve conduction velocity in diabetic neuropathy. *Ann Acad Med* 9(1): 65-70, 1980.
- Tremont-Lukats IW, Megeff C, Backonja MM: Anticonvulsants for neuropathic pain syndromes. Mechanisms of action and place in therapy. *Drugs* 60(5): 1029-1052, 2000.
- Triban C, Guidolin D, Fabris M, Marini P, Schavinato A, Dona M, Bortolami MC, Di Giamderardino L, Fiori MG: Ganglioside treatment and improved axonal regeneration capacity in experimental diabetic neuropathy. *Diabetes* 38: 1012-1022, 1989.
- Tulson ME, Jacoby JH, MacKenzie RG: Streptozotocin-induced diabetes reduces brain serotonin synthesis in rats. *J Neurochem* 46(4): 1068-72, 1986.

- Tuck RR, Schmelzer JD, Low PA: Endoneurial blood flow and oxygen tension in the sciatic nerves of rats with experimental diabetic neuropathy. *Brain Res* 107: 935-950, 1984.
- Turk DC, Okiuji A: Assessment of patients reporting of pain: an integrated perspective. *Lancet* 53: 1784-1788, 1999.
- Ulugol A, Karadag HC, Tamer M, Firat Z, Aslantas A, Dokmeci I: Involvement of adenosine in the anti-allodynic effect of amitriptyline in streptozotocin-induced diabetic rats. *Neurosci Lett* 328(2): 129-132, 2002.
- Utsumi I: Studs on thiamine disulfide II. Biological proprieties of o-benzoylthiamine disulfide. *J Vitaminology* 8: 213-349, 1962.
- Vaccarino AL, Melzack R: Analgesia produced by injection of lidocaine into the anterior cingulum bundle of the rat. *Pain* 39(2): 213-219, 1989.
- Vaccarino AL, Melzack R: Temporal processes of formalin pain: differential role of the cingulum bundle, fornix pathway and medial bulboreticular formation. *Pain* 49(2): 257-71, 1992.
- Vinik AI, Holland MT, Le Beau JM, Liuzzi FJ, Stansberry KB, Colen LB: Diabetic neuropathies. *Diabetes Care* 15(12): 1926-75, 1992.
- Wada T, Takagi H, Minakami H, Hamanaka W, Okamoto K, Ito A, Sahashi Y: A new thiamine derivative, S-benzoylthiamine O-monophosphate. *Sci* 134: 195-6, 1961.
- Wahren LK, Torebjork E: Quantitative sensory tests in patients with neuralgia 11 to 25 years after injury. *Pain* 48(2): 237-44, 1992.
- Waldmann R, Lazdunski M: H(+)-gated cation channels: neuronal acid sensors in the NaC/DEG family of ion channels. *Curr Opin Neurobiol* 8(3): 418-24, 1998.
- Walker K, Perkins M, Dray A: Kinins and kinin receptors in the nervous system. *Neurochem Int* 26(1):1-16; discussion 17-26, 1995.
- Wang YT, Salter MW: Regulation of NMDA receptors by tyrosine kinases and phosphatases. *Nature* 369(6477): 233-5, 1994.
- Watkins J, Natural history of the diabetic neuropathy. *Quart J Med New series* 284: 1209-1218, 1990.
- Wheeler-Aceto H, Porreca F, Cowan A: The rat paw formalin test: comparison of noxious agents. *Pain* 40(2): 229-38, 1990.

Wild A, Zimmermann M, Bartozyck GD, Jurna I: Antinociceptive properties of pyridoxine. Neurophysiological and behavioral findings. *Ann NY Acad Sci* 585: 219-230, 1990.

Winkler G, Pal B, Nagybeganyi E, Ory I, Porochnavec M, Kempler P. Effectiveness of different benfotiamine dosage regimens in the treatment of painful diabetic neuropathy. *Arzneimittelforschung* 49(3): 220-4, 1999.

Woelk H, Lehl S, Bitsch R, Kopcke W. Benfotiamine in treatment of alcoholic polyneuropathy: an 8-week randomized controlled study (BAP I Study). *Alcohol Alcohol* 33(6): 631-8, 1998.

Woolf CJ, Costigan M: Transcriptional and posttranslational plasticity and the generation of inflammatory pain. *Proc Natl Acad Sci* 96(14): 7723-30, 1999.

Woolf CJ, Ma QP, Allchorne A, Poole S: Peripheral cell types contributing to the hyperalgesic action of nerve growth factor in inflammation. *J Neurosci* 16(8): 2716-23, 1996.

Yoshimura M, Nishi S: Blind patch-clamp recordings from substantia gelatinosa neurons in adult rat spinal cord slices: Pharmacological properties of synaptic currents. *Neurosci* 53: 519-526, 1993.

Yu XM, Askalan R, Keil GJ 2nd, Salter MW: NMDA channel regulation by channel-associated protein tyrosine kinase Src. *Science* 275(5300): 674-8, 1997.

Ziegler D, Mayer P, Wiefels K, Gries FA: Assessment of small and large fiber function in long-term type 1 (insulin-dependent) diabetic patients with and without painful neuropathy. *Pain* 34(1): 1-10, 1988.

Zimmermann M: Basic concepts of pain and pain therapy. *Drug Res* 34(II): 1053-1059, 1984.

Zimmermann M: B-vitamins in pain. HU Gerbershagen and M Zimmermann Eds. Frankfurt, 1-8, 1998.

