

11261
Ces
4

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA

"ANALISIS FARMACOLOGICO DE LOS MECANISMOS GABAERGICOS
CEREBRALES INVOLUCRADOS EN LOS SISTEMAS
ANALGESICOS DE LA RATA Y RATON"

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE :

MAESTRO EN CIENCIAS BIOMEDICAS

AREA FARMACOLOGIA

PRESENTA: Med. Cir. Juan Raúl Meixueiro Montes de Oca

ASESOR ACADEMICO: D. en C. Cruz Reyes Vázquez

1988

FALLA DE ORIGEN



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.

RESUMEN.

La administración sistémica de fármacos GABAérgicos induce efectos analgésicos los cuales no son bloqueados por la administración de naloxona. Estos datos sugieren la existencia de un sistema analgésico endógeno mediado por sistemas diferentes a los empleados por los fármacos opioides. Sin embargo se desconoce el sitio y los mecanismos de acción utilizados por estos fármacos GABAérgicos para inducir tales efectos antinociceptivos. Los objetivos del presente estudio consisten, por un lado, en caracterizar a estos efectos analgésicos, y por otro lado en determinar las regiones del Sistema Nervioso Central involucradas en la producción de tales efectos. Para ello se utilizó la aplicación de GABA y de 2 de sus agonistas, THIP (4,5,6,7 Tetrahydroisoxazol 3-4 piridín 3-ol) y Baclofen aplicados por 3 diferentes vías de administración; intraperitoneal, intracerebroventricular y subaracnoidea. Los efectos analgésicos de estos fármacos fueron analizados en 3 diferentes pruebas dolorimétricas, inmersión de la cola de ratas en agua caliente, aplastamiento de la cola en ratón y placa caliente en ratón. Además, se realizó un análisis comparativo entre los efectos analgésicos inducidos por estos fármacos GABAérgicos y la analgesia provocada por la morfina. Se emplearon criterios convencionales para medir las latencias de respuesta. Con el propósito de localizar los sitios utilizados por los fármacos GABAérgicos para ejercer sus acciones analgésicas se repitió la prueba dolorimétrica de inmersión de la cola en animales con lesión ya sea del tálamo medial, de los núcleos del rafé dorsal o de la substancia gris periacueductal en ratas. Para ello se aplicó una corriente anódica de 5 mA durante 30 seg. La administración tanto de baclofen como de THIP por estas 3 vías de administración produjo un incremento en la latencia de respuesta de las 3 pruebas dolorimétricas empleadas. Por su parte, el GABA solo indujo efectos analgésicos cuando se administró por vía intracerebroventricular. Los efectos de estos fármacos GABAérgicos sobre las latencias respuesta en estas pruebas siempre mostró una relación dosis-respuesta gradual. La potencia del efecto analgésico de la morfina fue de 5 a 10 veces mayor que la del GABA o del THIP, y de solo 2 o 3 veces en relación con el baclofen. La lesión del tálamo medial, y principalmente de los núcleos del rafé y de la substancia gris periacueductal, indujeron una disminución o abolición en algunos casos, del efecto analgésico provocado por los fármacos GABAérgicos. Estos datos sugieren que se requiere de la integridad de los sistemas GABAérgicos, de los núcleos del rafé dorsal y de la substancia gris periacueductal, para que la acción analgésica del GABA y sus agonistas puedan manifestarse.

ABSTRACT.

Recently the existence of an endogenous analgesic system mediated by non-opioid mechanisms was postulated. The neurotransmitter involved in this non-opioid system, seems to be the gamma amino-butyric acid. The systemic administration of this substance induce a long lasting analgesic effect which is not blocked by naloxone. However, the mechanisms and nervous system site of action used by GABA in order to provoke such analgesic action is unknown. The objectives of the present study, includes the characterization of the GABAergic analgesic actions and to find out what CNS structures are involved in such antinociceptive GABAergic action. In order to carry out such objectives, we used the application of GABA and two receptor agonists Thip (4,5,6,7 Tetrahydroisoxazole 3-4 pyridin 3-ol) and baclofen, by different routes of administration; intraperitoneally, into the lateral ventricle and into the subarachnoid space. The analgesic actions of these GABA drugs were analyzed in three different dolorimetric tests; wistar rats tail immersion in hot water, tail pinch and hot plate in cd-1 mice. Additionally, a comparative analysis between the analgesic properties of these GABAergic drugs with those provoked by morphine was realized. Conventional criterium were used in order to measured the responses latency. With the aim to localize the CNS sites responsables for these GABA analgesia effects, the tail immersion test was repeated in, medial thalamus, or dorsal raphe nucleus or periaqueductal gray matter lesioned animals. These lesions were made using anodic currents (5mA during 30 sec.) Baclofen and Thip administration by these routes induced an increase of the latency in the mentioned dolorimetric test. In contrast GABA administration only induced effects when it was administrated by an intracerebral route. The effects induced by these drugs always happened in a dose-reponse fashion. Morphine had a potency 5 to 10 times higher than GABA or THIP, but only 2 to 3 times higher than baclofen. Medial thalamic lesions, and particulary dorsal raphe nuclei and periaqueductal gray substance, provoked a significative reduction, or even an abolishment of the analgesic reponse to these GABAergic drugs. The data of the present study support the existence of a GABA analgesic system, which requires the participation of some brain stem structures, such as dorsal raphe and periaqueductal gray matter, in order to be evident.

INTRODUCCION

El dolor es provocado por la estimulación de receptores periféricos, llamados nociceptores, y distribuidos en todo el organismo. Las fibras nerviosas que conducen los estímulos nociceptivos de la periferia a la médula espinal son de dos tipos, mielinizadas tipo A δ , con velocidades de conducción de 5 a 10 m/seg, y las fibras tipo C con una velocidad de conducción de aproximadamente 1m/seg (50). Además, estas fibras aferentes conducen información de otra índole como la térmica.

La mayoría de los nociceptores son polimodales, en el sentido de que pueden ser excitados por varios tipos de estímulos diferentes a los dolorosos. Así algunos pueden ser activados por cambios ambientales de índole térmica, mecánica o química (76).

Las fibras aferentes A δ y C dentro de la médula espinal, se distribuyen directamente en la sustancia gelatinosa. Se describió que las fibras mielinizadas A δ terminan en la lámina I de Rexed, mientras que las fibras no mielinizadas C se lo hacen preponderantemente en la sustancia gelatinosa. Esta regionalidad de las fibras aferentes, implica que el área relacionada principalmente con la percepción del dolor a nivel de la médula espinal, esta localizada en las primeras 2 o 3 láminas de Rexed (36), las cuales corresponde a la sustancia gelatinosa de

Rolando.

Además de las fibras aferentes A6 y C, la sustancia gelatinosa posee también fibras descendentes que llegan de los núcleos del rafe, de la formación reticular, del locus coeruleus, del hipotálamo, y de otras estructuras del Sistema Nervioso Central. La sustancia gelatinosa contiene neurotransmisores como la serotonina, el ácido gama-aminobutírico, la noradrenalina, y péptidos como la sustancia P, péptidos opioides, el péptido intestinal vasoactivo, la somatostatina, la angiotensina y la colecistocinina (25).

Las fibras eferentes y ascendentes de la sustancia gelatinosa las cuales conducen información nociceptiva, alcanzan al tálamo directamente a través del tracto espinotalámico, o lo hacen por vías de relevo a niveles intermedios como los tractos espinotalámico ventral y del sistema espinoretículo talámico (19).

A su vez, las fibras eferentes del complejo ventrobasal talámico y de los núcleos del grupo posterior del tálamo, sitios a donde llegan las aferencias nociceptivas que proyectan hacia la corteza cerebral, específicamente hacia el área prefrontal (20).

Así como existen sistemas que transmiten la información nociceptiva, también existen vías descendentes que se originan en centros encefálicos como la sustancia gris periacueductal, los núcleos del rafe, y el área SII entre otras. Las cuales pueden modificar la actividad aferente de la médula espinal (3). La eficacia de estos sistemas descendentes para modular la transmisión nociceptiva fue establecida apenas hace unos 20 años. Este control se ejerce aparentemente a través de las vías que se

originan en la corteza y el tallo cerebral primordialmente (1). Así, varios estudios mostraron la presencia de una inhibición de la actividad eléctrica de las neuronas nociceptivas espinales por la estimulación de algunas áreas de la corteza sensoriomotor, principalmente en la región SII y de la corteza orbitaria (9).

Estos hallazgos han permitido establecer bases científicas a algunos procedimientos empíricos utilizados desde la antigüedad cuando el dolor era tratado con acupuntura, o con la aplicación de irritantes químicos, temperaturas extremas o incluso estimulación eléctrica (6,46). Estos procedimientos en muchos casos resultaron exitosos, pero se desconocía su mecanismo de acción. Los trabajos de Reynolds realizados en 1969 (58) mostraron que la estimulación eléctrica de la sustancia gris periacueductal mesencefálica provocaba una analgesia específica, sin modificar ninguna otra modalidad sensorial, tal que permitía el realizar una interevención quirúrgica en ausencia de algún fármaco anestésico. Estos estudios representaron la confirmación de que existen en el organismo mecanismos analgésicos endógenos capaces de bloquear toda sensación dolorosa en una forma específica.

También, estos estudios de la analgesia provocada por la estimulación eléctrica fueron primordiales para iniciar la descripción de los mecanismos de acción analgésicos de los fármacos opioides. Otros estudios mostraron que los opioides se asocian con receptores específicos en el cerebro y en plexos nerviosos intestinales, lo que constituía la caracterización de los receptores opioides. Estos receptores muestran tal especificidad, que únicamente los analgésicos narcóticos y sus agonistas y

antagonistas son capaces de asociarse a ejercer efectos biológicos, mientras que otros agentes neuroactivos, fármacos y neurotransmisores, no muestran ningún tipo de afinidad por ellos (57). Estudios farmacológicos diferenciales mostraron que con base en las interacciones entre fármacos del tipo de la morfina, la ketociclasocina y la N-alil-normetazocina, con los receptores opioides, se pueden clasificar a estos receptores en cuatro clases principales los mu, kappa y sigma. Supuestamente estos receptores median los efectos analgésicos, sedantes y psicomiméticos respectivamente. Además en 1977 se postulo la existencia de un nuevo tipo de receptor opioide denominado delta (37).

Posteriormente se mostró la existencia de los ligandos endógenos a estos receptores, los cuales inicialmente se caracterizaron como péptidos opioides (67), y posteriormente como encefalinas. Finalmente a todas estas sustancias, las cuales ahora son una numerosa familia, se les ha agrupado bajo el término de endorfinas.

Los péptidos opioides son sustancias que poseen dos características únicas, una de ellas es su asociación estereoespecífica, con alguno de los receptores opioides y la otra es su eficacia para ejercer una acción de tipo morfinico, ya sea en preparación "in vitro" o "in vivo" (32).

En general, todas las endorfinas presentan semejanzas básicas en su estructura molecular, con ligeras modificaciones estructurales, que les confiere tanto actividad de agonistas como de antagonistas. De hecho tanto los opioides naturales como los sintéticos poseen actividad agonista/antagonista.

La primera descripción de los receptores opioides, fue realizada apenas en 1981 por Snyder (28), mientras que las primeras sustancias aisladas con propiedades opioides denominadas encefalinas, fueron descritas por Hughes y Kosterlitz en 1976 (28). Posteriormente Goldstein (61) mostró la existencia de un segundo péptido endógeno con propiedades analgésicas el cual, se localiza en la glándula pituitaria. A este péptido se le denominó endorfina. La aplicación intracerebral de esta sustancia en animales, provocó una analgesia, tal que mostró ser 48 veces más potente que la provocada por morfina. Sin embargo, las endorfinas poseen diversas acciones, no solo de tipo analgésica, en casi todas las especies estudiadas, y su función biológica es aún desconocida. Al parecer regula funciones de la pituitaria, además de actuar como precursores de otros péptidos (13).

Estudios tanto anatómicos, como electrofisiológicos, muestran que las fibras descendentes y las neuronas del asta dorsal de la médula espinal, juegan un papel muy importante en la analgesia provocada por los opioides. Por ejemplo, existe una alta concentración de péptidos y de receptores opioides que se localizan en las placas superficiales de las astas dorsales (lámina I, II y III). Además se mostró que algunas neuronas que contienen encefalinas, están concentradas en la lámina I y II del asta dorsal (71).

A nivel de los centros superiores la localización de neuronas y receptores opioides ocurre principalmente en áreas como el hipotálamo, el cual parece que sintetiza endorfinas, también el

cuerpo estriado, rico en encefalinas y la pituitaria con endorfinas. Otras áreas que contienen grandes niveles de péptidos y receptores opioides son la sustancia nigra, el globo pálido, el complejo nuclear trigeminal y el núcleo del tracto solitario. Cantidades moderadas de encefalinas se localizan en la amígdala, y el tallo cerebral. Cantidades menores de encefalinas se han encontrado en el fornix, cerebelo e hipocampo (51).

Esta distribución de péptidos y receptores opioides, sugiere que los sistemas opioides endógenos se encuentran en áreas que reciben fibras pequeñas aferentes primarias las cuales se colocan en forma estratégica para modular la información nociceptiva (13).

Existen relaciones funcionales importantes entre los sistemas opioides endógenos y la analgesia provocada por la estimulación eléctrica de algunas zonas del tallo cerebral, tales como la sustancia gris periacueductal y la periventricular, y en los núcleos del tálamo medial. La analgesia provocada por estimulación eléctrica posee características que en efecto son comparables a la analgesia producida por los opioides. Por ejemplo, ambas son significativamente reducidas por la administración de naloxona, un antagonista opioide, lo que sugiere que la analgesia provocada por estimulación eléctrica, es al menos parcialmente debida a la liberación de péptidos opioides. Además, este tipo de estimulación induce una elevación de endorfinas en el líquido cefalorraquídeo.

Las endorfinas juegan también un papel fisiológico en la regulación y en la apreciación del dolor particularmente en sus componentes afectivos. (13). Por ejemplo, estudios farmacológicos muestran que los opioides son capaces de inhibir la entrada de la

información nociceptiva proveniente de las fibras aferentes primarias, en las neuronas del asta dorsal. El efecto parece deberse a una acción opioide presináptica. Los receptores opioides están presentes en las terminaciones aferentes primarias, algunas de las cuales utilizan a neuropéptidos, como a la sustancia P como neurotransmisores (25) Niveles elevados de encefalinas se encuentran en las astas dorsales, y los receptores opioides están presentes en las neuronas de las mismas astas dorsales, las cuales proyectan fibras hacia centros de integración superiores. Lo que sugiere entonces, que los opioides inhiben la transmisión del dolor también por una acción postsináptica en las neuronas espinales (1).

Uno de los mecanismos utilizados por los opioides para suprimir la transmisión del dolor es la activación de las vías inhibitorias monoaminérgicas, las cuales se proyectan a las astas dorsales provenientes de centros superiores (34).

La administración de morfina afecta las concentraciones de noradrenalina y serotonina en el Sistema Nervioso. Algunos investigadores enfatizan el papel de la serotonina, mientras que otros favorecen a las catecolaminas como los responsables de la analgesia producida por la morfina. Los efectos de los opioides en las neuronas catecolaminérgicas, consiste en disminuir la actividad de la noradrenalina y su liberación. Estudios en el núcleo del locus coeruleus, sito de origen de las fibras noradrenérgicas prosencefálicas mostraron que el prototipo opioide la morfina, causa una reducción marcada en la frecuencia normal de descarga. Estas neuronas del locus coeruleus responden a estímulos

dolorosos, con un incremento en el índice de descarga, así este efecto puede ser bloqueado por la morfina. El descubrimiento de receptores opioides específicos en el cerebro, mostraron que existe una muy densa acumulación de receptores opioides en el locus coeruleus. Estos datos sugieren que los receptores opioides específicos en el locus coeruleus, los cuales normalmente utilizan endorfinas como neurotransmisores naturales, inhiben la frecuencia de descarga de las neuronas del locus coeruleus con lo cual modulan la actividad noradrenérgica cerebral (2,27).

En lo relativo a la serotonina se describió ^{que} las respuestas conductuales a estímulos nociceptivos disminuyen cuando existe una mayor liberación de serotonina. Contrariamente, la respuesta a los estímulos nociceptivos se incrementa cuando la disponibilidad de serotonina disminuye (22). La activación de la neurotransmisión serotoninérgica es acompañada por una disminución en la respuesta al dolor (68).

La naloxona no antagoniza el efecto antinociceptivo provocado por la serotonina a nivel de la sustancia gelatinosa. En cambio, cuando al administrar de p-clorofenilalanina, fármaco que disminuye los niveles de serotonina, disminuye el umbral al dolor, sin modificar la concentración de endorfinas (65). Se describió que la serotonina reduce las respuestas nociceptivas de las neuronas a nivel de las láminas I y II de Rexed, lo que sugiere que las propiedades antinociceptivas de la serotonina, pueden ser debidas a depresión monoaminérgica de las neuronas de la lámina II (56).

Desde fines del siglo XIX, ya se realizaron intentos para

Provocar analgesia por estimulación eléctrica en diversas regiones cerebrales como la sustancia gris periacueductal, los núcleos del rafe, y otras estructuras. Sin embargo los resultados obtenidos fueron muy contradictorios. Pero no fué sino hasta 1969 cuando Reynolds (32) mostro que la estimulación eléctrica de la sustancia gris periacueductal mesencefálica es capaz de inducir una analgesia profunda.

