

**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
ESCUELA SUPERIOR DE MEDICINA
SECCIÓN DE ESTUDIOS DE
POSGRADO E INVESTIGACIÓN**



**“ACTIVIDAD ANTINOCICEPTIVA DE LAS VITAMINAS B₁,
B₆ y B₁₂ SOLAS O EN COMBINACIÓN CON
DICLOFENACO SÓDICO EN MODELOS DE DOLOR
INFLAMATORIO”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

**DOCTOR EN CIENCIAS
EN INVESTIGACIÓN EN MEDICINA**

P R E S E N T A:

M. en C. JUAN GERARDO REYES GARCÍA

**TRABAJO DIRIGIDO POR: DR. VINICIO GRANADOS SOTO
DR. CARLOS CASTILLO HENKEL**

NOVIEMBRE, 2003

Este trabajo se realizó en la Sección de Estudios de Postgrado e Investigación de la Escuela Superior de Medicina del Instituto Politécnico Nacional, bajo la Dirección de los Doctores Vinicio Granados Soto y Carlos Castillo Henkel.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	5
LISTA DE TABLAS Y FIGURAS	8
RESUMEN	10
1. INTRODUCCIÓN	11
1.1. Vías de conducción nociceptiva	11
1.1.1. Definición de dolor	11
1.1.2. Definición de nocicepción	12
1.1.3. Clasificaciones de dolor	12
1.1.4. Transmisión del dolor nociceptivo	16
1.1.5. Los nociceptores	17
1.1.6. Neuronas de primer orden	23
1.1.7. Neuronas nociceptivas de segundo orden	25
1.1.8. Vías ascendentes	29
1.1.9. Mecanismos tálamo corticales	31
1.1.10. Vías descendentes	32
1.2. Mediadores del dolor	35
1.2.1. Activación de nociceptores	35
1.2.2. Sensibilización periférica	36
1.2.3. Mecanismos de sensibilización	49
1.2.4. Sensibilización espinal	52
1.2.5. Sensibilización supraespinal	65
1.3. Analgésicos antiinflamatorios no esteroideos	69
1.3.1. Efectos periféricos	69
1.3.2. Efectos centrales	76
1.3.3. Efectos de los AINEs en seres humanos	80
1.4. Diclofenaco	82
1.4.1. Generalidades del diclofenaco	82
1.4.2. Propiedades farmacológicas	82
1.4.3. Usos terapéuticos	83
1.4.4. Toxicidad	83
1.4.5. Mecanismos de acción del diclofenaco	84
1.5. Vitamina B ₁ , B ₆ , B ₁₂ y dolor	89
1.5.1. Tiamina	90

1.5.2 Piridoxina	92
1.5.3. Cianocobalamina	93
1.5.4. Actividad terapéutica de las vitaminas B ₁ , B ₆ y B ₁₂	96
1.5.5. Actividad antineuropática de las vitaminas B	97
1.5.6. Actividad antinociceptiva de las vitaminas B	98
2. JUSTIFICACIÓN	102
3. HIPÓTESIS	105
4. OBJETIVOS	106
4.1. Disfunción articular inducida por dolor	106
4.1.1. Objetivo general	106
4.1.1. Objetivos particulares	106
4.2. Hiperalgnesia térmica	106
4.2.1. Objetivo general	106
4.2.2. Objetivos particulares	107
4.3. Formalina	107
4.3.1. Objetivo general	107
4.3.2. Objetivos particulares	107
4.4. Mecanismo de acción de las vitaminas B	108
4.4.1. Objetivo general	108
4.4.3. Objetivos particulares	108
5. MATERIAL Y MÉTODOS	109
5.1. Modelo de disfunción inducido por dolor.	109
5.2. Modelo de hiperalgnesia térmica inducida por carragenina	112
5.3. Modelo de formalina	115
6. RESULTADOS	119
7. DISCUSIÓN	137
8. CONCLUSIONES	145
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	147

ABREVIATURAS

AAEs	Aminoácidos excitatorios
ABC	Área bajo la curva
AINEs	Antiinflamatorios no esteroideos
AMPA	RS- α -amino-3-hidroxi-5-metilsoxazol-4-propionato
AMPC	Adenosin monofosfato cíclico
ARD	Neuronas de amplio rango dinámico
ATP	Trifosfato de adenosina
BC	Bradicinina
COX	Ciclooxigenasa
DA	Dopamina
DAG	Diacilglicerol
D-NAME	N^G -D-nitro-arginina
FI	Índice de funcionalidad
FCN	Factor de desarrollo neural
FLC	Fosfolipasa C
FLA	Fosfolipasa A
GABA	Ácido gamma amino butírico
GMPc	Guanidin monofosfato cíclico
GRD	Ganglio de la raíz dorsal
GTP	Trifosfato de guanidina
H ⁺	Protón

HETE	Ácido hidroxieicosatetraenóico
His	Histamina
IASP	International Association for the Study of Pain
i.c.v.	Intracerebroventricular
IL	Interleucina
IN	Interneuronas
i.p.	Intraperitoneal
KA	Ácido kainico
INEX	Interneuronas excitatorias
ININ	Interneuronas inhibitorias
IP	Fosfatidilinositol
L-NAME	Metil éster de la N^G -L-nitro-arginina
LOX	Lipooxigenasa
NR	Neuronas nociceptivas específicas
NA	Noradrenalina
NMDA	N metil D aspartato
NN	Neurona no nociceptiva
NP	Neuronas de proyección espinotalánica
NPY	Neuropéptido Y
ODQ	1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3- <i>al</i> quinoxalin-1-ona
ON	Óxido nítrico
PGs	Prostaglandinas
PIFIR	Pain-induced functionality impairment in the rat

PKC	Protein cinasa C
PKG	Protein cinasa G
PRGC	Péptido relacionado con el gen de calcitonina
RNAm	Ácido ribonucleico mensajero
VPL	Tálamo ventroposterior lateral
VPI	Tálamo ventroposterior inferior
s.c.	Subcutáneo
SON	Sintasa de óxido nítrico
S1	Área cortical S1
S2	Área cortical S2
TNF	Factor de necrosis tumoral
TTX	Tetrodotoxina
5HT	Serotonina

LISTA DE TABLAS Y FIGURAS

TABLAS

Tabla 1.1	Criterios de clasificación del dolor	13
Tabla 1.2	Clasificación del dolor	17
Tabla 1.3	Características generales de las fibras nerviosas periféricas	20

FIGURAS

Figura 1.1	Vías de conducción nociceptiva	19
Figura 1.2.	Nociceptores y neuronas de primer y segundo orden.	28
Figura 1.3.	Esquema laminar de Rexed	28
Figura 1.4.	Vías nociceptivas ascendentes	34
Figura 2.1.	Activación y sensibilización de los nociceptores	39
Figura 3.1.	Clasificación de los AINEs	70
Figura 3.2.	Vía ON-GMPc-Canal de potasio	77
Figura 4.1.	Estructura química del diclofenaco	83
Figura 5.1.	Estructura química de la tiamina	91
Figura 5.2.	Estructura química de la piridoxina	93
Figura 5.3.	Estructura química de la cianocobalamina	95
Figura 6.1.1	Efecto antinociceptivo del diclofenaco en el modelo PIFIR	121
Figura 6.1.2.	Efecto antinociceptivo de las vitaminas B en el modelo PIFIR	121
Figura 6.1.3.	Efecto antinociceptivo del diclofenaco y vitaminas B en el modelo PIFIR	122
Figura 6.1.4.	Efecto antinociceptivo del diclofenaco y vitaminas B individuales.	122

Figura 6.2.1.	Curso temporal del modelo de hiperalgia térmica	125
Figura 6.2.2.	Efecto antihiperalgésico del diclofenaco	125
Figura 6.2.3.	Efecto antihiperalgésico de las vitaminas B	126
Figura 6.2.4.	Efecto antihiperalgésico del diclofenaco más vitaminas B	126
Figura 6.3.1.	Curso temporal del modelo de la formalina	128
Figura 6.3.2.	Efecto antinociceptivo local de la tiamina	129
Figura 6.3.3.	Efecto antinociceptivo local de la piridoxina	129
Figura 6.3.4.	Efecto antinociceptivo local de cianocobalamina	130
Figura 6.3.5.	Efecto antinociceptivo local de la mezcla de las vitaminas B	130
Figura 6.3.6.	Efecto antinociceptivo oral de la mezcla de las vitaminas B	131
Figura 6.3.7.	Efecto antinociceptivo oral individual de las vitaminas B	131
Figura 6.3.8.	Efecto antinociceptivo oral del diclofenaco	132
Figura 6.3.9.	Efecto antinociceptivo oral del diclofenaco más las vitaminas B	132
Figura 6.3.10	Efecto de la naloxona sobre la antinocicepción de las vitaminas B	135
Figura 6.3.11	Efecto del L-NAME sobre la antinocicepción de las vitaminas B	135
Figura 6.3.12	Efecto de la glibenclamida sobre la antinocicepción de las vitaminas B	136
Figura 6.3.13	Efecto de la metiopina sobre la antinocicepción de las vitaminas B	136

RESUMEN

La actividad analgésica de las vitaminas B₁, B₆ y B₁₂, solas o en combinación con diclofenaco, ha resultado un tema altamente controvertido. No obstante su amplio uso clínico como tratamiento de diversas condiciones inflamatorias dolorosas, la información sobre su actividad analgésica en modelos de dolor inflamatorio, y sobre su mecanismo de acción es escasa. En este trabajo se estudió la actividad antinociceptiva de las vitaminas B, solas o en combinación con diclofenaco en los modelos de dolor inflamatorio de disfunción inducida por ácido úrico, hiperalgesia térmica inducida por carragenina y dolor inducido por formalina. Además, se exploró el posible mecanismo de acción involucrado. Las vitaminas B, administradas por la vía oral, mostraron actividad antinociceptiva significativa en el modelo de la formalina pero no en los dos restantes. Sin embargo, no produjeron efecto antinociceptivo al aplicarse localmente en el modelo de la formalina. En los tres modelos se observó que las vitaminas B aumentan notablemente la actividad antinociceptiva del diclofenaco. El mecanismo de acción antinociceptivo de las vitaminas B se relacionó con la activación de receptores opioides y la apertura de canales de potasio sensibles a ATP, así como con la producción de óxido nítrico, pero no con la activación de receptores serotoninérgicos. Los resultados sugieren que las vitaminas B poseen actividad antinociceptiva variable de acuerdo al modelo utilizado, apoyan la utilidad analgésica de la combinación de vitaminas B y diclofenaco en el tratamiento del dolor inflamatorio, e indican que el mecanismo de acción involucrado es de origen central.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. VÍAS DE CONDUCCIÓN NOCICEPTIVA

1.1.1. Definición de dolor

La complejidad del significado del dolor radica en que cada sujeto lo aprende a través de la experiencia personal, se origina por causas múltiples, presenta diversas características anatómicas y fisiológicas, y además variadas relaciones con aspectos psicológicos y culturales. No obstante, el dolor ha sido definido por la Asociación Internacional para el Estudio del Dolor (International Association for the Study of Pain, IASP) como *"Una experiencia sensorial y emocional desagradable asociada con una lesión tisular real o potencial, o que se describe como si dicha lesión hubiera ocurrido"* (IASP, 1986). Evidentemente, en la definición anterior se intenta incluir las características básicas de esta modalidad sensitiva. Así, tiene implícito que el dolor es una sensación desagradable en un sitio del organismo. Además, considera que no siempre resulta de la simple conducción del estímulo por las vías correspondientes a las áreas sensoriales, ya que además presenta componentes emocionales y subjetivos. Asimismo, relaciona al dolor con la presencia de daño tisular potencial, que de esta manera actuaría como mecanismo de defensa, o real, cuando de hecho el organismo está sufriendo una lesión. Finalmente, considera que no siempre es necesario que exista lesión tisular aparente para que el dolor se presente.

