



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
IZTACALA**

**Caracterización de la potenciación del efecto antinociceptivo de
diclofenac por vitaminas del complejo B (B₁, B₆ y B₁₂) en la rata**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

PRESENTA:

FLAVIO TERÁN ROSALES

**DIRECTOR DE TESIS:
Dr. Gerardo Reyes García**

México, D.F.

Diciembre 2004



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.

DEDICATORIAS

- *Especialmente a mi esposa Angélica, gracias por tu apoyo. Este trabajo es una ofrenda a tu labor, entrega y a tu forma de vivir la vida.*
- *A mis hijas Marysol, Jessica Y Yazmín por ser el motivo y la razón*
- *A mi mama por ser una muestra de amor talento y entusiasmo por ese carácter indomable.*
- *A mis hermanos Arturo por su apoyo incondicional; a Francisco, Marcelino, Sandra, Concepción, Raúl, Samuel Y Rubén. Por estar siempre á mi lado; por su cariño y su apoyo.*

- *A mis sobrinos que son una motivación para seguir luchando y salir adelante.*
- *A todos aquellos quienes de manera indirecta contribuyeron a la realización de este proyecto.*

AGRADECIMIENTOS

- *Dr. Gerardo Reyes García por sus comentarios y sugerencias, sobre todo y lo mas importante, por su apoyo incondicional, y por brindarme su amistad.*
- *A mis sinodales, al Dra.Leticia Moreno Fierros, Dr. Maximiliano Ibarra Barajas, Dr. Norma Laura García Saldivar, M. en C. Angel Duran Díaz por sus criticas y atinadas sugerencias para el enriquecimiento de este trabajo.*
- *Al Departamento de Farmacobiología de la sección de Posgrado de la Escuela Superior de Medicina del Instituto Politécnico Nacional, por permitirme realizar este trabajo en sus instalaciones.*
- *De manera importantemente a la Universidad Autónoma de México campus Iztacala Por abrirme sus puertas y permitir este pasó en mi vida.*



TABLA DE CONTENIDO

ABREVIATURAS	i
I. TITULO	1
II. INTRODUCCIÓN	2
III. OBJETIVOS	47
IV. MATERIAL Y MÉTODOS	48
V. ARTICULO	50
VI. DISCUSION	55
VII. REFERENCIAS	61



II. INTRODUCCIÓN

1. DOLOR

El dolor es una experiencia sensorial y emocional desagradable y, como tal, personal e intransferible. Aunque comunicable. Dicha experiencia es única, irrepetible, y trascendente. En ella se conjugan mecanismos neurofisiológicos, psicológicos, de comportamiento y culturales. Definido así, el dolor es un problema multidimensional, psicofísico y sociocultural que trasciende al paciente, a la familia y a toda la sociedad. Se han propuesto muchas definiciones de dolor, sin embargo, fue hasta 1960 que se consideró como una respuesta sensorial al daño tisular y en ese entonces existía poca información acerca de su componente afectivo. En 1979 La Organización Internacional para el Estudio del Dolor (IASP, *International Association for the Study of Pain*) define al dolor como una experiencia sensorial y emocional desagradable asociada a un daño tisular real o potencial que puede describirse en términos de la magnitud del daño (Merskey, 1979). Hasta la fecha esta definición de dolor se considera la más adecuada, ya que presenta un cambio con respecto a las anteriores al introducir dos nuevos conceptos. En primer lugar: considera que el dolor no es sólo una respuesta sensorial al daño tisular, sino que está integrada además por componentes emocionales y subjetivos; en segundo lugar puede producirse sin causa somática que lo justifique.

A. Clasificación del dolor



Existen varios 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 diferentes tipos 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, inmovilización, entre otras.



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

Björkman (1995) clasifica el dolor de acuerdo a la región anatómica donde se produce en: somatosensorial (originado en la piel o tejido conectivo, hueso, músculo y membranas sinovial y articular), visceral (dolor procedente de las distintas vísceras abdominales o torácicas) y neurogénico (se refiere al dolor que se produce debido al daño o irritación en el sistema nervioso).

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

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



múltiples comportamientos frustrantes denominados con frecuencia conductas del dolor, entre las que destacan la ansiedad, depresión, insomnio, miedo, histeria, entre otros factores psicológicos y sociales (Hyman y Cassem, 1995).

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

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

2. NOCICEPCIÓN

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).

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




Para transmitir información nociceptiva la neurona debe ser selectiva, es decir, debe haber algún mecanismo con la capacidad de distinguir entre estímulos inocuos y



nocivos (Hyman y Cassem, 1995). Los nociceptores (abreviación de nocirreceptor) poseen dos características que ayudan a realizar esta distinción: un umbral alto de estimulación y la capacidad de relacionar de manera directa la frecuencia de la descarga con la intensidad del estímulo (Bessou y Perl, 1969).

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.

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

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



Clasificación de los nociceptores en función de su localización:

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

A. Nociceptores cutáneos

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

Presentan tres propiedades fundamentales:

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

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



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

<i>Tipo de Nociceptor</i>	<i>Tipo de Fibra</i>	<i>Tipo de Estímulos</i>	<i>Campo receptivo</i>
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 ⁰ C) Mecánicos	< 5 mm ²
Nociceptores Polimodales C	C	Térmicos (>38 ⁰ 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).

B. Nociceptores musculares

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



C. Nociceptores articulares

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

D. Nociceptores viscerales o silenciosos

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

E. Nociceptores óseos

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

F. Nociceptores dentales y de córnea

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

3. FISIOLÓGÍA DEL DOLOR

El proceso comienza con la activación de nociceptores aferentes primarios (fibras A- δ y C), en respuesta a estímulos físicos, mecánicos y/o químicos (Siddall y Cousins, 1998). Este mensaje se propaga a través de las aferentes primarias hasta el asta

dorsal de la médula espinal (**Figura 1**), donde se encuentra el primer centro de relevo (García y Herrero, 1998).

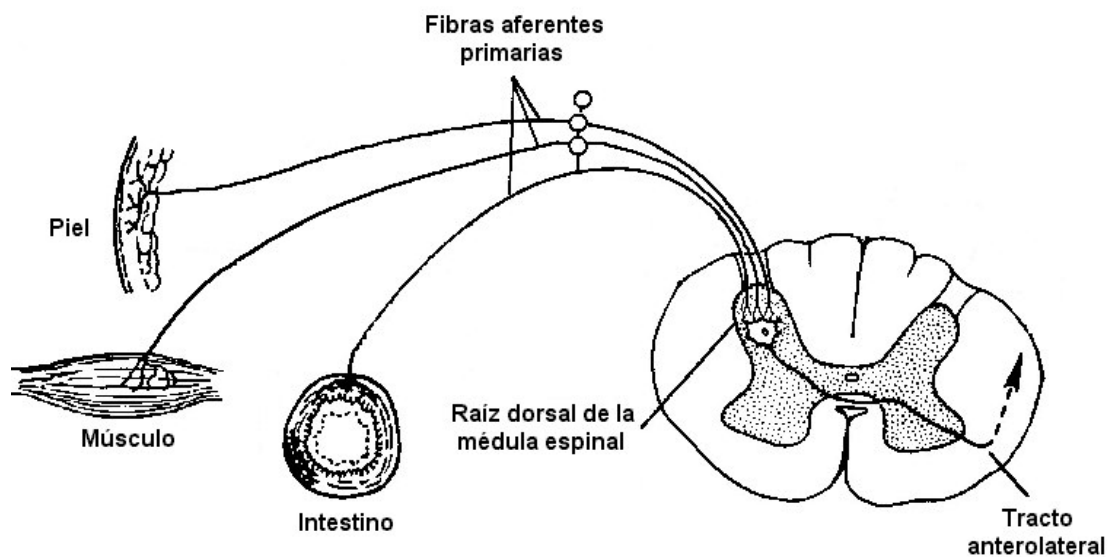


Figura 1. Esquema de la inervación cutánea, muscular y visceral por fibras aferentes nociceptivas, su relevo en la médula espinal y origen del sistema ascendente anterolateral. Modificado de Jesell y Kelly (1991).

Cada axón aferente primario contacta con muchas neuronas medulares, y cada neurona medular recibe impulsos convergentes de muchas fibras aferentes primarias (Fields y Martin, 1994). La convergencia y la divergencia de señales 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 2**), de las cuales tienen especial importancia la capa marginal de Waldeyer (lámina I), la sustancia gelatinosa (lámina II), el núcleo propio (láminas III-VI), y el área que rodea el conducto central (lámina X). Los axones de la mayoría de las neuronas de dichas láminas constituyen el sistema espinotalámico (Sorkin, 1997). Las láminas del I-VI forman el asta dorsal de la medula espinal. Dentro del asta dorsal los nociceptores primarios terminan en neuronas de proyección y en interneuronas excitatorias e inhibitorias (Hyman y Cassem, 1995).

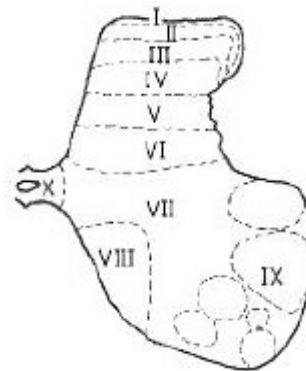


Figura 2. Clasificación de la sustancia gris de la médula espinal a nivel de la quinta vértebra lumbar según Rexed (1952).

A. Vías ascendentes

El dolor surge a partir de la estimulación de receptores específicos llamados nociceptores (Levine, 1996) en cuatro zonas principales del cuerpo: tejido cutáneo,



muscular, articular y visceral (Besson, 1997). Las neuronas aferentes periféricas se clasifican dependiendo de su diámetro y grado de mielinización: las fibras A α y A β (6-12 μ m de diámetro) y A δ (1-5 μ m de diámetro) son mielínicas, mientras que las C (< 1 μ m de diámetro) son amielínicas. La velocidad de conducción es mayor cuanto mayor es el diámetro y grado de mielinización (Dykes, 1975). Algunos nociceptores están especializados para detectar determinada sensación dolorosa: las fibras A δ que responden a estímulos mecánicos o térmicos se conocen como mecanorreceptores o termorreceptores, respectivamente; mientras que las fibras C de alto umbral que no responden selectivamente a estímulos mecánicos, térmicos o químicos se denominan receptores polimodales (Besson y Chaouch, 1987).

Diversos estímulos nociceptivos mecánicos, térmicos, eléctricos o químicos provocan la actividad de fibras aferentes primarias mielínicas A δ y de fibras amielínicas C. Estas fibras transducen la actividad en una serie de potenciales de acción que se transmiten a lo largo de los axones y se dirigen al asta dorsal de la médula espinal (Dykes, 1975). En este sitio, las fibras penetran por la división lateral de la raíz dorsal, luego se bifurcan y ascienden o descienden por el fascículo de Lissauer. Estas fibras hacen sinapsis en el asta dorsal de la médula espinal en las láminas I (células marginales de Cajal), II y V (neuronas de rango dinámico amplio) de la sustancia gris con interneuronas locales o neuronas de relevo que se concentran en los tractos espinotalámico, espinorreticular y espinomesencefálico, **(figura 3)** (Besson y Chouch, 1987). Estos sistemas ascendentes llevan la información nociceptiva hasta la región supraespinal, donde la percepción y conciencia del dolor es generada mediante la entrada de impulsos sensoriales que llegan a las áreas límbicas, talámicas y corticales involucradas en el aspecto sensitivo, afectivo y cognoscitivo (Besson, 1999).

Si se aplican estímulos nocivos repetidos, los nociceptores manifiestan una disminución del umbral de activación, un incremento en la respuesta al estímulo o la aparición de actividad espontánea (Levine et al., 1993). Este proceso se conoce



como sensibilización, en donde un estímulo antes inocuo se percibe como doloroso originando un estado de hiperalgesia o sensibilidad aumentada a un estímulo (Levine, 1996). La hiperalgesia suele extenderse más allá del sitio de lesión (Dougherty y Willis, 1991). Cuando se estimula de manera constante y repetida una fibra C se induce el fenómeno de sensibilización que se conoce como *wind-up* en el cual se incrementa la respuesta de las neuronas del asta dorsal y la duración de la respuesta continúa aún después de haber eliminado el estímulo periférico (Dickenson, 1990).

B. Sistemas inhibidores de control descendente

A diferentes niveles de la transmisión del dolor existen diferentes sistemas de control endógeno que constantemente modulan la transmisión de la información nociceptiva (Basbaum y Fields, 1984). Melzack y Wall (1965) en su teoría de “Control de la compuerta” proponen que la transmisión del dolor a nivel espinal está bajo control segmental y supraespinal. En el control segmental los efectos inhibitorios son producidos por la activación de fibras aferentes de gran diámetro $A\alpha$ y $A\beta$ que bloquean presinápticamente a nivel espinal el estímulo doloroso transmitido por las fibras de diámetro pequeño $A\delta$ y C (Besson, 1997). Este efecto inhibitorio está mediado por el ácido γ -aminobutírico (GABA) y por péptidos opioides endógenos (Besson y Chaouch, 1987).

A nivel supraespinal la sustancia gris periacueductual (SGPA) y el núcleo del rafe magno (NRM) tienen una función muy importante en la modulación de la transmisión nociceptiva a nivel espinal (Basbaum y Fields, 1984). La SGPA participa en el procesamiento y modulación del dolor. Su principal circuito intrínseco es una red GABAérgica que está tónicamente activa (Behbehani, 1995). En el NRM existen tres tipos de células: Las células de encendido (*on-cells*), las células de apagado (*off-cells*) y las células neutras (*neutral cells*) que se proyectan hacia el trigémino y

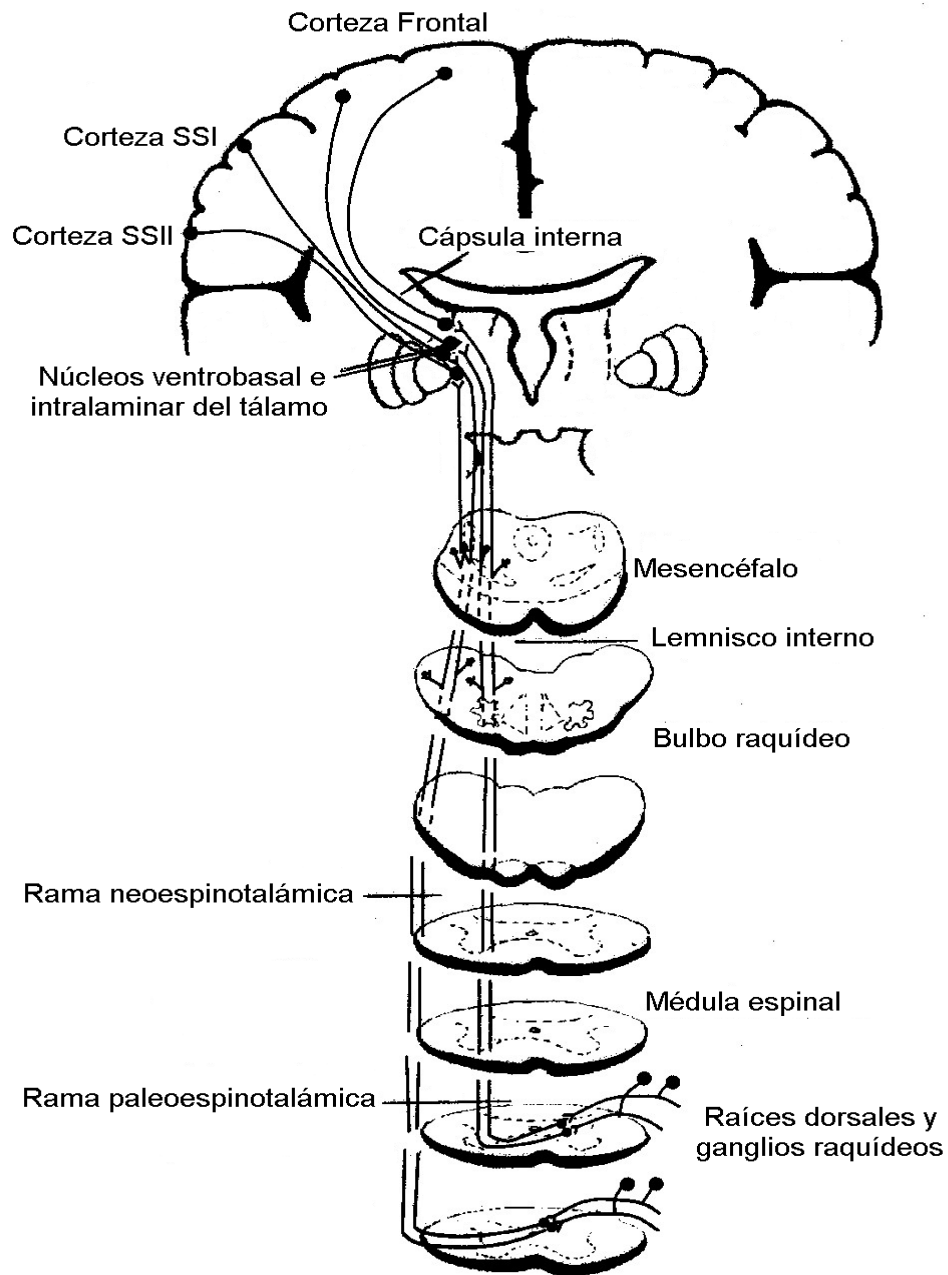


Figura 3. Representación del sistema ascendente anterolateral. Modificado de Guyton y Hall (1996).



médula espinal a lo largo del funículo dorsolateral. Las “*off-cells*” tienen una influencia inhibitoria tónica sobre las aferentes nociceptivas en la médula espinal, mientras que las “*on cells*” facilitan la respuesta de estas aferencias al estímulo nocivo y las “*neutral cells*” no experimentan cambios (Fields et al., 1991). Cuando se estimula la SGPA se produce analgesia porque se excitan las “*off cells*” y se inhiben las “*on cells*” del NRM, bloqueando las neuronas nociceptivas del asta dorsal y la respuesta de las fibras A δ y C. Este mecanismo se conoce como “Teoría de la desinhibición” (Behbehani, 1995; Harris, 1996).