Zimmermann M: Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain* 16: 109-110, 1983.

Zimmermann M: Pathobiology of neuropathic pain. *Eur J Pharmacol* 429: 23-37, 2001.

Zirrgiebel U, Ohga Y, Carter B, Berninger B, Inaaki N, Thoen H, Lindholm D: Characterization of TrkB receptor-mediated signaling pathways in rat cerebellar granule neurons: involvement of protein kinase c in neuronal survival. *J Neurochem* 65(5): 2241-2250, 1995.

11. ANEXO

Benfotiamine relieves inflammatory and neuropathic pain in rats

Gabriela M. Sánchez-Ramírez, Nadia L. Caram-Salas, Héctor I. Rocha-González,
Guadalupe C. Vidal-Cantú, Roberto Medina-Santillán, Gerardo Reyes-García,
Vinicio Granados-Soto

Benfotiamine relieves inflammatory and neuropathic pain in rats

Gabriela M. Sánchez-Ramírez¹, Nadia L. Caram-Salas¹, Héctor I. Rocha-González¹, Guadalupe C. Vidal-Cantú¹, Roberto Medina-Santillán², Gerardo Reyes-García², Vinicio Granados-Soto^{1*}

¹Departamento de Farmacobiología, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, México, D.F., MEXICO.

²Sección de Estudios de Posgrado e Investigación, Escuela Superior de Medicina del Instituto Politécnico Nacional, México, D.F., MEXICO.

* Author for correspondence
Vinicio Granados-Soto, Ph.D.
Departamento de Farmacobiología
Centro de Investigación y de Estudios Avanzados-Coapa
Calzada de los Tenorios 235
Colonia Granjas Coapa
14330 México, D.F., MEXICO
Phone Number: +52-55-5061-2868
Fax Number: +52-55-5061-2863
E-mail: vgranados@prodigy.net.mx

ABSTRACT

Benfotiamine has shown therapeutic efficacy in the treatment of painful diabetic neuropathy in human beings. However, so far there is no evidence about the efficacy of this drug in preclinical models of pain. The purpose of this study was to assess the possible antinociceptive and antiallodynic effect of benfotiamine in inflammatory and neuropathic pain models in the rat. Inflammatory pain was induced by injection of formalin in normal and diabetic (2 weeks) rats. Reduction of flinching behavior was considered as antinociception. Neuropathic pain was induced by either ligation of left L5/L6 spinal nerves or administration of streptozotocin (STZ, 50 mg/kg, ip) in Wistar rats. Benfotiamine dose-dependently reduced inflammatory (10-300 mg/kg) and neuropathic (75-300 mg/kg) pain in normal and diabetic rats. Results indicate that oral administration of benfotiamine is able to reduce tactile allodynia from different origin in the rat and they suggest the use of this drug to reduce inflammatory and neuropathic pain in humans.

Key words: Benfotiamine, inflammatory pain, neuropathy, diabetes.

1. Introduction

Neuropathic pain represents a chronic pain syndrome group with diverse etiology, but that shares some common underlying pathophysiologic mechanisms and clinical features. The clinical features of neuropathic pain include the paradox combination of sensory loss in the painful neuropathic area and hypersensitivity phenomena such as touch-evoked pain (allodynia) in the same area. The allodynia is assumed to reflect a neuronal hyperexcitability in the central nervous system (Koltzenburg et al., 1992).

Anticonvulsants and tricyclic antidepressants have become the mainstay in the treatment of chronic neuropathic pain (McQuay et al., 1996; Sindrup and Jensen, 1999). However, these drugs often have a limited effect and they may cause intolerable side effects. Therefore, other options of treatment have been explored. B vitamins have been proposed as possible drugs to treat neuropathic pain. In this sense, previous evidence showed that thiamine and pyridoxine are useful in the treatment of symptomatic diabetic peripheral neuropathy (Abbas and Swai, 1997). A recent study found evidence that the combination of thiamine, pyridoxine and cyanocobalamine improves the analgesic effect of gabapentin in the treatment of diabetic neuropathy (Medina-Santillán et al., 2004). Then, vitamins could be an alternative to treat neuropathic pain.

Benfotiamine was synthesized in early 1960s as a thiamine (vitamin B₁) derivative with high bioavailability (Fujiwara, 1954; Bitsch et al., 1991). Previous studies have showed that thiamine or the mixture of thiamine, pyridoxine and cyanocobalamine could have a role in the treatment of painful neuropathy (Stracke et al., 1996); however, since these vitamins are water-soluble, the rate

of absorption was relatively small. Benfotiamine is a lipid-soluble analogue of vitamin B₁ with capacity to reach several organs in animals and humans (Woelk et al., 1998). This drug has shown therapeutic efficacy in the treatment of alcoholic polyneuropathy (Woelk et al., 1998) and painful diabetic neuropathy (Winkler et al., 1999) in human beings. However, so far there is no evidence about the efficacy of benfotiamine in preclinical models of neuropathic pain. B vitamins have also shown to reduce inflammatory pain in animals (Franca et al., 2001; Reyes-García et al., 2001). Therefore, the purpose of this study was to assess the possible antiallodynic and antinociceptive effect of benfotiamine in neuropathic and inflammatory pain, respectively, models in the rat.