Posteriormente, diversos autores (6,46,47,48) mostraron que las respuestas conductuales a estímulos nociceptivos pueden ser reducidas o abolidas, por la estimulación eléctrica de algunas estructuras cerebrales. El grado de intensidad de esta analgesia depende tanto de la estructura estimulada como de los parámetros de estimulación. En animales de laboratorio sometidos a diferentes pruebas dolorimétricas como las de placa caliente, aplastamiento de la cola y retiramiento de la misma, se observó la producción de una mayor analgesia al estimular a las estructuras periventriculares y periacueductales.

Los animales que presentan analgesia por estimulación eléctrica, no presentan signos de sedación, y muestran una movilidad completa, así como una respuesta normal a estímulos ambientales inocuos. Estos datos sugieren que esta estimulación afecta específicamente a la transmisión del dolor. Tales resultados, también se observan en pacientes en quienes se produce analgesia por estimulación eléctrica. Al pasar corriente por electrodos localizados en o cerca de la sustancia gris periventricular^{acueductal}. En estos pacientes tampoco se presentan alteraciones motoras o sensitivas (47).

Tiempo después se mostró que la lesión del funículo dorsolateral bloquea esta analgesia producida por la estimulación eléctrica de la sustancia gris periacueductal. Esto sugiere que el efecto de esta estimulación se realiza a un nivel espinal.

Estructuras supraespinales como los núcleos rafé dorsal y rafé magno, el núcleo paragigante celular y el retículo magnocelular, así como el tegmento dorsolateral del puente; también intervienen en la producción de la analgesia provocada por la estimulación eléctrica. Todos estos núcleos contribuyen con axones descendentes al funículo dorsolateral (8).

Existe una interacción funcional entre la analgesia provocada por la estimulación eléctrica y la analgesia inducida por péptidos opioides. Una evidencia de tal relación muestra, que las β -endorfinas y las encefalinas se localizan en estructuras que intervienen en la producción de analgesia por estimulación eléctrica como es el caso de la sustancia gris periacueductal (25,70,71). También, la presencia de concentraciones elevadas de receptores opioides en la sustancia gris periacueductal y periventricular, son una fuerte evidencia de tal relación (5). La microinyección de opioides en la sustancia gris periacueductal y periventricular provocan analgesia, misma que puede ser bloqueada por naloxona o por la lesión del funículo dorsolateral (73). Además la administración intraventricular de morfina o encefalinas, inducen una marcada inhibición de las neuronas periacueductales, las cuales están asociadas con la producción de analgesia (69).

Lesiones a nivel de la sustancia gris periacueductal o

periventricular, bloquean la analgesia provocada por opioides aplicados en forma sistémica (17). También la naloxona revierte las analgesia provocada por la estimulación eléctrica de la sustancia gris periacueductal y periventricular, tanto en ratas como en el hombre (26).

En la analgesia producida por la estimulación eléctrica, también participan aminas como la noradrenalina y la dopamina, así como indoles como la serotonina. La depleción de serotonina, dopa, y noradrenalina, induce una poderosa inhibición de la analgesia provocada por la estimulación eléctrica, siendo esta restaurada por la inyección de serotonina o de L-dopa. La depleción específica de serotonina causa una reducción en la analgesia provocada por la estimulación eléctrica, mientras que la elevación de los niveles de este indol, provoca un mayor grado de profundidad en la analgesia. El bloqueo de receptores dopaminérgicos disminuye la analgesia inducida por la estimulación eléctrica, mientras que la administración de agonistas dopaminérgicos la incrementa (10,27). También la depleción selectiva de noradrenalina causa un incremento en la producción de analgesia por estimulación eléctrica, y al mismo tiempo, cuando los niveles de noradrenalina disminuyen, los de dopamina aumentan, y como consecuencia la analgesia se incrementa (2). Estos datos sugieren que la dopamina y la serotonina facilitan la analgesia inducida por estimulación eléctrica, mientras que la noradrenalina la inhibe (22).

El papel de los opioides en la supresión del dolor es estudiado ampliamente bajo muchos enfoques experimentales, por ejemplo se

observó que en algunos procedimientos para suprimir el dolor, tal como la acupuntura, el estrés, la administración de óxido nítrico, y la estimulación eléctrica de la sustancia gris periacueductal mesencefálica, se produce una liberación de péptidos opioides. En términos generales la analgesia producida por estos procedimientos es parcial o totalmente revertida por la administración de naloxona (35). Este fármaco es considerado como el antagonista de la morfina "más puro" que existe. Aunque evidencias recientes muestran, que no todas las acciones inducidas por la morfina o los opioides son antagonizadas por este fármaco. Además que la naloxona posee efectos no relacionados con las respuestas opioides.

Un hecho común a todos los procedimientos anteriormente mencionados es el desarrollo de tolerancia, la cual muestra tolerancia cruzada con la inducida por la administración de opioides.

Por otra parte, existen múltiples evidencias que muestran la presencia de sistemas analgésicos que no son mediados por opioides, como sería el caso de la analgesia provocada por la estimulación eléctrica subcutánea de los nervios mediano, radial y safeno. Este tipo de analgesia el cual no es revertido por naloxona, tampoco muestra tolerancia cruzada con opioides. Así los pacientes que no responden a la morfina, pueden beneficiarse con la analgesia producida por la estimulación eléctrica subcutánea. Estas y otras observaciones sugieren la existencia de vías no endorfinérgicas las cuales provocan analgesia (35). También existen datos sugestivos de que sistemas no opioides, como algunas

porciones de las vías descendentes serotoninérgicas, las cuales provienen de los núcleos del raquí, suprimen el dolor en animales de laboratorio sin la necesidad de sistemas opioides (22).

En años recientes, también se postuló la existencia de un mecanismo analgésico mediado por el ácido gamma-aminobutírico (GABA) (23,43,72). El GABA es el neurotransmisor inhibitor más ampliamente distribuido en el Sistema Nervioso Central (37,67). Tanto el GABA como sus agonistas Baclofen (β -para-clorofenil-GABA), THIP (4,5,6,7-tetrahidroisoxazol (3,4-C) piridín-3-ol) y muscimol (3-hidroxi-5-aminoetilisoxazol) (41) producen una gran variedad de efectos farmacológicos, los cuales incluyen acciones antiepilépticas, ansiolíticas, relajación muscular, hipotensora y una acción antinociceptiva (36). Además algunas alteraciones de las funciones GABAérgicas están implicadas en algunas alteraciones neurológicas, y en los efectos farmacológicos provocadas por fármacos psicoactivos (63).

El efecto antinociceptivo del GABA y de sus agonistas es materia de estudio actual, puesto que se desconoce el sitio y el mecanismo de acción empleado por este neurotransmisor para ejercer tal efecto. La proporción del GABA que atravieza la barrera hematoencefálica es muy reducida (15) lo cual origina la necesidad de que los estudios para determinar las propiedades antinociceptivas se realicen con agonistas GABAérgicos como lo es el baclofen, el THIP y el muscimol.

Existen múltiples datos sugerentes de que el GABA es un neurotransmisor liberado por neuronas, las cuales en el caso de la médula espinal, median el control presináptico de las

Porciones de las vías descendentes serotoninérgicas, las cuales provienen de los núcleos del rafe, suprimen el dolor en animales de laboratorio sin la necesidad de sistemas opioides (22).

En años recientes, también se postuló la existencia de un mecanismo analgésico mediado por el ácido gama-aminobutírico (GABA) (23,43,72). El GABA es el neurotransmisor inhibitor más ampliamente distribuido en el Sistema Nervioso Central (37,67). Tanto el GABA como sus agonistas Baclofen (β -para-clorofenil-GABA), THIP (4,5,6,7-tetrahidroisoxazol (3,4-C) piridín-3-ol) y muscimol (3-hidroxi-5-aminoetilisoxazol) (41) producen una gran variedad de efectos farmacológicos, los cuales incluyen acciones antiepilépticas, ansiolíticas, relajación muscular, hipotensora y una acción antinociceptiva (36). Además algunas alteraciones de las funciones GABAérgicas están implicadas en algunas alteraciones neurológicas, y en los efectos farmacológicas provocadas por fármacos psicoactivos (63).

El efecto antinociceptivo del GABA y de sus agonistas es materia de estudio actual, puesto que se desconoce el sitio y el mecanismo de acción empleado por este neurotransmisor para ejercer tal efecto. La proporción del GABA que atraviesa la barrera hematoencefálica es muy reducida (15) lo cual origina la necesidad de que los estudios para determinar las propiedades antinociceptivas se realicen con agonistas GABAérgicos como lo es el baclofen, el THIP y el muscimol.

Existen múltiples datos sugerentes de que el GABA es un neurotransmisor liberado por neuronas, las cuales en el caso de la médula espinal, median el control presináptico de las

terminaciones aferentes primarias. Las concentraciones de GABA en la médula espinal son mayores en las astas dorsales, y sus niveles se reducen por la sección de estas raíces; lo que sugiere una asociación importante entre el GABA y las terminales aferentes primarias (15).

La inhibición presináptica es antagonizada por la bicuculina, un antagonista GABAérgico, la cual también bloquea el efecto del GABA en neuronas espinales y supraespinales (16). Se sugiere que la hiperpolarización de algunas de las fibras aferentes primarias, pueda también ser mediado por el GABA, debido a que estos efectos son bloqueados por la bicuculina. El GABA es capaz de despolarizar las terminales aferentes primarias, con lo cual se reduce la actividad sináptica de las mismas (15,16).

El baclofen es empleado clínicamente en el tratamiento de la espasticidad de varios orígenes. Probablemente el mecanismo de acción sea la activación de los sistemas GABAérgicos de la médula espinal. Esta acción de relajación muscular, refleja una reducción en la excitabilidad de los componentes de los reflejos espinales. Tal hipoeccitabilidad espinal se manifiesta en estudios electrofisiológicos los cuales muestran que el baclofen suprimio los reflejos monosinápticos y polisinápticos, los potenciales postsinápticos excitadores y los potenciales de las raíces dorsales (54).

También el baclofen mostró ser un agente antinociceptivo en animales sometidos a pruebas dolorimétricas como la placa caliente, el retiramiento de la cola y el aplastamiento de la misma (36,43,44,45,55,72). Su potencia en la prueba de la placa

caliente fué equivalente en dosis equimolares a la potencia ejercida por la morfina (16).

El efecto antinociceptivo del baclofen se presenta en dosis bajas, cuando las dosis son altas, invariablemente se presenta principalmente sedación y un aumento en las latencias de respuesta a estímulos nociceptivos. Se sugiere que el efecto antinociceptivo a dosis altas refleja probablemente una incapacidad del animal para efectuar la respuesta al dolor debido a su condición. La diferencia entre el comienzo de los efectos analgésicos y los motores, sugiere acciones farmacológicas separadas. Así, después de la administración repetida de baclofen se observa una persistencia de la acción antinociceptiva inalterable en animales tolerantes a los efectos motores. Estos datos son también sugerentes de que las alteraciones motoras y la acción antinociceptiva del baclofen, son resultados de mecanismos independientes (43). Sin embargo, aún desconocemos si los efectos ejercidos con dosis bajas son mediados por un sistema farmacológicamente distinto al sistema que realiza los efectos con dosis altas, se decir si están involucrados diferentes tipos de receptores, o solo se trata de dos fenómenos, resultado de varios grados de un efecto en el mismo sistema fisiológico (72).

Proudfit y Levi en 1978 (55) mostraron la existencia de una reducción significativa en la latencia de la prueba de retiramiento de la cola, después de una transección de la médula espinal torácica en ratas, en las cuales se registraba el efecto antinociceptivo del baclofen. Esto indica la necesidad de que mecanismos supraespinales descendentes se activen para que se

manifiesta la acción antinociceptiva del baclofen. Además, se mostró que esta sustancia induce un decremento en los reflejos monosinápticos y polisinápticos, aunque la manifestación de este efecto fue de la misma magnitud en preparaciones espinales intactas que en preparaciones de animales descerebrados. Estos datos sugieren que el efecto muscular ocurre principalmente a nivel espinal, mientras que la acción antinociceptiva es ejercida primariamente en centros superiores. Sin embargo, autores como Wilson y Yaksh (72) sugieren que parte de la acción antinociceptiva es provocada tanto por acciones supraespinales como espinales.

La acción supraespinal del baclofen se manifiesta cuando este fármaco se administra por microiontoforesis con corrientes catiónicas de 10 a 60 nA en neuronas del tracto piramidal, en las células de purkinje y en las interneuronas. En estas condiciones el fármaco reduce la frecuencia de descarga de la actividad espontánea o de la excitación provocada por estímulos nociceptivos, aunque el inicio del efecto es lento, y el periodo de recuperación, de la neurona es de 1 a 2 minutos después de la aplicación (64).

Con respecto a la acción espinal del baclofen, Saito (62) mostró que el baclofen efectivamente bloquea la excitación de las sinápsis aferentes primarias, al antagonizar los efectos de la sustancia P, un neuropéptido excitador, localizado en las astas dorsales de la médula espinal. Este efecto también se reproduce en neuronas corticales, aunque no existen aún evidencias del mecanismo de acción empleado por el baclofen para antagonizar a la

substancia P.

Aunque la potencia antinociceptiva del baclofen, y de la morfina en algunas pruebas dolorimétricas son similares (16), el mecanismo por el cual el baclofen induce antinocicepción, parece ser diferente al de la morfina, ya que su efecto no es antagonizado por naloxona y no presenta tolerancia cruzada con la morfina (43). Aunque, es posible que tanto el baclofen como la morfina, activen al mismo sistema terminal a través de diferentes mecanismos, puesto que los sustratos anatómicos neuronales necesarios para inducir analgesia por baclofen, parecen estar localizados en las mismas áreas cerebrales que emplean los opioides. Así, algunos trabajos muestran que tanto la analgesia inducida por morfina como la provocada por baclofen en ratas, fueron bloqueadas por la transección a nivel del tercio anterior de la médula oblongada, 3 milímetros rostral al obex, mientras que la transección 4 milímetros más rostral al plano medio colicular, no disminuye la analgesia inducida por ambos fármacos (55).

Además, se mostró que el baclofen induce efectos antinociceptivos cuando se aplica por microinyección en sitios como la substancia gris periacueductal mesencefálica, el rafe magno, y el tallo cerebral, zonas necesarias para que se manifieste la analgesia provocada por los opioides (44).

Así Levy (44) mostró que la microinyección de dosis pequeñas de baclofen en la substancia gris periacueductal mesencefálica, incrementa la latencia en la prueba de retiramiento de la cola. El autor sugiere que la capacidad del baclofen y de la morfina de inducir efectos antinociceptivos cuando son microinyectados en la

substancia gris periacueductal mesencefálica, indican que ésta área es uno de los sitios de acción de estos fármacos.

El inicio del efecto antinociceptivo del baclofen con respecto a la morfina, es mas lento, lo cual pueda depender de parámetros farmacocinéticos de ambas sustancias, por ejemplo a la menor liposolubilidad del baclofen en comparación con la de la morfina. Entonces la diferencia entre los tiempos de inicio de acción de estas drogas, no necesariamente indica que existen substratos diferentes para la morfina y el baclofen, como fué sugerido (44). Otra similitud entre la morfina y el baclofen la constituye la hiperactividad provocada por ambos fármacos. Así, la hiperactividad producida por el baclofen (1.5 µg) cuando se microinyecta en la substancia gris periacueductal, parece ser muy similar a la hiperactividad inducida por la microinyección de dosis altas (5 µg) de morfina en la misma región (33).

Después de su administración intracerebroventricular, el baclofen induce antinocicepción en la prueba de aplastamiento de la cola, lo cual sugiere que este fármaco pone en acción substratos antinociceptivos que se localizan cerca de los ventrículos laterales. Además, en la prueba de retiramiento de la cola por aplicación de un estímulo térmico, la cual se considera que es básicamente un reflejo espinal (31), la latencia no es alterada significativamente por la administración de baclofen.

Sin embargo, la administración de baclofen por vía subaracnoidea induce efectos antinociceptivos en pruebas dolorimétricas como el retiramiento de la cola, y la placa caliente (21). Estos hallazgos son similares a los encontrados por

Wilson y Yaksh (72), y sugieren que el sitio de acción de este fármaco es también a nivel espinal.

Al parecer la acción del baclofen, aunque considerado como un agonista GABAérgico, podría involucrar la activación de sistemas de la acetilcolina, de la glicina o del GABA, aunque los antagonistas selectivos de estas sustancias no bloquean la depresión inducida por baclofen (36). Ciertamente se reportó que el baclofen bloquea la excitación cortical inducida por acetilcolina y glutamato (72).

También se mostró que los niveles de dopamina son incrementados después de la administración de baclofen (24). Tal hallazgo sugiere que el baclofen posee un sitio de acción supraespinal, puesto que las concentraciones más altas de dopamina se localizan a nivel supraespinal (63).

Otro compuesto con una acción selectiva de receptores GABAérgicos es el THIP, el cual posee una estructura rígida análoga del GABA (40). Este fármaco el cual se emplea para el tratamiento de diferentes enfermedades tales como la epilepsia, la discinesia tardía, la espasticidad, el mal de Parkinson, la corea de Huntington, la enfermedad de Alzheimer, la depresión y la esquizofrenia (14). Además actualmente se encuentra en estudio su propiedad antinociceptiva.