El sistema de control supraespinal activado por la aferencia nociceptiva se proyecta desde la corteza cerebral hacia la SGPA donde activa los sistemas encefalinérgicos, serotoninérgicos y noradrenérgicos en el NRM que bloquean la transmisión de la información nociceptiva a nivel espinal (Fields et al., 1991). Y aunque en la actualidad se han descubierto varios sistemas que pueden modular el dolor, sólo uno se ha estudiado en profundidad debido a su importancia (Fields y Martin, 1994). Dicho sistema consta de cuatro niveles (**Figura 4A**).

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

Las estructuras 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).

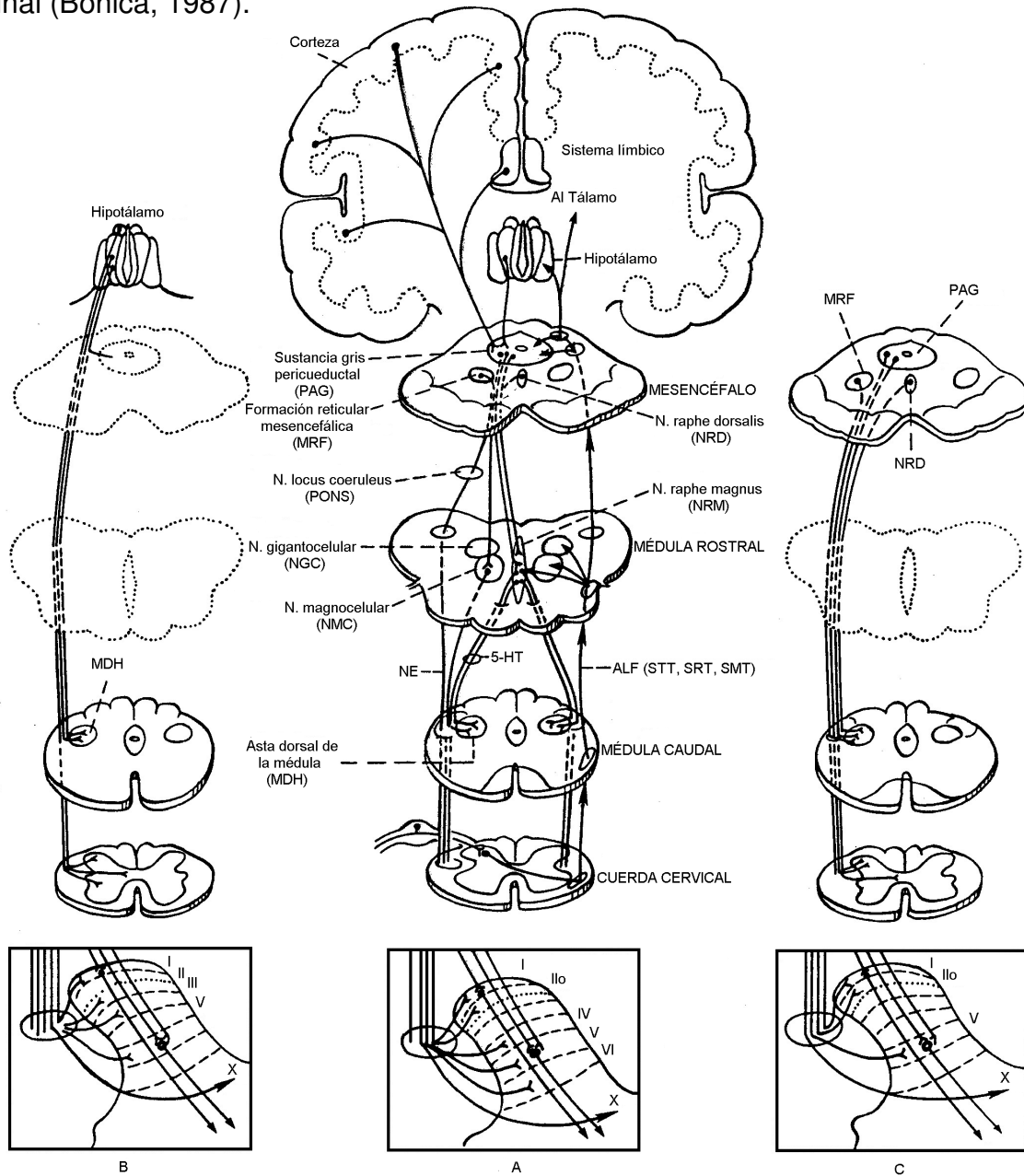


Figura 4. Sistemas de modulación nociceptiva: A) Sistema anterolateral ascendente (ALF); B) Sistema hipotálamo-espinal descendente y C) Sistema PAG-espinal. Modificado de Bonica (1987).



Otros sistemas que funcionan como moduladores del dolor son: el sistema descendente hipotálamo-espinal que se origina en el núcleo hipotalámico paraventricular y medial, el cual se encuentra formado principalmente por neuronas de vasopresina y oxitocina, aunque también existen neuronas ricas en endorfinas. Este sistema hace sinapsis en las láminas I, II, III, V y X del asta dorsal (**Figura 4B**); y el sistema PAG-espinal (**Figura 4C**) 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).

3. NEUROREGULADORES

La actividad y metabolismo de las fibras sensoriales es profundamente alterada por una variedad de mediadores que se generan por el daño tisular y la inflamación. Estos mediadores incluyen sustancias liberadas por el tejido dañado, sustancias de origen vascular, de fibras aferentes, fibras simpáticas y diversas células inmunes (**Tabla 3**). El efecto de estos mediadores consiste en activar o sensibilizar las fibras aferentes produciendo cambios en los canales iónicos y receptores de membrana. Estos cambios tienen el potencial de alterar la transcripción de genes e inducir a largo plazo alteraciones en la bioquímica de las neuronas sensoriales (Dray, 1995).

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

Dentro de la modulación, los neurreguladores juegan un papel muy importante en la comunicación celular nerviosa. Estos neurreguladores pueden subdividirse en neurotransmisores y neuromoduladores (Barchas et al., 1978). Los neurotransmisores básicamente llevan información entre células nerviosas adyacentes, mientras que los neuromoduladores aumentan o disminuyen la



actividad: afectando la síntesis, recaptura, biotransformación o unión al receptor de los neurotransmisores (Barchas et al., 1978; Stimmel, 1983).

Tabla 3. Principales neuroreguladores implicados en la respuesta del dolor.

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

Tabla elaborada con datos de Stimmel (1983).

A. Protones

Son producidos en condiciones tisulares ácidas como la isquemia, hipoxia e inflamación, producen dolor, espasmo muscular y en estados de enfermedad hiperalgesia debido a que aumentan la permeabilidad de la membrana. El proceso ocurre principalmente en nociceptores polimodales (Steen et al., 1992; Dray, 1995).



B. Acetilcolina

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

C. Dopamina

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

D. Histamina

Es sintetizada a partir de histidina por la histidina descarboxilasa y puede encontrarse libre o almacenada en vesículas sinápticas (Stimmel, 1983). La histamina es liberada en el proceso de desgranulación de mastocitos por mediadores de la inflamación (Dray, 1995), la cual activa receptores H₁ (Mobarakeh et al., 2000) que producen un aumento en la entrada de calcio a la célula, lo que libera neuropéptidos y cininas que ocasionan la amplificación de la señal dolorosa (Besson y Chaouch, 1987).



E. Serotonina

La 5-hidroxitriptamina (5-HT) es liberada por neuronas serotoninérgicas que se proyectan de la PAG al núcleo magno del raquí y de ahí a las láminas I, II, IV y V del asta dorsal (Roberts, 1984; Ruda et al., 1986). Actualmente se han relacionado tres subtipos de receptores de serotonina con la multiplicidad de efectos observados: 5-HT₁, 5-HT₂ y 5-HT₃. Se ha comprobado que los receptores 5-HT_{1A} facilitan la respuesta nociceptiva en tanto que los receptores 5-HT_{1B/D} la inhiben (Alhaider y Wilcox, 1993). Por su parte, los receptores 5-HT₂ acoplados a proteínas G sensibilizan a las neuronas mediante la activación de la fosfolipasa C que produce IP₃ y DAG, lo que libera calcio, aumentando su concentración intracelular, que a su vez provocan un aumento en la descarga neuronal (Fozard, 1984). Los receptores 5-HT₃ se encuentran acoplados a canales iónicos que aumentan la permeabilidad de sodio y disminuyen la de potasio produciendo hiperalgesia (Dray, 1995).

F. Sustancia P

La sustancia P es un polipéptido perteneciente a la familia de las neurocininas que agrupa a la neurocinina A y al péptido relacionado al gen de la calcitonina. Posee tres tipos de receptores: NK₁, NK₂ y NK₃ siendo el principal receptor NK₁, localizado en la duramadre, médula espinal y aferencias sensoriales (Hall y Geppetti, 1995; Basbaum, 1999). La sustancia P es un neurotransmisor aferente primario liberado por la activación de fibras C, está involucrado en reacciones inflamatorias debidas a un daño tisular químico o térmico (Gamse, 1984) que produce vasodilatación, aumento en la permeabilidad plasmática, liberación de histamina por mastocitos e incremento en la actividad fagocitaria de neutrófilos y macrófagos. Todos estos efectos provocan que la sustancia P tenga un efecto hiperalgésico (Dray, 1995).



G. Ácido γ -aminobutírico (GABA)

El GABA es el neurotransmisor inhibitorio más abundante en el SNC, es sintetizado a partir del glutamato por la glutamato descarboxilasa (GAD) y se ha relacionado con una gran variedad de funciones fisiológicas en el cerebro y tejidos no neuronales (Watanabe et al., 2002). Se han descubierto hasta la fecha tres receptores para GABA: Dos receptores ionotrópicos ligados a canales de cloro ($GABA_A$ y $GABA_C$) (Stephenson, 1995; Watanabe et al., 2002) y un receptor metabotrópico ($GABA_B$) acoplado a través de proteínas G a canales de K^+ y Ca^{2+} (Bowery, 1993). De los receptores GABA, los $GABA_A$ y $GABA_B$ han sido los más estudiados y se han relacionado con una acción analgésica a nivel espinal y supraespinal (Sawynok, 1987).

H. Bradicinina

Junto con la calicreína, la bradicinina pertenece al grupo de las cininas. Éstas son sintetizadas a partir de cininógenos de alto y bajo peso molecular por la acción de calicreínasas en plasma y tejido periférico. Sus efectos principales se atribuyen a dos receptores: B_1 y B_2 , aunque existe una mayor afinidad por los receptores B_2 . Ambos receptores se encuentran acoplados a proteínas G. La bradicinina se genera rápidamente estimulando receptores B_2 que a su vez activan a la PLA_2 y PLC. La PLA_2 incrementa la liberación de ácido araquidónico que es transformado en prostaglandinas, en tanto, se incrementa la concentración de calcio intracelular por la acción de la PLC, prolongando la sensación de dolor. Además del incremento de prostaglandinas, la bradicinina se ve involucrada en la liberación de otros mediadores del dolor como neurocininas, neuropéptidos, citocinas, CGRP, óxido nítrico, histamina y serotonina. Estos mediadores participan en procesos como la



vasodilatación, incremento de la permeabilidad vascular, extravasación plasmática, migración celular e hiperalgesia (Calixto et al., 2000).

I. Factor de crecimiento neural

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

J. Encefalinas, endorfinas y dinorfinas

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

Se han confirmado cinco tipos de receptores opioides: mu (μ), delta (δ), sigma (σ), kappa (κ) y épsilon (ϵ) en las diferentes regiones del SNC (Terenius, 1985) de los cuales μ , κ y δ son los de mayor importancia. Los receptores μ se asocian con la analgesia espinal y supraespinal, así como con la depresión respiratoria, euforia, relajación muscular, sedación y problemas de adicción. Los receptores κ producen analgesia espinal y disforia. Finalmente, los receptores δ se encuentran involucrados en el desarrollo de tolerancia, náusea, vómito y depresión respiratoria (Björkman, 1995).



Las endorfinas son particularmente abundantes en el hipotálamo, el *locus coeruleus*, tálamo y glándula pituitaria (Björkman, 1995). Por su parte, las encefalinas se distribuyen en las láminas I, II, V, VII y X del asta dorsal, donde contribuyen de manera importante a la modulación del dolor, también se encuentran en la PAG, el *globus pallidus*, núcleo magno del rafe y el núcleo reticular paragigantocelular (Glazer et al., 1981; Basbaum y Fields, 1984). Los opioides endógenos producen analgesia al unirse a sus receptores acoplados a proteínas G (Reisine y Pasternak, 1996). La unión a los receptores opioides inhibe la actividad de la adenilato ciclasa, lo que reduce los niveles de AMPc (Andrade y Aghajanian, 1985). Este mecanismo provoca que se inhiban canales de Ca^{2+} y se activen canales de K^+ provocando una hiperpolarización que impide la liberación de neurotransmisores y por ende la transmisión del dolor (Duggan y North, 1983).

K. Prostaglandinas

Junto con los leucotrienos y tromboxano, las prostaglandinas (PGs) pertenecen al grupo de los prostanoides (Abbadie y Besson, 1993). Las prostaglandinas son moléculas lipofílicas que contienen en su estructura 20 átomos de carbono y un anillo cíclico (Mycek et al., 2000). Son moléculas que se sintetizan a partir de fosfolípidos de membrana por activación de la lipólisis mediante la acción de la fosfolipasa A_2 y fosfolipasa C, que dan como resultado la liberación de ácido araquidónico, el más abundante precursor de prostaglandinas en mamíferos (Campbell y Halushka, 1996). El ácido araquidónico es entonces transformado en PGG_2 y después en PGH_2 por la acción de la enzima ciclooxigenasa (COX) en la médula espinal y los nervios aferentes primarios. Aunque (Willoughby et al. 2000) propone tres isoformas para la COX, sólo se han estudiado ampliamente dos de ellas: La COX-1 o “constitutiva”, descrita como la reponsable de la biosíntesis de



PGs importantes en la homeostasis y la COX-2 o “inducible” que aparece en respuesta a daño tisular (Vanegas y Schaible, 2001).

La liberación de las prostaglandinas PGD₂, PGE₂, PGF_{2α} y PGI₂ ocurre en la médula espinal y la raíz ganglionar. Estas se unen a sus receptores en neuronas de la médula espinal (DP y EP₂) y neuronas aferentes primarias (EP₁, EP₃, EP₄ e IP). Los receptores de prostaglandinas se encuentran acoplados a proteínas G que al ser activados inhiben canales de potasio y activan canales de sodio vía AMPc y PKA. La despolarización producida incrementa la velocidad de disparo e induce la liberación de aminoácidos excitatorios (AAE), sustancia P y CGRP que a su vez incrementan la liberación de prostaglandinas produciendo hiperalgesia y alodinia (Vanegas y Schaible, 2001).