2. Material and Methods

2.1. Animals

Experiments were performed on adult female Wistar rats. Female rats were used based on the fact that previous experiments in our conditions (Wistar rats, formalin concentration 1% and weight range 180-220 g) have not shown significant differences between males and females (unpublished data). Other authors have found differences only with other rat strains, greater weight or different formalin concentrations (Gaumond et al., 2002). The animals were obtained from our own breeding facilities and had free access to drinking water, but food was withdrawn 12 h before experiments. All experiments followed the Guidelines on Ethical Standards for Investigation of Experimental Pain in Animals (Zimmermann, 1983). Additionally, the study was approved by the

Institutional Animal Care and Use Committee (Centro de Investigación y de Estudios Avanzados, México, DF, México).

2.2. Induction of diabetes

Rats (weight range, 220-240 g) were intraperitoneally (ip) injected with streptozotocin (50 mg/kg) (Research Biochemical International, USA) to produce experimental diabetes (Courteix et al., 1993). Control animals (age-matched) received saline 0.9%. Diabetes was confirmed 1 week after injection by measurement of tail vein blood glucose levels with the glucose meter Ascensia ELITE (Bayer, Mexico City). Diabetic rats were divided in two groups, one of two weeks (hyperalgesia) and other of four to six weeks (allodynia) after injection of streptozotocin. Glycemia was determined and only animals with a final blood glucose level ≥ 300 mg/dL were included in the study.

2.3. Measurement of antinociceptive activity

Antinociception in normal and diabetic (two weeks) rats was assessed using the formalin test (Dubuisson and Dennis, 1977). The rats were placed in open Plexiglas observation chambers for 30 min to allow them to acclimate to their surroundings; then they were removed for formalin administration. Fifty μ l of diluted formalin (0.5% for diabetic rats or 1% for normal rats) were injected subcutaneously into the dorsal surface (Capone and Aloisi, 2004) of the right hind paw with a 30-gauge needle. The animals were returned to the chambers and nociceptive behavior was observed immediately after formalin injection.

Mirrors were placed in each chamber to enable unhindered observation. Nociceptive behavior was quantified as the numbers of flinches of the injected paw during 1-min periods every 5 min, up to 60 min after injection (Wheeler-Aceto and Cowan, 1991). Flinching was readily discriminated and was characterized as rapid and brief withdrawal, or as flexing of the injected paw. Formalin-induced flinching behavior was biphasic (Dubuisson and Dennis, 1977). The initial acute phase (0-10 min) was followed by a relatively short quiescent period, which was then followed by a prolonged tonic response (15-60 min). At the end of the experiment the rats were sacrificed in a CO₂ chamber.

2.4. Evaluation of antiallodynic activity

Rats were prepared according to the method of Kim and Chung (1992). Animals (weight range, 120-140 g) were anesthetized with a mixture of ketamine/xylazine (45-12 mg/kg, i.p.). After surgical preparation and exposure of the dorsal vertebral column, the L5 and L6 spinal nerves were exposed and tightly ligated with 6-0 silk suture distal to the dorsal root ganglion. For sham operated rats, the nerves were exposed but not ligated. The incisions were closed, and the animals were allowed to recover for 12 days. Rats exhibiting motor deficiency (such as paw-dragging) were discarded from testing.

Tactile allodynia was determined, in spinal nerve ligated rats and diabetic rats of four to six weeks after injection of streptozotocin, by measuring paw withdrawal in response to probing with a series of calibrated fine filaments (von Frey filaments). The strength of the von Frey stimuli range from 0.4 to 15 g. Withdrawal thresholds were determined by increasing and decreasing stimulus

strength eliciting paw withdrawal (Chaplan et al., 1994). The stimulus intensity required to produce a response in 50% of the applications for each animal was defined as "50% withdrawal threshold". All rats were verified to be allodynic (responding to a stimulus of less than 4 g). Rats not demonstrating allodynia were not further studied.

2.5. Drugs

Benfotiamine was a gift of Merck SA de CV (Mexico City). Benfotiamine was dissolved in carboxymethyl cellulose 1% and given orally at a volume ratio of 4 ml/kg. Streptozotocin was dissolved in distilled water.

2.6. Study design

For the study of hyperalgesia, rats received the oral administration of vehicle (carboxymethyl cellulose 1%) or benfotiamine (300 mg/kg, po) at different times (10 min, 1 and 2.5 h) before formalin injection (50 µl). Since we observed the best antinociceptive effect at the 2.5 h pretreatment, dose-response curve for benfotiamine was carried out giving vehicle (carboxymethyl cellulose 1%) or increasing doses of benfotiamine (10-300 mg/kg) 2.5 h before formalin injection into the right paw. The formalin concentration used in normal rats was 1%, while 0.5% was used in diabetic rats (2 weeks).

For the study of allodynia, rats received the oral administration of vehicle (carboxymethyl cellulose 1%) or increasing doses of benfotiamine (75-300 mg/kg, po) and withdrawal threshold in both spinal nerve-injured and diabetic rats (4-6 weeks) was measured for the next 5 h. Observer was unaware of the

treatment in each animal. Rats in all groups were observed regarding behavioral or motor function changes induced by the treatments. This was assessed, but not quantified, by testing the animals' ability to stand and walk in a normal posture, as proposed elsewhere (Chen and Pan, 2001).