1.1.2. Definición de nocicepción

Un término frecuentemente utilizado como sinónimo de dolor, aunque ciertamente diferente, es el de nocicepción. Éste representa los mecanismos fisiológicos asociados con la recepción de señales en el sistema nervioso central, generadas tras la activación de los receptores sensoriales específicos, o nociceptores, por los estímulos nocivos (Bonica, 1990). Aunque normalmente la percepción del dolor es consecuencia directa de la activación del proceso nociceptivo, la experiencia consciente del dolor y la nocicepción pueden ocurrir separadamente. Por ejemplo, la estimulación de los nociceptores por heridas de guerra pueden cursar sin dolor, o bien pueden generarse dolores intensos sin la aparente activación de los nociceptores. En otras palabras, el dolor es la percepción sensorial consciente del proceso de la nocicepción.

1.1.3. Clasificaciones del dolor

El dolor se ha clasificado de diversas maneras (Tabla 1.1) en función de sus obvias implicaciones de duración, etiología, mecanismo fisiopatológico, localización, intensidad y calidad (Dagnino, 1994).

1.1.3.1. Dolor agudo y crónico

De acuerdo a su evolución, una de las clasificaciones reconoce la existencia de dos tipos de dolor: el agudo y el crónico. El dolor agudo incluye el dolor transitorio resultante de la activación del sistema nociceptivo en la piel o en otros tejidos, en ausencia de daño tisular extenso. Se le considera una función protectora que

permite activar mecanismos de defensa para evitar daños mayores en el organismo por la persistencia del estímulo. Asimismo, el dolor agudo es producido por lesiones tisulares cuya duración está en función del tiempo requerido para que los tejidos lesionados sanen. La IASP ha definido un tiempo de seis meses como duración límite para definir el dolor agudo.

Tabla 1.1. Criterios de clasificación del dolor (Modificado de Dagnino, 1994).

CRITERIO	CLASIFICACIÓN
Duración	Agudo, crónico
Etiología	No neoplásico, neoplásico, inflamatorio
Mecanismo	Nociceptivo (somático, visceral), neuropático
Localización	Localizado, difuso
Intensidad	Leve, moderado, severo
Calidad	Urente, lancinante, punzante, quemante

El dolor agudo se genera inmediatamente después de la activación del sistema nociceptivo tras la existencia de daño tisular somático o visceral, es autolimitado y desaparece habitualmente con la lesión que lo originó. En estos casos también se le atribuyen funciones protectoras, ya que alerta al individuo ante la presencia de una lesión, y al limitar la actividad previene un daño mayor y facilita la cicatrización. Las reacciones emocionales asociadas se limitan generalmente a ansiedad (Cerveró y Laird, 1995).

Por otro lado, el dolor crónico se genera por la persistencia del estímulo nocivo, de la enfermedad o por ciertas condiciones fisiopatológicas. Carece de función protectora; más que un síntoma resulta en sí una enfermedad. No es un proceso autolimitado, ya que puede persistir indefinidamente tras la lesión inicial e incluso aparecer en ausencia de lesión periférica aparente. Suele ser refractario a múltiples tratamientos y se asocia a reacciones emocionales como ansiedad crónica, miedo, depresión e insomnio (Dickinson, 1996).

1.1.3.2. Dolor nociceptivo y neuropático

Otra clasificación considera el dolor, de acuerdo a su mecanismo, como nociceptivo o neuropático (Dickinson, 1996). El dolor nociceptivo o “normal” se produce por la existencia de daño somático (piel, músculos o articulaciones) o visceral. El dolor somático es generalmente bien localizado. El dolor visceral se origina tras el daño a los órganos internos. Es un dolor mal localizado que se extiende más allá del órgano lesionado. En ocasiones se localiza en una superficie del organismo distante de la víscera que lo origina (dolor referido) y suele asociarse con reacciones vegetativas.

El dolor neuropático, también conocido como anormal o patológico, resulta de una lesión o enfermedad del sistema nervioso periférico o central. El sistema nociceptivo opera de manera anormal y no existe una relación causal entre lesión tisular y dolor. Una de sus características típicas es la existencia de alodinia (estímulos usualmente no dolorosos propician la aparición de dolor). La neuralgia

del trigémino, la neuralgia postherpética, el dolor de miembro fantasma y distintas neuropatías periféricas constituyen ejemplos de dolor neuropático (Yaksh, 1999).

1.1.3.3. Dolor de fase 1, fase 2 y fase 3

Finalmente, otros autores consideran el dolor normal (nociceptivo) y el anormal (neuropático) como los extremos de un abanico de sensaciones integradas en el sistema nervioso central. En condiciones normales existe un equilibrio entre lesión y dolor, el cual se altera por estímulos muy intensos, prolongados o repetitivos, y da lugar a variaciones en la intensidad y duración de las respuestas nociceptivas. Aunque estos cambios pueden ser temporales y el sistema tiende a restaurar el equilibrio, en algunas situaciones éste se pierde en conjunto con la relación entre la lesión tisular y el dolor.

En función de las características del estímulo nociceptivo y de la respuesta al mismo se describen tres fases o tipos de dolor. El dolor de fase 1 corresponde al dolor producido por una lesión pequeña y breve que actúa como mecanismo protector señalando el daño potencial. Este tipo de dolor se transmitiría por una simple vía hacia el tálamo y corteza, pudiendo sufrir en el trayecto modulaciones principalmente inhibitorias. En esta fase existe una correlación estrecha de los cursos temporales del estímulo nocivo y la sensación dolorosa. El dolor de fase 2 es el generado por lesiones más intensas o duraderas que producen lesiones tisulares e inflamación. Se considera también un mecanismo protector ante agresiones que requieren un proceso de curación y cicatrización. En esta fase el mecanismo de transmisión nociceptiva experimenta dos cambios importantes: por

un lado se liberan diversos factores por el proceso de inflamación y se observan sensibilización periférica y central con hiperalgesia (respuesta exagerada a estímulos dolorosos) y pérdida de la relación estímulo-sensación, y además se observa que el dolor persiste en ausencia de estimulación. El dolor de fase 3 corresponde a condiciones dolorosas anormales y se caracteriza, a diferencia de los dolores de fases 1 y 2, por la falta de relación entre lesión y dolor. Este tipo de dolor es el producido por lesiones neurológicas que incluyen neuropatías periféricas o alteraciones centrales. Se considera no debido a estímulo tisular periférico, de naturaleza espontánea o provocado por estímulos inocuos (alodinia) y representa un comportamiento nociceptivo anormal producido por alteraciones centrales o descargas periféricas (Tabla 1.2, Cerveró, 2000).

1.1.4. Transmisión del dolor nociceptivo

De manera general se puede señalar que la nocicepción ocurre cuando un estímulo nocivo o potencialmente nocivo activa los nociceptores. Estos constituyen fibras nerviosas libres que transducen el estímulo nocivo en potenciales de acción. El estímulo, así generado, se transmite por las fibras nociceptivas hacia los ganglios de la raíz dorsal y de ahí a la sustancia gris de la médula espinal. En este sitio se establecen sinapsis con interneuronas o directamente con neuronas de proyección espinotalámica. Del tálamo se conduce el estímulo hacia la corteza cerebral, donde se genera la percepción sensorial consciente del dolor (Millan, 1999).

Tabla 1.2. Clasificación del dolor (Modificado de Cerveró, 2000).

FASE 1	FASE 2	FASE 3
Lesión pequeña y breve	Lesión inflamatoria	Lesión neurológica
Mecanismo protector	Mecanismo protector	Dolor patológico
Señala lesión potencial	Defensa ante agresión	No debido a estímulo tisular periférico
Simple transmisión central hacia tálamo y corteza	Sensibilización periférica y central (hiperalgesia)	Dolor espontáneo o provocado por estímulo inocuo (alodinia)
	Pérdida de la relación estímulo-sensación	Comportamiento nociceptivo anormal
	Dolor persistente en ausencia de estimulación	Alteraciones centrales o descargas periféricas

Asimismo, se reconoce la existencia de zonas mesencefálicas y bulbares como la sustancia gris periacueductal que directamente, o haciendo sinapsis con el núcleo del raquí establecen conexiones descendentes con la sustancia gris medular. La estimulación de estas zonas provoca efectos inhibidores sobre la nocicepción, y analgesia, por lo que se consideran sistemas moduladores del dolor (Figura 1.1).

1.1.5. Los nociceptores

En la mayor parte del organismo existen poblaciones de nociceptores cuya característica básica es la capacidad para diferenciar los estímulos nocivos de los

inocuos. Los nociceptores reconocen la intensidad de un estímulo dentro del intervalo de intensidades nocivas y lo transmiten al SNC, mientras que no responden o lo hacen irregularmente a los estímulos de intensidad baja (Cerveró y Laird, 1999; Millan, 1999).

En función de su localización se distinguen tres grupos de nociceptores: los cutáneos, los musculares y articulares, y los viscerales. Debido a su fácil acceso, los nociceptores cutáneos han sido los más estudiados. Se caracterizan por presentar un alto umbral a la estimulación, por su capacidad para codificar la intensidad de los estímulos en el intervalo nocivo y por su falta de actividad espontánea en ausencia de estímulos nocivos previos (Cerveró y Laird, 1999). Los campos receptores son de extensión variable desde 5 mm^2 a 2 cm^2 .

De acuerdo a las características de las fibras de conducción aferentes que los conectan, se reconocen dos tipos de nociceptores cutáneos (Tabla 1.3). Los nociceptores A- δ son terminaciones sensoriales de fibras mielínicas de diámetro pequeño (2-6 μm), con velocidades de conducción entre 5 y 30 m/seg. Responden casi exclusivamente a estímulos nocivos de tipo mecánico. Se localizan en las capas superficiales de la dermis, con ramificaciones que se extienden hasta la epidermis. Se activan por estímulos mecánicos con umbrales mucho más altos que los correspondientes a los mecanorreceptores de bajo umbral relacionados con el sentido del tacto.

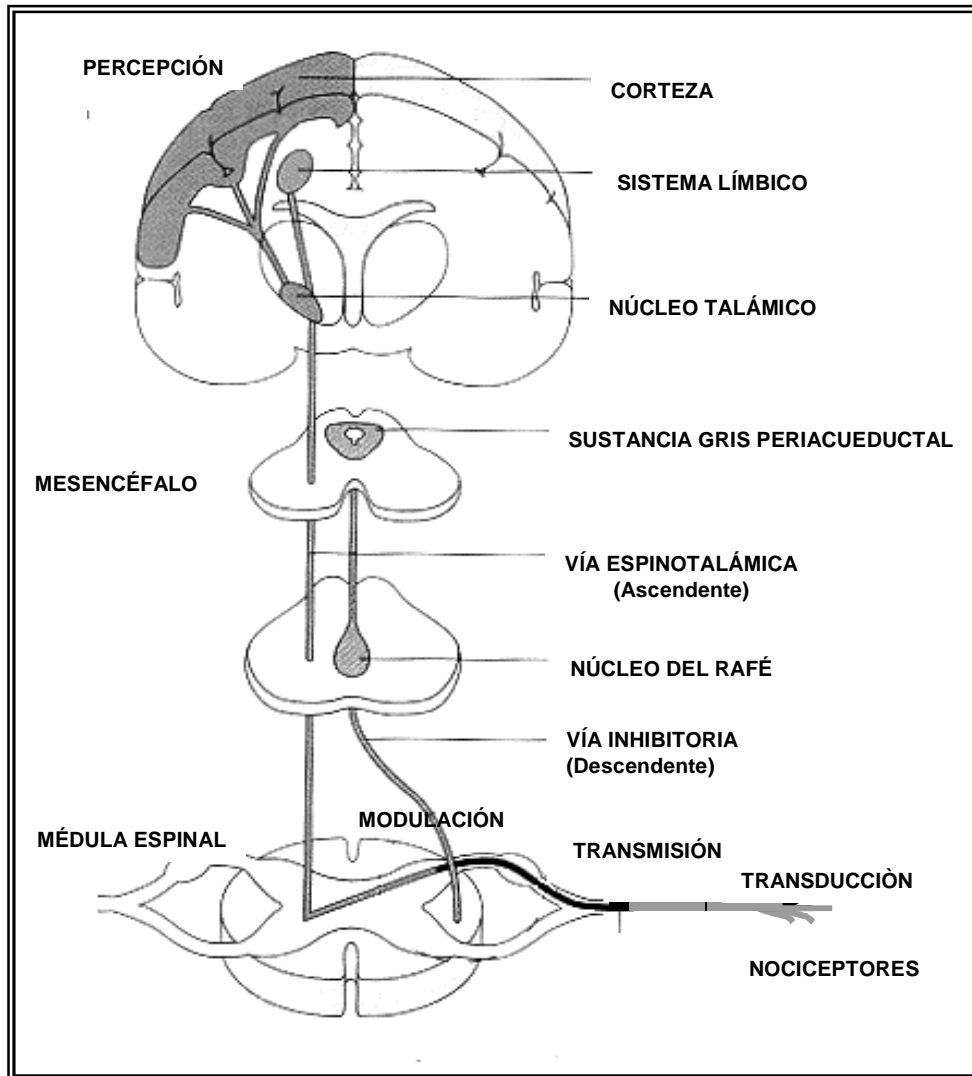


Figura 1.1. Vías de conducción nociceptiva.