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

L. Noradrenalina

La noradrenalina es almacenada en vesículas y liberada por el influjo de calcio en la neurona (Lefkowitz et al., 1996) a través de toda la vía bulboespinal que va desde los núcleos pontobulbares, núcleo *coeruleus* y *subcoeruleus* a las láminas I, II, IV, V, VI y X del asta dorsal (Ruda et al., 1986).

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



M. Glutamato

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

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

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

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

La unión del glutamato a receptores NMDA permite que se active la entrada de calcio, activando sistemas de señalización como el de calcio-calmodulina cinasa (CaM-Kinase II) que promueven la liberación de neurotransmisores y la amplificación de las señales dolorosas (Dougherty y Willis, 1991).

Por su parte, algunos receptores de glutamato metabotrópicos ($mGluR_1$, $mGluR_3$ y $mGluR_5$) están involucradas en la activación de fosfolipasa C vía proteínas G. Las



proteínas G están compuestas de tres subunidades α , β y γ . Al unirse el glutamato al receptor, la subunidad α toma una molécula de GTP disociándose de la subunidad $\beta\gamma$, la cual sirve como un mensajero intracelular. La activación de la proteína G causa la producción de IP_3 y DAG (Berridge, 1987). El IP_3 abre canales de Ca^{2+} del retículo endoplásmico que activa la vía CaM-Kinase II y promueve la liberación de neurotransmisores. El DAG, en tanto, activa la PKC que estimula otras vías de señalización, las cuales incrementan la conductancia de canales de sodio vía receptores NMDA (Kelso et al., 1992).

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

N. Óxido Nítrico

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

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



El ON es sintetizado durante la conversión enzimática de L-arginina a L-citrulina por la ON sintasa neuronal (nSON), una enzima localizada en neuronas del SNC y que requiere calcio para activarse, o por la ON sintasa inducible de óxido nítrico (iSON) localizada en la glía y que requiere activación por endotoxinas y citocinas (Meller y Gebhart, 1993) (**Figura 5**).

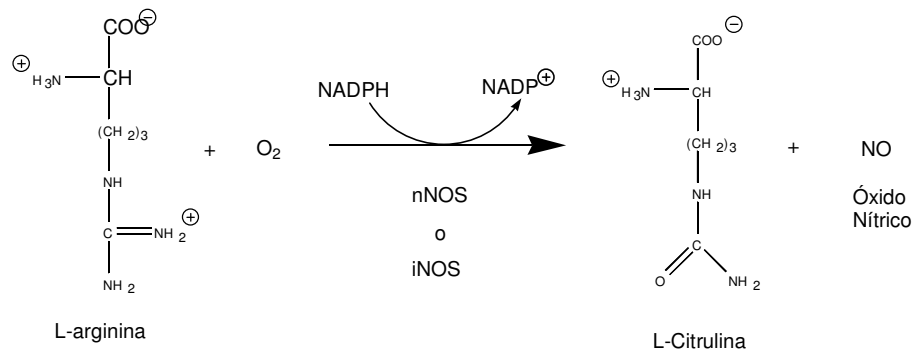


Figura 5. Representación química de la conversión enzimática de la L-arginina a L-citrulina.

El ON es sintetizado enzimáticamente en el SNC, en estructuras post-sinápticas, en respuesta a la activación de receptores NMDA (Garthwaite, 1991). Los receptores NMDA provocan la apertura de canales de calcio, incrementando la concentración intracelular del ión. El calcio se une a la calmodulina formando un complejo necesario para que la SON lleve a cabo la síntesis de ON. El ON sintetizado activa la guanilato ciclasa (GC), provocando un aumento en los niveles de GMPc y la activación de varias proteín-cinasas (Moncada et al., 1989).

Actualmente existe controversia sobre la función del ON en la transmisión dolorosa, ya que se han reportado efectos contradictorios. Por una parte, se ha sugerido que aparece en el foco inflamatorio, liberado por macrófagos activados (Jorens et al., 1995). En experimentos preliminares, (Reeh et al. 1991) observaron la activación y



sensibilización significativa de nociceptores cuando se impregnaban a los campos receptivos cutáneos con soluciones de concentraciones precisas de ON gaseoso. Otro estudio determina que la administración intradérmica de soluciones de ON causa dolor en humanos (Holthusen y Arndt, 1994). También se ha reportado que la administración intratecal de L-arginina y NMDA produce una facilitación rápida y transitoria del reflejo doloroso que se bloquea por inhibidores de la síntesis de ON (éster metílico de la N(G)-nitro-L-arginina, L-NAME) y por inhibidores de la guanilato ciclasa soluble (azul de metileno) (Meller et al., 1992).

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

4. MODELOS PARA EVALUAR LA NOCICEPCIÓN EN ANIMALES

El conocimiento científico concerniente a la percepción del “dolor en animales” es limitado y se ha obtenido por analogías basadas en la anatomía comparativa, fisiología, patología y por inferencias basadas en respuestas subjetivas del dolor (Erickson y Kitchell, 1984). Presenta problemas éticos, filosóficos y técnicos. Desde un punto de vista general, los investigadores tienen que seguir las recomendaciones propuestas por la IASP (Zimmermann, 1983; Roberts, 1989) en las que se establece que el animal no debe ser visto como un objeto, sino como un ser vivo con sensaciones. También se recomienda minimizar o eliminar de los protocolos el dolor producido a los animales, la evaluación del beneficio potencial que traerá la



investigación y en la medida de lo posible que el estímulo nocivo que se va a aplicar se lleve en el menor número de animales y que no sea invasivo.

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

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

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

1. PRUEBAS BASADAS EN UN ESTÍMULO TÉRMICO

El calor es una vía más selectiva para estimular nociceptores cutáneos, pero tiene su principal desventaja en la velocidad en que se produce el estímulo debido a que sucede de forma lenta ($<10^0\text{C/s}$), lo que resulta en una activación asincrónica de las fibras periféricas y centrales. Estas pruebas no involucran estimulación a vísceras o músculo esquelético (Le Bars et al., 2001).

a. Prueba “Tail-Flick”



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

b. Prueba "Paw Withdrawal"

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

c. Prueba "Hot Plate"

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

d. Prueba "Cold Plate"

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



2. PRUEBAS BASADAS EN UN ESTÍMULO MECÁNICO

Estas pruebas poseen la ventaja de poder graduar la intensidad o duración del estímulo, pero tienen la desventaja de no ser específicos. Pues hay estimulación de mecanorreceptores de bajo umbral, como de nociceptores (Le Bars et al., 2001).

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

3. PRUEBAS BASADAS EN UN ESTÍMULO ELÉCTRICO

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

a. Pruebas que utilizan descargas eléctricas largas

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



- b. Pruebas que utilizan choques eléctricos o descargas eléctricas cortas

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

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

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

1. ESTIMULACIÓN A ÓRGANOS

Estas pruebas sirven para estudiar el dolor visceral, involucran la administración de sustancias algésicas directamente a diferentes órganos, como el colón (Miampamba et al., 1994), el útero (Wesselmann et al., 1998), entre otros. La prueba más conocida es la de distensión colorrectal en rata que evalúa mediante un electromiógrafo el reflejo de los músculos abdominales (Ness y Gebhart, 1988).

2. INYECCIÓN INTRAPERITONEAL O “WRITHING TEST”

La administración intraperitoneal de agentes que irritan la membrana serosa provoca un comportamiento típico que se caracteriza por contorsión abdominal y reducción de la coordinación y actividad motora. Esta prueba cuantifica generalmente el



número de contorsiones por unidad de tiempo (Siegmund et al., 1957). Entre las sustancias algésicas frecuentemente empleadas en este modelo encontramos la benzoquinona, ácido acético, ácido etacrínico y la p-benzoquinona (Jaques, 1977).

3. INYECCIÓN INTRADERMICA

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

4. PRUEBA DE LA FORMALINA

El modelo de la formalina se lleva a cabo principalmente en roedores, aunque se han hecho experimentos en gatos, conejos, cobayos, primates, cocodrilos y aves domésticas. La prueba consiste en la administración subcutánea de formalina (formaldehído en un intervalo de concentraciones que van del 1 al 5%), en un volumen de 20-25 μL en ratones y 30-100 μL en ratas. La inyección se da generalmente en la superficie dorsal de la pata posterior derecha y los animales son generalmente sacrificados poco después de terminada la prueba. La prueba de formalina describe diferentes comportamientos, entre los que se encuentran el morder (biting), lamer (licking) y sacudir (flinching/shakes) la pata inyectada, siendo este último el parámetro más utilizado para cuantificar el grado de dolor (Dubuisson y Dennis, 1977).

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



restricciones en cuanto al sonido y nivel de actividad durante la realización de la misma.

La prueba de formalina en roedores es bifásica. La primera fase (aguda o neurogénica) inicia después de la inyección y dura entre 3 y 5 minutos y se debe a la estimulación directa de nociceptores, principalmente fibras C. La segunda fase (tónica o inflamatoria) inicia 15-20 minutos después de la inyección y dura entre 20 y 40 minutos. Se atribuye al proceso inflamatorio desencadenado por la histamina, serotonina, prostaglandinas y bradicinina. Es por esta segunda fase que la temperatura es un factor importante de controlar, pues a menor temperatura el proceso de inflamación se desarrolla más lentamente (Tjølsen et al., 1992). Se propone una temperatura de 22-23°C (Rosland, 1991) para ratones y 25-27°C para ratas (temperatura estandarizada en el laboratorio).

5. ANALGÉSICOS

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



A. Analgésicos opioides

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

Los analgésicos opioides pertenecen a varios subgrupos químicos, que incluyen fenantrenos (morfina, codeína), fenilheptilaminas (metadona), fenilpiperidinas (butorfanol) y benzomorfanos (pentazocina). La mayoría de estos analgésicos se absorben en las superficies mucosas de la nariz o boca, intramuscular y subcutáneamente. Su absorción en el tracto gastrointestinal es rápida aunque algunos opioides como la morfina y la oximorfona presentan efecto del primer paso importante.

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

Se unen a receptores μ , κ , y δ impidiendo la liberación de neurotransmisores y por ende, la transmisión del dolor (Duggan y North, 1983). Se usan clínicamente para aliviar el dolor, la tos, diarrea, edema pulmonar y como anestésicos. Entre sus principales desventajas se encuentran la tolerancia y la dependencia tanto física como psicológica (Way et al., 2001).

B. Analgésicos anti-inflamatorios no esteroidales (AINEs)

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



nimesulide, ketorolaco y diclofenaco (Björkman, 1995; Vaile y Davis, 1998). En la práctica clínica se utilizan en el alivio del dolor de leve a moderado. Tradicionalmente se ha descrito que su mecanismo de acción es a través de la inhibición de la ciclooxigenasa 1 (COX-1; constitutiva) y ciclooxigenasa 2 (COX-2; inducida en el sitio de la inflamación), que trae como consecuencia, la reducción de la síntesis de prostaglandinas (PGs) y tromboxano (**Figura 6**).

Se considera que la inhibición de la COX-2 media (cuando menos parcialmente) las acciones antipiréticas, analgésicas y anti-inflamatorias de los AINEs, pero la inhibición simultánea de la COX-1 ocasiona efectos colaterales no deseados, en particular los que culminan en úlceras gástricas (Forth et al., 1995). El principal sitio de acción de los AINEs es a nivel periférico. Sin embargo, algunos resultados experimentales sugieren que otros mecanismos y sitios de acción pueden estar involucrados (Cashman, 1996). Se han propuesto mecanismos adicionales que contribuyen en el efecto analgésico de los AINEs, como el de la estimulación del sistema L-arginina-ON-GMPc (Duarte et al., 1990; Ferreira et al., 1991; Tonussi y Ferreira, 1994; Björkman, 1995; Granados-Soto et al., 1995b; López-Muñoz et al., 1996; Aguirre-Buñuelos y Granados-Soto, 2000; Lázaro-Ibáñez et al., 2001) y canales de potasio (Lázaro-Ibáñez et al., 2001; Ortiz et al., 2002).

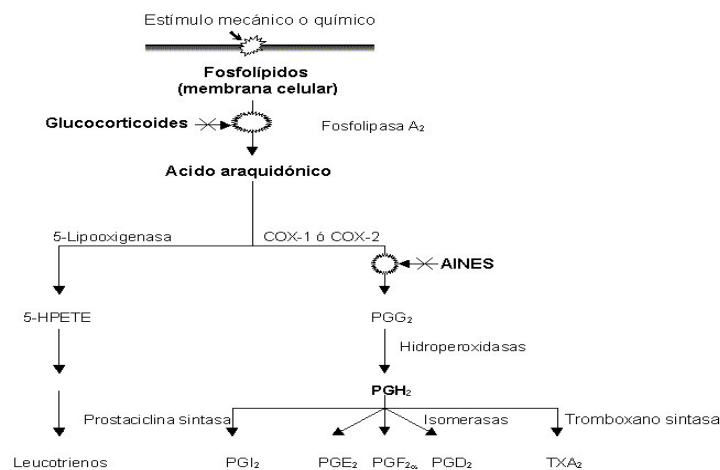


Figura 6. Vía catabólica del ácido araquidónico



DICLOFENACO

El diclofenaco ó ácido o-[(2,6-diclo-fenil) amino] fenil acético (**Figura 7**) es un AINE derivado del ácido fenil acético, con actividad antiinflamatoria, analgésica y antipirética (Menassé et al., 1978; Todd y Sorkin, 1988), se emplea para el tratamiento del dolor inflamatorio reumático y no reumático (Todd y Sorkin, 1988). Su actividad antiinflamatoria, al igual que la de otros fármacos tipo aspirina, se atribuye a su potente capacidad de inhibir *in vitro* e *in vivo* a la COX (Oliw et al., 1978; Todd y Sorkin, 1988).

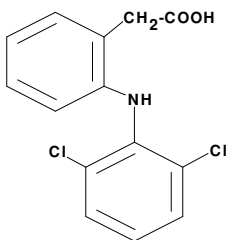


Figura 7. Estructura química del diclofenaco.

a. Actividad antiinflamatoria

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



b. Actividad analgésica

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

c. Actividad antipirética

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

d. Mecanismos de acción

1. Efectos en el metabolismo del ácido araquidónico

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



disminuye las concentraciones de $\text{PGF}_{2\alpha}$ y PGE_2 en la medula renal (Oliw et al., 1978), PGE_2 , 6-ceto- $\text{PGF}_{1\alpha}$ y PGI_2 en la mucosa gástrica de ratas y cobayos (Rainsford y Willis, 1982; Kobayashi et al., 1985).

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

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

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

También se ha sugerido que otro mecanismo que participa en su efecto antinociceptivo es la inhibición de la expresión de la L-selectina en la superficie de los neutrófilos. Esto reduce la adhesión de estos polimorfonucleares al endotelio



vascular durante el proceso inflamatorio, evitando su migración al tejido dañado (Díaz-González et al., 1995).

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

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



e. *Propiedades farmacocinéticas*

Estudios de biodisponibilidad con dosis únicas del fármaco administrado por vía oral sugieren que es absorbido casi en su totalidad (John, 1979; Kendall et al., 1979; Riess et al., 1978). Sufre el efecto del primer paso y alrededor del 60% llega a la circulación sistémica en forma intacta (John, 1979). El producto se liga fuertemente a proteínas séricas que varían entre 99.5 y 99.7%. Su volumen de distribución es de 0.1 a 0.2 L/Kg (Davies y Anderson, 1997). El diclofenaco se metaboliza en el hígado por la acción de la isoenzima de la subfamilia CYP2C del citocromo P450. Primero se hidroxila y por fase II se conjuga con ácido glucorónico y el aminoácido taurina (Masubuchi et al., 2001). Se conocen los siguientes metabolitos: 3-hidroxi, 4-hidroxi, 3-hidroxi-4-metoxi y 4, 5-dihidroxi-diclofenaco (John, 1979). La vida media terminal del diclofenaco basada en concentraciones de líquido sinovial es de 5.2 ± 1.1 horas (Riess et al., 1986), es decir, se acumula en líquido sinovial después de su ingestión (esto explica la duración de su efecto terapéutico que es considerablemente más largo que su vida media plasmática). El metabolito principal en humanos es el 4-hidroxi-diclofenaco (Davies y Anderson., 1997). El diclofenaco y sus metabolitos se excreta por orina en un 60 a 70%, el resto se excreta en bilis y heces (Stierlin y Faigle., 1979), su vida media de eliminación es de 1.1 a 1.8 h.