2.7. Data analysis and statistics

All results are presented as means \pm S.E.M. for 6 animals per group. For the formalin test, curves were made for mean number of flinches against time. The area under the number of flinches against time curves (AUC) for both phases was calculated according to trapezoidal rule. For allodynia, curves were constructed plotting the 50% threshold for paw withdrawal as a function of time. An increase of 50% threshold withdrawal was considered as an antiallodynic effect. Effect was also expressed as the area under the 50% threshold withdrawal against time curve (AUC).

Analysis of variance followed by Tukey's test was used to test the significance of differences between treatments. A $P < 0.05$ was considered significant.

3. Results

3.1. Antinociceptive effect of benfotiamine in normal and diabetic rats

Subcutaneous formalin injection into the right hind paw of normal and diabetic (2 weeks) rats produced a typical pattern of flinching behavior characterized by a biphasic time course (Fig. 1). Phase 1 of the nociceptive response began immediately after formalin administration and then declined

gradually in approximately 10 min. Phase 2 began about 15 min after formalin administration and lasted about 1 h (Dubuisson and Dennis, 1977; Porro and Cavazzuti, 1993). Diabetic rats injected with 0.5% formalin (black circles) displayed a flinching behavior similar to that observed in normal rats injected with 1% formalin (white circles), thus suggesting a hyperalgesic effect of diabetes.

Oral administration of benfotiamine (300 mg/kg) significantly reduced formalin-induced nociceptive behavior at 1 and 2.5 h, but not at 10 min, pretreatment (Fig. 2). Therefore, 2.5 h pretreatment time was used in the following experiments. Benfotiamine pretreatment reduced in a dose dependent manner ($P < 0.05$) flinching behavior in both normal (Fig. 3A) and diabetic (2 weeks, Fig. 3B) rats.

3.2. Antiallodynic effect of benfotiamine in spinal nerve ligated and diabetic rats

Ligation of L5 and L6 spinal nerves produced a clear-cut allodynia in rats submitted to the surgery compared to the sham operated rats (Fig. 4A). Ligation of spinal nerves did not modify weight gain in these rats compared to the sham operated rats (data not shown). On the other hand, 1 week after administration of streptozotocin glucose levels increased to about 500 mg/dL and remained high after 6 weeks (data not shown). The weight of the diabetic rats became significantly lower than that of controls by the first week and did not change significantly up to week 6. No autotomy behavior was ever observed during the experiment. Four to six weeks after diabetes induction, a clear tactile allodynia

was observed in the streptozotocin-injected compared to the distilled water-injected rats (Fig. 4B).

Oral administration of benfotiamine, but not vehicle (carboxymethyl cellulose 1%), reduced spinal nerve ligation- or streptozotocin-induced tactile allodynia in a dose-dependent manner ($P < 0.05$) (Fig. 5). Benfotiamine produced a maximal antiallodynic effect at 300 mg/kg in both models. No change in the reflexes was observed in either group, control or treated (data not shown).

4. Discussion

In the present study we have observed that oral administration of benfotiamine was able to reduce formalin-induced nociception in rats. Moreover, benfotiamine also reduced flinching behavior in diabetic rats (2 weeks). To our knowledge, this is the first report about the antinociceptive effect of benfotiamine in a pre-clinical model of pain in normal and diabetic rats. Recent data have demonstrated that the mixture of thiamine, pyridoxine and cyanocobalamin significantly reduced nociception in the formalin test (Reyes-Garcia et al., 2001; Franca et al., 2001). Since benfotiamine is an analogue of thiamine, our results confirm the antinociceptive effect of B vitamins in this kind of pain.

Our results also indicate that benfotiamine is able to reduce tactile allodynia induced either by L5/L6 spinal nerve ligation or administration of streptozotocin in the rat. To the best of our knowledge, this is the first report about the antiallodynic effect of benfotiamine in two well accepted models of neuropathic pain in the rat. Previous open and double-blind clinical trials have shown that

benfotiamine is able to significantly reduce neuropathic pain produced by alcoholism (Woelk et al., 1998) or diabetes (Winkler et al., 1999; Haupt et al., 2005). Therefore, our data in rats confirm clinical evidence about the antiallodynic efficacy of benfotiamine.

Results showed that benfotiamine produced a best antiallodynic effect in the diabetic neuropathy than in the spinal nerve ligation model. This better antiallodynic effect could be due to the effects of benfotiamine in diabetic rats. Diabetes leads to several complications including renal failure, stroke, cardiovascular disease and nerve damage (Obrenovich and Monnier, 2003). It has been hypothesized that diabetes-induced high plasma glucose concentrations are responsible for increased mitochondrial free radical production and subsequent inactivation of glyceraldehyde phosphate dehydrogenase (GAPDH) in several cells implicated in these conditions. As a result of the reduced ability of GAPDH to process upstream metabolites, three pathways of metabolic damage are activated, namely the advanced glycation end-product formation pathway, the diacylglycerol-protein kinase C (PKC) pathway, and the hexosamine pathway (Brownlee, 2001). A recent study has reported that benfotiamine blocks the three pathways via activating the pentose phosphate pathway enzyme transketolase. This blockade correlates with the prevention of experimental diabetic retinopathy (Hammes et al., 2003) and nephropathy (Babaei-Jadidi et al., 2003). In addition, previous studies have shown that benfotiamine is able to inhibit the advanced glycation end-product formation pathway and to completely prevent diabetes-induced glycoxidation products in peripheral nerves of diabetic rats (Stracke et al., 2001; Karachalias

et al., 2003; Hammes et al., 2003). Moreover, benfotiamine significantly increased the nerve conduction velocity in the same rats. All these effects could be the basis to explain the antiallodynic effect of benfotiamine in diabetic rats.