Los nociceptores A δ responden especialmente bien a pinchazos y pellizcos aplicados a la piel, o a penetraciones de objetos punzantes. También se han descrito nociceptores A δ que responden a estímulos térmicos intensos, además de aquellos que responden mejor al frío que a estímulos mecánicos (Millan, 1999).

Las fibras nociceptivas C son terminaciones nerviosas de fibras aferentes amielínicas (0.4-1.2 μ m) con velocidades de conducción inferiores a 1.5 m/seg.

Tabla 1.3. Características generales de las fibras nerviosas periféricas (Modificado de Cerveró y Laird, 1999).

Tipo	Función	Diámetro (mm)
A α	Motora	15
Ab	Tacto, propiocepción	>10
A γ	Tacto, tono muscular	5
Ad	Dolor, estimulación mecánica	2 – 6
B	Preganglionar autonómica	3
C	Dolor, estimulación mecánica. Térmica y química	0.4 – 1.2

Son simples terminaciones libres en la piel y responden a estímulos nocivos mecánicos, térmicos o químicos. También pueden ser activados por sustancias liberadas durante el daño tisular, como bradicinina, histamina, acetilcolina y iones de potasio. Los nociceptores C capaces de responder a todas la variedad de estímulos nocivos también se denominan polimodales (Millan, 1999).

Los receptores sensoriales $A\beta$ son fibras mielinizadas gruesas ($>10 \mu\text{m}$) y velocidades de conducción de 30 a 100 m/seg. Bajo circunstancias normales no transmiten información nociceptiva, y solo son sensibles al tacto y a la vibración no nociva.

A nivel muscular, los nociceptores son terminaciones de fibras $A\delta$ y de fibras C. Las primeras responden a iones potasio, bradicinina, serotonina y a contracciones sostenidas del músculo. Las segundas responden a estímulos como presión, calor e isquemia muscular. Las articulaciones están inervadas por nociceptores que responden a movimientos articulares nocivos y son las terminaciones de fibras aferentes amielínicas. Se estimulan en presencia de factores liberados por el daño tisular y pueden ser sensibilizados por la inflamación local de la articulación (Schaible y Grubb, 1993).

De acuerdo a su patrón de sensibilidad nociceptiva, las vísceras pueden ser clasificadas en tres grupos. La estimulación de los órganos parenquimatosos (sólidos), como el hígado, riñón y cerebro, no provoca la percepción consciente de sensación alguna. La distensión nociva de las vísceras huecas y las cápsulas de los órganos parenquimatosos generan la percepción sensorial de dolor (intestino, útero, uretero y vasos sanguíneos). Las vísceras huecas en cercana proximidad

con el medio ambiente externo responden tanto a estímulos nocivos como no nocivos. Estos órganos se relacionan con la ingestión o excreción de sustancias (esófago, recto y vejiga). Los nociceptores viscerales son los menos conocidos, por la dificultad en su estudio (Cerveró y Laird, 1999).

Se ha demostrado la existencia de dos tipos de nociceptores viscerales: unos de umbral elevado que responden únicamente a estímulos nociceptivos intensos y se encuentran en el corazón, esófago, sistema biliar, intestino delgado, colon, uretero, vejiga urinaria y útero. El segundo tipo de nociceptores viscerales (no específicos) puede responder tanto a estímulos inocuos como nocivos, y se han descrito en el corazón, esófago, testículos, colon y vejiga urinaria. La mayor parte de los nociceptores viscerales son terminaciones nerviosas libres amielínicas y se ha propuesto que participan en las sensaciones generadas por la isquemia cardiaca, la irritación del árbol bronquial, la congestión y el embolismo pulmonares, las lesiones testiculares, los cólicos renales y biliares y en el dolor del trabajo de parto (Cerveró y Laird, 1999).

Existe un grupo de nociceptores conocido como silente, que el cual se compone de aproximadamente el 10 al 20% de las fibras C de la piel, articulaciones y vísceras. Este grupo normalmente no responde a los estímulos nocivos comunes, sin embargo, bajo las condiciones de inflamación y daño tisular esos nociceptores silentes se sensibilizan y se activan por una gran variedad de mediadores químicos. El reclutamiento de los nociceptores silentes puede contribuir a la sumación espacial y temporal y aumentar la descarga al asta dorsal medular (Millan, 1999).

1.1.6. Neuronas de primer orden

Las fibras aferentes primarias que inervan los nociceptores periféricos tienen sus cuerpos celulares en los ganglios raquídeos. Sus ramas centrípetas entran a la médula espinal a través de las raíces posteriores y terminan en la sustancia gris del asta posterior. De esta manera, la primera neurona de las vías del dolor tiene su extremo distal en la periferia, el cuerpo en el ganglio raquídeo y el extremo proximal en el asta posterior de la médula espinal (Figura 1.2).

El asta posterior o dorsal de la médula espinal constituye un elemento importante que permite la integración de los estímulos sensoriales, incluyendo los nociceptivos. Su importancia radica en que permite el primer nivel de integración en el sistema nervioso central y su modulación por las interneuronas espinales, dirige la información a través de las vías ascendentes y permite la elaboración de respuestas reflejas vegetativas y motoras (Wall y Melzack, 1989). Asimismo, en esta localización se efectúa el control nociceptivo eferente a través de las vías descendentes.

La localización anatómica en la médula espinal de los distintos tipos de neuronas y de las terminaciones de las fibras aferentes suele hacerse con referencia al esquema laminar de Rexed (Figura 1.3), en el cual la sustancia gris está dividida en diez láminas o capas. Las seis primeras (láminas I a VI) constituyen el asta posterior de la médula espinal, aunque funcionalmente la lámina X, situada alrededor del canal central, también puede ser incluida.

Las terminales axónicas de la primera neurona siguen un patrón característico en función del tipo de receptor que las conecta.

Las fibras aferentes mielínicas de grueso calibre ($A\beta$) que están conectadas a mecanorreceptores cutáneos de bajo umbral (no nociceptivas), arborizan profusamente en las láminas III, IV, menos marcadamente en las láminas V y VI, limitadamente en la lámina I y prácticamente no inervan la lámina II. Las fibras nociceptivas C se proyectan densamente en la lámina II y menos intensamente a la lámina I. Se proyectan escasamente a las láminas V y X. Por otro lado, las fibras nociceptivas $A\delta$ terminan predominantemente en la lámina I y en límite menor en la II y en la X. Las fibras nociceptivas provenientes de las vísceras, articulaciones y músculo se proyectan primariamente a las láminas I, V y VI, y las de las vísceras también en la X.

Existe un grado significativo de convergencia en la entrada de varios tejidos, de tal manera que las neuronas individuales del asta dorsal pueden ser inervadas por fibras aferentes de diversas fuentes: por ejemplo músculo y piel o víscera y piel. La convergencia somático visceral provee las bases anatómicas del dolor referido. En resumen los extremos proximales de la neurona primaria tienen una distribución anatómica definida en función de la localización del nociceptor (cutánea, visceral o músculo-articular) y del tipo de fibra ($A\delta$ o C) que conduce el estímulo (Millan, 1999).

1.1.7. Neuronas nociceptivas de segundo orden

La mayoría de las neuronas nociceptivas de la médula espinal se localizan en las láminas I, II, IV, V y VI. De acuerdo a las características de sus aferencias cutáneas se consideran tradicionalmente dos grupos de neuronas nociceptivas (Cerveró, 1995): las neuronas de amplio rango dinámico (ARD) que son activadas tanto por estímulos de bajo umbral (no nociceptivos) como por estímulos nociceptivos, y las neuronas activadas exclusivamente por estímulos nociceptivos, también conocidas como nocirreceptoras (NR) o nociceptivas específicas. Las neuronas activadas exclusivamente por estímulos mecánicos de bajo umbral se denominan mecanorreceptoras.

Las neuronas específicas son activadas exclusivamente por estímulos nocivos de alta intensidad mediados por fibras C y A δ . Estas neuronas se concentran principalmente en las láminas I y II, aunque también se encuentra en láminas más profundas como las V, VI y X. Se consideran importantes para señalar el carácter nocivo de un estímulo y para su localización fina (ya que cuentan con campos receptores estrechos) pero su capacidad para codificar la intensidad del estímulo es limitada.

Las neuronas de amplio rango dinámico manifiestan considerable convergencia muscular, cutánea y visceral. Estas neuronas se encuentran principalmente en la lámina V, y también en las IV y VI, pero también se localizan en las láminas I, II y X, así como en el asta ventral. Son incapaces de distinguir entre estímulos inocuos y nocivos. Carecen de la capacidad de localización precisa de los estímulos (poseen campos receptores muy amplios). La definición de neuronas de

amplio rango dinámico se refiere a que producen una respuesta dinámica sobre un amplio rango de estímulos; esto es que manifiestan una relación estímulo-respuesta creciente desde las intensidades de estímulo inocuo a nocivo. Consecuentemente, las neuronas de amplio rango dinámico son consideradas el tipo principal que codifica la intensidad del estímulo (Ness y Gebhart, 1990).

Las neuronas de amplio rango dinámico son activadas por estímulos mecánicos, térmicos y químicos mediados por las fibras C y A δ , y también por las A β . Las neuronas de amplio rango dinámico de las láminas profundas son las más claramente involucradas en los procesos de sensibilización y amplificación, mediados por fibras, que contribuyen al dolor prolongado.

La tercer clase de neurona es la no nociceptiva (NN), encontrada principalmente en las láminas II, III y IV y unas pocas en la lámina I.

Las neuronas del asta dorsal también pueden ser clasificadas de acuerdo a su destino: esto es, neuronas supraespinales o neuronas de proyección (NP) y neuronas propioespinales o interneuronas (IN) (Willis y Coggeshall, 1991). En ambos casos estas neuronas pueden ser específicas, de amplio rango dinámico y no nociceptivas.

Las NP se encuentran predominantemente en las láminas I, también en las V y VI, y unas pocas en la II y X. Por definición, estas neuronas transmiten la información nociceptiva a los centros supraespinales. En contraste, las IN se encuentran principalmente en la lámina II y se encargan de la integración y modulación de la información nociceptiva a niveles ínter e intralaminar, y también reciben

información de centros supramedulares. A su vez, las IN pueden dividirse en excitatorias (INEX) e inhibitorias (ININ) (Millan, 1999).