1. VITAMINAS

- a. Propiedades analgésicas y antiinflamatorias del complejo de vitaminas B (B₁, B₆ y B₁₂)



Se conoce que el complejo de vitaminas B tienen actividad antinociceptiva y anti-inflamatoria (Bartoszyk y Wild., 1989), pero su mecanismo de acción es desconocido. Este complejo, compuesto por tiamina (vitamina B₁), piridoxina (vitamina B₆) y cianocobalamina (vitamina B₁₂) son esenciales para la síntesis de neurotransmisores, para la producción de mielina en el sistema nervioso central y sistema nervioso periférico (Bermond, 1989).

b. Tiamina (vitamina B₁)

La tiamina (**Figura 8**) es la primera vitamina del complejo B. La deficiencia de esta vitamina causa polineuropatía, acompañada por una degeneración axonal. Altas dosis de tiamina producen bloqueo ganglionar (Castro, 1965; Boissier et al., 1966) y supresión de la transmisión del estímulo neural. La relación entre la vitamina B₁ y el sistema nervioso fue la base para extender el uso de altas dosis de tiamina por diversas rutas con el propósito de aliviar el dolor neuropático ya que la tiamina prácticamente carece de acciones farmacológicas a bajas dosis en humanos (Bermond, 1989).

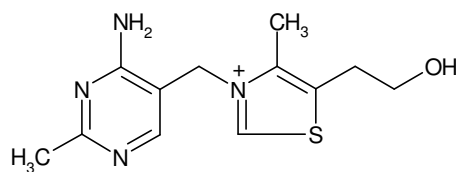


Figura 8. Estructura química de la tiamina.



1. *Farmacocinética*

La tiamina es una coenzima esencial para el metabolismo de los carbohidratos, interviene en la descarboxilación oxidativa del piruvato de acetil coenzima A y en la síntesis de acetilcolina (mediador químico neuronal). Sus ésteres tiene un alto grado de recambio en el organismo y no se almacena en ningún órgano o tejido por tiempos prolongados, por lo que es indispensable una ingesta continúa. La tiamina y sus derivados que ingresan por vía digestiva natural o por vía parenteral, se depositan rápidamente en el hígado, el músculo, el cerebro y en menor grado en otros tejidos, su absorción es en la porción proximal del intestino delgado, se almacena en pequeños depósitos en el músculo con una breve vida biológica. La tiamina en exceso se almacena y se deposita en sus 3 tipos de ésteres, pasado cierto límite se elimina el resto por orina (Rosenstein E, 2003).

c. Piridoxina (vitamina B₆)

La vitamina B₆ (**Figura 9**), es una coenzima de lisiloxidasa, esencial para la formación del fibroblasto (Mielke, 1985) ya que éstos ayudan a la síntesis y liberación de colágeno por la influencia del ácido ascórbico. Se sabe que el colágeno es esencial para la formación de articulaciones, que es el sitio donde se originan muchas condiciones de dolor. La concentración de piridoxina en sangre es baja en artritis reumatoide (Igari, 1978), aunque no es bien conocido si el decremento de esta vitamina es una causa o una consecuencia de los mecanismos reumáticos. Estudios recientes muestran que la administración de piridoxina puede suprimir directamente la respuesta de estímulos nociceptivos, lo que sugiere que esta supresión puede originar una respuesta analgésica (Sharma et al., 1990). Finalmente, la influencia de la piridoxina en el metabolismo de serotonina indica que puede prevenir manifestaciones del dolor.

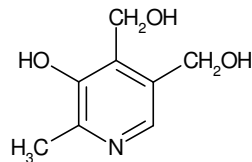


Figura 9. Estructura química de la piridoxina.

1. *Farmacocinética*

La piridoxina, es rápidamente absorbida por el tracto gastrointestinal después de la administración oral; sin embargo, la absorción gastrointestinal puede ser disminuida en pacientes con síndrome de mala absorción. La concentración sérica normal de piridoxina es de 30-80 mg/mL. Se almacena principalmente en hígado y en menor grado en músculo y cerebro. La vida media biológica de la piridoxina es de 15 a 20 días, en hígado el su principal metabolito el piridoxal es oxidado a ácido piridóxico, el cual es excretado por la orina (Rosenstein E, 2003).

d. Cianocobalamina (vitamina B₁₂)

Se sabe que la vitamina B₁₂ (**Figura 10**) incrementa el RNA en neuronas. Esta vitamina es un factor esencial para la formación de propionil-CoA dentro del ciclo de Krebs y proporcionar metamalonil-CoA a las neuronas, metamalonil-CoA, es el último metabolito importante para la síntesis de cerebrosidos neuronales y fosfolípidos para la producción de mielina (Corson et al., 1971). Uno de los papeles más importantes de la cianocobalamina es la transformación de poliglutamato a tetrahidrofolato, necesario para la síntesis de hemoglobina y glóbulos rojos en la



formación de sangre. La deficiencia de esta vitamina ocasiona el síndrome neuroanémico originando dolor. Estudios recientes en ratas confirman que la administración de vitamina B₁₂ disminuye el dolor provocado por diversas sustancias tales como la carragenina, caolín, calcio, etc. observándose una actividad preventiva y una actividad terapéutica. La actividad preventiva se obtiene al administrar vitamina B₁₂ media hora antes de la provocación del dolor y la actividad terapéutica se observa 2 horas después de la provocación del dolor (Bermond, 1989). La vitamina B₁₂, además de prevenir la anemia, ayuda a disminuir el dolor provocado por sustancias que inducen inflamación (Bermond, 1989).

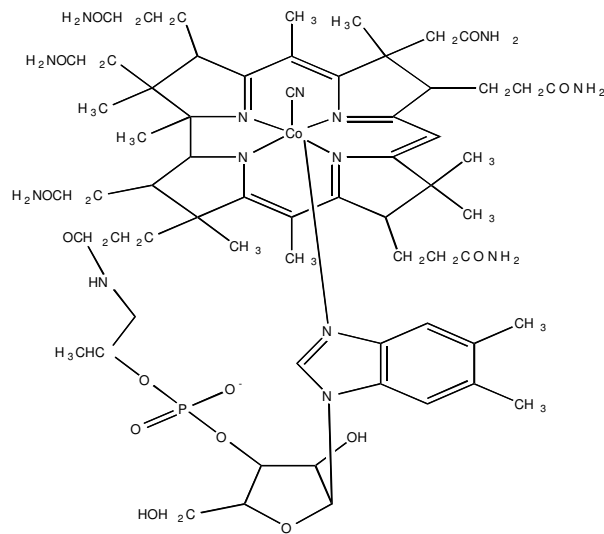


Figura 10. Estructura química de la cianocobalamina.

1. Farmacocinética

La vitamina B₁₂ es regularmente absorbida por el intestino delgado distal, cuando se suministra por vía oral. En el estómago la vitamina B₁₂ libre se une al factor intrínseco, que es una glucoproteína excretada por la mucosa gástrica que es necesaria para una absorción activa de la vitamina por el tracto gastrointestinal. El



complejo es detenido transitoriamente en receptores específicos de la pared del íleon distal, antes de que la vitamina sea absorbida y entre a la circulación sistémica. El mecanismo de transporte del factor intrínseco es saturado por 1.5-3 mg de vitamina B₁₂; sin embargo, cantidades adicionales de vitaminas pueden ser absorbidas independientemente del factor intrínseco, por difusión pasiva a través de la pared intestinal. Este mecanismo de difusión pasiva es importante sólo en presencia de cantidades de vitamina muchos más grandes (mínimos 1 mg). En la administración por vía oral de vitamina B₁₂ en dosis menores de 3 mg, el pico de concentración plasmática no se alcanza hasta después de 8-12 horas, porque la vitamina es transitoriamente retenida en la pared del íleon distal. En las células de la mucosa intestinal la vitamina B₁₂ es liberada del factor intrínseco, y se une rápidamente a las proteínas del plasma en la sangre, principalmente a una proteína de almacenamiento transcobalamina III. Las concentraciones sanguíneas de transcobalamina II se retiran después de que la vitamina B₁₂ es absorbida. En estado de ayuno la mayor parte de la vitamina circulante se une a la transcobalamina I. La vitamina B₁₂ es distribuida en el hígado y médula ósea y otros tejidos, incluyendo la placenta. El almacenamiento corporal total de la vitamina B₁₂ en sujetos sanos está estimado en un rango de 1-11 mg con un promedio de 5 mg del 50-90% está almacenado en el hígado. Cuando la vitamina B₁₂ es administrada en cantidades que exceden la capacidad de unión en plasma, hígado y otros tejidos, está libre en sangre y disponible para excreción urinaria. Aproximadamente del 10-15% es sintetizada diariamente por bacterias en el intestino grueso, pero es excretada por las heces, sin ser absorbida (Rosenstein E, 2003).



III. OBJETIVOS

Objetivo General

- Determinar si existe sinergismo en el efecto antinociceptivo de la administración oral de diclofenac al coadministrarse con las vitaminas del complejo B (B₁, B₆ y B₁₂).

Objetivos Particulares

- Determinar la relación dosis-respuesta de diclofenaco administrado por vía oral en el modelo PIFIR.
- Determinar la relación dosis-respuesta de las vitaminas del complejo B (B₁, B₆ y B₁₂) administrado por vía oral en el modelo PIFIR.
- Determinar la relación dosis-respuesta de las vitaminas del complejo B (B₁, B₆ y B₁₂) coadministrado con el diclofenaco por vía oral en el modelo PIFIR.
- Determinar si existe sinergismo en la coadministración de la mezcla diclofenaco-complejo B por vía oral en el modelo PIFIR.
- Determinar si existe sinergismo a dosis fijas de las vitaminas individuales y diclofenac en el modelo d PIFIR



MATERIAL Y MÉTODOS

1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Se utilizaron ratas Wistar hembra de 9-11 semanas de edad con un peso corporal de 180-200 g. Las ratas se mantuvieron con libre acceso a agua, pero se les retiró el alimento 12 horas antes de los experimentos.

Todos los experimentos se realizaron de acuerdo a las guías sobre aspectos éticos para la investigación del dolor experimental en animales (Zimmermann, 1983). Adicionalmente, el estudio fue aprobado por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de la sección de posgrado de la Escuela Superior de Medicina del I.P.N. Cada rata se utilizó solo una vez y se sacrificó en una cámara saturada con éter al final del experimento.

2. FÁRMACOS Y REACTIVOS

Las vitaminas del complejo B y el diclofenaco fueron donadas por Merck de México SA de CV (Ciudad de México). Ácido úrico y aceite mineral fueron adquiridos en Sigma (St. Louis, MO, USA). El diclofenaco y las vitaminas fueron disueltos en solución salina al 0.9% (p/v NaCl).

Soldadura de plata de la empresa Eutic Castolin de México. Cables de teléfono de siete hilos



3. METODOLOGÍA

A. MODELO PIFIR

El efecto antinociceptivo de la administración oral de complejo B, diclofenaco y la mezcla AINE-complejo B se evaluó con el modelo de dolor que induce impedimento funcional en la rata, P.I.F.R. (Pain-induced functional-impairment model in the rat).

La rata se le dio entrenamiento en los tambores del rotor durante 2 m. cada media hora por un tiempo de 2.5 h. (esto le permitió al animal adaptarse a su entorno), después se colocó en una cámara saturada de éter para ser anestesiada, posteriormente se inyectaron 50 µl. de una suspensión de ácido úrico en aceite mineral al 30% (p/v) en la rodilla de la pata posterior derecha, utilizando una aguja del No. 20, 1/4". Se colocaron electrodos de plata en cada una de sus extremidades posteriores. Se pusieron en los tambores para su evaluación, haciendo caminar dos minutos cada media hora. Se mide el índice de funcionalidad que consiste en el cociente entre la pata enferma contra el de la pata sana y se multiplica por cien.

I.F. = (No. de pisadas de la pata derecha/No. de pisadas de la pata izquierda) X 100.

Poco a poco la pata que fue inyectada con el ácido úrico la deja de usar y a las dos horas y media se observa que este valor tendió a cero en este momento se administran los fármacos vía oral Inmediatamente después de la administración, la rata fue colocada nuevamente en los tambores del rotor para la observación de la pata inyectada. La conducta dolorosa o nociceptiva de la pata inyectada, manifestada en forma suspensión o flexión y se cuantificó en intervalos de 2 minuto cada 30 minutos hasta completar 4 h. La prueba se realizó en un intervalo de temperatura de 25 a 27°C. Al final del experimento los animales se sacrificaron en una cámara de saturada de éter.



B. Evaluación del efecto antinociceptivo de complejo B

El complejo B (mezcla de vitaminas B₁, B₆ y B₁₂, en proporciones 100:100:1.0) se administró por vía oral (p.o.) a cuatro grupos de ratas (n = 6) en dosis crecientes (177 y 300 mg/kg) dos h. posteriores a la administración de el ácido úrico. Un grupo control de ratas (n = 6) recibió solamente solución salina fisiológica 0.9 % p.o.

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

El diclofenac se administró p.o. a cuatro grupos de ratas (n = 6) en dosis crecientes (0.3, 1.0, 3.1 y 10 mg/kg) dos h. posteriores a la administración de el ácido úrico. El grupo control empleado en la evaluación del efecto antinociceptivo de diclofenac fue empleado también como grupo control de este experimento.

D. Evaluación del efecto antinociceptivo de la mezcla diclofenac -complejo B administrada por vía oral

La mezcla diclofenac -complejo B se administró p.o. a cuatro grupos de ratas (n = 6) en dosis crecientes de la mezcla de vitaminas (56, 87, 100 y 177 mg/kg.) a dosis fijas de diclofenaco (1.8 mg/kg.) dos h. posteriores a la administración de el ácido úrico. El grupo control empleado en la evaluación del efecto antinociceptivo de diclofenac fue empleado también como grupo control de este experimento.



E. Evaluación del efecto antinociceptivo de la mezcla diclofenac –vitaminas de forma individual administrada por vía oral.

La mezcla diclofenac -complejo B se administró p.o. a cuatro grupos de ratas ($n = 6$) en dosis fijas de vitaminas (100 mg/kg.) a dosis fija de diclofenac (1.8 mg/kg.) dos h. posteriores a la administración de el ácido úrico. El grupo control empleado en la evaluación del efecto antinociceptivo de diclofenac fue empleado también como grupo control de este experimento.

F. Análisis estadístico

Los resultados se expresan como el promedio \pm error estándar (e.e.) de la media para cada grupo experimental ($n = 6$). Se construyeron curvas del promedio del índice de funcionalidad a partir de un punto de cohorte a las dos h. después de administrar el diclofenac, las vitaminas o la mezcla de ambos (mezcla de vitaminas y diclofenac). Las curvas dosis-respuesta se ajustaron por regresión lineal empleando el método de mínimos cuadrados. La dosis efectiva 30 (DE_{30}) y su error estándar (e.e.) de la media fueron calculados de acuerdo a lo descrito por Tallarida (Tallarida, 2000). Para evaluar la interacción de los con las vitaminas del complejo B

Los datos dosis-respuesta se analizaron mediante análisis de varianza de una cola (ANOVA) seguidos por la prueba de Tukey. La diferencia estadísticamente significativa entre el punto aditivo teórico y experimental (DE_{30}) se evaluó mediante una prueba de “t” de student. Un valor de DE_{30} experimental significativamente menor que el valor de la DE_{30} teórica ($p < 0.05$) se consideró como indicativo de una interacción sinérgica ente los analgésicos y las vitaminas del complejo B.