On the other hand, it has been shown that spinal and local peripheral administration of PKC inhibitors produce antiallodynic and antinociceptive effect in rats previously submitted to spinal nerve ligation (Hua et al., 1999; Yajima et al., 2003) or formalin injection (Aley et al., 2000; Souza et al., 2002), respectively. Since benfotiamine is able to inhibit the diacylglycerol-PKC pathway (Hammes et al., 2003; Babaei-Jadidi et al., 2003), we speculate that the observed antiallodynic and antinociceptive effect of this drug may be due to the inhibition of this pathway. However, so far the mechanism of antiallodynic or antinociceptive action of benfotiamine in spinal nerve ligated rats and in the formalin test, respectively, warrants further investigation.

In summary, this study has shown that oral administration of benfotiamine has antinociceptive and antiallodynic activity in rats, suggesting the possible clinical use of this drug.

Acknowledgements

The authors greatly appreciate the bibliographic assistance of Héctor Vázquez. Héctor I. Rocha-González and Nadia L. Caram-Salas are CONACYT fellows.

References

- Abbas, Z.G., Swai, A.B., 1997. Evaluation of the efficacy of thiamine and pyridoxine in the treatment of symptomatic diabetic peripheral neuropathy. *East. Afr. Med. J.* 74, 803-808.
- Aley, K.O., Messing, R.O., Mochly-Rosen, D., Levine, J.D., 2000. Chronic hypersensitivity for inflammatory nociceptor sensitization mediated by the epsilon isozyme of protein kinase C. *J. Neurosci.* 20, 4680-4685.
- Babaei-Jadidi, R., Karachalias, N., Ahmed, N., Battah, S., Thornalley, P.J., 2003. Prevention of incipient diabetic nephropathy by high-dose thiamine and benfotiamine. *Diabetes* 52, 2110-2120.
- Bitsch, R., Wolf, M., Moller, J., Heuzeroth, L., Gruneklee, D., 1991. Bioavailability assessment of the lipophilic benfotiamine as compared to a water-soluble thiamin derivative. *Ann. Nutr. Metab.* 35, 292-296.
- Brownlee, M., 2001. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* 414, 813-820.
- Capone, F., Aloisi, A.M., 2004. Refinement of pain evaluation techniques. The formalin test. *Ann. Ist. Super. Sanita.* 40, 223-229.
- Chaplan, S.R., Bach, F.W., Pogrel, J.W., Chung, J.M., Yaksh, T.L., 1994. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. *J. Neurosci. Methods* 53, 55-63.
- Chen, S.R., Pan, H.L., 2001. Spinal endogenous acetylcholine contributes to the analgesic effect of systemic morphine in rats. *Anesthesiology* 95, 525-530.

- Courteix, C., Eschalier, A., Lavarenne, J., 1993. Streptozocin-induced diabetic rats: behavioural evidence for a model of chronic pain. *Pain* 53, 81-88.
- Dubuisson, D., Dennis, S.G., 1977. The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats. *Pain* 4, 161-174.
- Franca, D.S., Souza, A.L., Almeida, K.R., Dolabella, S.S., Martinelli, C., Coelho, M.M., 2001. B vitamins induce an antinociceptive effect in the acetic acid and formaldehyde models of nociception in mice. *Eur. J. Pharmacol.* 421, 157-164.
- Fujiwara, M., 1954. Allithiamine: a newly found derivative of vitamin B₁. *J. Biochem. (Tokyo)* 2, 273-285.
- Gaumond, I., Arsenault, P., Marchand, S., 2002. The role of sex hormones on formalin-induced nociceptive responses. *Brain Res.* 958, 139-145.
- Hammes, H.P., Du, X., Edelstein, D., Taguchi, T., Matsumura, T., Ju, Q., Lin, J., Bierhaus, A., Nawroth, P., Hannak, D., Neumaier, M., Bergfeld, R., Giardino, I., Brownlee, M., 2003. Benfotiamine blocks three major pathways of hyperglycemic damage and prevents experimental diabetic retinopathy. *Nat. Med.* 9, 294-299.
- Haupt, E., Ledermann, H., Kopcke, W., 2005. Benfotiamine in the treatment of diabetic polyneuropathy--a three-week randomized, controlled pilot study (BEDIP study). *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.* 43, 71-77.
- Hua, X.Y., Chen, P., Yaksh, T.L., 1999. Inhibition of spinal protein kinase C reduces nerve injury-induced tactile allodynia in neuropathic rats. *Neurosci. Lett.* 276, 99-102.