El THIP posee propiedades antinociceptivas después de su administración oral y parenteral (29). Tal efecto se manifiesta en pruebas dolorimétricas como la placa caliente, el dolor artrítico, en el estiramiento e inmersión de la cola. Su potencia antinociceptiva sin embargo es baja. Es de 20 a 50 veces y entre 3

y 4 veces menos potente que la morfina y el baclofen respectivamente en las diferentes pruebas dolorimétricas (23). La falta de desarrollo de tolerancia al THIP y la incapacidad de la naloxona para revertir sus acciones, indican que este fármaco no interactúa directamente con sustancias opioides. Es concebible que el efecto antinociceptivo del THIP sea debido a una interacción con mecanismos sensibles al baclofen e insensibles a la bicuculina, ya que en algunos casos el efecto no es revertido por la bicuculina (29).

Al tiempo que se alcanzan los efectos antinociceptivos del THIP, una serie de efectos adversos se presentan, como es el caso de sedación, ataxia, mioclonias y vómito. Estos efectos se presentan con cantidades de fármaco cercanas a las dosis que producen la DE50 de sus acciones antinociceptivas en animales, y son más intensos a medida que se aumentan las dosis (29).

Se reportó que el THIP inhibe las descargas de las neuronas de las astas dorsales espinales cuando se administra por microiontoforesis (23). Sin embargo el efecto antinociceptivo del THIP observado después de su administración parenteral y oral, no parece involucrar acciones a nivel de la médula espinal. La administración intratecal en dosis altas produce flacidez e incoordinación motora aunque no se observan efectos antinociceptivos (23). La presentación a este efecto sugiere la afectación de sistemas motores GABAérgicos de la médula espinal (21). Como consecuencia, se sugiere que las acciones antinociceptivas de este fármaco se realizan a nivel supraespinal (29). Un aspecto importante del efecto antinociceptivo ejercido

por el THIP lo constituye la influencia que algunos compuestos colinérgicos poseen sobre esta respuesta. Tal relación farmacológica sugiere que la actividad antinociceptiva del THIP es diferente a la ejercida por los analgésicos clásicos (36).

Los animales que reciben en forma crónica por 21 días THIP desarrollan tolerancia cuando se les somete a pruebas dolorimétricas tales como la inmersión de la cola y la placa caliente. Además estos animales muestran una respuesta analgésica disminuida hacia la morfina, y los animales tolerantes a la morfina también presentan una respuesta menor ante la administración de THIP (4).

Estos datos sugieren que aunque los opioides y los agonistas GABAérgicos provocan un estado analgésico empleando mecanismos diferentes y quizás diferentes vías. Al parecer estas vías se relacionan entre sí a nivel del Sistema Nervioso Central.

Reyes y cols. (59) mostraron que el núcleo parafascicular talámico, es un sitio probable capaz de mediar la respuesta antinociceptiva a fármacos GABAérgicos como es el caso del THIP. Estudios previos muestran que este núcleo parafascicular talámico está involucrado en mecanismos de producción de dolor (53).

La administración microiontoforética de THIP en el núcleo parafascicular talámico induce efectos depresores en aquellas neuronas que son activadas por la inmersión de la cola de ratas en agua caliente. La administración de 50 nA de THIP también reduce la frecuencia de descarga de neuronas que se activan espontáneamente. Los efectos desencadenados por esta substancia comienzan aproximadamente de 1 a 2 segundos después de su

administración. En terminos generales los autores observaron que el 67% de las neuronas del núcleo parafascicular talámico son activadas por el estímulo nociceptivo, mientras que el 58% de las neuronas fueron inhibidas por la aplicación local de THIP (60).

El muscimol, un relajante muscular y agente potencializador de narcóticos, es otro análogo estructural del GABA. también su aplicación microiontoforética a neuronas provoca una inhibición de la frecuencia de descarga (49). Además el muscimol microinyectado en la sustancia nigra provoca efectos analgésicos (7) en animales sometidos a pruebas dolorimétricas como la placa caliente y el retiramiento de la cola. La administración intranigral de muscimol posterior a la lesión de la formación reticular en estos animales, provoca que aunque el efecto analgésico desaparezca en la prueba de inmersión de la cola el efecto analgésico se mantiene para la prueba de la placa caliente. Tales datos sugieren que la sustancia nigra mantiene conexiones descendentes a través de la formación reticular necesarias para la supresión del dolor.

También estos datos sugieren que los efectos analgésicos del muscimol administrado intranigralmente en estas dos pruebas, es mediado por diferentes vías (49).

La aplicación de muscimol por vía intratecal en dosis bajas provoca una acción analgésica ligera, sin la presencia de alteraciones motoras, la cual sólo es evidente cuando se administran dosis de 20 µg (21). Tales observaciones confirman la sugerencia de que el sitio de acción antinociceptivo del muscimol es supraespinal.

Por otra parte, los estudios realizados con la administración

de inhibidores de la transaminasa del GABA como el Gama vinil GABA y el Gama Acetilenico GABA, muestran que estos fármacos aumentan la latencia en animales sometidos a la prueba de la Placa caliente, aunque este efecto es de 20 a 200 veces menos potente que el provocado por la morfina. El aumento en el tiempo de reacción inducido por los inhibidores de la transaminasa del GABA no es antagonizado por la naloxona. Además es probable que estos inhibidores provoquen sus efectos antinociceptivos como consecuencia de incrementar las concentraciones de GABA en el Sistema Nervioso Central (11).

El efecto máximo de estos compuestos se encuentra de 4 a 6 horas después de su administración intraperitoneal y su acción se extendió hasta 8 horas después. Si los animales tratados con estos fármacos se colocan en el aparato de rotación para evaluar ataxia, se observa que estos fármacos en dosis elevadas no reducen el tiempo en el que los animales permanecen en este aparato. Este hallazgo excluye la ataxia como explicación de la acción antinociceptiva de los inhibidores de la transaminasa del GABA (11).

Varios intentos se realizaron con la finalidad de correlacionar la acción analgésica de la morfina, con las alteraciones de recambio de varios neurotransmisores, como es el caso de la acetilcolina, las catecolaminas, los indoles y del GABA. Con respecto a este último se mostró que su administración potencia la acción analgésica de la morfina, mientras que una disminución en sus niveles atenúa esta analgesia (75). La manipulación farmacológica del GABA modifica la analgesia, tolerancia y

dependencia física inducida por morfina (30). Así, el aumento de los niveles de GABA por inhibición de su destrucción, aumenta la analgesia provocada por la morfina, además de los fenómenos de tolerancia y dependencia física. Por otra parte, el bloqueo de receptores presinápticos GABAérgicos provocado por la bicuculina produce una inhibición de la tolerancia y la dependencia física a los opioides (30).

Biggio en 1976 (8) mostró que la administración intravenosa de muscimol, 10 minutos antes de la aplicación de morfina, reduce la DE 50 de morfina provocadora de analgesia. Además la dosis de muscimol empleada no produjo analgesia por sí misma.

Después de la administración intraperitoneal de morfina se observa un incremento significativo de GABA en ciertas áreas cerebrales, como es el caso del tálamo, específicamente en el núcleo ventral, el núcleo entopeduncular, el núcleo reuniens y el núcleo parafascicular. Estos incrementos fueron antagonizados por levorfan, un antagonista opioide (42).

Por otro lado, la administración aguda de morfina induce un incremento significativo del GABA, y de la enzima glutámico descarboxilasa presentes en las astas dorsales de la médula espinal, y en la porción que rodea el canal central acueductal. Tal incremento también se observa en el núcleo ventral, el núcleo entopeduncular, el núcleo reuniens, y el núcleo parafascicular. Estos datos mencionados sugieren, que la analgesia provocada por morfina puede involucrar mecanismos que intensifiquen la entrada de información nociceptiva a neuronas inhibitoras GABAérgicas en los niveles espinales y talámicos, donde la primera y segunda

neuronas involucradas en la percepción del dolor terminan (11). Tal intensificación de esta información sensorial provoca una respuesta inhibitoria más potente de estas neuronas sobre los sistemas de percepción del dolor. Finalmente esta acción se manifiesta como una respuesta analgésica (42).

Muchos antecedentes experimentales muestran que los sistemas analgésicos GABAérgicos se encuentran involucrados en la modulación fisiológica del dolor. También, estas acciones son diferentes a las provocadas por los sistemas opioides.

Existen por lo menos 3 posibles sitios supraespinales en los cuales los fármacos GABAérgicos ejercerían su acción analgésica. El primer nivel se localiza en la sustancia gris periacueductal misma que contiene una gran cantidad de receptores GABAérgicos, así como las enzimas sintetizantes del GABA. El segundo sitio lo constituye el rafe dorsal. Particularmente la estimulación de los núcleos de rafe dorsal inducen cambios en los niveles del umbral del dolor, los cuales podrían asociarse con cambios en la concentraciones de GABA en estas estructuras. Finalmente, el tercer sitio se localiza en el tálamo medial. La analgesia provocada por esta estructura se caracteriza por un estado analgésico que modifica principalmente la percepción y la respuesta al dolor. En esta región talámica, existen concentraciones elevadas de GABA, y su aplicación microiontoforética puede bloquear los efectos de la estimulación nociceptiva.

El presente estudio tiene como objetivos, por un lado emplear un enfoque farmacológico en la caracterización de los efectos

analgésicos del GABA, así como de sus agonistas baclofen y ThiP, en animales de laboratorio sometidos a diversas pruebas dolorimétricas. También es nuestro objetivo, efectuar un análisis comparativo entre la analgesia provocada por opioides, y aquella desencadenada por fármacos GABAérgicos. Otro objetivo derivado de este estudio consiste en identificar los sitios dentro del Sistema Nervioso Central, en los cuales los agentes GABAérgicos ejercen tales acciones analgésicas.

METODO

Los experimentos fueron realizados en ratas wistar machos de 150 a 180 gramos, y en ratones CD-1 machos de 30 a 35 gramos. Estos animales se mantuvieron en el laboratorio desde 3 días antes de iniciarse la fase experimental hasta el fin de la misma, con ciclos de luz-obscuridad de 12 x 12 horas (9:00-21:00). Los animales se colocaron individualmente en cajas de metal de 29.5x20x14.5 cm o en cajas de plexiglass de 30x20x15 cm. Todos los animales tuvieron acceso libre al alimento (purina micromezcla) y al agua. Cada sujeto fué numerado al azar en la cola, utilizando una numeración binaria. En todos los experimento se emplearon grupos de 5 sujetos.

Los fármacos empleados fueron: Morfina, Acido Gama-aminobutírico (laboratorio Sigma); Baclofen (lioresal) donado por el Laboratorio Ciba Geigy de México; el 4,5,6,7-tetrahidroisoxasol (3-4) piridín-3-ol, el cual fué proporcionado por el Dr. Krogsgard Larsen. Todas estas sustancias se disolvieron en solución salina (laboratorios Fisa) al 0.9%.

Las dosis administradas de estos fármacos por vía intraperitoneal fueron de 1, 5, 10 y 20 mg/kg de peso. Cuando estos mismos fármacos se emplearon por vías subaracnoidea o intracerebroventricular se emplearon dosis de 1, 5, 10 y 20 µg como dosis total.

Las pruebas dolorimétricas empleadas en este estudio fueron: placa caliente a $55 \pm 1^\circ\text{C}$, aplastamiento de la cola en ratón e inmersión de la cola en agua caliente a $50 \pm 1^\circ\text{C}$ en rata.

INMERSION DE LA COLA DE RATA EN AGUA CALIENTE A 50° C

Cada rata se colocó en un inmovilizador de plástico de 19 cm de longitud, 5 cm de altura y 5.7 cm de diámetro, del cual solo quedaba fuera la cola de la rata (Fig. 1). Antes de iniciar cualquier procedimiento experimental, el animal permaneció por 20 minutos en el inmovilizador con el objeto de habituarlo, y así reducir al máximo el estrés provocado por esta situación. Posteriormente, se procedió a introducir los últimos 5 cm de la cola de la rata en un vaso de precipitado de 100 ml que contenía agua caliente a $50 \pm 1^\circ$ C. Tal procedimiento provoca el retiro brusco de la cola del animal. El tiempo de latencia se consideró al tiempo que transcurrió entre la inmersión de la cola en agua y el retiramiento de esta. Tal parámetro fue registrado electrónicamente, empleando un cronómetro digital modelo grabb-lab 3000, el cual detecta hasta centésimas de segundo. En la fase control antes de administrar cualquier fármaco, se realizaron 3 mediciones cada 5 min. Después el animal se retiró del inmovilizador para administrarse el fármaco o en su caso una solución control, ya sea por vía intraperitoneal, intracerebroventricular o subaracnoidea. Inmediatamente después se introducía nuevamente el animal en el inmovilizador. La prueba dolorimétrica era repetida posteriormente cada 5 min durante un lapso de 45 min. Con la finalidad de no provocar una lesión orgánica en la cola, decidimos que si un animal no retiraba su cola del agua en los primeros 30 seg, la prueba finalizaba entonces.

PRUEBA DE LA PLACA CALIENTE A 55° C EN RATON

Cada ratón fue levantado por la cola, y colocado sobre la superficie de un aparato de Hot-Plate (modelo Hp-A1915B type Sybron/Thermolyne), de 16 x 16 cm, mantenida a una temperatura de $55 \pm 1^{\circ}\text{C}$. En el momento en que el animal era colocado en la placa caliente, se ponía en marcha un reloj digital modelo grabb-lab 3000, el cual era detenido cuando el animal se lamía las patas delanteras. Cuando los sujetos mostraban esta conducta eran retirados inmediatamente de la placa. También en esta prueba, si durante los primeros 30 seg el ratón no mostraba tal conducta, el animal era retirado para evitar la presencia de un daño orgánico. Dos mediciones de control con intervalo de 5 min cada una se efectuaron a cada animal previos a la administración de los fármacos, posteriormente el animal era colocado en la placa caliente a los 5, 10, 20, 30, 40, 50 y 60 min después de administrado alguno de los fármacos.

• APLASTAMIENTO DE LA COLA EN RATON

Los ratones se colocaban sobre una rejilla de acero de 17 x 17 cm, se pinza la cola del animal a 1 cm de su raiz con una pinza arterial. Bajo estas condiciones el animal se voltea y muerde la pinza. El tiempo de respuesta se considero como el tiempo que transcurre entre el pinzamiento de la cola, y cuando el animal muerde la pinza. Tal parámetro también fué registrado en un cronómetro digital marca Grabb-lab 3000. Antes de administrar cualquier fármaco por alguna de las vías de administración señaladas se realizaron 2 mediciones del tiempo de respuesta como control. Posteriormente se pinzó la cola a los 5, 10, 20, 30, 40,

50 y 60 min después de la administración del fármaco. Si el animal no respondía al aplastamiento de la cola dentro de los primeros 30 seg. se le retiraba la pinza para evitar lesionar orgánicamente al animal.

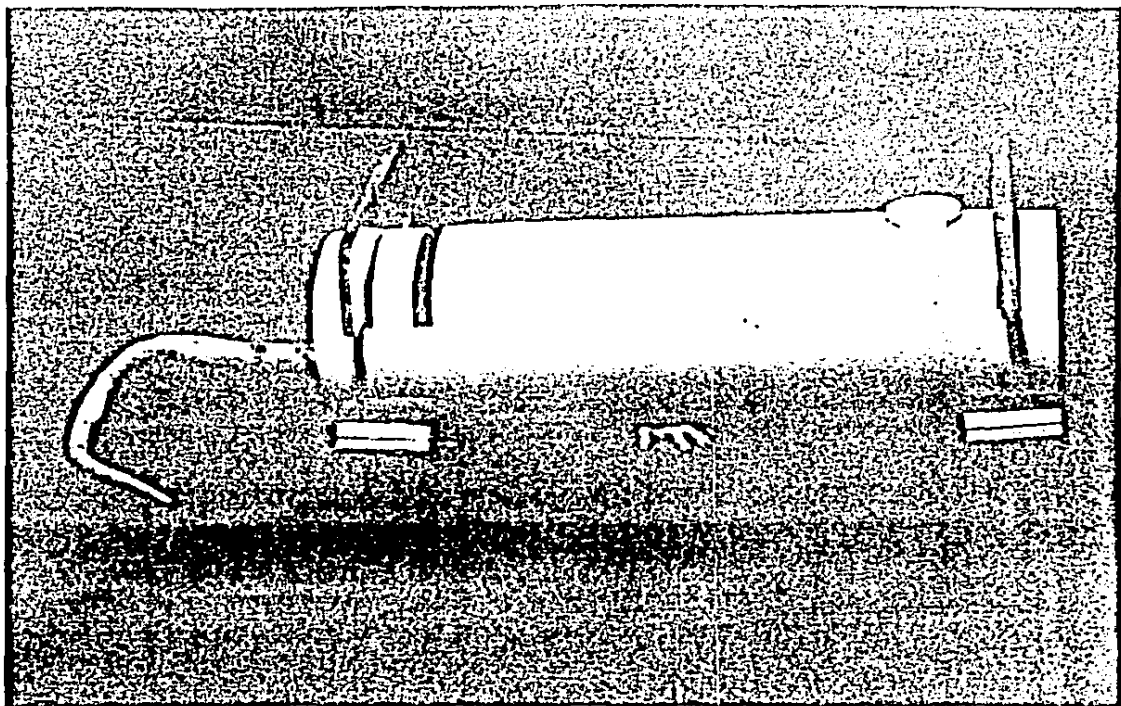


FIG. 1

IMPLANTE DE CANULA INTRACEREBROVENTRICULAR EN RATA Y RATON.

Se empleó un método de implantación de cánulas intracerebroventriculares el cual permite después de pocos días de la cirugía, la administración crónica de sustancias a nivel del ventrículo lateral. En este método, desarrollado para las ratas por Packard (52) y para ratón por G. Boschi (12), las cánulas están hechas de acero inoxidable y usualmente poseen una longitud de 1.5 mm y un diámetro de 0.4 mm. Antes de su uso estas cánulas son tratadas con benzal.