Original articles

Characterization of the potentiation of the antinociceptive effect of diclofenac by vitamin B complex in the rat

Gerardo Reyes-García^{a,*}, Roberto Medina-Santillán^a, Flavio Terán-Rosales^a,
Eduardo Mateos-García^b, Carlos Castillo-Henkel^a

^aSección de Estudios de Postgrado e Investigación, Escuela Superior de Medicina, Instituto Politécnico Nacional, Plan de San Luis y Díaz Mirón, Del. Azcapotzalco, 14000, Mexico D.F., Mexico;

^bCentro Médico Nacional "La Raza", Instituto Mexicano del Seguro Social, Mexico D.F., Mexico

Received 8 February 2000; accepted 8 February 2000

Abstract

The role of vitamin B complex preparations as an analgesic adjuvant is controversial. Therefore, the purpose of the present study was to characterize the potentiation of the antinociceptive effect of diclofenac by a vitamin B complex preparation and its individual components by using the pain-induced functional-impairment model in the rat (PIFIR). Pain was produced by the intraarticular injection of uric acid in the right hind limb. Oral administration of diclofenac resulted in a dose-dependent antinociceptive effect. Oral administration of a vitamin B complex preparation containing thiamine (vitamin B₁), pyridoxine (vitamin B₆), and cyanocobalamin (vitamin B₁₂) in a 1:1:0.01 proportion did not produce any antinociception by itself, but it significantly potentiated the effect of diclofenac. Coadministration of diclofenac with either thiamine or pyridoxine resulted in an antinociceptive effect similar to that of diclofenac alone. On the other hand, coadministration of cyanocobalamin significantly increased diclofenac-induced antinociception. It is concluded that the potentiation of diclofenac-induced antinociception in the PIFIR model is due to cyanocobalamin. © 2000 Elsevier Science Inc. All rights reserved.

Keywords: Diclofenac; Vitamin B; Thiamin; Pyridoxine; Cyanocobalamin; Analgesia

1. Introduction

Diclofenac is a nonsteroidal anti-inflammatory drug (NSAID) that has been shown to be effective for relieving pain in rheumatic and nonrheumatic diseases (Menassé et al., 1978). The analgesic and anti-inflammatory activities of diclofenac have been traditionally related to the inhibition of prostaglandin synthesis (Menassé et al., 1978). Notwithstanding, additional mechanisms have been suggested to take part in the antinociceptive effect of this drug, including central actions and nitric oxide release at the peripheral level (Björkman, 1995; López-Muñoz et al., 1996; Tonussi & Ferreira, 1994).

Vitamin B preparations have been reported to be able to potentiate the antinociceptive effect of diclofenac in animal models (Bartoszyk, 1990; Dimpfel et al., 1990). In humans, vitamin B preparations have been extensively used as an analgesic adjuvant combined with diclofenac for the treatment of acute lumbar vertebral pain (Bruggemann et al., 1990; Kuhlwein et al., 1990; Vetter et al., 1988). However, the

ability of vitamin B complex preparations to increase the analgesic effect of diclofenac has been questioned. Some authors have reported that vitamin B preparations do not result in any significant pain relief. Moreover, it has also been reported that such preparations fail to increase the analgesic effect of diclofenac (Bromm et al., 1995; Eschaliér et al., 1983; Misumi et al., 1985).

Despite the extensive use of vitamin B preparations as analgesic adjuvants, systematic studies on their ability to potentiate the effects of diclofenac or other NSAIDs are scarce. Furthermore, the information available on the analgesic properties of the individual components of such preparations is scarce. Therefore, we decided to evaluate the ability of a vitamin B complex preparation, as well as of its individual components, to produce antinociception and to potentiate the effect of diclofenac in an experimental model of pain in the rat.

2. Materials and methods

2.1. Animals

Male Wistar rats (weight range, 180–220 g) from our breeding facilities were used in this study. Twelve hours be-

* Corresponding author. Tel: (52) 5729-6000 ext. 46261; Fax: (52) 5358-3969

E-mail address: InfectMed_2000@yahoo.com

fore the initiation of experiments, food was withheld, but animals had free access to drinking water. All experiments followed the Guidelines on Ethical Standards for Investigation of Experimental Pain in Animals (IASP, 1983). Additionally, the study was approved by the local Animal Care Committee.

2.2. Drugs

Vitamins B₁ (thiamine), B₆ (pyridoxine), B₁₂ (cyanocobalamin), and diclofenac sodium were a gift from Laboratorios Merck (Mexico City). Uric acid was purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). All other reagents were of analytical grade. A vitamin B complex mixture, containing vitamins B₁:B₆:B₁₂ in a 1:1:0.01 proportion, was prepared.

2.3. Measurement of antinociceptive activity

Antinociception was assessed by using the pain-induced functional-impairment model in the rat (PIFIR), as described previously (Granados-Soto et al., 1992; López-Muñoz et al., 1993). Nociception was induced by the intraarticular injection of 50 μ l of a 30% uric acid suspension in mineral oil into the right hind knee, under light anesthesia with ether. Then, an electrode was attached to each hind limb behind the plantar pads. At selected times, rats were required to walk on a 30-cm-diameter stainless steel cylinder, rotating at 4 rpm for 2-min periods. The variable measured in this model was the time of contact of each electrode with the cylinder floor. When the electrode placed on the animal's paw made contact with the cylinder floor, a circuit was closed and the time that the circuit remained closed was recorded. Animals were allowed to rest between recording periods. During resting periods, the rats did not show any sign of discomfort, such as licking, biting, shaking, elevating, and vocalization.

As a result of uric acid injection, rats developed a progressive dysfunction of the injured limb. This dysfunction was recorded as a diminished time of contact between the right hind limb and the cylinder. Data are expressed as the functionality index (FI); that is, the time of contact of the injected limb divided by the time of contact of the control left limb multiplied by 100. After 2.5 h, the injected limb made no contact with the cylinder; that is, the functionality index was zero. This time was considered time zero, and analgesic agents were immediately administered. Recordings were carried out every hour in the next 4 h. A recovery of the functionality index was considered the expression of the antinociceptive effect. Animals not receiving any analgesic agent maintained a functionality index of zero for at least 4 h.

2.4. Study design

In the first experimental series, seven groups of eight rats each were studied. Animals in group 1 received vehicle (saline) and served as controls. Animals in groups 2 to 5 received oral diclofenac 0.31, 1, 3.1, and 5.7 mg/kg, respectively. Groups 6 and 7 received the vitamin B₁:B₆:B₁₂

complex *per os* 177:177:1.7 and 300:300:3.0 mg/kg, respectively. Functionality index was determined hourly for 4 h. The highest recovery in functionality index was observed 2 h after diclofenac administration. Therefore, functionality index values observed at 2 h (FI-2h) were chosen for further analysis. Diclofenac produced a dose-dependent recovery in FI-2h. Analysis of dose-response curves allowed an estimation of the ED₄₀; that is, the diclofenac dose producing a recovery of 40% in FI-2h, being 1.8 mg/kg. This dose was selected to study the potentiation of the antinociceptive effect by the vitamin B preparations.

In a second experimental series, five groups of eight rats were studied. One group received diclofenac (1.8 mg/kg) alone. The other four groups received diclofenac (1.8 mg/kg) in coadministration with the vitamin B₁:B₆:B₁₂ preparation in the following doses: 56:56:0.56, 87:87:0.87, 100:100:1, and 177:177:1.77 mg/kg, respectively.

In a third experimental series, we studied four groups of eight rats. One group received diclofenac (1.8 mg/kg) alone. The other three groups received diclofenac combined with the individual components of the vitamin B preparation; that is, diclofenac/thiamine (1.8/100 mg/kg), diclofenac/pyridoxine (1.8/100 mg/kg), and diclofenac/cyanocobalamin (1.8/1 mg/kg), respectively.

2.5. Statistical analysis

Comparisons between groups within each experimental series were performed by analysis of variance followed by the Dunnett's test. Differences were considered to reach statistical significance when $p < 0.05$.

3. Results

Oral administration of diclofenac produced a dose-dependent recovery of FI-2h (Fig. 1). The calculated ED₄₀ for sodium diclofenac was 1.8 mg/kg. Conversely, oral administration of the vitamin B₁:B₆:B₁₂ mixture did not result in any significant antinociceptive effect compared with saline (Fig. 2). Notwithstanding that the vitamin B₁:B₆:B₁₂ preparation, by itself, failed to produce antinociception, it was able to increase the effect of diclofenac (1.8 mg/kg). This potentiation appeared to be dose dependent, because coadministration of increasing doses of the vitamin B preparation resulted in higher FI-2h values (Fig. 3). The adjuvant effect of the vitamin B₁:B₆:B₁₂ mixture appeared to reach a maximum, because no further increase in FI-2h was observed with doses higher than 100:100:1 mg/kg.

Because the 100:100:1 mg/kg dose of the vitamin B₁:B₆:B₁₂ mixture yielded the greatest potentiation of the antinociceptive effect of diclofenac, the effects of the individual components of the preparation at this dose level were tested. Coadministration of diclofenac and either 100 mg of vitamin B₁ or vitamin B₆ did not result in a significantly greater antinociceptive effect compared with diclofenac alone. On the other hand, the coadministration of vitamin

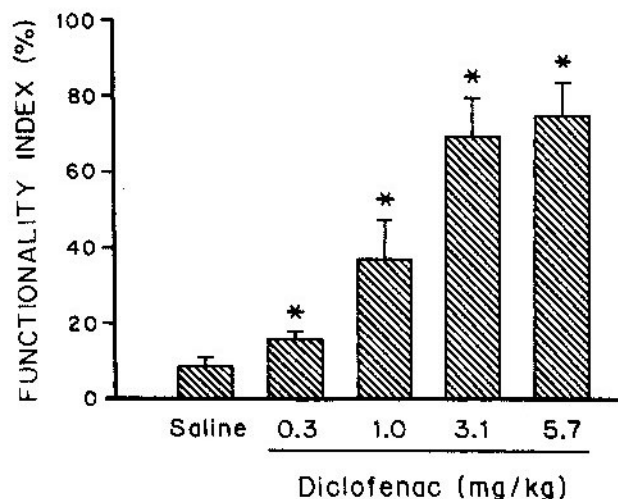


Fig. 1. Antinociceptive effect observed after oral administration of saline and of increasing doses of diclofenac in rats that were injected with uric acid in the right hind knee. Antinociception is expressed as functionality index observed 2 h after diclofenac administration. Bars indicate the mean of eight animals \pm SEM. *Indicates significant difference from the saline group ($p < 0.05$).

B₁₂ (1 mg/kg) was able to significantly increase the antinociceptive effect of diclofenac (Fig. 4).

4. Discussion

Diclofenac produced a dose-related antinociception in the PIFIR model, with an ED₄₀ of 1.8 mg/kg. These results are consistent with those reported previously with the use of this experimental procedure (Torres-López et al., 1994, 1997) as well as other models of pain (Attal et al., 1988;

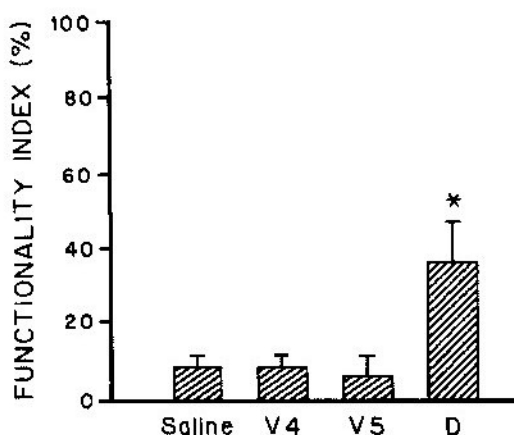


Fig. 2. Antinociceptive effect observed after oral administration of saline, of a vitamin B₁:B₆:B₁₂ mixture, 177:177:1.7 (V4) and 300:300:3.0 (V5) mg/kg, and of diclofenac, 1.8 mg/kg (D), in rats that were injected with uric acid in the right hind knee. Antinociception is expressed as functionality index observed 2 h after diclofenac administration. Bars indicate the mean of eight animals \pm SEM. *Indicates significant difference from the saline group ($p < 0.05$).

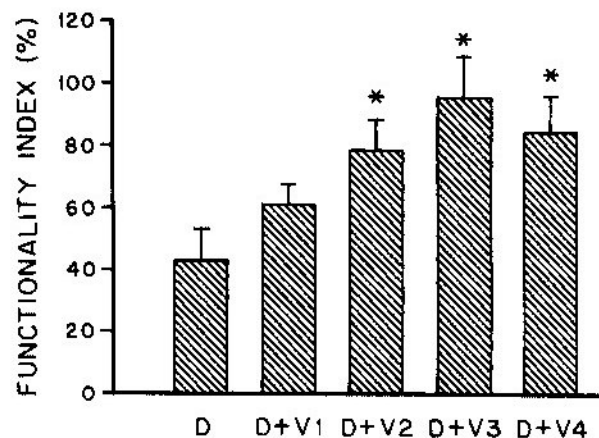


Fig. 3. Antinociceptive effect observed after oral administration of diclofenac (1.8 mg/kg) alone (D) and combined with increasing doses of a vitamin B₁:B₆:B₁₂ mixture (V1: 56:56:0.56; V2: 87:87:0.87; V3: 100:100:1; V4: 177:177:1.77 mg/kg) in rats that were injected with uric acid in the right hind knee. Antinociception is expressed as functionality index observed 2 h after drug administration. Bars indicate the mean of eight animals \pm SEM. *Indicates significant difference from diclofenac alone.

Krupp et al., 1973; Menassé et al., 1978; Tonussi & Ferreira, 1994). On the other hand, the vitamin B₁:B₆:B₁₂ mixture, by itself, failed to produce any significant antinociception in the PIFIR model, despite the fact that high doses (i.e., 300:300:3 mg/kg) were tested. These results are in agreement with those reported by Eschaliér et al. (1983) and Misumi et al. (1985), who observed that vitamin B preparations were not able to produce antinociception in several models of pain in rats and mice. Notwithstanding, other investigators have reported that vitamin B complex preparations are effective in a variety of experimental pain models

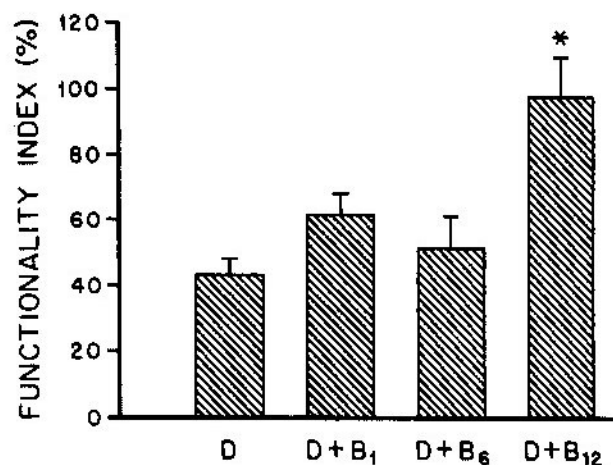


Fig. 4. Antinociceptive effect of diclofenac (1.8 mg/kg) alone (D) and combined with vitamin B₁ (100 mg/kg), vitamin B₆ (100 mg/kg), or vitamin B₁₂ (1 mg/kg) in rats that were injected with uric acid in the right hind knee. Antinociception is expressed as the functionality index observed 2 h after drug administration. Bars indicate the mean of eight animals \pm SEM. *Indicates significant difference from diclofenac alone.

(Dimpfel et al., 1990; Fu et al., 1988; Jurna et al., 1990; Wild & Bartoszyk, 1988). Jurna et al. (1990) proposed that this controversy about the analgesic effectiveness of vitamin B complex preparations is due to the use of different pain stimuli. It should be noted that the intraarticular injection of 30% uric acid results in a moderate to severe pain intensity (López-Muñoz et al., 1993).

Although the synergistic effect of the combination of NSAIDs and vitamin B preparations has long been controversial (Bartoszyk, 1990), our data show that a mixture of vitamins B₁, B₆, and B₁₂ was able to significantly increase the antinociceptive effect of diclofenac in a dose-dependent manner. These results confirm previous observations on the ability of vitamin B preparations to potentiate diclofenac-induced antinociception in animals (Bartoszyk & Wild, 1989) and humans (Bruggemann et al., 1990; Kuhlwein et al., 1990; Vetter et al., 1988). Notwithstanding, others have observed that vitamin B preparations do not significantly increase the analgesic effect of diclofenac (Bromm et al., 1995). It should be mentioned that there is no standardization on the composition of the vitamin B preparations used as analgesic adjuvants. Hence, the composition, as well as the doses and proportions of the different components of the complex, vary among the different published studies. Therefore, we decided to study the potentiation of the antinociceptive effect of diclofenac by the individual components of the vitamin B complex preparation used in this study. Our results showed that the coadministration of either vitamin B₁ or vitamin B₆ failed to significantly increase the antinociceptive effect of diclofenac at doses that were effective when administered as the vitamin B₁:B₆:B₁₂ mixture. Conversely, coadministration of vitamin B₁₂ with diclofenac resulted in a significantly higher antinociceptive effect compared with that of diclofenac alone. These results strongly suggest that vitamin B₁₂ (cyanocobalamin) is the active ingredient in the vitamin B complex preparation. It is therefore highly probable that discrepancies in the results reported for the role of vitamin B preparations as analgesic adjuvants of diclofenac are due to the use of different doses and proportions of the individual ingredients in the mixtures employed.