- Karachalias, N., Babaei-Jadidi, R., Ahmed, N., Thornalley, P.J., 2003. Accumulation of fructosyl-lysine and advanced glycation end products in the kidney, retina and peripheral nerve of streptozotocin-induced diabetic rats. *Biochem. Soc. Trans.* 31, 1423-1425.
- Kim, S.H., Chung, J.M., 1992. An experimental model for peripheral neuropathy produced by segmental spinal nerve ligation in the rat. *Pain* 50, 355-363.
- Koltzenburg, M., Lundberg, L.E., Torebjork, H.E., 1992. Dynamic and static components of mechanical hyperalgesia in human hairy skin. *Pain* 51, 207-219.
- McQuay, H.J., Tramer, M., Nye, B.A., Carroll, D., Wiffen, P.J., Moore, R.A., 1996. A systematic review of antidepressants in neuropathic pain. *Pain* 68, 217-227.
- Obrenovich, M.E., Monnier, V.M., 2003. Vitamin B₁ blocks damage caused by hyperglycemia. *Sci. Aging Knowledge Environ.* 10, PE6.
- Porro, C.A., Cavazzuti, M., 1993. Spatial and temporal aspects of spinal cord and brainstem activation in the formalin pain model. *Prog. Neurobiol.* 41, 565-607.
- Reyes-García, G., Medina-Santillán, R., Terán-Rosales, F., Castillo-Henkel, C., Rodríguez-Silverio, J., Torres-López, J.E., Ochoa-Cetina, L., Medina-Tato, D.A., Granados-Soto, V., 2001. Analgesic effect of B vitamins in formalin-induced inflammatory pain. *Proc. West. Pharmacol. Soc.* 44, 139-140.
- Sindrup, S.H., Jensen, T.S., 1999. Efficacy of pharmacological treatments of neuropathic pain: an update and effect related to mechanism of drug action. *Pain* 83, 389-400.
- Souza, A.L., Moreira, F.A., Almeida, K.R., Bertollo, C.M., Costa, K.A., Coelho, M.M. In vivo evidence for a role of protein kinase C in peripheral nociceptive processing. *Br. J. Pharmacol.* 135, 239-247.

- Stracke, H., Hammes, H.P., Werkmann, D., Mavrakis, K., Bitsch, I., Netzel, M., Geyer, J., Kopcke, W., Sauerland, C., Bretzel, R.G., Federlin, K.F., 2001. Efficacy of benfotiamine versus thiamine on function and glycation products of peripheral nerves in diabetic rats. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes* 109, 330-336.
- Stracke, H., Lindemann, A., Federlin, K., 1996. A benfotiamine-vitamin B combination in treatment of diabetic polyneuropathy. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes* 104, 311-316.
- Wheeler-Aceto, H., Cowan, A., 1991. Standardization of the rat paw formalin test for the evaluation of analgesics. *Psychopharmacology (Berl)* 104, 35-44.
- Winkler, G., Pal, B., Nagybeganyi, E., Ory, I., Porochnavec, M., Kempler, P., 1999. Effectiveness of different benfotiamine dosage regimens in the treatment of painful diabetic neuropathy. *Arzneimittelforschung* 49, 220-224.
- Woelk, H., Lehl, S., Bitsch, R., Kopcke, W., 1998. Benfotiamine in treatment of alcoholic polyneuropathy: an 8-week randomized controlled study (BAP I Study). *Alcohol Alcohol.* 33, 631-318.
- Yajima, Y., Narita, M., Shimamura, M., Narita, M., Kubota, C., Suzuki, T., 2003. Differential involvement of spinal protein kinase C and protein kinase A in neuropathic and inflammatory pain in mice. *Brain Res.* 992, 288-293.
- Zimmermann, M. Ethical guidelines for investigations on experimental pain in conscious animals. *Pain* 16, 109-110.

FIGURES LEGENDS

Fig. 1. Time course of the nociceptive behavior induced by subcutaneous injection of formalin to normal (black circles) and diabetic (white circles) rats. Data are expressed as the mean number of flinches. Data are the means \pm S.E.M. of 6 animals.

Fig. 2. Effect of benfotiamine on the second phase of the formalin test. Rats received oral administration of benfotiamine at 10 min, 1 and 2.5 h and then an injection of 1% formalin (50 μ l) at time zero. Data are expressed as the area under the number of flinches against time curve (AUC). Bars are the means \pm S.E.M. of 6 animals. * Significantly different from the vehicle (Veh) group ($P < 0.05$), as determined by analysis of variance followed by the Tukey's test.

Fig. 3. Antinociceptive effect produced by oral administration of benfotiamine during phase 2 of the formalin test in normal (A) and diabetic (B) rats. Normal and diabetic rats received oral administration of benfotiamine (-2.5 h) and an injection of either 1 or 0.5% formalin (50 μ l) at time zero, respectively. Data are expressed as the area under the number of flinches against time curve (AUC). Bars are the means \pm S.E.M. of 6 animals. * Significantly different from the vehicle (Veh) group ($P < 0.05$), as determined by analysis of variance followed by the Tukey's test.

Fig. 4. A: Effect of L5/L6 spinal nerve ligation to normal rats. Animals were allowed to recover from surgery for 12 days. B: Effect of oral administration of

streptozotocin to normal rats. After diabetes induction, animals were allowed to be diabetic for 4 to 6 weeks. In both cases animals were treated with saline before starting thresholds evaluations with the von Frey filaments. Data are the mean \pm S.E.M. for 6 animals.

Fig. 5. Antiallodynic effect produced by oral administration of benfotiamine in L5/L6 spinal nerve injured (A) and diabetic (B) rats. Spinal nerve injured and diabetic rats received oral administration of benfotiamine (-2.5 h) and the withdrawal threshold was assessed at time zero and for the next 5 h. Data are expressed as the area under the number of flinches against time curve or as 50% threshold withdrawal against time curve (AUC) for spinal nerve injured and diabetic rats, respectively. Bars are the means \pm S.E.M. of 6 animals. * Significantly different from the vehicle (Veh) group ($P < 0.05$), as determined by analysis of variance followed by the Tukey's test.