De esta manera, los estímulos nociceptivos sufren procesos de modulación espinales y supraespinales dentro del asta dorsal de la médula espinal. En general, la modulación intraespinal se realiza básicamente por las neuronas de la lámina II que se comportan como interneuronas. Algunas de ellas reciben aferencias nociceptivas y no nociceptivas, además de terminaciones descendentes de núcleos supraespinales, que generalmente excitan las neuronas de la lámina I que inician la vía espinotalámica. Otras, circunscriben su actividad a la lámina II conectando con neuronas específicas y de ARD, y su actividad suele ser de tipo inhibitorio. Los axones de las neuronas de la lámina I, cruzan la médula por la comisura anterior hasta alcanzar los cordones anterolaterales contralaterales, y de este cordón se diferencian los fascículos espinotalámicos anterior y lateral, el fascículo espinoreticular y el fascículo espinotectal. Existe evidencia de fibras que siguen un trayecto ascendente ipsilateral, sin cruzarse a nivel segmentario celular, e inician la vía espinotalámica. Una gran proporción envía sus axones a centros supraespinales bulbares y talámicos, siendo los más importantes el complejo medular reticular, el complejo reticular mesencefálico, la sustancia gris periacueductal y el núcleo ventroposterolateral del tálamo (Dickinson, 1996; Millan, 1999) (Figura 1.4).

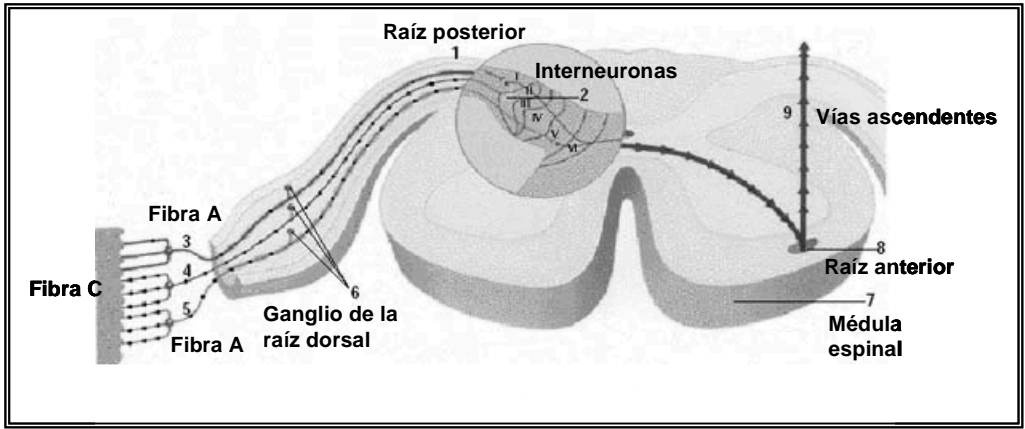


Figura 1.2. Conexiones de los nociceptores y las neuronas de primer y segundo órdenes.

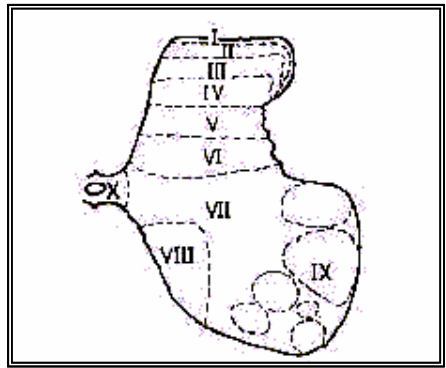


Figura 1.3. Esquema laminar de la médula espinal propuesto por Rexed.

1.1.8. Vías ascendentes

La sensación del dolor comprende dos componentes: el discriminativo sensorial que implica la percepción y la detección de un estímulo nocivo *per se*, lo cual incluye su intensidad, localización, duración y calidad, y el afectivo cognitivo que incluye la relación entre dolor y humor, la atención al dolor, la memoria sobre el fenómeno, su tolerabilidad y su racionalización (Besson et al., 1995).

La neuroanatomía y organización de las vías ascendentes de proyección dolorosa son complejas. Las neuronas del asta posterior de la médula espinal dan origen a las vías nociceptivas ascendentes que se concentran principalmente en el cuadrante anterolateral. Estas fibras ascienden en forma bastante difusa. Aunque una gran proporción de las neuronas nociceptivas medulares envían sus axones a centros supraespinales, bulbares y talámicos, los fascículos mejor definidos anatómicamente son los fascículos espinotalámicos anterior y lateral, el fascículo espinorreticular y el fascículo espinotectal (hacia el techo del mesencéfalo). Otras vías como el fascículo espinocervical constituyen vías secundarias de transmisión nociceptiva, y su papel se aprecia mejor cuando se lesionan las vías principales (Flores, 1993).

La vía espinotalámica está formada por dos fascículos: el fascículo espinotalámico lateral (que transmite la sensibilidad térmica y dolorosa) y el fascículo espinotalámico anterior o ventral (relacionado con la sensibilidad táctil). Los axones de estas neuronas cruzan la línea media por la comisura anterior y ascienden por el cordón anterolateral del lado opuesto de la médula espinal hacia el núcleo ventroposterolateral del tálamo (además sus axones proyectan

colaterales a diversos núcleos del tronco del encéfalo desde el bulbo al mesencéfalo (Flores, 1993; Millan, 1999). Este núcleo posteriormente se proyecta a la corteza sensorial primaria. Esta vía se considera especialmente discriminativa y transmite información sobre la localización precisa del dolor.

Así como la vía espinotalámica resulta fundamental en los procesos discriminativos sensoriales dolorosos, la vía espinoreticular lo es en el componente afectivo emocional. Esa asciende sobre ambos lados de la médula espinal hacia los núcleos intralaminares del tálamo. De ahí, la siguiente neurona lleva información a muchas áreas del cerebro como la parte anterior del giro cingulado (emoción), la amígdala (memoria y emoción), y el hipotálamo (emoción y respuestas vasculares a la emoción) (Cerveró, 1995). El fascículo mesencefálico ha sido descrito viajando con el fascículo espinotectal hacia la sustancia gris periacueductal y al colículo superior. Este puede ser el mismo o relacionado con la vía que viaja al núcleo parabraquial, el cual a su vez proyecta a la amígdala, hipotálamo y otras estructuras del sistema límbico (Flores, 1993). La vía espinohipotálamica, recientemente descrita, no hace sinapsis con la formación reticular. Transmite información de significación emocional de la piel, labios, órganos sexuales, tracto gastrointestinal, y córneas directamente al hipotálamo.

Estudios realizados en animales muestran que las neuronas de la lámina I (sobre todo nociceptivas específicas) establecen conexiones con el sistema simpático toracolumbar (lo que parece puede constituir la base para los reflejos somato-simpáticos), con la porción caudal del núcleo del tracto solitario y la médula ventrolateral (dos zonas implicadas en la regulación cardiorrespiratoria); otras

proyecciones se dirigen al área lateral parabraquial del mesencéfalo y a la sustancia gris ventrolateral periacueductal (su activación origina reacciones cardiovasculares defensivas).

1.1.9. Mecanismos tálamo corticales (neurona de tercer orden)

Los elementos discriminativo-sensoriales están mediados principalmente por el complejo ventrobasal del tálamo y por la corteza somatosensorial, estas áreas poseen neuronas nociceptivas con características similares a las de la médula espinal, con propiedades que permiten clasificarlas dentro de las clases II y III (multirreceptoras o de amplio rango dinámico y nocirreceptoras). El componente afectivo de las sensaciones dolorosas está mediado por núcleos talámicos mediales y por zonas de la corteza que incluyen las regiones prefrontales y especialmente la corteza supraorbital.

Aunque tradicionalmente se había considerado que la integración final de los componentes discriminativos, sensoriales y afectivos del dolor se hacía a nivel subcortical, sobre todo en el tálamo y núcleos diencefálicos subtalámicos, se ha observado que también existen centros corticales que participan en esta integración final, llegando la información modulada desde el tálamo hasta la corteza cerebral a través de las neuronas de tercer orden. Respecto al componente discriminativo-sensorial, una de las proyecciones más importantes parece ser la que va desde los núcleos del tálamo ventroposterior lateral (VPL) y ventroposterior inferior (VPI) hasta las áreas corticales S1 y S2, que a su vez

están interconectadas con áreas visuales, auditivas, de aprendizaje y memoria (Schaible y Grubb, 1993).

1.1.10. Vías descendentes

En años recientes ha sido posible demostrar la existencia de sistemas endógenos antinociceptivos supraespinales. El sistema de control inhibitorio descendente mejor caracterizado involucra la sustancia gris periacueductal que se extiende hasta el piso del tercer ventrículo.

Esta vía establece un relevo en el bulbo rostral ventromedial que incluye el núcleo magno del rafé y la formación reticular adyacente, y termina en el asta posterior de la médula espinal (Flores, 1993).

Las estructuras periacueductales reciben fibras de la corteza, el hipotálamo y el sistema límbico, explicando posiblemente la interacción de los elementos cognitivos y emocionales con la percepción del dolor. De esta manera, estímulos muy diversos pudieran activar la sustancia gris periacueductal, y ésta a su vez los núcleos del rafé con los consecuentes efectos inhibitorios de la nocicepción sobre la médula espinal (Álvarez et al.,1999). Adicionalmente, el sistema descendente puede ser activado por fibras colaterales nociceptivas ascendentes de la vía espinotalámica, espinoreticular y espinomesencefálica. Sin embargo, actualmente no está claro hasta que límite esos sistemas descendentes cooperan e interaccionan con las funciones normales y como pueden ser activados fisiológicamente (Flores, 1993).

Los procesos inhibitorios descendentes son de gran interés, y han sido estudiados extensivamente. En animales anestesiados, se ha observado que el disparo de las neuronas nociceptivas espinales, en respuesta al calentamiento nocivo de la piel, puede ser inhibido por la estimulación de la sustancia gris periacueductal y la formación reticular lateral mesencefálica (Zimmerman, 1984). Adicionalmente, también se puede inhibir las neuronas nociceptivas de la médula espinal por la estimulación eléctrica de otras regiones del cerebro tales como el núcleo del rafé, el "locus ceruleus" y varias regiones de la formación reticular medular, así como en el hipotálamo, corteza orbital y corteza somatomotora (Zimmerman, 1984).

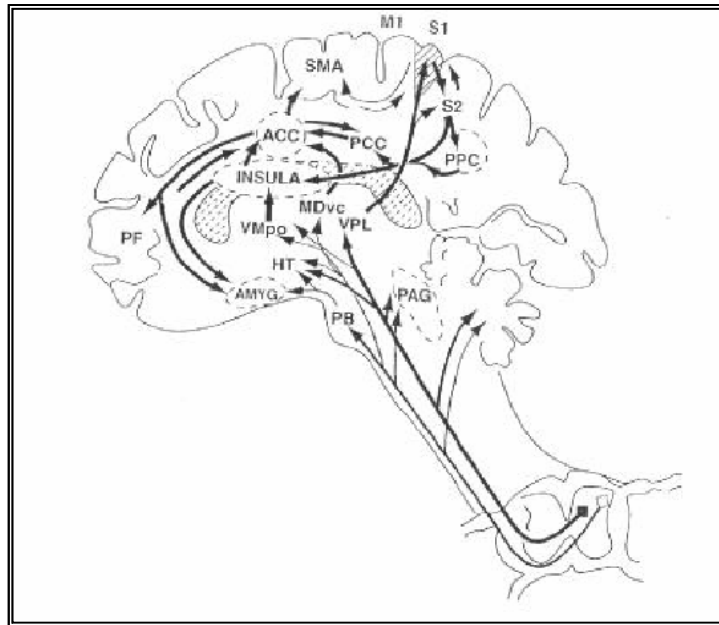


Figura 1.4. Vías ascendentes y estructuras subcorticales y corticales implicadas en la transmisión dolorosa. PAG (sustancia gris periacueductal). PB (núcleo parabraquial de la protuberancia). Vmpo (parte ventromedial del complejo posterior). MDvc (parte ventrocaudal del núcleo mediodorsal). VPL (núcleo ventroposterior lateral). ACC (corteza cingulada anterior). PCC (corteza cingulada posterior). HT (hipotálamo). Sñ1, S-2 (áreas somatosensoriales corticales). PPC (complejo parietal posterior). SMA (área motora suplementaria). AMYG (amígdala). PF (corteza prefrontal).