The mechanism of action by which vitamin B preparations or, particularly, vitamin B₁₂ produce a potentiation of the analgesic effect of NSAIDs is not yet clear. It has been suggested that the inhibition of spinal dorsal horn nociceptive activity (Fu et al., 1988), as well as the participation of a central serotonergic inhibitory activity (Dimpfel et al., 1990) may be implicated in such effect. Notwithstanding, the information available at present is not conclusive. Further studies that specifically address the question of the mechanism of action of NSAID-induced analgesia by vitamin B preparations are still required.

References

Attal, N., Kayser, V., Eschelier, A., Benoist, J. M., & Guilbaud, G. (1988). Behavioral and electrophysiological evidence for an analgesic effect of

- a non-steroidal anti-inflammatory agent, sodium diclofenac. *Pain* 45, 341–348.
- Bartoszyk, G. D. (1990). The interactions of vitamins B₁, B₆ and B₁₂ with non-steroidal antirheumatic and analgesic drugs: animal experimental results. *Klin Wochenschr* 68, 121–124.
- Bartoszyk, G. D., & Wild, A. (1989). B-vitamins potentiate the antinociceptive effect of diclofenac in carrageenin-induced hyperalgesia in the rat-tail pressure test. *Neurosci Lett* 101, 95–100.
- Björkman, R. (1995). Central antinociceptive effect of non-steroidal anti-inflammatory drugs and paracetamol: experimental studies in the rat. *Acta Anaesthesiol Scand* 39(suppl. 103), 1–44.
- Bromm, K., Herrmann, W. M., & Schulz, H. (1995). Do the B-vitamins exhibit antinociceptive efficacy in men? Results of a placebo-controlled repeated-measures double-blind study. *Neuropsychobiology* 31, 156–165.
- Bruggemann, G., Koehler, C. O., & Koch, E. M. (1990). Results of a double-blind study of diclofenac + vitamin B₁, B₆, B₁₂ versus diclofenac in patients with acute pain of the lumbar vertebrae: a multicenter study. *Klin Wochenschr* 68, 116–120.
- Dimpfel, W., Spuler, M., & Bonke, D. (1990). Influence of repeated vitamin B administration on the frequency pattern analyzed from rat brain electrical activity (Tele-Stereo-EEG). *Klin Wochenschr* 68, 136–141.
- Eschelier, A., Aumaitre, O., Decamps, A., & Dordain, G. (1983). A comparison of the effects of vitamin B₁₂ and aspirin in three experimental pain models in rats and mice. *Psychopharmacology* 81, 228–231.
- Fu, Q. G., Carstens, E., Stelzer, B., & Zimmermann, M. (1988). B vitamins suppress spinal dorsal horn nociceptive neurons in the cat. *Neurosci Lett* 95, 192–197.
- Granados-Soto, V., Flores-Murrieta, F. J., López-Muñoz, F. J., Salazar, L. A., Villarreal, J. E., & Castañeda-Hernández, G. (1992). Relationship between the paracetamol plasma levels and its analgesic effect in the rat. *J Pharm Pharmacol* 44, 741–744.
- IASP (1983). Ethical guidelines for investigations on experimental pain in conscious animals. *Pain* 16, 109–110.
- Jurna, I., Carlsson, K. H., Komen, W., & Bonke, D. (1990). Acute effects of vitamin B₆ and fixed combinations of vitamins B₁, B₆ and B₁₂ on nociceptive activity evoked in the rat thalamus: dose-response relationships and combinations with morphine and paracetamol. *Klin Wochenschr* 68, 129–135.
- Krupp, P. J., Menassé, R., Sallman, A., Wilhelm, G., Ziel, R., & Jaques, R. (1973). Sodium [o[(2,6-dichlorophenyl)amino]-phenyl]-acetate (GP 45840), a new non-steroidal anti-inflammatory agent. *Experientia* 29, 450–452.
- Kuhlwein, A., Meyer, H. J., & Koehler, C. O. (1990). Reduced diclofenac administration by B vitamins: result of a randomized double-blind study with reduced daily doses of diclofenac (75 mg diclofenac versus 75 mg diclofenac plus B vitamins) in acute lumbar vertebral syndromes. *Klin Wochenschr* 68, 107–115.
- López-Muñoz, F. J., Salazar, L. A., Castañeda-Hernández, G., & Villarreal, J. E. (1993). A new model to assess analgesic activity: pain-induced functional impairment in the rat (PIFIR). *Drug Dev Res* 28, 169–175.
- López-Muñoz, F. J., Castañeda-Hernández, G., Torres-López, J. E., Pícazo, Y. F., Flores-Murrieta, F. J., & Granados-Soto, V. (1996). Differences in the mechanism of antinociceptive action of non-steroidal anti-inflammatory drugs in the rat. *Pharm Sci* 2, 189–190.
- Menassé, R., Hedwell, P., Kraetz, J., Pericin, C., Riesterer, L., Sallman, A., Ziel, R., & Jaques, R. (1978). Pharmacological properties of diclofenac sodium and its metabolites. *Scand J Rheumatol* 22(Suppl.), 5–16.
- Misumi, J., Nagano, M., Kaisaku, J., & Hitoshi, T. (1985). Effects of vitamin B₁₂ and B₆ on 2,5-hexanedione-induced neuropathy. *Arch Toxicol* 56, 204–206.
- Tonussi, C. R., & Ferreira, S. H. (1994). Mechanism of diclofenac analgesia: direct blockade of inflammatory sensitization. *Eur J Pharmacol* 251, 173–179.
- Torres-López, J. E., Granados-Soto, V., & López-Muñoz, F. J. (1994). Evaluación del curso temporal del efecto antinociceptivo del diclofenac

- con el modelo de disfunción inducida por dolor en la rata. *Univ. Cienc. 11*, 125–131.
- Torres-López, J. E., López-Muñoz, F. J., Castañeda-Hernández, G., Flores-Murrieta, F. J., & Granados-Soto, V. (1997). Pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling of the antinociceptive effect of diclofenac in the rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 282, 685–690.
- Vetter, G., Bruggemann, G., Lettko, M., Schwieger, G., Asbach, H., Biermann, W., Blasius, K., Brinkmann, R., Bruns, H., & Dorn, E. (1988). Shortening diclofenac therapy by B vitamins: results of a randomized double-blind study, diclofenac 50 mg versus diclofenac 50 mg plus B vitamins, in painful spinal diseases with degenerative changes. *Z. Rheumatol.* 47, 351–362.
- Wild, A., & Bartoszyk, G. D. (1988). Additive antinociceptive effects of vitamins B1, B6 and B12 in the writhing test and antinociception in the heat coil test. In G. Zimmermann (Ed.), *B-Vitamins in Pain* (pp. 9–17). Frankfurt: Pfl.-Verlag.



VI. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

1. EFECTO ANTINOCICEPTIVO DE LA ADMINISTRACIÓN ORAL DE COMPLEJO B

La administración oral de complejo B (mezcla de vitaminas B₁, B₆ y B₁₂, en proporción 100:100:1.0) y con dosis de (300:300:3.0) por vía oral no redujo el efecto nociceptivo provocado por la administración del ácido úrico. En un modelo basado en estimulación térmica en ratón, la administración aguda o crónica del complejo B no tuvo ningún efecto (Franca et al., 2001). Y en uno de hiperalgnesia térmica inducida por carragenina en rata (Reyes-García et al., 2002), la administración oral del complejo B no tuvo ningún efecto, pero tiene la habilidad de potenciar el efecto antinociceptivo del diclofenaco, respectivamente. Las discrepancias entre los resultados obtenidos en los diferentes estudios posiblemente se deben a que el efecto de la administración del complejo B se ha evaluado en diferentes especies, modelos de dolor, vías de administración y concentraciones. Sin embargo, la mayoría de los reportes sugieren que su administración oral produce antinocicepción.

Estos resultados se contraponen con los resultados obtenidos por Reyes-García et al. (2001) quienes reportan que la administración oral del complejo B reduce de manera dependiente de la dosis el número de sacudidas en la segunda fase de la prueba de formalina en rata. En el modelo de hiperalgnesia inducida por carragenina en rata, la administración de una dosis alta del complejo B (B₁ y B₆, 667 mg/kg y B₁₂, 6.7 mg/kg, p.o.) tiene un efecto antinociceptivo (Bartoszyk y Wild, 1989). En un modelo de estimulación térmica en gato, la administración intratecal del complejo B redujo de manera dependiente de la dosis la respuesta inducida



por el calentamiento de la piel de la pata trasera (Fu et al., 1988) e incrementó el efecto inhibitorio de la estimulación eléctrica transcutánea de fibras aferentes en ratas anestesiadas con pentobarbital (Fu et al., 1990). En un modelo de estimulación eléctrica en rata, la administración i.p. del complejo B redujo de manera dependiente de la dosis la actividad nociceptiva provocada en el tálamo (Jurna et al., 1990). En la prueba de la formalina en ratón la administración i.p. crónica del complejo B (50 o 100 mg/Kg/día) redujo el número de lamidas de la pata cuando se administró una hora antes (Franca et al., 2001). En el modelo de contorsión abdominal en ratón, la administración oral crónica (Leuschner, 1992) e i.p. aguda (Franca et al., 2001) del complejo B redujo de manera dependiente de la dosis el número de contorsiones inducidas por ácido acético. Sin embargo, estos resultados contrastan con los resultados obtenidos en otros modelos de nocicepción.

El efecto antinociceptivo de las vitaminas del complejo B se puede explicar por la activación de diferentes mecanismos. Algunos estudios indican que la administración de piridoxina (Dakshinamurti et al., 1990; Hartvig et al., 1995) y la del complejo B (Dakshinamurti et al., 1990) producen la activación de la transmisión serotoninérgica del sistema inhibitorio descendente endógeno. También se ha sugerido que el efecto antinociceptivo del complejo B está asociado a un incremento del control inhibitorio aferente a nivel espinal (Fu et al., 1988; 1990) y que esta inhibición es provocada posiblemente por un incremento en la síntesis de neurotransmisores inhibitorios a nivel central (Fu et al., 1990). Otros reportes sugieren que la administración de piridoxina (Sharma et al., 1990) y la del complejo B (Jurna y Bonke, 1988; Jurna et al., 1990) produce supresión de la respuesta neuronal a nivel talámico y espino-talámico, respectivamente. Evidencia muy reciente sugiere que las vitaminas del complejo B producen antinocicepción posiblemente a través de la liberación de opioides endógenos o la activación



directa de receptores opioides, ya que su efecto antinociceptivo en la prueba de formalina fue parcialmente bloqueado por el pretratamiento de ratas con naloxona (Reyes-García et al., 2002). Más aún, se ha sugerido que la activación del sistema L-arginina-ON-GMPc también participa en el efecto antinociceptivo del complejo B, ya que su administración produce un incremento de los niveles de GMPc a través de la activación de la guanilato ciclasa (Vesely, 1985) ya que su actividad antinociceptiva fue revertida por la administración de un inhibidor de la síntesis de óxido nítrico (L-NAME), pero no por su enantiómero inactivo (D-NAME). Por otra parte, se ha sugerido la inhibición de la síntesis de prostaglandinas es otro mecanismo que está involucrado en el efecto antinociceptivo de las vitaminas del complejo B, ya que la administración de piridoxina en humanos inhibe la síntesis de la prostaglandina E₂ (Saareks et al., 1998).

2. EFECTO ANTINOCICEPTIVO DE LA ADMINISTRACIÓN ORAL DE DICLOFENACO

La administración oral de diclofenaco produjo un efecto antinociceptivo de manera dependiente de la dosis en la prueba del modelo P.F.I.R. Estos resultados son congruentes con los resultados obtenidos por Torres-Lopez et al. (1994, 1997), También son consistentes con los resultados obtenidos en otros modelos de dolor y nocicepción. El pretratamiento de ratones con diclofenaco redujo de manera dependiente de la dosis las conductas de nocicepción inducidas por la administración. Además de su efecto inhibitorio en la síntesis de protanoides, el diclofenaco aparentemente tiene otros mecanismos que participan en su efecto analgésico (Attal et al., 1988). Se ha sugerido que uno de los mecanismos que participan en el efecto analgésico del diclofenaco es la estimulación de la síntesis opioides endógenos (β -endorfinas) en el hipotálamo y la liberación de los mismos de la glándula pituitaria (Sacerdote et al., 1985; Vescovi et al., 1986; Björkman,



1995). En contraposición, existe evidencia de que la naloxona (un antagonista de receptores opiodes) y la N-metil-nalorfina (un antagonista de receptores opiodes periféricos) tienen la capacidad de bloquear el efecto antinociceptivo que se produce por la administración de morfina, pero no el efecto que se produce por la administración de diclofenaco (Tonussi y Ferreira, 1994).

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

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

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



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

3. EFECTO ANTINOCICEPTIVO DE LA ADMINISTRACIÓN ORAL DE LA MEZCLA, DICLOFENACO-COMPLEJO B.

La administración de diclofenac a dosis fija de 1.8 mg./kg. P.o., con dosis crecientes de las vitaminas del complejo B, y produjo potenciación de su efecto antinociceptivo. Estos resultados son congruentes con otros resultados que sugieren que la administración de las vitaminas del complejo B tienen la habilidad de potenciar el efecto antinociceptivo de otro AINE. En 1988 Stanislavchuk et al. Reportan que la administración de tiamina tiene la capacidad de potenciar el efecto antinociceptivo de diclofenaco en un modelo de artritis crónica en rata. En 1989 Bartoszyk y Wild reportan que las vitaminas del complejo B potencian el efecto antinociceptivo del diclofenaco en el modelo de hiperalgesia inducida por carragenina en rata. En 1999 y 2002 Reyes-García et al. Reportan que la administración oral de las vitaminas del complejo B tienen la habilidad de potenciar el efecto antinociceptivo y anti-hiperalgésico del diclofenaco en un modelo de



nocicepción crónico-inflamatorio (disfunción articular en rata) y en uno de hiperalgesia térmica inducida por carragenina en rata, respectivamente. La administración de vitaminas del complejo B reduce significativamente la cantidad de acetaminofén necesaria para aliviar el dolor de lumbalgia mecánica e irritante (Mauro et al., 2000).

Los mecanismos que están involucrados en la potenciación del efecto antinociceptivo de los AINEs por las vitaminas del complejo B aún no se han aclarado, pero pueden estar asociados a interacciones farmacocinéticas o a la interacción de los diferentes mecanismos involucrados en el efecto antinociceptivo de cada uno de los fármacos. Una posible explicación pudiera ser la siguiente. Si se hace una analogía de los mecanismos moleculares propuestos por Ingram (2000) para explicar los efectos de potenciación obtenidos cuando se administran las combinaciones AINEs-opioides en los efectos de potenciación obtenidos cuando se administran las combinaciones AINEs-vitaminas se pueden sugerir cuales son los mecanismos moleculares involucrados en el efecto de potenciación de las combinaciones AINEs-vitaminas a nivel periférico y central. Ingram sugiere que a nivel periférico el efecto de potenciación entre AINEs-opioides se debe a que existe convergencia en los sistemas de transducción de receptores a prostanoïdes y receptores opioides y que a nivel central su efecto de potenciación se debe a que los AINEs facilitan la vía de transducción de los receptores opioides, a través de la inhibición de la síntesis de prostanoïdes que favorecen la formación de productos de la 12-lipoxigenasa, provocando la apertura de canales de potasio sensibles a voltaje. Estos mecanismos pudieran ser los mismos que se presentan cuando se administran las vitaminas del complejo B y los AINEs, considerando que existe evidencia que sugiere que las vitaminas del complejo B producen antinocicepción posiblemente a través de la liberación de opioides endógenos o la activación directa de receptores opioides (Reyes-García et al., 2001).



En resumen, la administración oral de las vitaminas del complejo B y diclofenaco producen un efecto antinociceptivo de manera dependiente de la dosis en el modelo de P.I.F.I.R. los resultados sugieren que las vitaminas del complejo B producen potenciación del efecto antinociceptivo de diclofenaco.