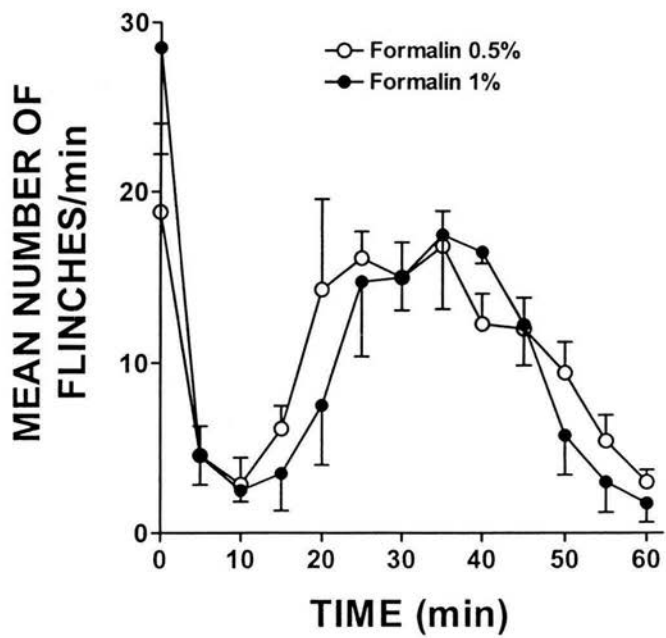


Fig. 1. Sánchez-Ramírez et al

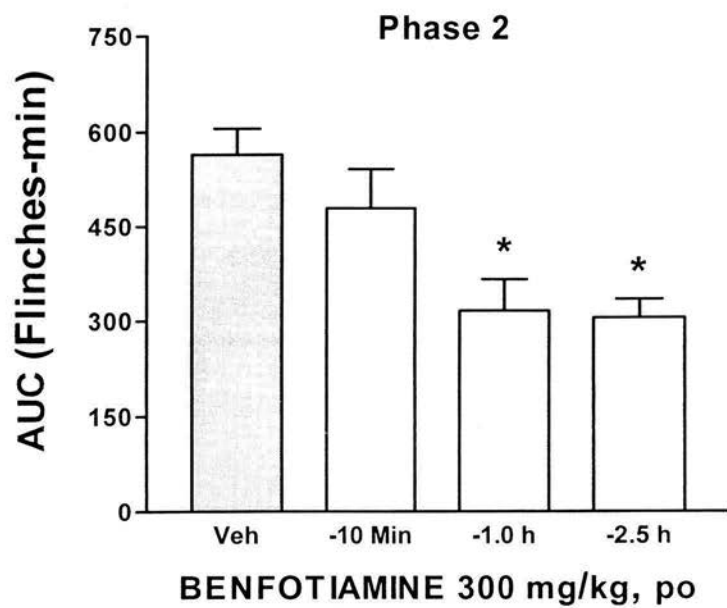


Fig. 2. Sánchez-Ramírez et al

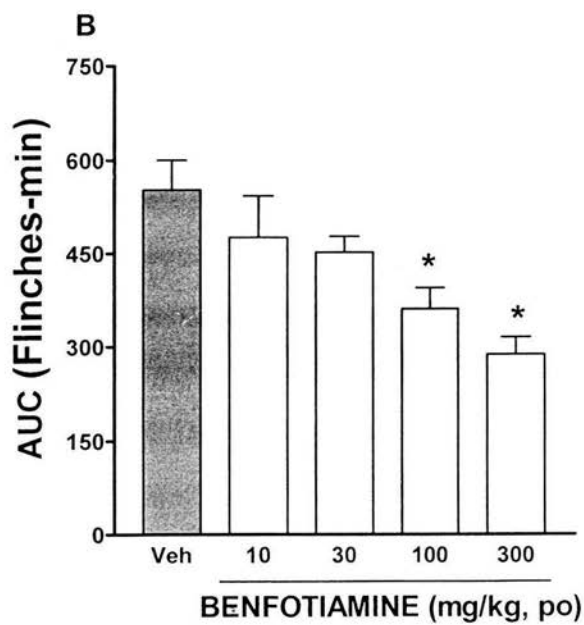
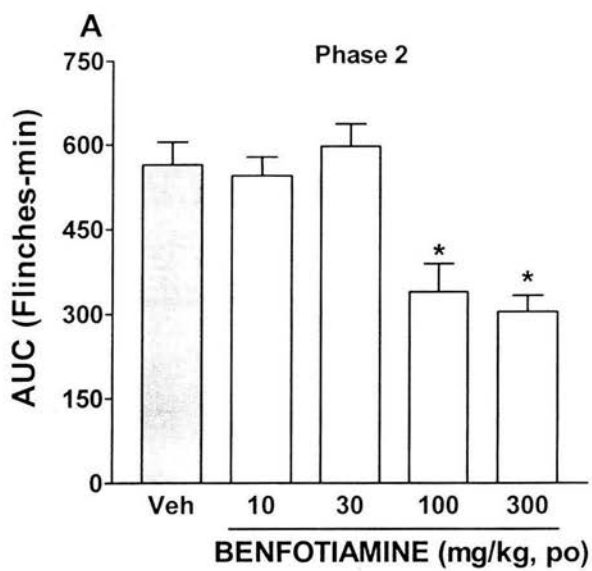