1.2. MEDIADORES DEL DOLOR

Los estímulos nociceptivos periféricos activan las fibras sensoriales A δ y C, las cuales conducen la información al asta dorsal de la médula espinal. Las terminaciones nerviosas de estas fibras liberan transmisores excitatorios que actúan sobre receptores específicos e inducen la despolarización de las neuronas de segundo orden de la médula espinal. La información nociceptiva se transmite todavía hacia centros superiores talámicos y corticales. Asimismo, a su paso por las diferentes estructuras nerviosas, los impulsos nociceptivos sufren modulación inhibitoria a varios niveles por sistemas capaces de disminuir la liberación de transmisores excitatorios y la excitabilidad neuronal (Yaksh, 1999).

1.2.1 Activación de los nociceptores

Tras la activación de los nociceptores resulta necesario distinguir dos situaciones: primero cuando son estimulados directamente por condiciones nocivas concretas, como un estímulo mecánico o térmico intenso de corta duración que no causan lesión tisular manifiesta; y segundo, la estimulación de dichos nociceptores después de una lesión y destrucción celular que induce la liberación de mediadores químicos algogénicos, tanto por parte del propio tejido lesionado como por los elementos que participan en la reacción inflamatoria consiguiente. En el primer caso, el estímulo mecánico o térmico activa los nociceptores e induce la despolarización de la membrana, lo cual genera potenciales de acción que se transmiten hacia el asta dorsal y después hacia centros superiores. Aunque puede

aparecer dolor, el nociceptor recobrará en poco tiempo su condición basal. En el segundo caso, el nociceptor no recupera su sensibilidad original, ya que aparecen fenómenos de sensibilización e hiperalgesia que modifican el estado basal del nociceptor, alterando la respuesta habitual al fenómeno nociceptivo (Dray et al., 1994).

El daño tisular cutáneo provocado por irritantes químicos, daño térmico, estimulación eléctrica, etc., relacionado con reacción inflamatoria, se asocia con 2 zonas principales de dolor. La primera, conocida como zona de hiperalgesia primaria, comprende la región tisular dañada, y se caracteriza por la presencia de dolor espontáneo y una sensibilidad aumentada a los estímulos térmicos, mecánicos y químicos. Rodeando esta área se encuentra un espacio no dañado conocido como zona de hiperalgesia secundaria, la cual se caracteriza por una sensibilidad aumentada a los estímulos mecánicos, pero no al calor, y también manifiesta hipersensibilidad a los estímulos fríos (Aloe, 1997).

1.2.2 Sensibilización periférica

La hiperalgesia primaria resulta de cambios en la sensibilidad de la transducción, en la respuesta y actividad de los nociceptores periféricos y en la activación de nociceptores silentes. Los procesos de activación o excitación y sensibilización de las terminales aferentes periféricas son altamente complejos e involucran las acciones aditivas y sinérgicas, sobre el nociceptor, de una diversidad de sustancias liberadas por el mismo nociceptor, el tejido dañado, células

inmunocompetentes, vasos sanguíneos y terminales simpáticas (McMahon, 1994; Dray, 1997) (Figura 2.1).

La excitación consiste en una despolarización rápida y directa del nociceptor seguida por un pico de actividad y la inducción de potenciales de acción. En contraste, la sensibilización se refiere al aumento de la probabilidad de disparo de las neuronas en respuesta a un estímulo adicional.

Las acciones pronociceptivas de las sustancias algogénicas sobre las terminales reflejan su despolarización y la transmisión ortodrómica de los impulsos dolorosos al asta dorsal. Simultáneamente se pueden disparar impulsos antidrómicos en fibras colaterales. Esto provoca la liberación de aminoácidos excitatorios, sustancia P y otros mediadores que aumentan el dolor mediante un sistema de retroalimentación (McMahon, 1994; Rang et al., 1994; Dray, 1997). Entre los mediadores más conocidos implicados en la activación y sensibilización de los nociceptores periféricos se describen los siguientes.

1.2.2.1. Protones y vanilloides

El exudado inflamatorio, músculo isquémico, tejido cardíaco postinfarto, fluido sinovial de articulaciones artríticas, hematomas provocados por fractura y el tejido que rodea a los tumores malignos pueden producir aumento en la concentración de protones, y la excitación de las fibras nociceptivas por este mecanismo (Bevan y Geppetti, 1994; Wood y Docherty, 1997).

La aplicación de soluciones ácidas (pH 5) o capsaicina en la piel induce la activación de las fibras aferentes nociceptivas y dolor por la activación de

receptores específicos denominados receptores VR1 y VR1-like (Bevan y Yeats, 1991; Caterina y Julius, 2001). Los receptores VR1 se activan por protones, calor nocivo, capsicina y algunos metabolitos del ácido araquidónico. En contraste, los receptores VR1-like se activan por calor nocivo extremo (más de 50°C).

1.2.2.2. Bradicinina

La destrucción celular permite la salida de enzimas proteolíticas al líquido extracelular, las cuales degradan cininógenos de alto peso molecular dando lugar a la bradicinina. Esta amina es un producto de la calicreína, involucrada en múltiples procesos fisiológicos como el control de la presión arterial, la contracción y relajación de músculo liso, la respuesta inflamatoria y la nocicepción (Marceau, 1995). La infusión intradérmica de bradicinina, su aplicación en la piel o su inyección intravenosa, producen dolor intenso e inmediato relacionado con la excitación de las fibras polimodales C y las A δ (Whalley et al., 1987; Khan et al., 1992). La bradicinina se une de manera específica a 2 receptores de membrana (Marceau, 1995; Hall, 1997). Los receptores B₁ no están presentes en los tejidos en condiciones normales, sin embargo, tienen un papel importante en condiciones de inflamación prolongada y luego de su inducción por citocinas, como el TNF α y la IL-1 β .

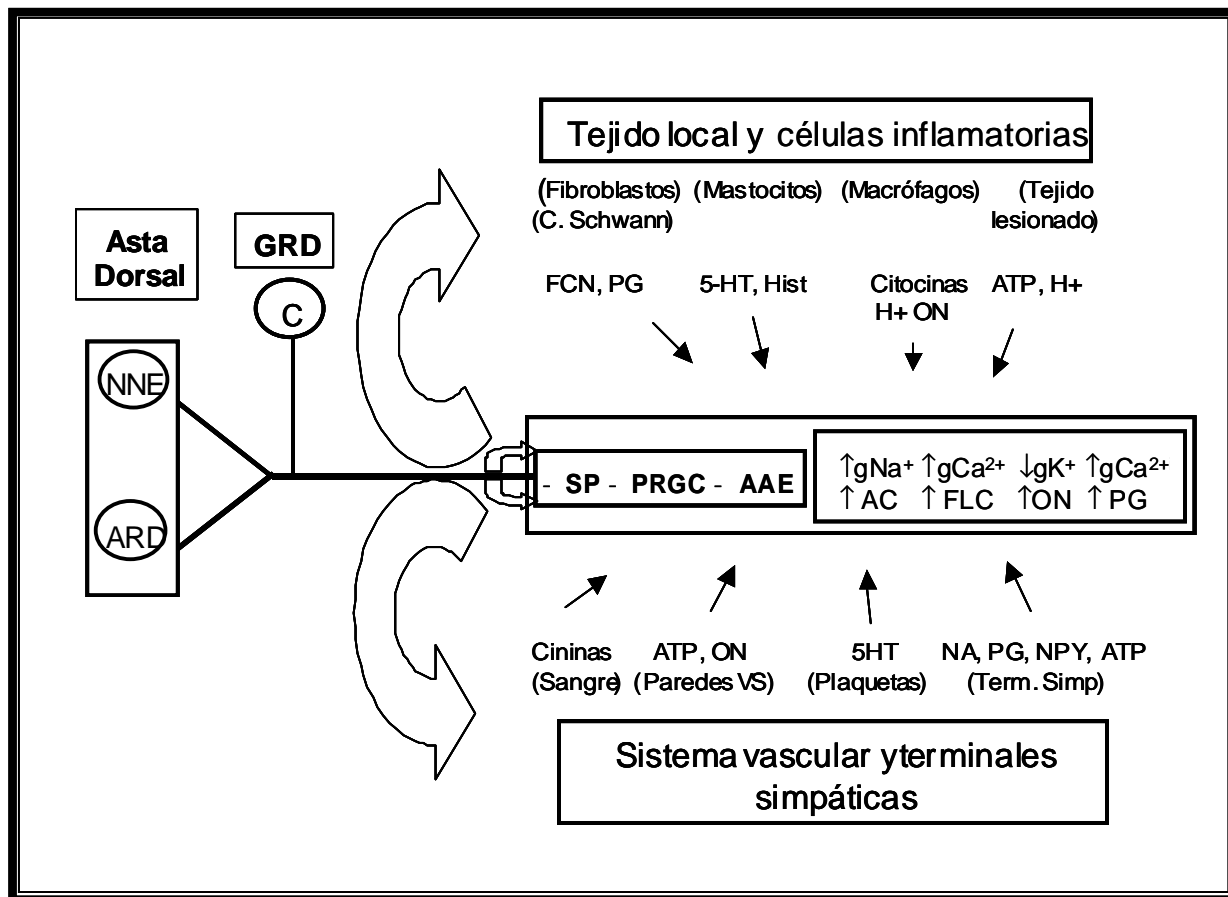


Figura 2.1. Proceso de activación y sensibilización de terminales aferentes periféricas en el sistema sensorial nociceptivo. NNE (neurona nociceptiva específica). ARD (neurona de amplio rango dinámico). C (fibra C). GRD ganglio de la raíz dorsal. FCN (factor de desarrollo neural). PG (prostaglandinas). 5-HT (serotonina). Hist (histamina). H⁺ (protón). ON (óxido nítrico). ATP (adenosin trifosfato). SP (sustancia P). PRGC (péptido relacionado con el gen de calcitonina). AAE (aminoácidos excitatorios). AC (adenilato ciclasa). FLC (fosfolipasa C). G (corriente). NA (noradrenalina). NPY (neuropéptido Y).

Se ha sugerido que los receptores B₁ y B₂ ejercen acciones excitatorias y sensibilizadoras. Experimentos en ratones transgénicos indican que los receptores B₂ son los encargados de mediar las acciones algésicas y fásicas de la bradicinina sobre las terminales nerviosas (Calixto et al., 2000). De tal manera, los antagonistas B₂ ejercen efectos antinociceptivos más marcados (Buritova et al., 1997). Por otro lado, la activación del receptor B₁ es importante para el desarrollo de la hiperalgesia, ya que ratones transgénicos sin dicho receptor muestran respuestas hipoalgésicas a formalina, capsaicina o a estímulos térmicos.

Estudios sobre neuronas sensoriales sugieren que la excitación de las terminales aferentes por receptores B₂ se debe a la estimulación de la fosfolipasa C (FLC), lo cual aumenta el Ca²⁺ intracelular y el diacilglicerol (DAG). Esto activa a la proteína cinasa C (PKC) resultando en la fosforilación de canales de Na⁺. El aumento de Ca²⁺ intracelular puede, potencialmente, iniciar una amplia gama de eventos que modifican la actividad de las fibras aferentes nociceptivas. Además de sus acciones excitatoria y sensibilizadora, la bradicinina puede liberar algunos neurotransmisores como prostaglandinas, óxido nítrico y péptido relacionado con el gene de calcitonina (PRGC) (Gammon et al., 1989; Dray y Urban, 1996; Dray, 1997), lo que permite amplificar la respuesta nociceptiva.