Las cánulas se colocan en una sesión quirúrgica, para ello los animales son anestesiados por la vía intraperitoneal con pentobarbital sódico (35 mg/kg). La superficie de la cabeza es rasurada y el animal es fijado en un aparato estereotáxico. Se procede entonces a realizar antisepsia de esta región con benzal. Posteriormente se realiza una incisión longitudinal caudal de 3 cm extendiéndose entre las orejas de la rata, y 2 cm en el ratón a nivel de la línea media del cráneo, entonces la fascia es retraída y fijada.

Utilizando el atlas estereotáxico para rata de Koning y Klippel (39) se localizaron las coordenadas del ventrículo lateral izquierdo (2 mm posterior a Bregma y 1 mm lateral de la línea media), sobre este punto se realiza una trepanación y la cánula es introducida a una profundidad de 3.5 mm. Posteriormente se realizan otras 2 trepanaciones, 1 cm separadas de la primera, en los cuales se procede a la colocación de dos tornillos. Tanto la cánula como los tornillos son fijados al cráneo con cemento acrílico dental. Cuando el cemento se fraguó se pasaron 5 μ l de solución salina durante 2 min para determinar la permeabilidad de

las cánulas. El animal se colocó en jaulas de manera individual, y se le permitió recuperarse de la cirugía durante 2 a 3 días, tiempo en que no se realizó prueba dolorimétrica alguna.

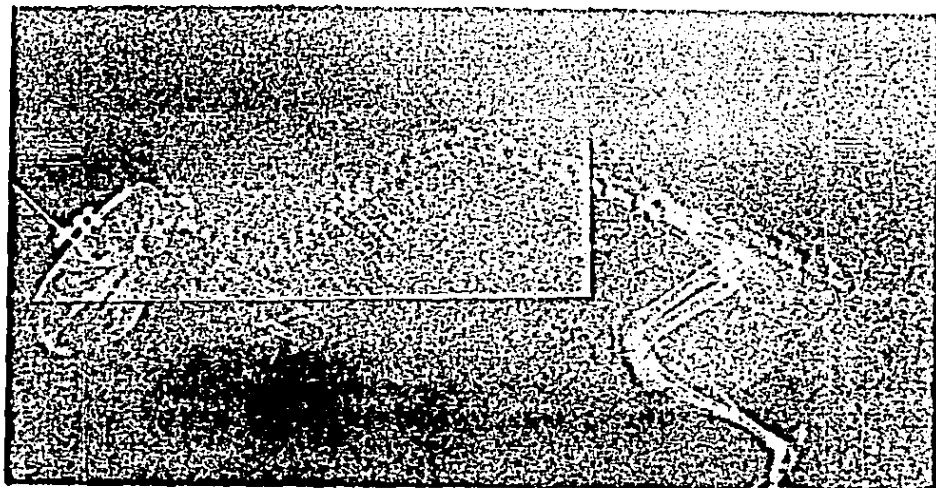


FIG. 2

En ratón, la colocación de las cánulas se realizó de acuerdo a las coordenadas descritas por G. Boschi (12), las cuales son 3.9 anterior a lambda; 1.1 mm lateral a la línea media y 2 mm de profundidad. El resto del procedimiento es el mismo que el empleado para la rata. Para determinar la permeabilidad de las cánulas se pasaron durante 60 seg 2 μ l de solución salina por

todas las cánulas.

La verificación de la colocación de las cánulas se realizó por medio de una radiografía expuesta cuando se administraba medio de contraste o aire (Fig. 2 y 3)

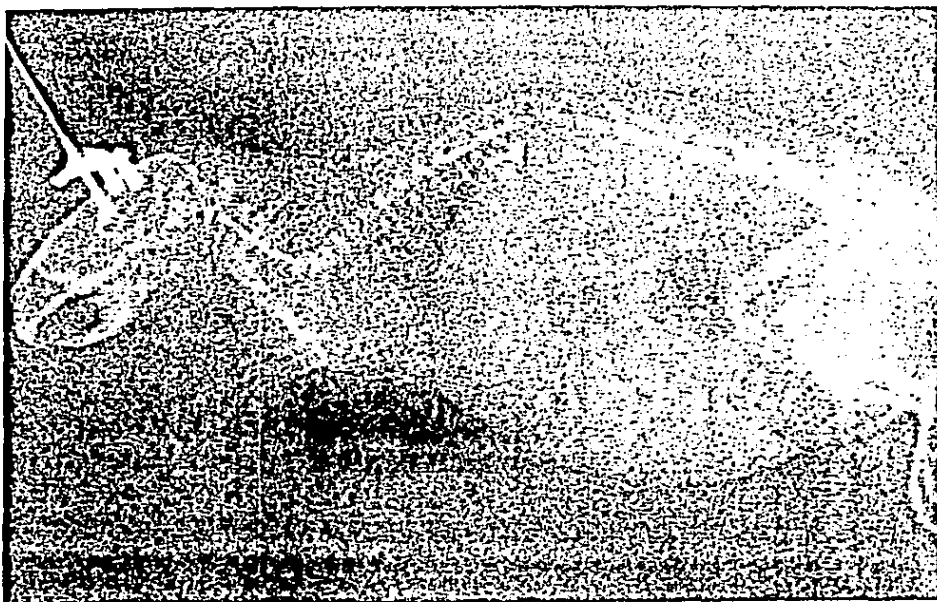


FIG. 3

CATERIZACION CRONICA DEL ESPACIO SUBARACNOIDEO EN RATA

Este procedimiento se realizó conforme a la técnica descrita por Yaksh T. (74). Se empleo tubo de polietileno (PE-10), con una longitud de 10 cm y un diámetro de 0.3 mm. Antes de ser utilizado este cateter fué esterilizado. Su colocación se realizó a través de la luz de una aguja del número 22 la cual servía como guía.

La cateterización crónica también se realizó en ratas

anestesiadas con pentobarbital sódico (35 mg/kg). Una vez en anestesia quirúrgica, a los animales se les rasuró el cráneo y se colocaron en un aparato estereotáxico marca David Kopf. Se realizó antisepsia del cráneo y se practicó una incisión en la línea media del cráneo extendiéndose entre las orejas y a 4 cm caudal a bregma. La fascia se retrajo del cráneo, así como también los músculos de la nuca, los cuales se fijaron firmemente. Después de esta maniobra, quedó expuesta la base del cráneo y la primer vertebra cervical. Entonces se localizó la articulación atlanto-occipital y con la punta de la aguja que contiene al cateter de polietileno, se perforó la membrana localizada en esta articulación, y se pasó lentamente 4 cm del cateter, lo cual una vez realizado permitió que se retirara la aguja que sirvió como guía. Cuando la perforación se realiza correctamente existe una pequeña salida de líquido cefalorraquídeo. Debe tenerse considerable cuidado al perforar la membrana pues es posible dañar la superficie dorsal de la médula espinal. Cualquier resistencia al paso del cateter puede ser atribuible a un ángulo de inserción incorrecto, punción incorrecta de la dura madre u obstrucción del paso por raíces de nervios espinales. Una vez introducido el cateter se fija a los músculos de la nuca con sutura inabsorbible (nylon 5-0) y se procede a cerrar piel con sutura de algodón. Para determinar la permeabilidad del cateter se introducen a través de él 5 µl de solución salina en 2 min. Al animal se le permitió recuperarse de 2 a 3 días antes de iniciar cualquier experimento.

La correcta colocación del cateter fue verificada una vez

terminados los experimentos. Para ello se introdujo por el cateter de 5 a 8 μ l de medio de contraste y se toma una placa de rayos X.

Aunque la longevidad de la rata con el catéter empleando la técnica descrita es buena, en algunos animales se puede presentar decamulación, y desarrollo de problemas motores como parálisis de los cuartos traseros.

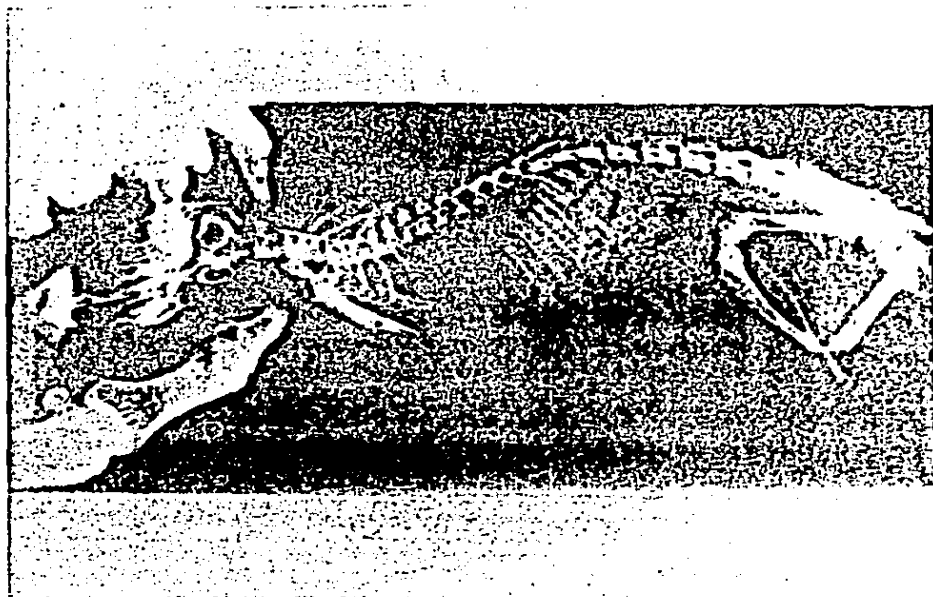


FIG. 4

LESION DEL TALAMO MEDIAL, RAFA DORSAL Y SUBSTANCIA GRIS
PERIAQUEDUCTAL EN RATA

La lesión de cualquiera de estas porciones del Sistema Nervioso Central se realizó utilizando un electrodo de acero

inoxidable (360 μ m), recubierto con teflón. El animal fue anestesiado con pentobarbital sódico (35 mg/kg) por vía intraperitoneal. Cuando el sujeto se encontraba en una etapa de anestesia quirúrgica, se procedió a rasurar el cráneo y posteriormente la cabeza se colocó y se fijó en un aparato estereotáxico (David Kopf). Se realizó antisepsia de la región con benzal y posteriormente se realizó una incisión longitudinal de 3 cm a nivel de la línea media del cráneo; se retrajo y se fijó la fascia. Cuando la superficie del cráneo se encuentra limpia se realiza un trépano en los puntos elegidos de acuerdo al atlas de Koning. Por ejemplo, para lesionar el tálamo medial se utilizan los puntos, 3.7 mm posterior a bregma y sobre la línea media se introduce el electrodo de lesión a una profundidad de 5 mm. El polo negativo del estimulador se coloca en el recto del animal y el polo positivo se coloca en el electrodo de lesión, mientras se pasa una corriente de 5 mA por 30 seg a través de un generador de corriente directa (Lesion Maker Grass). La misma operación se efectuó para lesionar los núcleos del rafe dorsal (Coordenadas 6.5 mm posterior a bregma y 7 mm de profundidad) y la sustancia gris periacueductal (coordenadas 7.0 mm posterior a bregma y 4.3 mm de profundidad). Una vez que la lesión se realizó, el trépano se cubre con cera para hueso, y se sutura la piel con nylon 5-0. Antes de iniciar cualquier prueba dolorimétrica se le permite al animal recuperarse del acto quirúrgico durante al menos 3 días. Tanto la extensión como el sitio exacto en que se realizó las diferentes lesiones se determinan por técnicas histológicas realizadas en los cerebros de estos animales.

ANALISIS DE LOS DATOS

Para comprobar la existencia de diferencias significativas entre el grupo que recibió solución salina, y aquellos que recibieron los fármacos se empleó una prueba de análisis de varianza (ANOVA) cuando esta mostró la existencia de diferencias significativas, entonces se empleó la prueba de Dunnett para determinar los grupos que provocaban tal diferencia.

Así también, para comparar los resultados encontrados en el grupo sin lesión que recibió los fármacos, con los provenientes de los grupos con lesión que recibieron los fármacos se empleó también el análisis de varianza (ANOVA) y la prueba de T de Student.

Para tal efecto se empleó un paquete estadístico llamado Statgraf el cual fue corrido en una microcomputadora Printaform.

Para realizar la graficación de los resultados obtenidos se empleó el paquete estadístico Chart Maker, el cual también fue corrido en una microcomputadora Printaform.

RESULTADOS.

En 17 de los 57 animales empleados, los cuales fueron sometidos a cateterización crónica del espacio subaracnoideo se presentaron alteraciones motoras como, hipotonía muscular generalizada y parálisis de los cuartos traseros. Estos 17 animales fueron eliminados del estudio debido a que estas lesiones fueron irreversibles. Cinco de estos 57 animales con cateter subaracnoideo, al presentar un adicalamiento vigoroso se extrajeron el cateter, estos animales también fueron eliminados de nuestra muestra. En el resto de los animales no se observó alteración motora alguna. Aproximadamente a las 48 hs la conducta de estos animales general fue indistinguible de los sujetos no cateterizados.

Por otra parte, 8 de las ratas sometidas a lesiones ya sea del tálamo medial o de los núcleos del rafé, presentaron un estado de hiperactividad caracterizado por la presencia de giros hacia el lado derecho, saltos, además se proyectaban y golpeaban contra las paredes de las cajas de plexiglass donde fueron colocadas. Estas alteraciones las cuales se iniciaban inmediatamente después de que la anestesia se desvanecía, duraban varias horas y desaparecían completamente después de 12 hs. De 2 a 3 días después, los animales se comportaban de igual manera que los controles.

Ni la colocación de las cánulas intracerebroventriculares, ni la lesión de la sustancia gris periacueductal provocaron alteraciones motoras o conductuales observables en estos animales.

Al inicio de cualquiera de las pruebas dolorimétricas todos los animales, independientemente del tipo de manipulación quirúrgica

que recibieron, mostraron condiciones motoras muy similares a las desplegadas por los sujetos controles. Es decir, podían saltar, comer por sí mismos, y mostrar conductas estereotipadas típicas.

En términos generales, tanto la aplicación de Baclofen como de THIP y a diferencia de la de GABA y de morfina, provocó efectos motores observables. Estos efectos motores consistían en sacudidas de todo el cuerpo, hipotonía muscular generalizada y ocasionalmente se presentaron signos de sedación. Estos efectos, los cuales se presentaban únicamente con las dosis más altas, se iniciaban generalmente entre 15 y 25 min después de la administración y persistían por más de una hora. Aproximadamente el 8% de los animales mostraron tales efectos motores. A pesar de ello, estos animales fueron capaces de responder ante la presencia de estímulos nociceptivos. La administración de baclofen por vía intraperitoneal a dosis de 20 mg/kg en la prueba de inmersión de la cola, indujo en 3 ratas alteraciones motoras como sacudidas de todo el cuerpo e hipotonía muscular de los cuartos traseros, la cual impedía que los animales se desplazaran.

También, después de la administración de 5 y 10 µg de baclofen por vía ICV se presentó piloerección generalizada, los animales se acicalaban y tendían a girar hacia la izquierda. En esta misma prueba, la administración de 20 µg de THIP provocó hipotonía muscular de los cuartos traseros en 2 ratas.

La administración subaracnoidea de 20 µg de THIP en ratas originó hiperextensión de los cuartos traseros, tambor en todo el cuerpo y piloerección generalizada, misma que desapareció después de 1 hr.

En el caso de los ratones, la administración intraperitoneal de

20 mg/kg de baclofen provocó en 2 de los 5 animales empleados, temblores generalizados, mientras que la aplicación de 20 mg/kg de Thip indujo sacudidas musculares en los cuartos traseros. Ambos efectos desaparecieron a los 30 min aproximadamente. La administración de 20 µg de baclofen provocó hipotonía muscular de todo el cuerpo, la cual en el caso de un animal le impedía caminar. Sin embargo, este mismo animal respondió en una latencia similar a los sujetos controles a los estímulos nociceptivos. La administración de 10 y 20 µg de THIP por esta misma vía indujo piloerección y temblor de todo el cuerpo, disminución de su conducta exploradora y estiramiento de los cuartos traseros.

INMERSION DE LA COLA DE LA RATA.

En los animales, controles la introducción de los últimos 5 cms de la cola en agua caliente a $50 \pm 1^\circ\text{C}$, provocó una reacción de retiramiento de aproximadamente 7.7 seg en promedio. Esta reacción se caracterizó por un encogimiento brusco de la cola, el cual se realizaba en aproximadamente 300 mseg y fué bastante constante a lo largo de todos los experimentos. En el 1% de los animales se presentó vocalización conjuntamente con el retiramiento de la cola.

La administración intraperitoneal de baclofen provocó un incremento de la latencia de respuesta en forma creciente con la dosis, este efecto alcanzó los 26.3 seg ($P < 0.005$) después de una dosis de 20 mg/kg. La dosis de 10 mg/kg provocó un incremento hasta de 19.5 seg ($P < 0.025$), mientras que con 5 mg/kg esta latencia analgésica sólo fue de 13.3 seg, la cual no es diferente

estadísticamente de la fase control (Fig. 5). Este efecto del baclofen se inicio 15 min después de su administración y perduró durante los 35 min restantes de la prueba. Este incremento en la latencia provocadas por el baclofen fueron consecuencia de una mayor permanencia de la cola en el agua, puesto que el tiempo utilizado por el animal para retirar la cola empleando un encogimiento brusco (300 msec) de la misma, no se modificó.