ABREVIATURAS

5-HT	5- Hidroxitriptamina
AA	4-aminoantipirina
AAA	4-acetilaminoantipirina
AAE	Aminoácidos excitatorios
AINE	Analgésico antiinflamatorio no esteroidal
AMPA	Ácido α -amino-metil-isoxazolpropiónico
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
ANOVA	Análisis de varianza
CGRP	Péptido relacionado al gen de la calcitonina
CoA	Coenzima A
COX	Ciclooxigenasa
COX-1	Ciclooxigenasa 1
COX-2	Ciclooxigenasa 2
CYP	Citocromo P450
D-NAME	Ester metílico de la N(G)-nitro-D-arginina
DAG	Diacilglicerol
DE ₄₀	Dosis efectiva 40
e.e.	Error estándar de la media
FAA	4-formilaminoantipirina



GABA	Ácido γ -aminobutírico
GAD	Glutamato descaboxilasa
GC	Guanilato ciclasa
GMPc	Guanosín monofosfato cíclico
GTP	Guanosín trifosfato
IASP	Asociación Internacional para el Estudio del Dolor
iSON	Sintasa inducible de óxido nítrico
i.p.	Intraperitoneal
i.pl.	Intraplantar
IP ₃	Inositol trifosfato
i.t.	Intratecal
L-NAME	Éster metílico de la N(G)-nitro-L-arginina
MAA	4-metilaminoantipirina
NGF	Factor de crecimiento neural
NMDA	N-metil-D-aspartato
nSON	Sintasa neuronal del óxido nítrico
NRM	Núcleo magno del rafé
ON	Óxido nítrico
PGD ₂	Prostaglandina D ₂
PGE ₂	Prostaglandina E ₂
PGF _{2α}	Prostaglandina F _{2α}



PGG ₂	Prostaglandina G ₂
PGH ₂	Prostaglandina H ₂
PGI ₂	Prostaglandina I ₂
PGs	Prostaglandinas
P.I.F.R.	Pain-induced functional-impairment model in the rat
PKA	Proteíncinasa A
PLA ₂	Fosfolipasa A ₂
PLC	Fosfolipasa C
p.o.	Vía oral
SNC	Sistema nervioso central
SGPA	Sustancia gris pericueductal
TXA ₂	Tromboxano A ₂



VII. REFERENCIAS

Aanonsen LM, Wilcox GL. 1987. Nociceptive action of excitatory amino acids in the mouse: effects of spinally administered opioids, phencyclidine and agonists. ***J Pharmacol Exp Ther.* 243:9-19.**

Abbadie C, Besson JM. 1993. C-fos expression in rat lumbar spinal cord following peripheral stimulation in adjuvant induced arthritic and normal rats. ***Brain Res.* 607:195-204.**

Abbate R, Gori AM, Pinto S, Attanasio M, Paniccia R, Coppo M, Castellani S, Giusti B, Boddi M, Neri SGG. 1990. Cyclooxygenase and lipoxygenase metabolite synthesis by polymorphonuclear neutrophils: in vitro effect of dipyrrone. ***Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 41:89-93.**

Aguirre-Bañuelos P, Granados-Soto V. 1999. Evidence for a peripheral mechanism of action for the potentiation of the antinociceptive affect of morphine by dipyrrone. ***J Pharmacol Toxicol.* 42:79-85.**

Aguirre-Bañuelos P, Granados-Soto V. 2000. Peripheral antinociceptive interaction of dipyrrone and morphine in the formalin test. ***Proc West Pharmacol Soc.* 43:11-14.**

Alhaider AA, Wilcox GL. 1993. Differential roles of 5-HT_{1A} and 5-HT_{1B} receptor subtypes in modulating spinal nociceptive transmission in mice. ***J Pharmacol Exp Ther.* 265(1):378-385.**

Anand P. 1995. Nerve growth factor regulates nociceptors in human health and disease. ***BJA.* 75:201-208.**

Andrade R, Aghajanian GK. 1985. Opiate and alpha 2 adrenoceptor induced hyperpolarizations of locus ceruleus neurons in brain slices: reversal by cyclic adenosine 3',5' monophosphate analogues. ***J Neurosci.* 5:2359-2364.**

Arbex ST, Wassal T, Nunes EL. 1992. An assessment of nimesulide by comparison with naproxen in the treatment of pain following oral surgery. ***Rev Bras Odontol.* 1:15-18.**



Ashburn MA, Staats PS. 1999. Management of chronic pain. **Lancet. 353:1865-1869.**

Attal N, Kayser V, Eschalier A, Benoist JM, Guilbaud G. 1988. Behavioural and electrophysiological evidence for an analgesic effect of a non-steroidal anti-inflammatory agent, sodium diclofenac. *Pain.* 35:341-348.

Barchas JD, Akil H, Elliott GR, Holman RB, Watson SJ. 1978. Behavioral neurochemistry: neuroregulators and behavioral states. **Science. 200:964-973.**

Bartoszyk GD, Wild A. 1989. 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.**

Bartoszyk GD, Wild A. 1989. B-vitamins potentiate the antinociceptive effect of diclofenac in carrageenin-induced hyperalgesia in the rat tail pressure test. **Neurosci Lett. 101:95-100.**

Basbaum AI. 1999. Spinal mechanisms of acute and persistent pain. **Reg Anesth Pain Med. 24:59-67.**

Basbaum AI, Fields HL. 1984. Endogenous pain control systems: brain stem spinal pathways and endorphin circuitry. **Ann Rev Neurosci. 7:309-338.**

Behbehani MM. 1995. Functional characteristics of the midbrain periaqueductal gray. **Prog Neurobiol. 46:575-605.**

Ben-Bassat J, Peretz E, Sulman FG. 1959. Analgesimetry and ranking of analgesic drugs by the receptacle method. **Arch Int Pharmacodyn Ther. 122:434-447.**

Beric´ Aleksander.1997. Estados dolorosos después de una lesión de la médula espinal. En: clínicas de anestesiología de Norteamérica. Wallace MS, Dunn JS, Yaksh TL. Ed.Mc Graw Hill. 2:295-314.



- Bermond P. 1989. Analgesic and anti-inflammatory properties of vitamins. *Int J Vitam Nutr Res Suppl.* **30:153-160.**
- Berridge MJ. 1987. Inositol triphosphate and diacylglycerol: two interacting second messengers. *Ann Rev Biochem.* **56:159-193.**
- Besson JM. 1997. La complexité des aspects physiopharmacologiques de la douleur. *Drugs.* **53 :1-9.**
- Besson JM. 1999. The neurobiology of pain. *The Lancet.* **353:1610-1615.**
- Besson JM, Chaouch A. 1987. Descending serotonergic systems; neurotransmitters and pain control. In: pain headache. Ed. H. Akil, Lewis JW. 9:64-100.
- Besson JM, Chaouch A. 1987. Peripheral and spinal mechanisms of nociception. *Physiol Rev.* **67:67-186.**
- Bessou P, Perl ER. 1969. Responses of cutaneous sensory units with unmyelinated fibers to noxious stimuli. *J Neurophysiol.* **32:1025-1043.**
- Bianchi C, Francheschini J. 1954. Experimental observations on Haffner's method for testing analgesic drugs. *Br J Pharmacol.* **9:280-284.**
- Björkman R. 1995. Central antinociceptive effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs and paracetamol. *Acta Anaesthesiol Scand.* **103(39):9-44.**
- Björkman R, Hallman KM, Hedner J, Hedner T, Henning M. 1994. Acetaminophen blocks spinal hyperalgesia induced by NMDA and substance P. *Pain.* **57:259-264.**
- Boissier JR, Tillement JP, Merlin L. 1966. Fluorimetric titration of large quantities of free and bound thiamine in tissues. *Ann Pharm Fr.* **24:633-638.**
- Bonica JJ. 1990. Evolution and current status of pain programs. *J Pain Symptom Manag.* **5:347-368.**
- Bonica JJ. 1987. Importance of effective pain control. *Acta Anaesthesiol Scand (Suppl 85):1-16.*



Brunetti L. 1994. Nitric oxide: a gas as a modulator of neuroendocrine secretions. ***Clin Ter.* 144(2):147-153.**

Butler MJ, FRCP, FRACP. 1997. Artritis y dolor musculoesquelético. En: ***Clínicas de anestesiología de Norteamérica. Wallace MS, Dunn JS, Yaksh TL. Ed. Mc Graw Hill. 2:459-477.***

Calixto JB, Cabrini DA, Ferreira J, Campos MM. 2000. Kinins in pain and inflammation. ***Pain.* 87:1-5.**

Campbell WB, Halushka PV. 1996. Lipid-derived autacoids. In: Goodman and Gilman's, The pharmacological basis of therapeutics. Hardman JG, Limbird LE, Molinoff PB, Ruddon RW, Gilman AG. 9th ed. Mc Graw Hill. Cap. 26:601-616.

Cashman JN. 1996. The mechanisms of action of NSAIDs in analgesia. ***Drugs.* 52 (Suppl 5):13-23.**

Cassell EJ. 1982. The nature of suffering and the goals of medicine. ***N Engl J Med.* 306:639-645.**

Castro G. 1965. 15e Congrès français d'anesthésie et de réanimation, Toulouse 4-7.6.1965 neuroleptanalgesie à base de thiamine. Compte rendu du 9^e congrès mondial d'anesthésiologie, Sao Paulo, 20-26.9.1964.

Cerveró F, Laird JM. 1995. Fisiología del dolor. En: tratamiento del dolor: teoría y práctica. MCR. Barcelona. 9-25.

Charpentier J. 1961. Sur une nouvelle méthode psychophysiologique de mesure quantitative des réactions douloureuses chez le rat. ***C R Soc Biol.* 155:727-731.**

Chen GG, Chalazonitis A, Shen KF, Crain SM. 1988. Inhibitor of cyclic AMP-dependent protein kinase blocks opioid induced prolongation of the action



potential of mouse sensory ganglion neurons in dissociated cell cultures. **Brain Res. 462(2):372-377.**

Chen SR, Pan HL. 2001. Spinal endogenous acetylcholine contributes to the analgesic effect of systemic morphine in rats. **Anesthesiol. 95:525-530.**

D' Amour FE, Smith DL. 1941. A method for determining loss of pain sensation. **J Pharmacol Exp Ther. 72:74-79.**

Dakshinamurti K, Sharma SK, Bonke D. 1990. Influence of B vitamins on binding properties of serotonin receptors in the CNS of rats. **Klin Wochenschr. 68:142-145.**

Davies NM, Anderson KE. 1997. Clinical pharmacokinetics of diclofenac. Therapeutic insights and pitfalls. **Clin Pharmacokinet. 33 (3):184-213.**

Díaz-González F, González-Alvaro I, Campanero MR, Mollinedo F, del Pozo MA, Muñoz C, Pivel JP, Sánchez-Madrid F. 1995. Prevention of in vitro neutrophil-endothelial attachment through shedding of L-selestin by nonsteroidal antiinflammatory drugs. **J Clin Invest. 95(4):1756-1765.**

Dickenson AH. 1990. A cure for wind-up: NMDA receptor antagonists as potential analgesics. **TIPS. 11:307-309.**

Dougherty PM, Willis WD. 1991. Enhancement of spinothalamic neuron responses to chemical and mechanical stimuli following combined micro-iontophoretic application of N-methyl-D-aspartic acid and substance P. **Pain. 47:85-93.**

Dray A. 1995. Inflammatory mediators of pain. **Br J Anaesth. 75(2):125-131.**

Duarte ID, Ferreira SH. 1992a. The molecular mechanism of central analgesia induced by morphine or carbachol and the L-arginine-nitric oxide-cGMP pathway. **Eur J Pharmacol. 22:171-174.**

Duarte ID, Lorenzetti BB, Ferreira SH. 1990. Peripheral, analgesia and activation of the nitric oxide-cyclic GMP pathway. **Eur J pharmacol. 221(1):171-174.**



Duarte ID, Santos IR, Lorenzetti BB, Ferreira SH. 1992. Analgesia by direct antagonismo of nociceptor sensitization involves the arginine-nitric oxide-cGMP pathway. *Eur J Pharmacol.* **217:225-227.**

Dubuisson D, Dennis SG. 1977. The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine and brain stem stimulation in rats and cats. *Pain.* **4:161-174.**

Duggan AW, North RA. 1983. Electrophysiology of opioids. *Pharmacol Rev.* **35(4):219-281.**

Dykes RW. 1975. Nociception. *Brain Res.* **99:229-245.**

Edwards JE, Meseguer F, Faura CC, Moore RA, McQuay HJ. 2001. Single-dose dipyron for acute postoperative pain. *Cochrane Database Syst Rev.* **3:CD003227.**

[Erickson HH, Kitchell RL. 1984. Pain perception and alleviation in animals. *Fed Proc.* **43\(5\):1307-1312.**](#)

Evans WO. 1961. A new technique for the investigation of some drugs on a reflexive behavior in the rat. *Psychopharmacol.* **2:318-325.**

Ferreira SH. 1972. Prostaglandins, aspirin-like drugs and analgesia. *Nat New Biol.* **240:200-203.**

Ferreira SH, Duarte ID, Lorenzetti BB. 1991. The molecular mechanism of activation of peripheral morphine analgesia: stimulation of the cGMP system via nitric oxide release. *Eur J Pharmacol.* **201(1):121-122.**

Ferreira SH, Lorenzetti BB, Faccioli LH. 1992. Blockade of hyperalgesia and neurogenic oedema by topical application of nitroglycerin. *Eur J Pharmacol.* **217:207-209.**

Fields HL, Heinricher MM, Mason P. 1991. Neurotransmitters in nociceptive modulatory circuits. *Annu Rev Neurosci.* **14:219-245.**

Forth W, Martin E, Peter K. 1995. Dolor. En: El alivio del dolor. Ed. Hoechst SA. México. 1-20.



Galeotti N, Ghelardini C, Vinci MC, Bartolini A. 1999. Role of potassium channels in the antinociception induced by agonists of alpha 2 adrenoceptors. **Br J Pharmacol.** **126(5):1214-1220.**

Gamse VR. 1984. Physiologie und pathophysiologie der substanz P. **Drug Res.** **34(II):1074-1079.**

García JA, Herrero JF. 1998. Somestesia: mecanorrecepción, termorrecepción y nocicepción. En: manual de neurociencia. Ed. Síntesis. España. 18:457-481.

Garthwaite J. 1991. Glutamate, nitric oxide and cell-cell signaling in the nervous system. **Trends Neurosci.** **14:60-67.**

Glazer EJ, Steinbush H, Verhofstad A, Basbaum AI. 1981. Serotonin neurons in nucleus raphe dorsalis and paragigantocellularis of the cat contain enkephalin. **J Physiol.** **77:241-245.**

Guyton AC, Hall JE. 1996. Dolor, cefalea y sensaciones de temperatura. En: tratado de fisiología médica. Ed. Interamericana-Mc Graw-Hill. 661-674.

Hall JM, Geppetti L. 1995. Kinins and kinin receptors in the nervous system. **Neurochem Int.** **26:17-26.**

Hargreaves K, Dubner R, Brown F, Flores C, Joris J. 1988. A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. **Pain.** **32:77-88.**

Harima A, Shimizu H, Takagi H. 1991. Analgesic effect of L-arginine in patients with persistent pain. **Eur Neuropsychopharmacol.** **1(4):529-533.**

Harris JA. 1996. Descending antinociceptive mechanisms in the brainstem: their role in the animal's defensive system. **J Physiol Paris.** **90:15-25.**

Harima A, Shimizu H, Takagi H. 1991. Analgesic effect of L-arginine in patients with persistent pain. **Eur Neuropsychopharmacol.** **1(4):529-533** **Heughan CE.**



Holland GR, Robinson PP. 1983. The number and sizes of axons at the apex of the cat's canine tooth. **Anat Rec.** **205:215-222.**

Holthusen H, Arndt JO, 1994 Nitric oxide evokes pain in humans on intracutaneous injection. **Neurosci Lett.** **165(1-2):71-74.**

Hyman SE, Cassem NH. 1995. Dolor. En: neurología. Ed. Científica médica latinoamericana. 1-20.