1.2.2.3. Prostaglandinas y leucotrienos

Las prostaglandinas son sustancias derivadas del metabolismo del ácido araquidónico, presente en los fosfolípidos de las membranas celulares. Son generadas bajo la acción de la enzima ciclooxigenasa (COX). Por otra parte, los

leucotrienos se sintetizan también a partir de ácido araquidónico por acción de la enzima lipooxigenasa (LOX). Aunque las prostaglandinas pueden sintetizarse en prácticamente todos los tejidos, en condiciones de inflamación y daño nervioso, también lo son por células inmunocompetentes y terminales simpáticas. La COX-2 es probablemente la fuente principal de prostaglandinas en condiciones inflamatorias (Buritova et al., 1996; Dray y Urban, 1996). Sin embargo, no existe evidencia sustancial para descartar la participación de la COX-1. Entre las sustancias que activan a la COX-2 para iniciar la síntesis de prostaglandinas están el óxido nítrico y algunas citocinas derivadas de células inmunes, tales como $\text{TNF}\alpha$ e $\text{IL-1}\beta$.

Se sabe que la PGE_2 y la PGI_2 (prostaciclina) son las prostaglandinas que más contribuyen a la hiperalgesia. La aplicación de prostaglandinas a la piel no es usualmente dolorosa, pero altas concentraciones de éstas pueden contribuir a la excitación de las fibras nociceptivas a través de la supresión de la conductancia al K^+ y el aumento de la conductancia al Na^+ y al Ca^{2+} , fenómenos que conducen a la liberación de neuropéptidos de las fibras C. Los subtipos de receptores que median estas acciones son inciertos, pero hay reportes de que los receptores EP e IP están involucrados. Estudios realizados en ratones transgénicos deficientes de PGI_2 muestran una reducción de la inflamación y el dolor consistentes con la participación de PGI_2 (Murata et al., 1997). El leucotrieno B_4 se acumula en el tejido inflamado y parece promover la liberación de $8R,15S$ -diHETE de leucocitos polimorfonucleares. Este leucotrieno interactúa con fibras C para producir

hiperalgesia mediante un mecanismo desconocido (Amann et al., 1996; Dray, 1997).

1.2.2.4. Citocinas

Las citocinas (interleucinas, factor de necrosis e interferones) liberadas por células fagocíticas también se han relacionado con el proceso de nocicepción. Se sabe que la administración de irritantes en la pata de la rata aumenta localmente la liberación de productos de la COX y aminas simpaticomiméticas relacionadas con la liberación de citocinas. El proceso inicia con la liberación de bradicinina después del estímulo doloroso. Esta a su vez estimula la liberación del factor de necrosis tumoral ($TNF\alpha$). El $TNF\alpha$ induce a la interleucina 1β (IL- 1β) y a la IL-6, las cuales estimulan la liberación de prostaglandinas e IL-8. Las prostaglandinas, además de otros mediadores inflamatorios como la misma bradicinina, serotonina, histamina, etc., se unen a receptores específicos en la terminal sensorial para producir la estimulación directa o la sensibilización, en tanto que la IL-8 estimula la liberación de aminas simpaticomiméticas, principalmente noradrenalina y dopamina (NA y DA), que también contribuyen a mantener el estado de dolor e hiperalgesia. Reciente evidencia demuestra que mientras algunas citocinas producen dolor e hiperalgesia (IL- 1β , IL-6, IL-8), otras (IL-4 e IL-10) disminuyen el dolor producido por diferentes estímulos inflamatorios.

1.2.2.5. ATP

El trifosfato de adenosina (ATP) puede generarse de fuentes múltiples para activar las terminales periféricas aferentes: 1) Las células cancerosas contienen altos niveles de ATP y pueden estar participando en la activación de las fibras aferentes nociceptivas en tejidos cancerosos. 2) Las células vasculares endoteliales y/o plaquetas pueden ser una fuente de ATP en casos de migraña, y dolor isquémico y 3) Las fibras simpáticas co-liberan ATP y noradrenalina, lo cual produce la activación de las fibras aferentes nociceptivas (Crea et al., 1990).

El ATP puede producir dolor si se infunde en la piel. Las acciones del ATP involucran la estimulación de receptores ionotrópicos de la familia P_{2X} . La interacción con el receptor resulta en una despolarización inmediata y aumento de Ca^{2+} intracelular. El RNAm que codifica para los receptores de esta familia se encuentra en los ganglios de la raíz dorsal y ganglios trigéminos y está co-localizado con SP y el PRGC. Las acciones rápidas y excitatorias del ATP parecen depender específicamente de la activación de los receptores P_{2X2} y P_{2X3} , los cuales están localizados exclusivamente en fibras de diámetro pequeño de neuronas sensoriales (Burnstock, 1996; Vulchonova et al., 1997).

Los receptores P_{2X3} rápidamente se desensibilizan debido a la desfosforilación dependiente de Ca^{2+} -calmodulina mediada por la calcineurina. En contraste, los receptores P_{2X2} no se desensibilizan rápidamente. Además de estos receptores, existe evidencia de que los receptores metabotrópicos P_{2Y} (acoplados a FLC y aumento de Ca^{2+}) tienen una participación importante en el dolor y la alodinia. El

ATP se metaboliza de manera rápida a adenosina, la cual puede modular el dolor a través de su interacción con diferentes receptores. Adicionalmente, la activación de receptores A_{2A} , acoplados positivamente a adenilato ciclasa, parece conducir a la producción de dolor. En contraste, los receptores periféricos A_1 , los cuales inhiben a la adenilato ciclasa y aumentan y disminuyen las corrientes de K^+ y Ca^{2+} , respectivamente, parecen ser antinociceptivos en analogía con el receptor espinal A_1 . Reciente evidencia indica que ratones transgénicos sin el receptor periférico A_{2A} despliegan hipoalgesia, lo cual confirma la participación de dicho receptor en la producción de dolor.

1.2.2.6. Serotonina

Las fibras aferentes nociceptivas se pueden excitar periféricamente por serotonina proveniente de la propia lesión tisular, de plaquetas, mastocitos y células endoteliales. Las terminales simpáticas son también una fuente de serotonina (5-HT). La administración de serotonina en la piel produce dolor en el hombre. De la misma manera, el ganglio de la raíz dorsal expresa el RNAm que codifica para diferentes receptores a serotonina.

La serotonina activa las fibras C polimodales y las $A\delta$ a través de la activación de receptores $5-HT_3$, los cuales están directamente acoplados a un canal iónico permeable al Na^+ (y K^+) (Grubb et al., 1988; Abbot et al., 1997). La despolarización neuronal abre canales de Ca^{2+} sensibles a voltaje (posiblemente del tipo L). Los receptores $5-HT_3$ están acoplados positivamente a la FLC e inician cambios en las fibras aferentes nociceptivas vía mecanismos intracelulares donde participa la

activación de la PKC inducida por DAG y el aumento de Ca^{2+} intracelular inducido por IP_3 . La entrada de Ca^{2+} , vía los canales de Ca^{2+} sensibles a voltaje produce un aumento mayor del Ca^{2+} intracelular a través de la activación de receptores a rianodina. Los antagonistas del receptor 5-HT_3 tienen efectos antinociceptivos en varios modelos de dolor inflamatorio, aunque en la clínica no se han observado resultados alentadores con estos fármacos.

1.2.2.7. Noradrenalina

La noradrenalina puede ser liberada por una gran cantidad de estímulos que incluyen al glutamato, óxido nítrico, bradicinina, prostaglandinas, serotonina, citocinas, neuropéptido Y (NPY) y la propia amina (Carlton et al., 1995, 1996).

Bajo condiciones de inflamación y dolor, la liberación de noradrenalina por el sistema simpático tiene una participación importante en la modulación del dolor. Aunque altas concentraciones de noradrenalina no excitan a las fibras aferentes nociceptivas, hay evidencia funcional de que noradrenalina activa directa e indirectamente la actividad de fibras aferentes nociceptivas de piel, músculo y articulaciones bajo condiciones de inflamación.

Diferentes estudios han implicado al receptor adrenérgico α_{1A} en la mediación de la hiperalgesia inflamatoria. El papel pronociceptivo de los receptores α_1 es consistente con su acoplamiento a FLC y aumento de Ca^{2+} intracelular. Aunque los efectos directos de la noradrenalina sobre la terminal parecen poco probables, en virtud de que las fibras aferentes nociceptivas expresan poco el receptor α_1 , dichos receptores podrían estar aumentados en condiciones de inflamación. Con

respecto a los receptores α_2 , los ganglios de la raíz dorsal expresan el RNAm que codifica para los receptores adrenérgicos α_{2A} , α_{2B} y α_{2C} , sugiriendo que pudieran modular la actividad nociceptiva de las fibras aferentes nociceptivas. Sin embargo, la evidencia de las acciones sobre el receptor α_2 parecen involucrarlo más en acciones antinociceptivas (Aley y Levine, 1997).

1.2.2.8. Histamina

La histamina se deriva de los mastocitos o células cebadas y es un componente común del medio inflamatorio. La histamina produce una sensación de comezón más que de dolor. Sin embargo, concentraciones altas pueden ser dolorosas. Además, la exposición a histamina puede conducir a la liberación de la sustancia P y del péptido relacionado con el gen de la calcitonina de las fibras aferentes nociceptivas y a la activación de las neuronas nociceptivas en el asta dorsal de una manera similar a la observada con estímulos nocivos cutáneos (Bileviciute et al., 1997). Las acciones de la histamina sobre las fibras aferentes se deben a la activación de los receptores H_1 positivamente acoplados a FLC y aumentos de Ca^{2+} intracelular. Esto podría activar a canales de Ca^{2+} sensibles a voltaje y la inducción de la síntesis de óxido nítrico. No se ha descartado la participación de los receptores H_2 (acoplados a adenilato ciclasa y PKA) en las acciones de la histamina.

1.2.2.9 Óxido nítrico

El óxido nítrico (ON) es un radical libre que actúa como mensajero en un gran número de sistemas biológicos, (Moncada et al., 1991) y está involucrado en los procesos de transmisión nociceptiva periférico y central. El ON se sintetiza por la conversión del aminoácido L-arginina a L-citrulina, mediante la acción de la enzima sintasa de óxido nítrico. El papel del ON a nivel periférico no está completamente establecido, y probablemente favorece la transmisión nociceptiva durante procesos inflamatorios (Anbar, 1997). Sin embargo, en el SNC el ON modula la liberación de diversos neurotransmisores (GABA, serotonina, acetilcolina, noradrenalina) y podría participar en procesos de plasticidad y sensibilización neuronales. Aparentemente el sistema ON-GMPc está implicado en la analgesia inducida por AINEs y opioides (Janicki et al., 1998).

1.2.2.10. Aminoácidos excitatorios, taquicininas y péptido relacionado con el gene de calcitonina

Se ha observado la liberación de glutamato de las terminales de las fibras aferentes nociceptivas mismas, y quizás, de células inmunocompetentes (Jeftinija et al., 1991). La evidencia experimental indica que el glutamato produce hiperalgesia vía la excitación directa de las fibras aferentes nociceptivas (Carlton et al., 1995; Davidson et al., 1997). Estudios de biología molecular y el análisis farmacológico indican la expresión del RNAm en los ganglios de la raíz dorsal y la presencia de receptores a N-metil-D-aspartato (NMDA), AMPA y kainato en las

fibras de diámetro pequeño periféricas. La administración local de antagonistas del receptor NMDA (ketamina) inhibe la hiperalgesia primaria y secundaria del tejido cutáneo sugiriendo que los receptores NMDA periféricos participan en procesos pronociceptivos en el hombre y en animales. La acción del glutamato sobre los receptores de las fibras aferentes nociceptivas produce a su vez la liberación de sustancia P de sus terminales nerviosas. La acción del glutamato sobre las fibras aferentes nociceptivas podría involucrar la participación del óxido nítrico (Sorkin, 1993).