La administración de THIP o GABA en dosis de hasta 20 mg/kg en esta prueba dolorimétrica, no produjeron efectos significativos alguno sobre los tiempos de latencia.

Por su parte, la morfina administrada por vía intraperitoneal produjo un aumento de la latencia máximo de 26.1 seg ($P < 0.005$) en dosis de 20 mg/kg. La administración de 5 y 10 mg/kg incrementó la latencia, de 8.8 seg obtenidos en la fase control, a 15.9 seg ($P < 0.01$) y 20 seg ($P < 0.005$), respectivamente (Fig. 5).

Cuando los fármacos fueron administrados por vía intracerebroventricular en la misma prueba dolorimétrica, sólo el GABA y la morfina mostraron acciones analgésicas. Ni el baclofen ni el THIP mostraron algún efecto significativo en las dosis administradas. En el caso del GABA, sólo con la dosis de 20 µg se provocó un incremento de la respuesta analgésica de 11.6 seg en la fase control, hasta 18.3 seg ($P < 0.01$) (Fig. 5). El inicio de este efecto GABAérgico se presentó desde los 15 min posteriores a su administración, observandose durante los siguientes 30 min.

La administración de morfina en dosis de 10 y 20 µg provocó incrementos significativos en la latencia, con 20 µg ésta fue de 23.5 seg ($P < 0.005$) contra 11.5 seg registrado en la fase control. Diez µg de morfina incrementaron el tiempo de latencia hasta 20.1

seg ($P < 0.025$). Estos efectos se presentaban a los 10 min posteriores a la administración, la cual es menor que la mostrada por los agentes GABAérgicos.

La administración subaracnoidea de GABA y Baclofen en las dosis administradas, provocaron incrementos en los tiempos de latencia, los cuales no fueron diferentes estadísticamente. En este tipo de administración sólo el THIP en dosis de 20 μ g ($P < 0.05$) y de la morfina en dosis de 10 ($P < 0.05$) y 20 μ g ($P < 0.05$) mostraron un incremento en las latencias analgésicas.

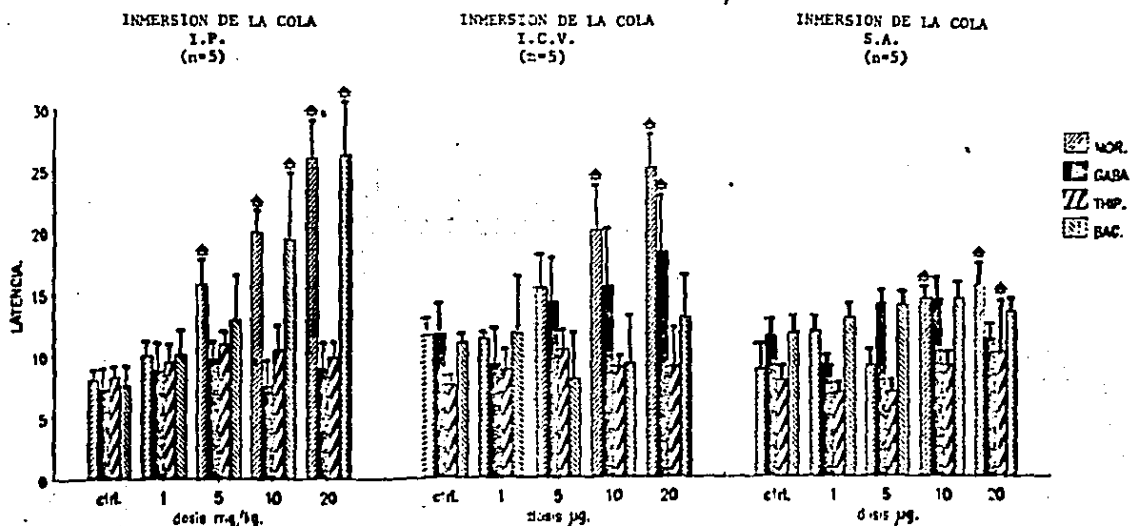


FIG. 5

APLASTAMIENTO DE LA COLA DEL RATÓN.

La colocación de la pinza arterial a 1 cm de la raíz de la cola del ratón provocó en estos animales una reacción motora vigorosa que incluso en el 5% de los sujetos se acompañaba de vocalización. La respuesta más frecuente fue una conducta de giro hacia alguno de los lados, con el intento de morder la pinza, y una vez realizado esto, tiende a correr hacia cualquier dirección del campo de experimentación. La aplicación subsecuente de esta prueba a los sujetos los convertía en sujetos difíciles de manipular por su tendencia a huir. La latencia en esta prueba de los animales controles de los animales en la fase control oscilaba entre 1.9 hasta 3.8 seg. La administración intraperitoneal tanto de baclofen como de THIP en dosis de 10 y 20 mg/kg provocó, un incremento significativo de la latencia (Fig. 6).

En el caso del baclofen este efecto relacionado con la dosis alcanzó valores con 10 y 20 mg/kg de hasta 6.7 y 9.1 veces el valor control ($P < 0.05$). Por su parte el efecto del THIP a esta misma dosis, provocó un incremento de 7.1 veces el valor de la latencia control ($P < 0.05$). Nuevamente el GABA administrado por vía I.P. no ejerció efectos significativos alguno (Fig. 6). La administración de morfina provocó incrementos importantes en dosis de 10 y 20 mg/kg ($P < 0.025$) (Fig. 6). Comparativamente en esta prueba dolorimétrica y por esta vía de administración los fármacos GABAérgicos THIP y Baclofen provocaron un efecto más importante al provocado por la morfina.

Cuando la administración de estos fármacos se realizó por vía intracerebroventricular, el agente más potente resultó ser la

morfina. Dosis de 5, 10 y 20 μg provocaron incrementos de hasta 13.3, 13.0 y 22.6 seg respectivamente, que comparados con la latencia registrada en condiciones controles, la cual fue de 2 seg, arrojó una $P < 0.005$. En relación a los agentes GABAérgicos, estos mostraron un efecto menor. Por su parte la administración de GABA no provocó efectos significativos alguno. Sólo las dosis de de 20 μg de Thip ($P < 0.005$) y Baclofen ($P < 0.005$) mostraron incrementos significativos.

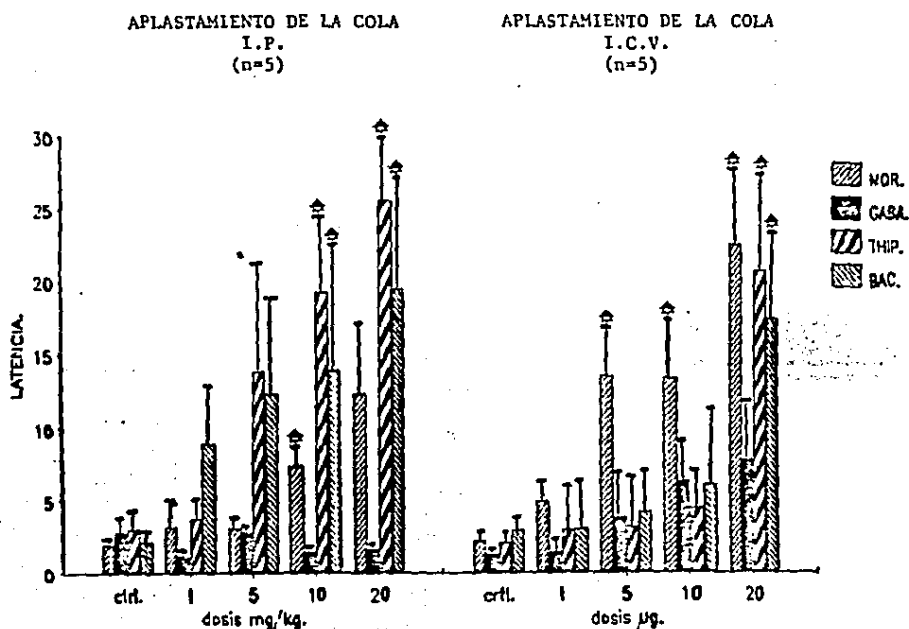


FIG. 6

PLACA CALIENTE EN RATON.

La colocación del ratón en el área de la placa caliente prevoco también respuestas inmediatas vigorosas en la conducta motora de

estos animales. La reacción inmediata a la colocación, fue el retiramiento de las extremidades de la superficie caliente, generalmente las extremidades que se retiraban fueron las anteriores, aunque en algunos casos el animal tendía a levantar alguna de sus extremidades posteriores. Usualmente, después de levantar las extremidades anteriores el animal se las lamía, conducta ésta que constituía el punto final de la latencia, que se registraba. En estas circunstancias, el animal también frecuentemente mostraba saltos vigorosos, los cuales provocaban que el sujeto chocara con el techo de la cubierta del aparato empleado en esta prueba dolorimétrica. El grado de vocalización fue del 20%, lo cual es mucho mayor que el observado en las otras pruebas dolorimétricas. La respuesta emocional de los sujetos en esta prueba, fue más intensa, que la mostrada por los animales empleados en las otras pruebas dolorimétricas. La manipulación posterior de estos animales, resultó mas conflictiva, básicamente por un incremento en su agresividad.

La administración intraperitoneal de GABA no indujo efecto alguno en esta prueba (Fig. 7). Por su parte los otros agentes GABAérgicos en dosis de 10 y 20 mg/kg mostraron un efecto significativo. Para el grupo tratado con baclofen, los valores controles fueron de 2.5 seg y se incrementaron hasta 17.2 ($P < 0.05$) y 20.4 ($P < 0.025$) seg después de la administración de 10 y 20 mg/kg respectivamente. En el caso del THIP, las latencias controles registradas tuvieron una media de 2.4 seg, y los valores registrados después de su administración de 10 y 20 mg/kg fue de 14.5 ($P < 0.05$) y 20.9 ($P < 0.01$) seg. Cuando se compararon las

latencias encontradas después de administrar 10 y 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de morfina, las cuales fueron de 17.2 y 18.2 seg, respectivamente, con la latencia contenida en la fase control, se observó una diferencia estadística con una $P < 0.05$, para ambos casos (Fig. 7).

En el caso en que estos fármacos se administraron por vía intracerebroventricular, se observó que el baclofen provocó efectos significativos a dosis de 20 μg ($P < 0.05$). La respuesta al THIP fue también pobre y sólo una dosis de 20 μg logró provocar una respuesta significativa con una $P < 0.01$. Sin embargo, tanto el GABA como la morfina provocaron efectos significativos con dosis de 5, 10 y 20 μg . Particularmente el GABA, provocó un aumento en meseta desde los 5 μg . Para el grupo tratado con GABA, los valores controles fueron de 7.4 seg y se incrementaron hasta 11.7 ($P < 0.025$), 11.9 seg ($P < 0.025$) y 12.5 seg ($P < 0.01$) después de la administración de 5, 10 y 20 μg , respectivamente (Fig. 7). La morfina provocó su efecto máximo con una dosis de 10 μg y una $P < 0.005$.

RESULTADOS DE ANIMALES CON LESION DEL TALAMO MEDIAL.

El análisis histológico de la lesión del tálamo medial efectuada en 15 animales mostró una variabilidad constante tanto en la extensión como en la cantidad y tipo de estructuras involucradas en ella (Fig. 8). En términos generales estas lesiones mostraron una extensión en las coordenadas anteroposteriores de aproximadamente 1.9 mm, lo cual correspondía a el tálamo medial localizado entre las coordenadas 4890A y 2970A,

según el atlas de Koning y Klippel (39). La lesión se intentó realizar introduciendo el electrodo en la línea media, sin embargo en el 95% de los casos tendió a lateralizarse ligeramente hacia cualquiera de ambos lados.

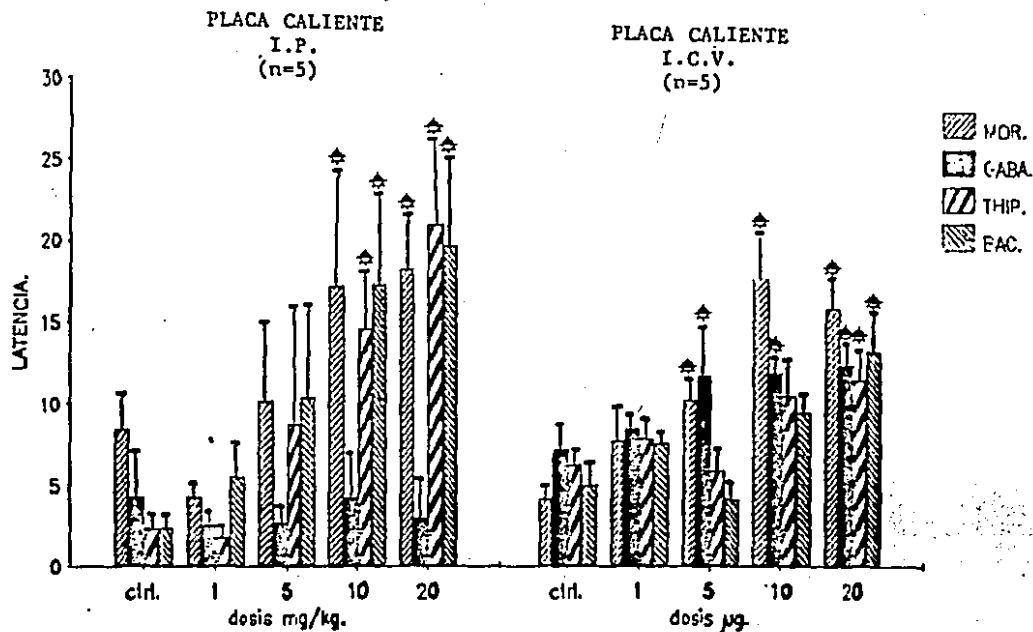


FIG. 7

En su mayoría, la extensión lateral de las lesiones fue cercana a 2.6 mm mientras que la extensión de la lesión en el sentido de altura fue de 2 mm. Las estructuras involucradas en estas lesiones fueron todas ellas diencefálicas y comprendían a los siguientes núcleos, la casi totalidad de los núcleos mediales talámicos, tanto anterior como lateral, el núcleo talámico posteromedial, porciones del tálamo ventromedial, la totalidad del

núcleo parafascicular y del núcleo centro mediano. Finalmente se encontró lesiones en los núcleos del complejo habenular, de la estria medularis y del fascículo retroflexus (Fig. 8). Toda esta nomenclatura esta definida también de acuerdo al atlas de Koning y Klippel (39).

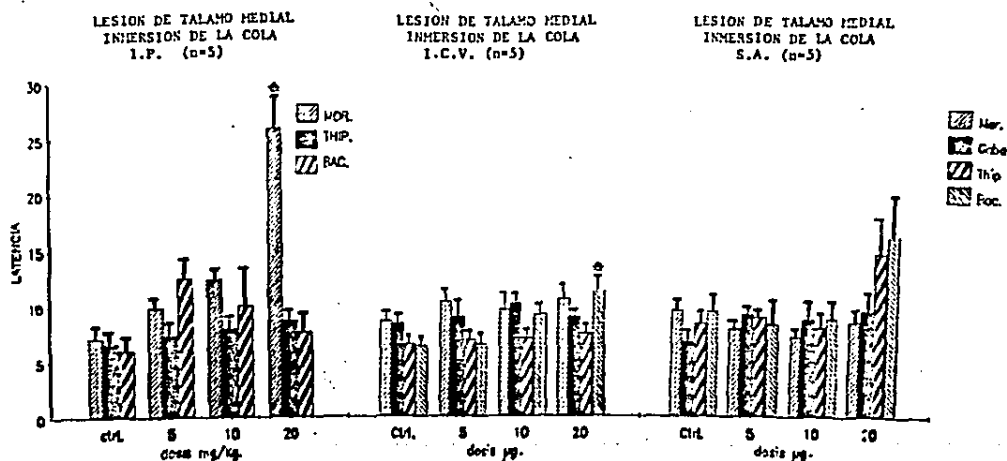


FIG. 9

La aplicación intraperitoneal de morfina en la fase control en animales con lesión del tálamo medial aún provocó un incremento significativo ($P < 0.005$) en la latencia analgésica. Este incremento consistió en aumentar la latencia control de 7.1 seg hasta 25.8 seg ($P < 0.005$) con la dosis de 20 mg/kg. Por el contrario, la administración por la misma vía de administración tanto de

baclofen como de THIP no provocaron modificaciones significativas en la latencia que los animales mostraron en esta prueba (Fig. 9).

La administración de estos fármacos por la vía intracerebroventricular en animales con lesión del tálamo medial provocó efectos diferentes a los encontrados cuando se empleó la vía intraperitoneal. Así la administración de morfina no provocó efecto analgésico alguno. En el caso de los fármacos GABAérgicos únicamente el baclofen indujo efectos significativos. La latencia registrada en la fase control fue de 6.4 seg y se incrementó hasta 10.7 seg ($P < 0.005$) cuando se administró el baclofen en dosis de 20 μ g (Fig. 9).

Por otra parte, el empleo de la vía subaracnoidea para la administración tanto de GABA, baclofen Thip y morfina, en animales con lesión talámica, no modificaron en forma significativa la latencia analgésica registrada en la fase control. Sin embargo, las dosis más altas de THIP y Baclofen provocaron incrementos importantes de esta respuesta, aunque la dispersión del efecto fue muy alta, lo que provocó que al comparar estos datos con los valores controles no se encontraran diferencias estadísticas. Con este tipo de administración nuevamente, la morfina no provocó modificaciones en la latencia de respuesta (Fig. 9).

RESULTADOS DE ANIMALES CON LESION DEL RAPE DORSAL.