Fig. 3. Sánchez-Ramírez et al

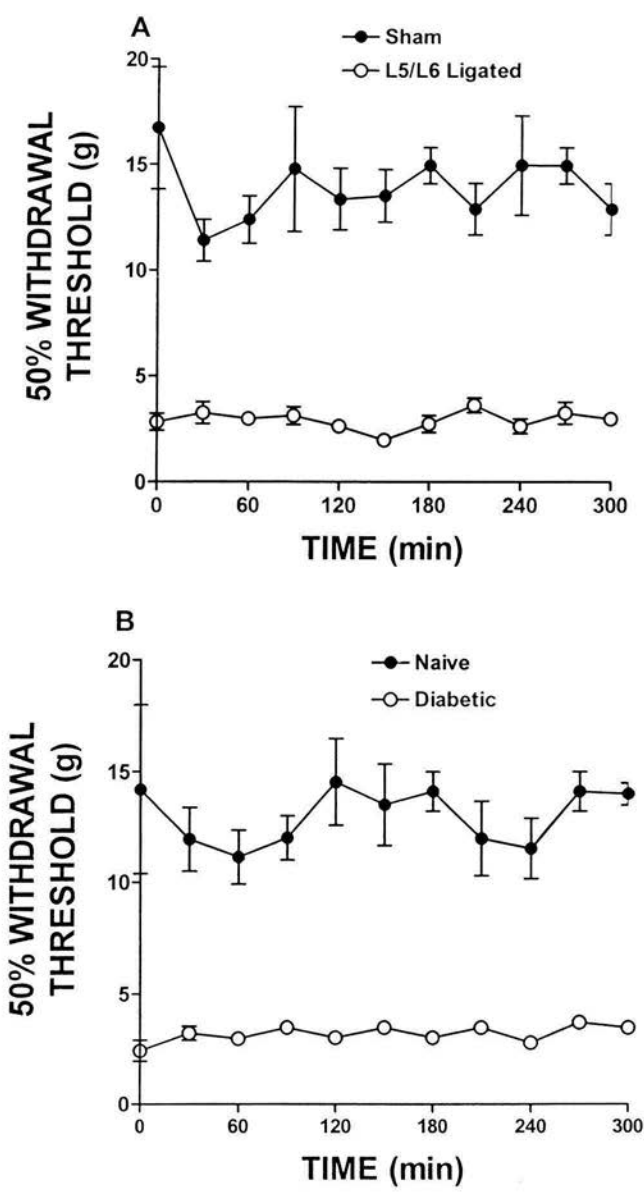


Fig. 4. Sánchez-Ramírez et al

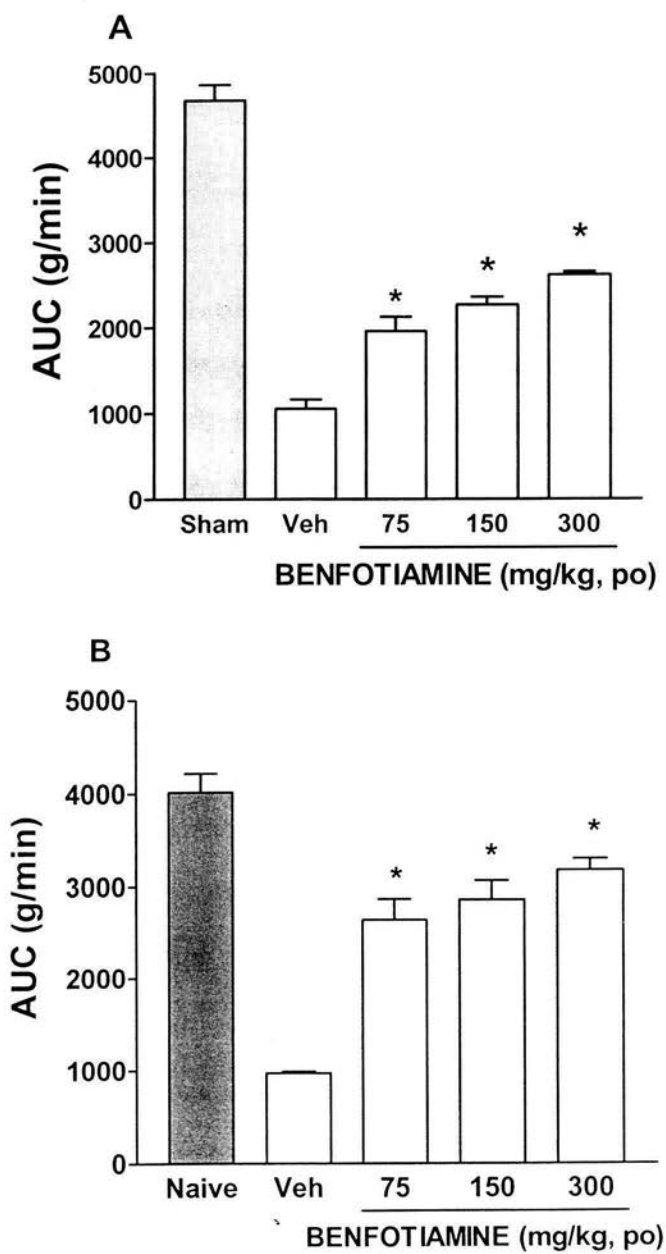


Fig. 5. Sánchez-Ramírez et al