La liberación de sustancia P por glutamato puede estar involucrada en las acciones pronociceptivas periféricas. En analogía con el glutamato, la sustancia P puede activar a las fibras aferentes nociceptivas en varios tejidos, incluyendo músculos y piel. La sustancia P es un decapeptido perteneciente a la familia de las taquicininas, que incluye a las neurocininas A y B. Se han caracterizado tres tipos de receptores a neurocininas (NK1, NK2 y NK3. La sustancia P tiene mayor afinidad por el receptor NK1 (Stein, 1993). La sustancia P es liberada a partir de las terminaciones periféricas de los nociceptores y produce vasodilatación, aumento de la permeabilidad capilar, aumento de la actividad fagocítica de los neutrófilos y macrófagos, aumento en la producción y liberación de mediadores inflamatorios y liberación de histamina por los mastocitos, efectos que contribuyen a mantener la respuesta inflamatoria y a la sensibilización de los nociceptores, aunque no una activación directa de los mismos (Dray, 1994). Sin embargo también se han descrito para la sustancia P acciones directas sobre el receptor NK₁, acoplado a FLC/PKC y aumento de Ca²⁺ intracelular (Carlton et al., 1996).

Los receptores NK_2 y $PRGC_1$ (acoplados positivamente a adenilato ciclasa) pueden activar también a fibras aferentes nociceptivas (Edvinsson et al., 1997).

1.2.3 Mecanismos de sensibilización

1.2.3.1. Aumento en los niveles de AMPc

La alteración de la excitabilidad de la neurona sensorial puede estar mediada por la activación de la adenilato ciclasa y la generación de AMPc. La administración intraplantar de análogos de AMPc produce hiperalgesia. Además, el efecto hiperalgésico de la PGE_2 se potencia en presencia de análogos de AMPc y de un activador de adenilato ciclasa; la enzima responsable de la síntesis de AMPc (Malmberg et al., 1997). La hiperalgesia inducida por serotonina ($5-HT_4$ y $5-HT_7$) y dopamina aumenta en presencia de un activador de la adenilato ciclasa y se prolonga en presencia de un inhibidor de la degradación de AMPc. El AMPc activa a la PKA, la cual fosforila a canales de K^+ , disminuyendo la conductancia a éste y disminuyendo el umbral al dolor.

1.2.3.2 Activación de corrientes de Na^+ resistentes a tetrodotoxina

Evidencia reciente indica que la interacción de diversas sustancias tales como PGE_2 , serotonina (posiblemente sobre los receptores $5-HT_4$) y adenosina facilitan una corriente de Na^+ ligada a voltaje y resistente a tetrodotoxina (TTX) en el canal llamado PN3 (Gold et al., 1996). Este canal es específico de neuronas nociceptivas de diámetro pequeño. El umbral de activación de este canal está disminuido, mientras que la magnitud y la frecuencia de activación están

aumentadas. Es probable que el aumento de actividad en AMPc/PKA en las terminales de las fibras aferentes nociceptivas no esté restringido a la alteración de la conductancia al K^+ , sino que también pueda estar participando en la potenciación de esta corriente de Na^+ .

1.2.3.3 Activación de corrientes de Ca^{2+}

Los canales de Ca^{2+} ligados a voltaje de alto umbral permiten a los iones Ca^{2+} entrar a las neuronas luego de la despolarización y por lo tanto pueden influenciar los sistemas de receptores y mediadores sinápticos, los niveles de excitabilidad de la membrana, la concentración de segundos y terceros mensajeros y la expresión de genes. Estos canales se clasifican en varios tipos: L, N, P/Q y R de acuerdo a sus propiedades electrofisiológicas y su sensibilidad a antagonistas específicos. Los canales L, N y R participan en la liberación de neurotransmisores y en una misma sinapsis se puede encontrar varios de los tipos de canales.

Las corrientes de Ca^{2+} de las células del ganglio de la raíz dorsal se pueden modular por una variedad de neurotransmisores y mediadores inflamatorios. Esta modulación puede estar mediada por vías que dependen de la PKC y la PKA. Además de su acción en la despolarización de la membrana, las corrientes de Ca^{2+} pueden activar de manera indirecta corrientes de Cl^- y K^+ activadas por Ca^{2+} para producir hiperpolarización de las membranas.

1.2.3.4 Activación de la PKC, vía la FLC

La inducción de la FLC por la activación de los receptores B_2 o NK_1 dispara varios mecanismos que aumentan la actividad de las fibras aferentes nociceptivas. La

estimulación de la FLC, mediante el aumento de la concentración de Ca^{2+} , puede aumentar indirectamente la actividad de la adenilato ciclasa y elevar los niveles de AMPc. Además, la estimulación de la FLC aumenta los niveles de DAG, el cual junto con el Ca^{2+} activa a la PKC, conduciendo a la fosforilación y aumento de actividad de ciertos canales iónicos permeables a cationes, incluyendo los canales de Ca^{2+} sensibles a voltaje, o receptores involucrados en el control de la actividad y liberación de neurotransmisores en las fibras aferentes nociceptivas (Dray y Urban, 1996). La bradicinina sensibiliza neuronas sensoriales primarias a estímulos térmicos por la activación de la FLC/PKC. La activación de la FLC/PKC fosforila proteínas localizadas en la terminal sináptica y esto conduce a la liberación de SP y PRGC de las terminales sensoriales. La despolarización de la terminal y el aumento de Ca^{2+} también participan en este efecto. El ácido araquidónico, las prostaglandinas y otros metabolitos (prostaciclina e isoprostanos) también aumentan la liberación de la terminal sensorial a través de un mecanismo que incluye la activación de la PKC y posiblemente los receptores metabotrópicos a glutamato (Collins y Davis, 1998).

La sustancia P aumenta por sí misma la sensibilidad de las fibras aferentes nociceptivas por una facilitación de las corrientes mediadas por ATP. Esta acción implica una aceleración de la desensibilización de los receptores P_{2X3} mediado por la PKC.

1.2.3.5 Inhibición de corrientes de K⁺

Las fibras aferentes nociceptivas poseen una población sustancial de receptores 5-HT_{2A}, el principal tipo de receptor serotoninérgico involucrado en la activación de las terminales en la sensibilización de las fibras aferentes nociceptivas. La activación de los receptores 5-HT_{2A} reduce la corriente de K⁺, de manera independiente de AMPc, vía la intervención de una proteína G. La atenuación de las corrientes de K⁺ reduce la post-polarización y es la base de las potentes acciones de los agonistas del receptor 5-HT_{2A} en tejidos inflamados (Abbott et al., 1997). Asimismo, los antagonistas del receptor producen antinocicepción en el dolor inflamatorio de la piel, vísceras y otros tejidos en animales y en el hombre. La supresión indirecta de la conductancia al K⁺ mediada por AMPc/PKA puede estar involucrada en las acciones de prostaglandinas (PGE₂) y otros transmisores que activan a la adenilato ciclasa de las fibras aferentes nociceptivas. Es posible que la disminución de la corriente de K⁺ mediadas por FLC participe en las acciones pronociceptivas de la sustancia P.

1.2.4. Sensibilización espinal

Existe suficiente evidencia de que la estimulación nociva prolongada, intensa y recurrente de las fibras C conduce a un aumento de la eficacia sináptica y de la excitabilidad de las neuronas de amplio rango dinámico en el asta dorsal. En analogía con la sensibilización periférica, el procesamiento central de amplificación de la respuesta refleja la transformación de las sinapsis de un modo “silencioso” a un modo “activo” (Cerveró, 1994).

El daño a la piel y otros órganos, la aplicación cutánea de capsaicina, la inflamación, la administración de glutamato o irritantes como la formalina o la estimulación eléctrica nociva breve activa las fibras C (y posiblemente $A\delta$, pero no $A\beta$) y produce un estado de excitabilidad exagerada en el asta dorsal, en particular, en laminas profundas (Fields y Basbaum, 1994). La excitabilidad aumentada tiene varias características generales: a) Un estímulo transitorio ahora provoca una respuesta de mayor duración e intensidad (hiperalgesia), b) Los campos receptivos aumentan de tal manera que ahora se puede provocar dolor activando áreas alejadas del sitio de daño (hiperalgesia secundaria), c) El umbral de disparo de las neuronas se reduce de tal manera que ahora los estímulos de baja intensidad y que bajo condiciones normales no son nocivos ahora producen dolor. Hay un aumento y aparición de respuestas a fibras $A\beta$ (alodinia).

La estimulación de las fibras C por estímulos nocivos produce la liberación de diferentes sustancias a nivel del asta dorsal de la medula espinal. Dentro de las sustancias más comunes liberadas en la medula espinal durante el desarrollo de la sensibilización espinal están la sustancia P, el péptido relacionado con el gen de la calcitonina y los aminoácidos excitadores (glutamato y aspartato, principalmente) (Hu et al., 1997). La influencia de estos transmisores localizados en las fibras aferentes nociceptivas de manera presináptica producen actividad sobre neuronas postsinápticas o neuronas de proyección, interneuronas e incluso sobre neuronas presinápticas localizadas en el asta dorsal mediante diferentes mecanismos (Yamagata et al., 1993; Breder et al., 1995). Estas sustancias se unen a sus receptores específicos para producir la sensibilización o facilitación.

El glutamato (Glu) y el aspartato (Asp) son considerados los principales transmisores nociceptivos en el asta dorsal de la médula espinal. La localización de inmunorreactividad al glutamato en neuronas del ganglio de la raíz dorsal, su liberación en el asta dorsal de la médula espinal provocada por estimulación eléctrica, la activación de las neuronas de proyección tras su aplicación iontoforética (la cual es inhibida por antagonistas específicos) y la generación de hiperalgesia térmica tras su aplicación (también inhibida por antagonistas específicos), involucran a los aminoácidos excitatorios como neurotransmisores entre las fibras aferentes primarias y las neuronas de segundo orden de la raíz dorsal.

Los aminoácidos excitatorios producen sus efectos a través de la activación de una amplia categoría de receptores ionotrópicos y metabotrópicos. Los receptores ionotrópicos han sido tradicionalmente clasificados en NMDA (N-metil-D-aspartato), AMPA (RS- α -amino-3-hidroxi-5-metilsoxazol-4-propionato) y KA (ácido kainico). Los receptores metabotrópicos activados por el glutamato están acoplados a proteínas G.

1.2.4.1. Receptores AMPA

La estimulación de las fibras C o la liberación espinal de glutamato y aspartato y otros aminoácidos excitadores produce corrientes catiónicas (principalmente de Na⁺) mediadas por el receptor ionotrópico AMPA (Dickinson, 1997; Wood y Docherty, 1997). La unión de glutamato con los receptores AMPA tiene una participación importante en la transmisión fásica (rápida) de la información nociceptiva en la medula espinal. La activación de los receptores AMPA conduce a

la activación de canales de Ca^{2+} sensibles a voltaje, los cuales amplifican la despolarización y aumentan el Ca^{2+} intracelular (Wood y Docherty, 1997). Todo este proceso ayuda a retirar al Mg^{2+} del canal del receptor NMDA. Las corrientes catiónicas producidas por la activación del receptor AMPA se desensibilizan también rápidamente. De hecho, hay evidencia que en la inflamación periférica se disminuye la expresión del gen de los receptores AMPA (subunidad gluR1). Por lo tanto, se puede considerar que la activación del receptor AMPA participa en el inicio de la sensibilización, pero no en el mantenimiento, donde los receptores NMDA y NK tienen una participación más importante (Coderre y Melzack, 1991; Dickinson, 1997).