En su totalidad de los 15 animales lesionados en el núcleo del rafe dorsal, el análisis histológico mostró la desaparición de

este núcleo. La extensión anteroposterior de las lesiones ocurrió desde 5.68 hasta 6.5 mm posteriores a Bregma lo que corresponde a A 1760 y P 840. La lesión se extendió generalmente de 1 a 1.3 mm lateralmente y de .8 a 2 mm en el sentido de altura. La lesión tendió a dirigirse más hacia la parte ventral que a la dorsal. Las estructuras lesionadas además del núcleo del rafe dorsal fueron, la parte caudal del núcleo oculo motor, el núcleo principal oculo motor, el fascículo longitudinalis medialis, la parte caudal del núcleo linearis, la porción superior de los pedúnculos cerebrales superiores de la formación reticular y la porción dorsal del núcleo del rafe mediano (Fig. 8).

La lesión de los núcleos del rafe dorsal no suprimió los efectos de las dosis de 20 mg/kg de los fármacos GABAérgicos ni de la morfina, cuando éstos fueron administrados intraperitonealmente. El baclofén modificó las latencias analgésicas desde 5.8 seg, obtenidos en la fase control, hasta 14.64 seg ($P < 0.025$) cuando se administró a dosis de 20 mg/kg. Por otra parte, la administración de 20 mg/kg de THIP no provocó un aumento significativo en la latencia analgésica. En el caso de la morfina su administración en dosis de 10 y 20 mg/kg incrementó la latencia analgésica de 7.5 seg hasta 13.3 ($P < 0.01$) y 24.4 seg ($P < 0.005$), respectivamente (Fig. 10).

La administración intracerebroventricular de estos mismos fármacos en los animales con lesión a nivel de los núcleos del rafe dorsal, mostró que ni la morfina ni el GABA provocaron modificaciones significativas en las latencias analgésicas. Únicamente el baclofen y el THIP en dosis de 20 µg provocaron un incremento en la latencia analgésica. El baclofen la incrementó de

5.6 seg registrados en la fase control, hasta 9.9 seg ($P < 0.01$) obtenidos en la fase postadministración. Mientras que el THIP la incremento de 6.4 seg hasta 9.1 seg ($P < 0.01$) (Fig. 10).

En cambio, la administración subaracnoidea de GABA, de baclofen, de THIP y de morfina en cualquier rango de dosis no produjo modificaciones significativas estadísticamente en la latencia analgésica de esta prueba. Sin embargo, la mayor dosis de GABA empleada, provocó un incremento de esta respuesta, aunque con una amplia dispersión de datos (Fig. 10).

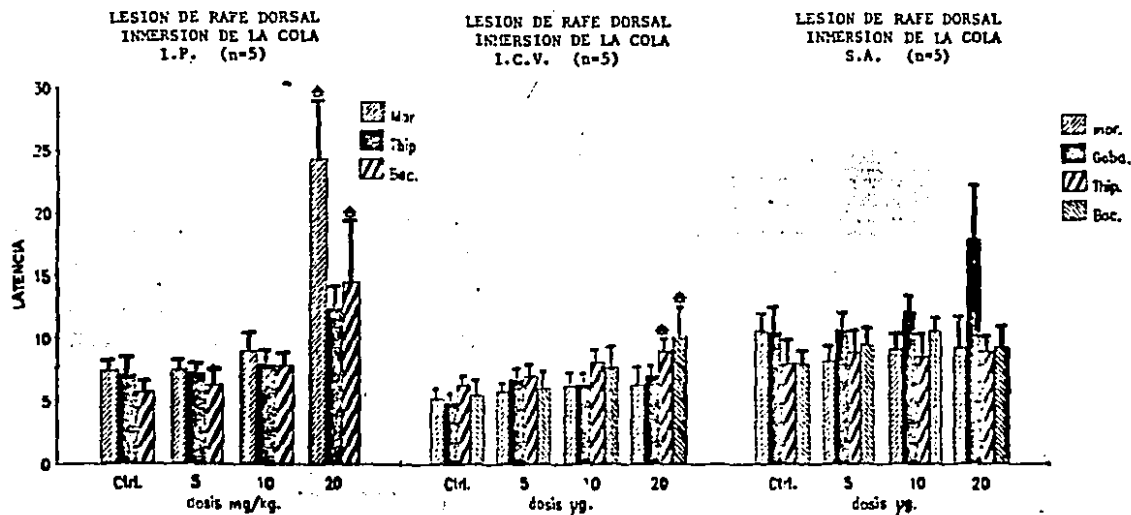


FIG. 10

RESULTADOS DE ANIMALES CON LESION EN LA SUBSTANCIA GRIS
PERIAQUEDUCTAL.

La administración de 5 mA de corriente anódica durante 45 seg en las coordenadas de la sustancia gris periaqueductal, provocó una lesión importante en esta estructura. La extensión anteroposterior de la lesión fue cercana en promedio (n=15) a 2 mm. Mientras que la extensión lateral y de altura fue en promedio de 1.8 y 2.2 mm respectivamente. Se lesionaron estructuras como, la sustancia gris central, tanto en su parte dorsal, lateral y ventral, el fascículo longitudinalis en su porción dorsal, tegmental y tectal, la comisura del fornix dorsal, el núcleo raquídeo dorsal, el núcleo ventralis tegmental y el fascículo longitudinal entre otros.

La administración de baclofen por vía intraperitoneal en ratas lesionadas en la sustancia gris periaqueductal, incrementó en forma significativa la latencia analgésica de los animales sometidos a la prueba de inmersión de la cola. En la fase control se registró una latencia promedio de 6.5 seg, la cual se incrementó hasta 16.4 seg ($P < 0.005$) con el empleo 20 mg/kg de baclofen. Sin embargo, la administración por esta vía de THIP no modificó de manera significativa a esta latencia. Por su parte la administración de 20 mg/kg de morfina a través de la vía intraperitoneal indujo un incremento en esta latencia hasta de 24.3 seg ($P < 0.005$) en contraste con los 6.9 seg registrados en la fase control.

La administración de GABA y THIP a través de la vía intracerebroventricular en animales con lesión de la sustancia

gris periacueductal no mostró alteración significativa alguna de la latencia analgésica en esta prueba. Los valores probabilísticos obtenidos al comparar las latencias encontradas después de la administración de estos fármacos con las obtenidas en la fase control, no fueron estadísticamente diferentes. En contraste la administración intracerebroventricular de 10 y 20 µg baclofen incrementó la latencia analgésica de 6.6 seg obtenido en la fase control, hasta 10.5 seg ($P < 0.01$) y 12 seg ($P < 0.005$) obtenido después de la administración de baclofen. También, la administración de morfina por esta vía, incrementó la latencia analgésica de 6.5 seg hasta 11.5 seg ($P < 0.005$) y 16.2 seg ($P < 0.005$) después de administrar 10 y 20 µg de morfina, respectivamente.

Tanto la administración subaracnoidea de GABA, como de baclofen y de morfina no alteraron significativamente en forma alguna la latencia analgésica de estos grupos de animales sometidos a la prueba de inmersión de la cola. La única diferencia encontrada la provocó la administración de 20 µg de THIP el cual incrementó la latencia analgésica hasta 10.1 seg ($P < 0.005$) contra 6.5 seg de latencia registrada en el grupo control.

En un intento de establecer un análisis comparativo de los efectos provocados por la lesión, decidimos comparar aquellos efectos significativos de los fármacos observados antes de la lesión con los efectos provocados por los mismos fármacos pero ahora después de la lesión (Fig. 11).

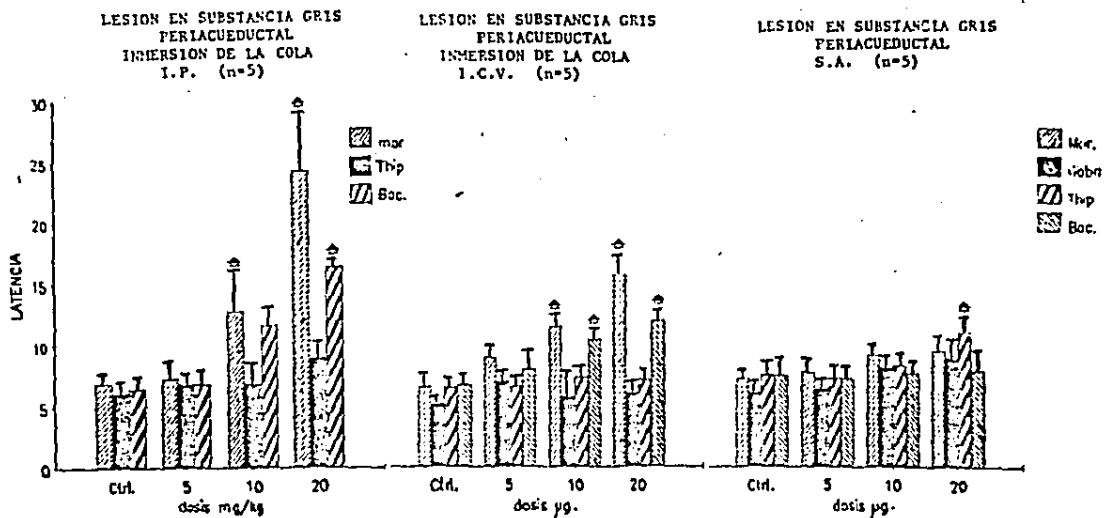


FIG. 11

La figura 12, muestra que los sujetos sometidos a una lesión del tálamo medial desarrollaron una latencia muy similar en la fase control a la observada por los sujetos no lesionados. Contrariamente, la lesión de esta estructura diencefálica modificó la analgesia provocada por baclofen en animales no lesionados. Así, la administración intraperitoneal de 10 y 20 mg/kg de baclofen en el grupo sin lesión, incrementó la latencia hasta 19.54 y 26.38 seg, respectivamente. Mientras que en el grupo lesionado, el empleo de estas dosis, registra una latencia de 10.8 (P<0.05) y 7.7 seg (P<0.05). Por su parte la administración intraperitoneal de 5 y 10 mg/kg de morfina indujeron incrementos hasta de 20.14 seg y 26.12 seg, en tanto que después de lesionar esta estructura las latencias se redujeron a 7.9 seg (P<0.025) y

12.45 seg ($P < 0.01$) (Fig. 12).

La aplicación intracerebroventricular de GABA en sujetos no lesionados provocó efectos analgésicos importantes en esta prueba dolorimétrica (Fig. 12). Sin embargo, cuando esta maniobra experimental se repitió en sujetos con lesión del tálamo medial, los efectos GABAérgicos provocados por las 3 dosis empleadas, desaparecieron. El efecto más notable provocado por la lesión fue el obtenido después de administrar 20 μ g. En este caso, la aplicación de GABA en animales íntegros aumentó la latencia analgésica de 11.6 seg hasta 18.32 seg. Sin embargo, cuando la aplicación de GABA se realizó en animales lesionados el cambio en la latencia fue de 8.4 hasta 8.95 seg ($P < 0.05$). También la administración de morfina intracerebroventricularmente en los animales no lesionados, incrementó la latencia analgésica en esta prueba dolorimétrica. Con dosis de 10 y 20 μ g, la latencia observada fue de 20.12 y 25.16 seg respectivamente. Estas latencias fueron significativamente menores en los animales lesionados, puesto que se redujeron a 9.64 seg ($P < 0.05$) con 10 μ g y a 10.6 seg ($P < 0.005$) con 20 μ g.

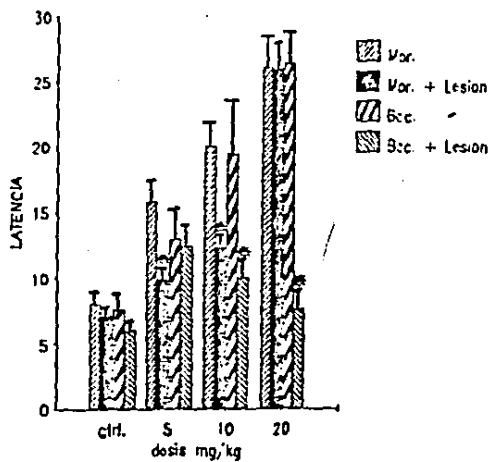
La figura 13 nos muestra los resultados obtenidos después de la lesión de los núcleos del rafe dorsal, como se observa en la porción A de la figura 13. La administración de morfina y baclofen indujeron efectos significativos después de su administración intraperitoneal en animales sin lesión. Cuando esta aplicación se repitió en animales lesionados los efectos tanto de morfina como de baclofen se vieron significativamente reducidos. El efecto más significativo provocado por la lesión fue la reducción de la

acción analgésica del baclofen ($P < 0.025$) y de la morfina ($P < 0.01$) a dosis de 20 y 10 mg/kg respectivamente. En el caso de la aplicación intracerebroventricular en condiciones previas a la lesión tanto el GABA como la morfina provocaron efectos significativos a cualquiera de las 3 dosis empleadas. La lesión provocó en ambos casos una pérdida de cualquier efecto analgésico cuando se administró GABA a dosis de 5 ($P < 0.01$), 10 ($P < 0.01$) y 20 μ g ($P < 0.025$) y morfina también a dosis de 5 ($P < 0.025$), 10 ($P < 0.025$) y 20 μ g ($P < 0.005$) respectivamente (Fig. 13).

Finalmente también se analizó el efecto de la lesión de la sustancia gris periacueductal sobre las acciones analgésicas de estos fármacos. Cuando se administró baclofen por vía intraperitoneal en la condición sin lesión, los animales mostraron un incremento en la latencia analgésica hasta de 19.59 seg y 26.38 seg después de la administración de 10 y 20 mg/kg, respectivamente. Cuando este efecto se estudio en animales con lesión de la sustancia gris periacueductal, la latencia analgésica descendió hasta 17.70 seg y 16.48 seg ($P < 0.025$) con las mismas dosis de 10 y 20 mg/kg, respectivamente. Para el caso de la morfina, el grupo sin lesión que recibió 5 y 10 mg/kg intraperitonealmente, las latencias analgésicas alcanzadas fueron de 15.9 y 20.14 seg, respectivamente. En cambio, cuando la morfina fue administrada a dosis de 5 y 10 mg/kg en animales lesionados, las latencias obtenidas fueron solo de 7.32 seg ($P < 0.01$), y de 12.86 seg ($P < 0.01$). Es decir, solo el efecto provocado por la dosis mas alta, no mostró alteración significativa (Fig. 14). Para el caso del GABA, administrado por vía intracerebroventricular en la fase control se registró una

latencia de 11.68 seg, la cual cuando se administró 5, 10 y 20 µg, se incrementó hasta 14.34 seg, 15.5 seg y 18.32 seg respectivamente. Sin embargo, el grupo con lesión en la substancia gris periacueductal mostró una latencia significativamente diferente desde la fase control, la cual fue de 5.1 seg ($P < 0.01$); en tanto que con la administración de 5, 10 y 20 µg se obtuvieron latencias hasta de 7.02 seg ($P < 0.05$), 5.75 seg ($P < 0.05$) y 6.02 seg ($P < 0.025$). La administración intracerebroventricular de morfina a cualquier dosis empleada provocó un incremento en la latencia. En la fase control la latencia fue de 11.72 seg, después de la administración de 5 µg fue de 15.42, con 10 µg de 20.12 y con 20 µg de 25.16 seg. Sin embargo en el grupo con lesión de la substancia gris periacueductal, estas latencias se redujeron en forma significativa desde la fase control. En la fase control, y después de la lesión se registró una latencia de 6.54 seg ($P < 0.025$), y con las dosis de 5, 10 y 20 µg, las latencias registradas fueron de 8.98, 11.54 y 16.24 seg ($P < 0.025$) respectivamente (Fig. 14).