Iadarola MJ, Brady LS, Draisci G, Dubner R. 1988. Enhancement of dynorphin gene expression in spinal cord following experimental inflammation: stimulus specificity, behavioral parameters and opioid receptor binding. **Pain.** **35:313-326.**

Igari T. 1978. Serum Vitamin B₁₂ levels of patients with rheumatoid arthritis. **Tohoku J Exp Med.** **16:125-287.**

Jasmin L, Kohan L, Franssen M, Janni G, Goff JR. 1998. The cold plate as a test of nociceptive behaviors: description and application to the study of chronic neuropathic and inflammatory pain models. **Pain.** **75:367-382.**

Jesell TM, Kelly DD. 1991. Pain and Analgesia. En: **Principles of Neural Science.** **Kandel ER, Schwartz JH, Jesell TM. 3rd ed. Elsevier, pp.385-399.**

Jorens PG, Matthys KE, Bult H. 1995. Modulation of nitric oxide synthase activity in macrophages. **Inflammation.** **4:75-89.**

Kangrga I, Rnadic M. 1991. Outflow of endogenous aspartate and glutamate from the rat spinal dorsal horn in vitro by activation of low and high threshold primary afferent fibers. **Brain Res.** **553:347-352.**

Kawabata A, Fukuzumi Y, Fukushima Y, Takagi H. 1992. Antinociceptive effect of L-arginine on the carrageenan-induced hyperalgesia of the rat: possible involvement of central opioidergic systems. **Eur J Pharmacol.** **218:153-158.**



Kelso SR, Nelson TE, Leonard JP. 1992. Protein kinase C-mediated enhancement of NMDA currents by metabotropic glutamate receptors in *Xenopus oocytes*. ***J Physiol.* 449:705-718.**

Kendall MJ, Thornhill DP, Willis JV. 1979. Factors affecting the pharmacokinetics of diclofenac sodium. *Rheumatol Rehabil.* (Suppl 2):38-45.

Kobayashi K, Arakawa T, Satoh H, Fukuda T, Nakamura H. 1985. Effect of indomethacin, tiaprofenic acid and diclofenac on rat gastric mucosal damage and content of prostacyclin and prostaglandin E₂. *Prostaglandins.* 30:609-618.

Kolesnikov Y, Pasternak GW. 1999. Topical opioids in mice: analgesia and reversal of tolerance by a topical N-methyl-D-aspartate antagonist. ***J Pharmacol Exp Ther.* 290:247-252.**

Krupp P. 1975. New aspects of inflammation prevention by means of non-steroid antiphlogistics: the effect of voltaren. ***Schweiz Med Wochenschr.* 105(20):646-652.**

Krupp P, Menassé R, Riesterer L, Ziel R. 1976. The role of prostaglandins in inflammation. ***Huber Publishers. Bern, pp. 108-121.***

Ku EC, Lee W, Kothari HV, Kimble EF, Liauw L, Tian J. 1985. The effects of diclofenac sodium on arachidonic acid metabolism. ***Semin Arthritis Rheum.* 15(Suppl 1):36-41.**

Ku EC, Lee W, Kothari HV, Scholer DW. 1986. Effect of diclofenac sodium on the arachidonic cascade. ***Amer J Med.* 80(Suppl 4B):18-23.**

Ku EC, Wasvary JM, Cash WD. 1975. Diclofenac sodium (GP 45, 840 voltaren), a potent inhibitor of prostaglandin synthetase. ***Biochem. Pharmacol.* 24:641-643.**

Kuhar MJ, Pasternak GW. 1984. "Analgesics: neurochemical, behavioral and clinical perspectives". Editado por Kuhar MJ y Pasternak GW. ***Raven Press. USA, NY: 289-312.***

Kuraishi Y, Hirota N, Sato Y, Kaneko S, Satoh M, Tagaki H. 1985. Noradrenergic inhibition of the release of substance P from the primary afferents in the rabbit spinal dorsal horn. ***Brain Res.* 359(1-2):177-182.**



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

Lefkowitz RJ, Hoffman BB, Taylor P. 1996. Neurotransmission: the autonomic and somatic motor nervous systems. In: Goodman and Gilman's. The pharmacological basis of therapeutics. **9th ed. Mc Graw Hill. Cap. 6.**

Levine JD, Fields HL, Basbaum AI. 1993. Peptides and the primary afferent nociceptor. ***J Neurosci.* 13:2273-2286.**

Lewis T, Kellgren JH. 1939. Observations relating to referred pain, visceromotor reflexes and other associated phenomena. ***Clin Sci.* 4:47-71.**

López-Muñoz FJ, Castañeda-Hernández G, Torres-López JE, Picazo YF, Flores-Murrieta FJ, Granados Soto V. 1996. Differences in the mechanism of antinociceptive action of non-steroidal anti-inflammatory drugs in the rat. ***Pharm Sci.* 2:189-190.**

MacDermott AB, Mayer ML, Westbrook GL, Smith SJ, Barker JL. 1986. NMDA-receptor activation increases cytoplasmic calcium concentration in cultured spinal cord neurons. ***Nature.* 321:519-522.**

Mansikka H, Pertovaara A. 1995. The role of alpha 2-adrenoceptors of the medullary lateral reticular nucleus in spinal antinociception in rats. ***Brain Res Bull.* 37:633-638.**

Marletta MA, Hurshman AR, Rusche KM. 1998. Catalysis by nitric oxide synthase. ***Curr Opin Chem Biol.* 2:656-663.**

McClane TK, Martin WR. 1967. Effects of morphine, nalorphine, cyclazocine and naloxone on the flexor reflex. ***Int J Neuropharmacol.* 6:89-98.**

Meller ST, Dykstra C, Gebhart GF. 1992. Production of endogenous nitric oxide and activation of soluble guanylate cyclase are required for N-methyl-D-aspartate produced facilitation of the nociceptive tail-flick reflex. ***Eur J Pharmacol.* 214:93-96.**



Meller ST, Gebhart GF. 1993. Nitric oxide (NO) and nociceptive processing in the spinal cord. *Pain*. **52:127-136**.

Melzack R, Wall PD. 1965. Pain mechanisms: a new theory. *Science*. **150:971-979**.

Menassé R, Hedwall PR, Kraetz J, Pesicin C, Riesterer L. 1978. Pharmacological properties of diclofenac sodium and its metabolites. *Scand J Rheumatol. (Suppl. 22):5-16*.

Merskey H. 1979. Pain terms: a list with definitions and notes on usage, recommended by the IASP subcommittee on taxonomy. *Pain*. **6:249**.

Miampamba M, Chery-Croze S, Gorry F, Berger F, Chayvialle JA. 1994. Inflammation of the colonic wall induced by formalin as a model of acute visceral pain. *Pain*. **57:327-334**.

Mielke K. 1985. Vitamine der B-Gruppe: Aditive Effkte bei der medikamentösen therapie rheumatischer Erkrankungen. *Therapie-Woche*. **35:3313**.

Mobarakeh JI, Sakurada S, Katsuyama S, Kutsuwa M, Kuramasu A, Lin ZY, Watanabe T, Hashimoto Y, Yanai K. 2000. Role of histamine H(1) receptor in pain perception: a study of the receptor gene knockout mice. *Eur J Pharmacol*. **391(1-2):81-89**.

Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. 1989. Biosynthesis of nitric oxide from L-arginine. A pathway for the regulation of cell function and communication. *Biochem Pharmacol*. **38:1709-1715**.

Mörsdorf K, Wolf G. 1977. Zur Wirkungspotenz neuerer Antiphlogistika. *Arzneimittel-Forschung*. **27:531-533**.

Mumford J, Bower D. 1976. Pain and prothopatic sensibility: a review with particular reference to the teeth. *Pain*. **2:223-243**.

Naguib M, Yaksh TL. 1997. Characterization of muscarinic receptor subtypes that mediate antinociception in the rat spinal cord. *Anesth Analg*. **85:847-853**.



Ness TJ, Gebhart GF. 1988. Colorectal distension as a noxious visceral stimulus. Physiologic and pharmacologic characterization of pseudoaffective reflexes in the rat. ***Brain Res.* 450:153-169.**

Noguchi Y, Ishiko J, Ohtsuki I. 1984. Comparative pharmacological profiles of piroxicam, indomethacin, phenylbutazone, diclofenac, ibuprofen, and mefenamic acid. ***Royal society of medicine international congress and symposium series.* 67:61-67.**

Oliw E, Lundén I, Anggård E. 1978. *In vivo* inhibition of prostaglandin synthesis in rabbit kidney by non-steroidal anti-inflammatory drugs. ***Acta Pharmacol Toxicol.* 42:179-184.**

Ortiz MI, Torres-López JE, Castañeda-Hernández G, Rosas R, Vidal-Cantú GC, Granados-Soto V. 2002. Pharmacological evidence for the activation of K⁺ channels by diclofenac. ***Eur J Pharmacol.* 438:85-91.**

Paalzow L. 1969. An electrical method for stimulation of analgesic activity in mice. II. Application of the method in investigations of some analgesic drugs. ***Acta Pharm Suec.* 6:207-226.**

Rainsford KD, Willis C. 1982. Relationship of gastric mucosal damage induced in pigs by anti-inflammatory drugs to their effects on prostaglandin production. ***Dig Dis Sci.* 27(7):624-635.**

Reeh PW, Steen KH, Hanesch A. 1991. A dominant role of pH in inflammatory excitation of nociceptors in rat skin. ***Soc Neurosci Abstr.* 17:537**

Reisine T, Pasternak GW. 1996. Opioid analgesics and antagonists. In: Goodman and Gilman's, *The pharmacological basis of therapeutics.* 9th ed. Mc Graw Hill. Cap. 23:521-554.

Reisine T, Pasternak GW. 1996. Opioid analgesics and antagonists. In: Goodman and Gilman's, ***The pharmacological basis of therapeutics.* 9th ed. Mc Graw Hill. Cap. 23:521-554.**

Rexed B. 1952. Cytoarchitectonic atlas of the spinal cord in the cat. ***J Comp Neurol.* 96:415-466.**



Riess W, Stierlin H, Degen P, Faigle JW, Gerardin A, Moppert J, Sallmann A, Schmid K, Schweizer A, Sulc M, Theobald W, Wagner J. 1978. Pharmacokinetics and metabolism of the anti-inflammatory agent voltaren. ***Scand J Rheumatol. (Suppl 22):17-29.***

Riess VW. Schmid K. Botta L. Kobayashi K and Moppert J. 1986. Die perkutane resorption von diclofenaco. ***Arzneimittel Forschung. 36:1092-1096.***

Roberts MH. 1984. 5-Hydroxytryptamine and antinociception. ***Neuropharmacol. 23:1529-1536.***

Roberts VJ. 1989. Ethical issues in the use of animals for pain research. In: issues in pain measurement: advances in pain research and therapy. Chapman CR, Loeser JD. vol.12. Raven press. pp.169-174.

Emilio RS. 2003. Diccionario de especialidades farmacéuticas. ***Ed. Ediciones PLM S.A. de C.V. ed. 49^{ava}:768.***

Rosland JH. 1991. The formalin test in mice: the influence of ambient temperature. ***Pain. 45:211-216.***

Ruda MA, Bennett GJ, Dubner R. 1986. Neurochemistry and neurocircuitry in the dorsal horn: progr. ***Brain Res. 66:219-268.***

Sacerdote P, Monza G, Mantegazza P and Panerai AE. 1985. Diclofenac and piroprofen modify pituitary and hypothalamic beta-endorphin concentrations. ***Pharmacol Res Commun. 8:17-21.***

Sakurada T, Katsumata K, Tan-No K, Sakurada S, Kisara K. 1992. The capsaicin test in mice for evaluating tachykinin antagonists in the spinal cord. ***Neuropharmacol. 31:1279-1285.***

Sawynok J. 1987. GABAergic mechanisms of analgesia: an update. ***Pharmacol Biochem Behav. 26:463-474.***

Schuman EM, Madison DV. 1994. Locally distributed synaptic potentiation in the hippocampus. ***Science. 263:532-536.***



Siddall PJ, Cousins MJ. 1998. Introduction to pain mechanisms. In: neural blockade in clinical anesthesia and management of pain. **Lippincott-Raven Publishers. 3rd.ed. Philadelphia. Cap. 23:675-699.**

Siegmund E, Cadmus R, Lu G. 1957. A method for evaluating both non-narcotic and narcotic analgesics. **Pro Soc Exp Biol Med. 95:729-731.**

Sorkin LS. 1997. Farmacología y fisiología básicas del proceso del dolor agudo. En: clínicas de anestesiología de Norteamérica. Wallace MS, Dunn JS, Yaksh TL. **Ed. Mc Graw Hill. 2:245-259.**

Sousa AM, Prado WA. 2001. The dual effect of a nitric oxide donor in nociception. **Brain Res. 897:9-19.**

Steen KH, Reeh PW, Anton F, Handwerker HO. 1992. Protons selectively induce lasting excitation and sensitization to mechanical stimulation of nociceptors in rat skin, *in vitro*. **J Neurosci. 12(1):86-95.**

Stephenson FA. 1995. The GABAA receptors. **Biochem J. 15(310):1-9.**

Stierlin H, Faigle JW, Sallmann A, Küng W. 1979. Biotransformation of diclofenac sodium (voltaren[®]) in animals and in man: I. Isolation and identification of principal metabolites. **Xenobiotica. 9:601-610.**

Stimmel B. 1983. Neuroregulators and pain. In: pain, analgesia and addiction: The pharmacologic treatment of pain. **Ed. Raven Press. NY. Cap. 2:18-36.**

Takashima T, Kado Y, Ono T. 1972. Anti-inflammatory effects of GP 49, 840. **Clinical Reports. 6:50-57.**

Teiger DG. 1976. A test for antinociceptive activity of narcotic and narcotic antagonists analgesic in the guinea pig. **J Pharmacol Exp Ther. 197:311-316.**

Terenius L. 1985. Families of opioid peptides and classes of opioid receptors. In: advances in pain research and therapy. HL Fields, R Dubner, F Cervero. 9th ed. Raven Press, pp. 463-477.



Tjölse A, Berge O-G, Hunskaar S, Rosland JH, Hole K. 1992. The formalin test: an evaluation of the method. *Pain*. **51:5-17**.

Todd PA, Sorokin EM. 1988. Diclofenac sodium: a reappraisal of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic efficacy. *Drugs*. **35:244-285**.

Tonussi CR, Ferreira SH. 1994. Mechanism of diclofenac analgesia: direct blockade of inflammatory sensitization. *Eur J Pharmacol*. **251:173-179**.

Tsurumi K, Hiramatsu Y, Yamaguchi A, Hayashi M, Shibuya T. 1973a. Effects of GP 45/840 on acute experimental inflammations. *Fol Pharmacol Jap*. **69:299-318**.

Turk DC, Okifuji A. 1999. Assessment of patient's reporting of pain: an integrated perspective. *The Lancet*. **353:1784-1788**.

Vaile JH, Davis P. 1998. Topical NSAIDs for musculoskeletal conditions. A review of the literature. *Drugs*. **56:783-799**.

Vanegas H, Schaible HG. 2001. Prostaglandins and cyclooxygenases in the spinal cord. *Progress in Neurobiology*. **64:327-363**.

Verhoeven AJ, Tool ATJ, Kuijpers TW, Roos D. 1993. Nimesulide inhibits platelet-activating factors synthesis in activated human neutrophils. *Drugs*. **46:52-58**.

Vescovi P, Passeri M, Gerra G, Grossi. 1986. Naloxone inhibits the early phase of diclofenac analgesia in man. *Pain Clinic*. **87:151-155**.

Watanabe M, Maemura K, Kanbara K, Tamayama T, Hayasaki H. 2002. GABA and GABA receptors in the central nervous system and other organs. *Int Rev Cytol*. **213:1-47**.

Watkins JC, Krosgaard-Larsen P, Honore T. 1990. Structure-activity relationships in the development of excitatory amino acid receptor agonists and competitive antagonists. *TIPS*. **11:25-33**.



Way WL, Fields HL, Schumacher MA. 2001. Opioid Analgesics & Antagonists. In: basic & clinical pharmacology. Bertram G. Katzung. 8th ed. Mc Graw-Hill. Cap. 31:512-531.

Wesselmann U, Czakanski PP, Affaitati , Giamberardino MA. 1998. Uterine inflammation as a noxious visceral stimulus: behavioral characterization in the rat. ***Neurosci Lett.* 246:73-76.**

Wilcox GL. 1991. Excitatory neurotransmitters and pain. In: pain research and clinical management: proceedings of the sixth world congress on pain. Bond M, Woolf CJ, Charlton JE. Elsevier Science Publishers BV, pp. 97-117.

Willoughby DA, Moore AR, Colville-Nash PR. 2000. COX-1, COX-2 and COX-3 and the future treatment of chronic inflammatory disease. ***Lancet.* 355:646-648.**

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

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

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