INMERSION DE LA COLA
 LESION EN TALAMO MEDIAL
 I.P. (n=5)



INMERSION DE LA COLA
 LESION EN TALAMO MEDIAL
 I.C.V. (n=5)

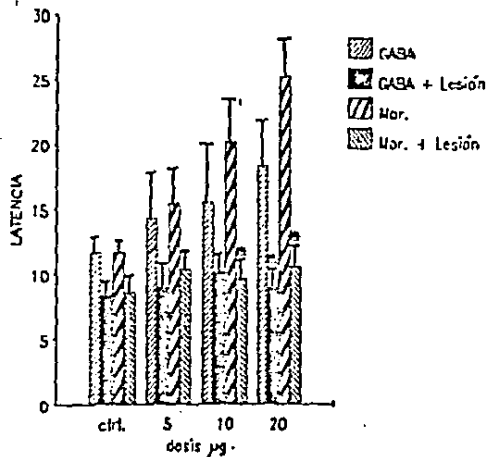
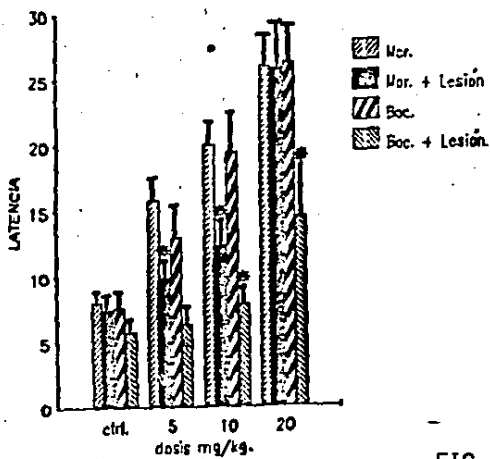


FIG. 12

INMERSION DE LA COLA
 LESION EN RAFA DORSAL
 I.P. (n=5)



INMERSION DE LA COLA
 LESION EN RAFA DORSAL
 I.C.V. (n=5)

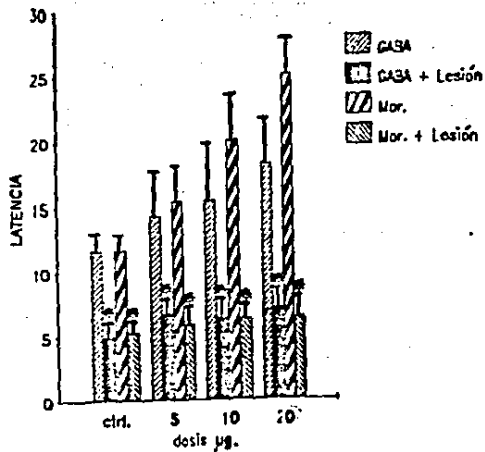
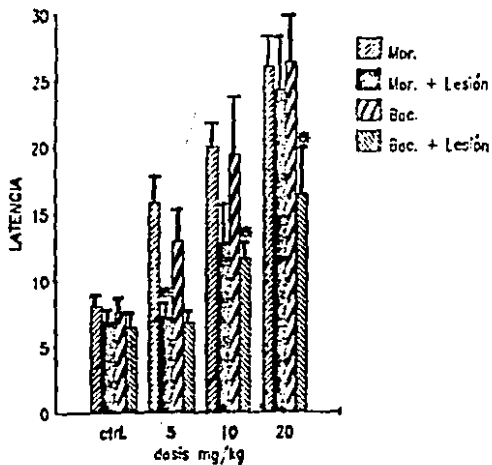


FIG. 13

INMERSION DE LA COLA
 LESION EN SUBSTANCIA GRIS
 PERIACUEDUCTAL
 I.P. (n=5)



INMERSION DE LA COLA
 LESION EN SUBSTANCIA GRIS
 PERIACUEDUCTAL
 I.C.V. (n=5)

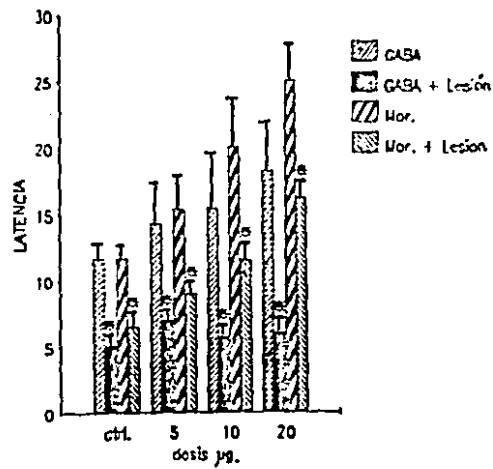


FIG. 14

DISCUSION.

El objetivo propuesto al inicio de este estudio fue el determinar inicialmente si el GABA y fármacos agonistas baclofen y THIP ejercen efectos analgésicos. Determinar las acciones analgésicas provocadas por fármacos o por algunas maniobras experimentales en animales de laboratorio es un procedimiento difícil. El principal obstáculo que complica la tarea es la necesidad de discernir entre la imposibilidad de los animales para responder a los estímulos nociceptivos y un efecto analgésico genuino. El origen de tal problema deriva en que todos los modelos experimentales utilizados para determinar posibles acciones analgésicas, evalúan sólo la respuesta al dolor, la cual está influenciada por múltiples factores ajenos al proceso neurofisiológico de la nocicepción. Entonces, factores tales como el estado de vigilia, el estrés, la velocidad de respuesta muscular, entre otros, son factores extraordinariamente complejos que deben considerarse en este tipo de estudios. Particularmente cuando se utilizan fármacos que pueden modificar a estos mismos factores.

Los resultados obtenidos en el presente estudio muestran que los fármacos GABAérgicos son sustancias capaces de incrementar las latencias de respuesta a estímulos nociceptivos, cuando son administrados a sujetos experimentales de laboratorio, los cuales son sometidos a diversas pruebas dolorimétricas. Estos resultados obtenidos concuerdan con los obtenidos por diversos autores como Levy (43), Wilson (72) y Cutting (16), los cuales también

Modificar en forma significativa la latencia de respuesta a estímulos nociceptivos. Además, es pertinente mencionar que en nuestro estudio los efectos analgésicos provocados por estos fármacos GABAérgicos se obtuvieron con dosis bajas, mientras que las alteraciones motoras encontradas se presentaron únicamente con

mostraron que fármacos como el baclofen y el THIP provocan incrementos significativos en las latencias de respuesta a estímulos nociceptivos; aunque ninguno de estos autores utilizó GABA en sus experimentos.

En el presente estudio se observó que el GABA también posee efectos sobre las latencias de respuesta, cuando se administró por vía intracerebroventricular o subaracnoidea. El GABA no ejerció efecto alguno cuando fue aplicado por vía intraperitoneal, básicamente debido a que esta sustancia por ser un fármaco hidrosoluble no atraviesa la barrera hematoencefálica (44). Por este motivo el GABA no alcanzó a las áreas cerebrales involucradas en la codificación y génesis de la respuesta a estímulos nociceptivos.

Los incrementos de la latencia de respuesta a estímulos nociceptivos provocados por los fármacos GABAérgicos se presentaron en animales que no mostraron alguna alteración motora detectable a simple vista. Sólo en pocas ocasiones, fue posible observar algún signo de flacidez y sacudidas reflejas, las cuales aparentemente no modificaron la respuesta analgésica. Es decir en ocasiones se observaron tales alteraciones motoras en animales con latencias muy similares a los mostrados por los sujetos controles. También la presencia de estas alteraciones motoras sucedió principalmente cuando se empleó la vía de administración subaracnoidea, fue rara con la aplicación intraperitoneal e intracerebroventricular. Únicamente la dosis más alta empleadas fueron las que provocaron tales alteraciones. En ocasiones, estos fármacos GABAérgicos podían provocar alteraciones motoras sin

mostraron que fármacos como el baclofen y el THIP provocan incrementos significativos en las latencias de respuesta a estímulos nociceptivos; aunque ninguno de estos autores utilizó GABA en sus experimentos.

En el presente estudio se observó que el GABA también posee efectos sobre las latencias de respuesta, cuando se administró por vía intracerebroventricular o subaracnoidea. El GABA no ejerció efecto alguno cuando fue aplicado por vía intraperitoneal, básicamente debido a que esta sustancia por ser un fármaco hidrosoluble no atraviesa la barrera hematoencefálica (44). Por este motivo el GABA no alcanzó a las áreas cerebrales involucradas en la codificación y génesis de la respuesta a estímulos nociceptivos.

Los incrementos de la latencia de respuesta a estímulos nociceptivos provocados por los fármacos GABAérgicos se presentaron en animales que no mostraron alguna alteración motora detectable a simple vista. Sólo en pocas ocasiones, fue posible observar algún signo de flacidez y sacudidas reflejas, las cuales aparentemente no modificaron la respuesta analgésica. Es decir en ocasiones se observaron tales alteraciones motoras en animales con latencias muy similares a los mostrados por los sujetos controles. También la presencia de estas alteraciones motoras sucedió principalmente cuando se empleó la vía de administración subaracnoidea, fue rara con la aplicación intraperitoneal e intracerebroventricular. Únicamente la dosis más alta empleadas fueron las que provocaron tales alteraciones. En ocasiones, estos fármacos GABAérgicos podían provocar alteraciones motoras sin

modificar en forma significativa la latencia de respuesta a estímulos nociceptivos. Además, es pertinente mencionar que en nuestro estudio los efectos analgésicos provocados por estos fármacos GABAérgicos se obtuvieron con dosis bajas, mientras que las alteraciones motoras encontradas se presentaron únicamente con el empleo de dosis altas. Al igual, cuando el THIPO el baclofen se administraron por la vía intracerebroventricular o intraperitoneal se presentaron básicamente sólo efectos analgésicos, sin la presencia de alteraciones motoras. Estas observaciones sugieren que los efectos analgésicos de estos fármacos GABAérgicos se producen a nivel supraespinal, mientras que las alteraciones motoras son producidas al activar, estos fármacos, substratos localizados en la médula espinal, tal sugerencia es vertida por otros autores (55).

Aunque con el empleo de dosis mayores de fármacos GABAérgicos, es posible provocar una sedación importante en el animal con flacidez muscular indiscriminada, en nuestro estudio y a las dosis utilizadas no encontramos signos que sugieran la presencia de una conducta de sedación en alguno de nuestros animales.

De cualquier forma aún no es claro si los efectos ejercidos por estos fármacos en relación a la analgesia a dosis bajas son mediados por una acción, la cual es farmacológicamente distinta a la acción responsable de las alteraciones motoras producidas por la administración de dosis altas. Si estas acciones realmente son farmacológicamente diferentes como es postulado por algunos autores, esto sugiere la activación de 2 sistemas GABAérgicos diferentes o bien la presencia de dos fenómenos distintos que

resultan de varios grados de activación de un mismo sistema fisiológico. Tal disociación es aún materia de controversia actual.

Las acciones analgésicas de estos fármacos cada vez son mejor aceptadas dentro de un concepto de actividad dentro del Sistema Nervioso Central. Así estudios previos en nuestro laboratorio (57), mostraron que los agentes GABAérgicos modifican las latencias de respuesta en una forma mucho más específica que la provocada por fármacos, del tipo de los barbitúricos los cuales producen una sedación que puede ser desde leve hasta profunda. Los resultados encontrados en el presente estudio, apoyan aún más la noción de que dentro del espectro de acciones farmacológico inducidas por los agonistas GABAérgicos, se encuentra la analgesia. Aparentemente este es uno de los primeros efectos que se provocan después de la administración de estos fármacos. Esta acción se manifiesta antes que su acción sedante, relajante muscular o anticonvulsiva, y se requiere de una dosis entre 10 y 15 veces menor que la requerida como anticonvulsivante, para desencadenar estas acciones analgésicas.

Otros estudios muestran que las acciones analgésicas GABAérgicas no son mediadas por sistemas opioides (56). Existe además una correlación electrofisiológica en la que se observa que no existen interacciones entre los efectos ejercidos por estos fármacos y los opioides (44). En nuestro estudio aunque no usamos antagonistas para intentar discriminar interacciones entre mecanismos opioides y GABAérgicos, existen datos que nos sugieren, que se trata de mecanismos diferentes. Por ejemplo, la intensidad

del efecto realizado, en latencia, su vulnerabilidad a las lesiones etc.

Actualmente, también se discute sobre los sitios de acción donde el GABA ejerce este efecto analgésico, lo cual es también uno de los objetivos del presente estudio.

Algunos autores sugieren que puede existir una influencia analgésica, por parte de estos fármacos a nivel espinal. Así Saito (62) mostró que el baclofen es un potente inhibidor espinal de la sustancia P; la cual es una sustancia involucrada en la transmisión del dolor con altas concentraciones a nivel de las astas posteriores de la médula espinal. Otros autores sugieren que el sitio de acción de estos fármacos puede ser tanto a nivel espinal como cerebral (45).

La capacidad de los fármacos GABAérgicos para provocar analgesia cuando se administran en alguno de los ventrículos laterales cerebrales, sugiere que las áreas analgésicas afectadas por estos fármacos se localizan cerca de estas zonas. Así, después de 10 a 15 min de la aplicación intracerebroventricular, estos fármacos prolongan la latencia en todas las pruebas dolorimétricas empleadas. Este tiempo, el cual sólo es suficiente para provocar una difusión cercana de aproximadamente 3 a 5 mm, sugiere que el GABA así como sus agonistas, activan substratos antinociceptivos fácilmente accesibles a partir de los ventrículos laterales. Algunas de estas regiones pueden ser la sustancia gris periacueductal, los núcleos del rafe dorsal y el tálamo medial.

Estas regiones poseen numerosos receptores tanto de tipo GABAérgico como opioides. La administración microiontóforética de

THIP y morfina en el tálamo medial, atenúa las respuestas provocadas por estímulos nociceptivos, tales como inmersión de la cola o aplastamiento de la cola (60). La administración de baclofen en los núcleos del raquí induce una prolongada analgesia, además de que esta área recibe una inervación GABAérgica muy importante y posee una alta densidad de receptores a esta sustancia (46). Llama la atención el hecho que tanto el tálamo medial como la sustancia gris, existen abundantes receptores GABAérgicos y opioides, y esto hace sugerir que en estos sitios existen sistemas anatómicos a través de los cuales los sistemas GABAérgicos y los opioides interactúan sobre un mismo sistema analgésico.

El ácido Γ -aminobutírico tiene una amplia distribución dentro del Sistema Nervioso Central, de hecho es el neurotransmisor que existe en mayor concentración en todo el cerebro. Sus acciones electrofisiológicas sugiere su asociación con procesos de inhibición (67). Así mismo, la activación de los sistemas GABAérgicos ya sea por medios físicos (estimulación eléctrica) o farmacológicos (uso de agonistas) provocan cambios conductuales representativos de una disminución del umbral de excitabilidad nerviosa. Para autores como Enna (73) este neurotransmisor constituye todo un sistema de regulación de la excitabilidad neuronal, el cual determina el grado de respuesta y reactividad que algún sustrato neuronal funcional podría manifestar. En este sentido, entonces resulta explicable la cantidad enorme de funciones que se modifican cuando se manipula a los sistemas GABAérgicos cerebrales. La administración de fármacos agonistas o

antagonistas del GABA, se asocia con estados de hipo o hiperactividad del Sistema Nervioso Central. Entonces en el caso del baclofen, por ejemplo, este fármaco provoca analgesia, relajación muscular, sedación, hipnosis y dosis mayores pueden provocar coma y muerte.

Los antagonistas del GABA, como la picrotoxina, provocan inicialmente hiperexcitabilidad refleja, hipotonía muscular, insomnio y convulsiones que pueden ser tan intensas que causan la muerte del individuo (40). A pesar de esta amplia gama de efectos las acciones GABAérgicas son específicas y selectivas. Específicas por que requieren de la presencia de una molécula de unión específica, cuya asociación previa con el GABA es imprescindible para que se presenten los efectos provocados por esta sustancia. Es selectiva, porque depende de la región cerebral afectada para que un determinado efecto pueda sucederse.

En relación a las moléculas de unión, actualmente se considera que existen 2 tipos de receptores GABAérgicos denominados como GABA_A y GABA_B (63). La discriminación entre estos receptores se realiza con bases farmacológicas. Así se sugiere que el THIP y el muscimol, actúan sobre receptores GABA_A, mientras que el baclofen lo hace, aunque no exclusivamente, si preferentemente sobre receptores GABA_B.

En nuestros resultados, la administración intraperitoneal de baclofen siempre provocó efectos analgésicos significativos (Figs. 5, 6 y 7) mientras que la administración intracerebroventricular provocó efectos muy reducidos y sólo en la dosis mayor. Lo cual esta sugiriendo una acción dirigida sobre componentes de la médula

espinal. Aunque, en nuestro estudio, la administración subaracnoidea de baclofen no ejerció efecto significativo alguno. De hecho, los fármacos efectivos en esta administración fueron la morfina, en dosis de 10 y 20 µg y el THIP en dosis de 20 µg. Otros autores encontraron, que la administración de baclofen por esta vía subaracnoidea, provoca una analgesia importante (72). La diferencia entre sus resultados y los nuestros, es la prueba dolorimétrica utilizada. Estos autores utilizaron la prueba de retiramiento de la cola por irradiación térmica, nosotros lo realizamos por inmersión de la cola. Existen datos experimentales que muestran que la prueba de retiramiento de la cola por irradiación térmica no es muy adecuada para analizar acciones analgésicas de fármacos GABAérgicos (55).

La administración intracerebroventricular de agentes GABAérgicos provocó efectos analgésicos significativos con mayor regularidad que la administración intraperitoneal o subaracnoidea.

De las 3 pruebas dolorimétricas utilizadas, la que mostró la mayor sensibilidad a estos fármacos fue la de placa caliente, seguida por aplastamiento de la cola y finalmente por la inmersión de la cola. Las 2 primeras fueron realizadas en ratones y la última en ratas. Esto sugiere que estos animales son más sensibles a estos fármacos, tal como fue mostrado por otros autores (43). La administración de morfina por las 3 vías produjo efectos en las 3 pruebas dolorimétricas, lo que sugiere efectos y acciones tanto a nivel espinal como supraespinal.

La selectividad del efecto analgésico, puede estar determinada por el sitio de acción de las sustancias GABAérgicas. Es probable

que estas acciones se ejerzan básicamente en los sitios que están involucrados en los procesos analgésicos. Es conocido que la estimulación eléctrica de los núcleos del rafe dorsal y de la sustancia gris periacueductal entre otras, provoca un bloqueo para los estímulos nociceptivos (58). El mecanismo de acción utilizado por estas estructuras es una influencia descendente, que se ejerce a nivel de las aferencias primaria de las astas dorsales de la médula espinal (55). Sin embargo, existen evidencias actuales que muestran que estos núcleos puedan también ejercer una influencia ascendente sobre estructuras como el tálamo medial (60). Esta última estructura, recibe además importantes aferencias de los tractos que conducen información nociceptiva, lo que la convierte en una estructura ideal para ejercer funciones de integración de la información sensorial (59). Además, su lesión modifica en forma importante la analgesia provocada por estos fármacos (33).

En nuestro estudio, provocamos lesiones en el núcleo del rafe dorsal, de la sustancia gris periacueductal y en el tálamo medial. La lesión de estas 3 estructuras modificó en forma considerable la respuesta provocada tanto por la morfina, como por la de los fármacos GABAérgicos. Así por ejemplo, después de la lesión del tálamo medial, sólo la dosis de 20 mg/kg de morfina mostró un efecto significativo, cuando se administró intraperitonealmente. En el caso de la administración intracerebroventricular, sólo el baclofen el cual ejerce supuestamente una acción espinal, provocó una acción analgésica significativa. Cuando se administraron por vía subaracnoidea, solo

el THIFy el baclofen produjeron acciones analgésicas, aunque por la dispersión de los datos, éstos no fueron significativos (figs. 9, 10 y 11).

La lesión del núcleo del rafé dorsal, la cual en ocasiones se acompañó de lesión del rafé mediano, provocó un claro desplazamiento de la curva dosis-respuesta de todos los fármacos hacia la derecha, específicamente en el caso de la morfina; para la cual, se pierde todo efecto después de su administración intracerebroventricular.

De igual forma la lesión de la sustancia gris periacueductal, la cual incluye al núcleo rafé dorsal, también provocó un importante desplazamiento de los efectos de estos fármacos, principalmente de los GABAérgicos. Con el propósito de realizar un análisis comparativo entre los efectos inducidos por estos fármacos antes y después de la lesión, decidimos comparar los valores promedio de las latencias registradas antes de la lesión con aquellas que se observaron después de las mismas. Únicamente comparamos aquellos fármacos que mostraron efectos significativos. Esta comparación representada en las figuras 12, 13 y 14, nos muestra que después de las lesiones de la sustancia gris periacueductal y de los núcleos del rafé, las acciones provocadas por la administración intracerebroventricular de GABA básicamente se pierda (Fig. 13), mientras que la acción de la morfina sólo se reduce significativamente con la lesión del rafé dorsal.

La lesión del tálamo medial modificó considerablemente las respuestas de agentes GABAérgicos pero no con la intensidad de las lesiones en la sustancia gris periacueductal y del rafé dorsal.

Estos datos sugieren, que las acciones de estos fármacos GABAérgicos son preponderantemente supraespinales y que se requieren de la integridad de los núcleos del raquí dorsal y de la sustancia gris periacueductal, para que se manifiesten. Estos datos, además confirman la existencia de efectos analgésicos GABAérgicos, puesto que se requiere de estructuras específicas, con acciones específicas sobre procesos analgésicos, para poder manifestarse.

BIBLIOGRAFIA.

- 1) Abdelmoumene, M. (1970). Cortical Areas Exerting Presynaptic Inhibitory Action. On the Spinal Cord in Cat and Monkey. Brain Research, 20, 327-329.
- 2) Akil, H. and Liebeskind, J. (1975). Monoaminergic Mechanisms of Stimulation-Produced Analgesia. Brain Research, 94, 279-286.
- 3) Andersen, P. et al. (1982). Presynaptic Inhibitory Action of Cerebral Cortex on Spinal Cord. Nature, 194, 740-743.
- 4) Andree, T., Kendall, D. A. and Enna, S.J. (1983). THIP Analgesia: Cross Tolerance with Morphine. Life Sciences 32, 2265-2272.
- 5) Atweh, S. F. and Kuhar, M. J. (1977). Autoradiographic Localization of Opiate Receptors in the Rat Brain. II The Brain Site. Brain Research, 129, 1-12.
- 6) Balagura, S. and Ralph, T. (1973). The Analgesic Effect of Electrical Stimulation of the Diencephalon and Mesencephalon. Brain Research, 60, 369-379.
- 7) Baumeister, A. A. et al. (1985). Involvement of the Midbrain Reticular Formation in Self-Injurious Behaviour, Stereotyped Behavior and Analgesia. Induced by Intranigral Microinjection. Brain Research 102, 56-65.
- 8) Biggio, G., Della Bella, D., Frigeni, V. and Guidotti, A. (1976). Potentiation of morphine analgesia by muscimol. Brain Research 114, 328-333.
- 9) Besson, J.M. et Guilbaud, G. (1982). Physiologie de la Nociception. J. Physiol Paris, 78, 7-107.
- 10) Bingham, W.G. (1975). Norepinephrine and Dopamine Levels in

Normal Dog and Monkey Spinal Cord. Life Sciences, 16, 1521-1526.

11) Buckett, W.R. (1980). Irreversible Inhibitors of GABA Transaminase Induced Antinociceptive Effects and Potentiate Morphine. Neuropharmacology, 19, 715-722.

12) Boschi, G., Launay, N. and Rips, R. (1981). Implantation of an Intracerebral Cannula in the Mouse. Journal of Pharmacological Methods, 6, 193-198.

13) Chretien, M. et al. (1981). Endorphines: Structure, Roles et Biogénèse. Journal Canadien de Physiologie et Pharmacologie, 59, 5, 413-431.

14) Christensen, A. V. et al. (1982). Pharmacodynamic Effects and Possible Therapeutic Uses of THIP, a Specific GABA-Agonist. Pharmaceutisch Weekblad Scientific Edition, 4, 145-153.

15) Curtis, D. R. et al. (1974). Central Effects of B-(p-Chlorophenyl)G-Aminobutyric Acid. Brain Research, 70, 493-499.

16) Cutting, D. A. and Jordan, C. C. (1975). Alternative Approaches to Analgesia: Baclofen as Model Compound. Br. J. Pharmac., 54, 171-179.

17) Dostrovsky, J. D. and Deakin, J. F. W. (1977). Periaqueductal Grey Lesions Reduced Morphine Analgesia in the Rat. Neurosci. Lett., 4, 99-103.

18) Fields, H. L. (1981). An Endorphin-Mediated Analgesia System; Experimental and Clinical Observations. Neurosecretion and Brain Peptides, Edited by J. B. Martin, S. Reichlin and K. L. Bick, Raven Press, NY 199-212.

19) Frederick, W. L. et al. (1980). New Observations on the Nociceptive Pathways in the Central Nervous System. Pain, Edited by John J. Bonica. Raven Press NY, 47-61.

20) Freeman, W. (1946). Pain of Organic Disease Relieved by Prefrontal Lobotomy. *Lancet*, 1, 953-957.

21) Hammond, D. L. (1984). Effects of Intrathecally Administered THIP, Baclofen, and Muscimol on Nociceptive Threshold. *European Journal of Pharmacology*, 103, 121-125.

22) Headley, P. M. et al (1978). Selective Reduction by Noradrenaline and 5-Hydroxytryptamine of Nociceptive Responses of Cat Dorsal Horn Neurons. *Brain Research*, 145, 185-189.

23) Hill, R. C. et al. (1981). Analgesic Properties of the GABA-Mimetic THIP. *European Journal of Pharmacology*, 69, 221-224.

24) Hoffman, F. (1976). Baclofen and G-Hydroxybutyrate: Similar Effects on Cerebral Dopamine Neurons. *Life Sciences*, 19, 1253-1264.

25) Hokfelt, T., Ljungdahl, A., Terenius, L., Elde, R. and Nilsson, G. (1977). Immunohistochemical Analysis of Peptide Pathways Possibly Related to Pain and Analgesia. Enkephalin and Substance P. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74, 3081-3085.

26) Hong, J. S., Yang, Y. T., Fratta, W. and Costa, E. (1977). Determination of Methionine Enkephalin in Discrete Region of Rat Brain. *Brain Research*, 134, 383-403.

27) Huda, A. and Liebeskind, J. C. (1975). Monoaminergic Mechanisms of Stimulation Produced Analgesia. *Brain Research*, 94, 279-296.

28) Hughes, R. et al. (1975). Identification of Two Related Peptides From the Rat Brain with Potent Opiate Agonist Activity. *Nature*, 258, 577-579.

29) Hynes, M. D. et al. (1984). Evaluation of THIP in Standar

Tests for Analgesic Activity. Drug Development Research, 4, 405-419.

30) Ing, K. H. et al. (1976). Pharmacological Manipulation of Gamma-Aminobutyric Acid (GABA) in Morphine Analgesia, Tolerance and Physical Dependence. Life Sciences, 18, 1111-1124.

31) Irwing, S. (1950). The Effects of Morphine, Methadone and Meperidine on Some Reflex Responses of Spinal Animals to Nociceptive Stimulation. Experientia, 23, 593-599.

32) Jacob, J. et al. (1979). Fonctions Endocrines et Neuroendocriniennes des Morphines Endogènes. J. Physiol, Paris, 75, 447-461.

33) Jacquet, Y. F. (1974). Paradoxical Effects After Microinjection of Morphine in the Periaqueductal Grey Matter in the Rat. Science, 153, 1055-1057.

34) Jhamandas, K. H. (1984). Opioid-Neurotransmitter Interactions: Significance in Analgesia, Tolerance and Dependence. Prog. Neuro-Psychopharmacol & Biol. Psychiat., 8, 565-570.

35) Judith, B. and Katz, R. L. (1981). Non-Opioid Pathways Suppress Pain in Humans. Pain, 11, 347-354.

36) Kendall, D. A. et al. (1982). Comparison of the Antinociceptive Effects of γ -Aminobutyric Acid (GABA). Agonists: Evidence for a Cholinergic Involvement. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 220, 3, 482-487.

37) Kerkut, G. and Phillips, J. (1978). Neurochemical Basis of the Therapeutic Effect of γ -Aminobutyric Acid and its Derivates. Progress in Neurobiology, 2, 10, 89-133.

38) Kerr, F. W. L. (1975). The Ventral Spinothalamic Tract and Other Ascending Systems of the Ventral Funiculus of the Spinal

Cord. J. Comp. Neurol., 159, 335-356.

39) Koning, J. F. R. and Klippel, P. A. (1963). The Rat Brain. A Stereotaxic Atlas of the Forebrain and Lower Parts of the Brain System. Krieger R. E. Publishing Co. Inc. NY.

40) Krosgaard, L. P. (1980). GABA Agonists and Antagonists, Annual Reports in Medical Chemistry, 15, 41-50.

41) Krosgaard, L. P. (1977). A new Class of GABA Agonist. Nature, 268, 53-55.

42) Kuriyama, K. et al. (1978). Morphine Induced Alterations of GABA and Taurine Contents and L-Glutamate Decarboxylase Activity in Rat Spinal Cord and Thalamus. Possible Correlates with Analgesic Action of Morphine. Brain Research, 148, 163-179.

43) Levy, R. A. and Proudfit, H. K. (1977). The Analgesic Action of Baclofen (B-(4-P-Chlorophenyl)-G-Aminobutyric Acid. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 202, 2, 437-445.

44) Levy, R. A. and Proudfit, H. K. (1979). Analgesia Produced by Microinjection of Baclofen and Morphine at Brain Stem Sites. Journal of Pharmacology, 57, 43-55.

45) Lienman, J. M. and Pastor, G. (1980). Antinociceptive Effects of Baclofen and Muscimol Upon Intraventricular Administration. European Journal of Pharmacology, 61, 225-230.

46) Masamichi, S., Akinori, A. and Hiroishi, T. (1980). Evidence for Involvement of Separate Mechanisms in the Production of Analgesia by Electrical Stimulation of the Nucleus Reticularis, Paragiganto Cellularys and Nucleus Rhape Magnus in Rat. Brain Research, 194, 525-529.

47) Mayer, J. D. (1984) Analgesia Produced by Electrical

Stimulation of the Brain. Prog. Neuro-Psychopharmacol. & Biol. Psychiat., 8, 4-6, 557-564.

48) Morrow, T. and Casey, K. (1976). Analgesia Produced by Mesencephalic Stimulation; Effect on Bulboreticular Neurons. Advances in Pain Research and Therapy, 68, 1503-1510.

49) Naik, S. R. et al. (1976). Central GABA Receptor Agonists: Comparison of Muscimol and Baclofen. Neuropharmacology, 15, 479-484.

50) Nakahama, H. (1975). International Anesthesiology Clinics. Neurophysiological Basis of Anesthesia. Ed. by Mori Kenjiro. Little Brown and Company, 13, 1, 109-147.

51) Olson, G. A. (1980). Endogenous Opiates: 1979. Peptides, 1, 365-379.

52) Packard, K., Pohorecky, L. A. and Brick, J. (1984). A Simple Cannula for Intraventricular Drug Administration in Rodents. Journal of Neuroscience Methods, 10, 139-143.

53) Peschanski, M. et al. (1981). Posterior Intralaminar Region in Rat: Neuronal Responses to Noxious and Non-Noxious Cutaneous Stimuli. Experimental Neurology, 72, 226-238.

54) Pierau, F. K. and Zimmermann, P. (1975). Presynaptic Action of B-(4-Chlorophenyl)-GABA. Exp. Neurol., 48, 343-351.

55) Proudfit, H. K. and Levyr, R. A. (1978). Delimitation of Neuronal Substrates Necessary for the Analgesic Action of Baclofen and Morphine. European Journal of Pharmacology, 47, 159-166.

56) Randic, M. and Yu, H. H. (1976). Effects of 5-Hydroxytryptamine and Bradykinin in Cat Dorsal Horn Neurons Activated by Noxious Stimuli. Brain Research, 111, 197-203.

57) Remi, G. (1984). Pain, Nociception and Spinal Opioid

Receptors. Prog. Neuro. Psychopharmacol. & Biol. Psychiat., 8, 571-579.

58) Reynolds, D. B. (1969). Surgery in the Rat During Electrical Analgesia Induced by Focal Brain Stimulation. Science, 164, 444-445.

59) Reyes-Vazquez, C. and Dafny, N. (1986). The Parafasciculus Thalami as Site for Mediating the Antinociceptive Response to GABAergic Drugs. Brain Research, ~~In Press~~.

60) Reyes-Vazquez, C. and Dafny, N. (1983). Microiontophoretically Applied THIP Effects Upon Nociceptive Responses of Neurons in Medial Thalamus. Applied Neurophysiology, 46, 254-260.

61) Richardson, R. et al (1982). Analgesia Produced by Stimulation of Various Sites in the Human B-endorphin System. Appl. Neurophysiology, 45, 116-122.

62) Saito, K. et al. (1975). Antagonism Between Liorezal and Substance P in the Rat Spinal Cord. Brain Research, 97, 177-180.

63) Sawynok, J. (1984). GABAergic Mechanisms in Antinociception. Prog. Neuro-Psychopharmacology & Biol. Psychiat., 8, 581-586.

64) Sawynok, J. (1987). GABAergic Mechanisms of Analgesia. Pharmacology, Biochemistry & Behaviour, 26, 463-474.

65) Sylwia, F. and Langwinski, R. (1979). Central Action of Narcotic Analgesics. Participation of Serotonin in the Mechanisms of Action of Narcotic Analgesic. Pol. J. Pharmacol., 31, 462-471.

66) Terenius, L. (1978). Endogenous Peptides and Analgesia. Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol., 18, 189-204.

67) Tapia, R. (1983). G-Aminobutyric Acid Metabolism and

Biochemistry of Synaptic Transmission. Handbook of Neurochemistry, 3, 423-466. 2nd Edition Raven Press NY.

68) Tricklenback, M., Hutson, P. and Curzon, G. (1982). Analgesia Induced by Brief Footshocks is Inhibited by 5-Hydroxytryptamine but Unaffected by Antagonists of 5-Hydroxytryptamine or by Naloxone. Neuropharmacology, 21, 51-56.

69) Urca, G., Frenk, H., Liebeskind, J. C. and Taylor, A. (1977). Morphine and Enkephalin: Analgesic and Epileptic Properties. Science, 197, 83-86.

70) Watson, S. J., Akil, H., Richard, C. W. and Barchas, J. D. (1978). Evidence for Two Separate Opiate Peptide Neuronal Systems. Nature, 275, 226-228.

71) Watson, S. J., Akil, H., Sullivan, S. and Barchas, J. D. (1977). Immunocytochemical Localization of Methionine Enkephalin: Preliminary Observations. Life Sciences, 21, 733-738.

72) Wilson, P. R. and Yaksh, T. L. (1978). Baclofen is Antinociceptive in the Spinal Intrathecal Space of Animals. European Journal of Pharmacology, 51, 323-330.

73) Yaksh, T. L. and Rudy, T. A. (1976). Systematic Examination in the Rat of Brain Sites Sensitive to the Direct Application of Morphine: Observation of Differential Effects within the Periaqueductal Grey. Brain Research, 114, 83-103.

74) Yaksh, T. L. and Rudy, T. A. (1976). Chronic Catheterization of the Spinal Subarachnoid Space. Physiology & Behavior, 17, 1031-1036.

75) Yoneda, Y. (1976). Possible Involvement of GABA in Morphine Analgesia. Biochemical Pharmacology, 125, 2669-2670.

76) Zimmerman, M. (1981). Physiological Mechanisms of Pain and

Pain Therapy. Triangle, 20, 1-2, 7-18.

77) Enna, S.J. and DeFrance, J.F. (1980). Glycine GABA and Benzodiazepine receptors. Neurotransmitter receptors. Enna, S.J. and Yamamura, H.I. Eds Chapman and Hall, Londres, pp 41-70.

78) Reyes-Vazquez, C. and Dafny, N. (1982). Does Naloxona have Functional Significant Activity on Medial Thalamic Neurons ? . Microiontophoretical study. Life Sciences, 32, 1443-1448.

79) Reyes-Vazquez, C. and Dafny, N. (1984). Microiontophoretically Applied Morphine and Naloxone on Single Cell Activity in the Parafasiculus Nucleus of Nive and Morphine Dependent Rats. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 229,2,583-588.

80) Reyes-Vazquez, C., Prieto-Gomez, B. and Dafny, N. (1988). Evidence for an Ascending Pain Modulation Pathway: Dorsal Raphe Stimulation, 5-HT and Morphine Microiontophoresis Effects on Noxious and Nonnoxious Identified Neurons in the Medial Thalamus of the Rat. Brain Res, in press.