1.2.4.2. Receptores a NMDA

El glutamato y aspartato activan a los receptores NMDA y no-NMDA postsinápticos. La estimulación de estos receptores produce la despolarización de neuronas secundarias y un aumento de la conductancia al Ca^{2+} . El aumento de Ca^{2+} y diacilglicerol activa a la PKC, la cual fosforila a los receptores NMDA para contrarrestar el bloqueo de éstos por el Mg^{2+} y permite a dichos receptores operar con potenciales más negativos (Chapman et al., 1996; Kawamata y Omote, 1996; Sharma y Stevens, 1996; Chizh et al., 1997). Además, los receptores NMDA presinápticos pueden aumentar la liberación de sustancia P y aminoácidos excitadores acentuando los efectos sensibilizadores de dichas sustancias en las neuronas de proyección en el asta dorsal. Esta acción se complementa con la

liberación de óxido nítrico y prostaglandinas (Yaksh y Malmberg, 1994; Yaksh, 1997; Wilcox y Seybold, 1997).

Se cree que el óxido nítrico y las prostaglandinas se liberan en la medula espinal para sensibilizar y facilitar el paso de la información dolorosa hacia niveles supraespinales. La participación de los receptores NMDA y no-NMDA y de las enzimas sintasa de óxido nítrico (SON) y COX en el proceso de sensibilización espinal se basa en la siguiente evidencia. Primero, el dolor y la hiperalgia producida por formalina o carragenina se reducen de una manera dependiente de la dosis por la administración intratecal de antagonistas del receptor NMDA y no-NMDA o de inhibidores de la SON y de la COX (Dickinson, 1997). Segundo, los efectos conductuales (dolor espontáneo e inducción de hiperalgia) se mimetizan por el pretratamiento, pero no el postratamiento, con agonistas del receptor NMDA y no-NMDA o la administración espinal de óxido nítrico y prostaglandinas y esos efectos se antagonizan por los antagonistas o inhibidores respectivos. Tercero, la estimulación periférica produce un aumento de los niveles extracelulares de aminoácidos excitadores, óxido nítrico y prostaglandinas medidos en el asta dorsal o en la región lumbar de la medula espinal.

El mecanismo de facilitación producido por las prostaglandinas es poco claro, pero se sabe que éstas facilitan la liberación de la sustancia P de aferencias sensoriales. En el caso del óxido nítrico, éste activa a la guanilato ciclasa para producir GMPc en las neuronas de amplio rango dinámico del asta dorsal. El aumento de GMPc activa a la PKG, la cual fosforila receptores gabaérgicos y

glicinérgicos inhibitorios. La inhibición de estas neuronas exacerba la sensibilización espinal.

1.2.4.3. Receptores metabotrópicos a glutamato (Glum)

Los receptores a glutamato Glum1 y Glum5 están acoplados positivamente a FLC. De tal manera que su activación resulta en el aumento del Ca^{2+} intracelular y la estimulación de la PKC (Valerio et al., 1997; Conn y Pin, 1997). Esta acción puede traer como consecuencia la inactivación de dichos receptores por fosforilación. La activación de los receptores Glum1 y Glum5 probablemente inicia eventos similares a los producidos por la sustancia P. Estudios electrofisiológicos indican que la activación de los receptores Glum por un estímulo inflamatorio nocivo produce una excitación lenta de las neuronas espinales a través del aumento y disminución de cationes y K^+ , respectivamente y cooperativamente facilitan las acciones excitatorias sobre los receptores NMDA y AMPA (Dickinson, 1997; Budai y Larson, 1998).

1.2.4.4. Receptores NK_1/NK_2

Después de la activación de las fibras C, se libera sustancia P y neurocinina A (NK_A) en el asta dorsal de la medula espinal. Estas sustancias activan los receptores NK_1 y NK_2 , respectivamente, lo cual contribuye significativamente a la inducción de la sensibilización del asta dorsal (Abbadie et al., 1997; Aicher et al., 1997). En comparación con los receptores NMDA, los receptores NK_1 y NK_2 tienen una participación más modesta en el mantenimiento del proceso de sensibilización

central. Esta acción se debe posiblemente a la fosforilación por la PKC con la consecuente desensibilización de los receptores. Reciente evidencia demuestra que uno de los mecanismos de desensibilización, en una escala de horas, es la internalización endosómica de los receptores NK₁ en neuronas de la lamina superficial (I/II) del asta dorsal y en las dendritas de neuronas en laminas más profundas. Este proceso es reversible, y una vez que se degrada la sustancia P, los receptores funcionalmente activos regresan a la superficie de las neuronas. De hecho, el daño a las fibras aferentes nociceptivas, y menos consistentemente la inflamación periférica, producen un aumento de la densidad de receptores NK₁ y aumento de la liberación de sustancia P de las fibras aferentes nociceptivas. La activación de los receptores NK₁ y NK₂ conduce a la liberación de IP₃ y Ca²⁺ por una parte, y DAG por otra, el cual actuando de manera sinérgica con Ca²⁺ activa a la PKC que fosforila al receptor NMDA quitándole el Mg²⁺ y permitiendo su activación.

Además de sus efectos sobre las neuronas de amplio rango dinámico, la sustancia P ejerce una acción de retroalimentación positiva en las terminales de las fibras aferentes nociceptivas, lo cual facilita la liberación de glutamato y sustancia P.

La importancia de los receptores NK₁ y NK₂ para mediar las acciones de las taquicinas es controversial. Estudios electrofisiológicos y conductuales indican la participación más activa del receptor NK₁. Hay evidencia importante que indica que la activación del receptor NK₁ refuerza el efecto excitador mediado por los receptores NMDA. De hecho, la activación conjunta de los receptores NK₁ y NMDA puede ser esencial para obtener un grado de sensibilización máximo. De

manera correspondiente, la co-administración de antagonistas a sustancia P y NMDA bloquea el dolor en estados de dolor persistente que reflejan la sensibilización de neuronas del asta dorsal (Chapman et al., 1996; Clayton et al., 1997).

1.2.4.5. Receptores al PRGC

La participación del receptor del péptido relacionado con el gen de la calcitonina (PRGC) en el asta dorsal no está bien definida, pero probablemente facilite las acciones de glutamato y la sustancia P. La activación del receptor por el péptido produce una despolarización membranal en paralelo con el aumento del Ca^{2+} a través de canales de Ca^{2+} sensibles a voltaje. Estas acciones potencian los efectos de la activación de los receptores NK_1 y NMDA y refuerzan el fenómeno de sensibilización. Las acciones del péptido relacionado con el gen de la calcitonina se deben a su interacción con receptores $PRGC_1$ y $PRGC_2$ acoplados a adenilato ciclasa y a la consecuente activación de la PKA y posiblemente de la PKG. El péptido relacionado con el gen de la calcitonina también facilita la nocicepción mediante la inhibición de la degradación de sustancia P y aumentando la liberación de glutamato y sustancia P de las fibras aferentes nociceptivas. La participación del péptido relacionado con el gen de la calcitonina en el dolor inflamatorio se apoya por el aumento de los niveles espinales de péptido relacionado con el gen de la calcitonina en los ganglios de la raíz dorsal después de inflamación crónica.

1.2.4.6. Activación de la sintasa de óxido nítrico

La sintasa de óxido nítrico (SON) está aumentada en los ganglios de la raíz dorsal y células inmunocompetentes después de la inflamación. El óxido nítrico liberado de las fibras aferentes nociceptivas mismas, de macrófagos, de células endoteliales y otras fuentes puede sensibilizar las terminales de las fibras aferentes nociceptivas y aumentar la liberación de neuropéptidos, posiblemente a través de un mecanismo donde participa la PKG dependiente de GMPc (Meller y Gebhart, 1993; Taylor et al., 1995). Asimismo, la administración de inhibidores de la SON bloquea la hiperalgesia inflamatoria, mientras que la administración subcutánea produce dolor en el hombre (Malmberg y Yaksh, 1993).

El óxido nítrico ejerce acciones en su sitio de origen y también puede actuar como un vehículo de comunicación intracelular. Hay varias formas mediante las cuales el óxido nítrico puede facilitar el dolor:

- 1) El óxido nítrico ejerce acciones en neuronas intrínsecas del asta dorsal que transmiten información nociceptiva a centros cerebrales. Los almacenes de óxido nítrico se generan probablemente de las mismas neuronas después de estimulación de las fibras C y activación del receptor NMDA y el consecuente aumento de Ca^{2+} . Se cree que en este sitio, el óxido nítrico sensibiliza mediante la generación de GMPc y la subsecuente fosforilación de proteínas mediada por la PKG (Clemente y Meldosi, 1997).
- 2) El óxido nítrico puede aumentar el dolor por difusión retrógrada de las neuronas sensibilizadas del asta dorsal hacia las terminales presinápticas de calibre fino de las fibras aferentes nociceptivas donde aumenta la liberación

de glutamato, sustancia P y péptido relacionado con el gen de la calcitonina, posiblemente mediante un mecanismo que involucra la inducción del GMPc (Coderre et al., 1993).

- 3) Los almacenes intrínsecos y extrínsecos de óxido nítrico pueden modificar la actividad de células inmunocompetentes y gliales, aumentando la síntesis de prostaglandinas y citocinas.

No obstante las indicaciones del papel pronociceptivo del óxido nítrico en la médula espinal, también se han reportado los efectos opuestos, por lo que su participación parece ser más compleja. Varios estudios han indicado que la inducción de la SON y la consecuente liberación de óxido nítrico puede participar en el proceso antinociceptivo, como los iniciados por opioides y algunos analgésicos antiinflamatorios (Duarte et al., 1992; Tonussi y Ferreira, 1994; Lorenzetti y Ferreira, 1996; Granados-Soto et al., 1997; Islas-Cadena et al., 1999; Aguirre-Bañuelos y Granados-Soto, 2000). Aparte de las acciones directas, el óxido nítrico indirectamente puede alterar la síntesis de prostaglandinas y modular el flujo sanguíneo y el proceso inflamatorio *per se*.

La importancia relativa de los mecanismos mediante los cuales el óxido nítrico modula la nocicepción no está bien definida. De hecho, el papel preciso del óxido nítrico en la modulación de la nocicepción está bajo discusión en virtud de sus múltiples acciones en varios tipos de células, algunas de las cuales tienden a disminuir la excitabilidad de los neuronas del asta dorsal (Dickinson, 1997).

1.2.4.7. Activación de la COX

La COX cataliza la síntesis de prostaglandinas a partir del ácido araquidónico generado por la acción de la fosfolipasa A₂ (FLA₂). Las prostaglandinas se derivan de fuentes neuronales y no neuronales y hay al menos 2 isoformas de la COX. Se considera actualmente que la COX-1 es una enzima constitutiva que genera prostaglandinas para mantener la función celular. En contraste, la COX-2 se induce por estímulos apropiados, tales como inflamación y citocinas proinflamatorias, y produce grandes cantidades de prostaglandinas. Existe evidencia de que la COX-2 se encuentra de manera constitutiva en neuronas, sin embargo, su actividad funcional se modifica importantemente por diferentes eventos sinápticos (Willingale et al., 1997). La síntesis de prostaglandinas se aumenta por la activación de los receptores NMDA y el consecuente aumento del Ca²⁺ (Lerea et al., 1997; Rodríguez-Alvarez et al., 1997). La isoforma COX-2 predomina en las láminas I, II y X del asta dorsal de la medula espinal. La COX-1 se encuentra en los ganglios de la raíz dorsal de las fibras aferentes nociceptivas. La administración periférica de capsaicina o la exposición a un estímulo inflamatorio aumenta los niveles extracelulares de prostaglandinas y aumenta la expresión del gene de la COX-2 en la medula espinal (Malmberg y Yaksh, 1995). La contribución relativa de las fuentes neuronales y no neuronales para aumentar los niveles de prostaglandinas a nivel espinal no está dilucidada. Se ha observado el efecto antinociceptivo de inhibidores selectivos de la COX-2 en condiciones de dolor de largo plazo, pero hay evidencia de que la COX-1 también tiene una participación importante cuando la estimulación nociva es de

duración corta o limitada (Yamamoto y Nozaki-Taguchi, 1996). De manera correspondiente, se ha observado que la administración espinal de prostaglandinas induce hiperalgesia al estímulo nocivo y alodinia al estímulo táctil inocuo (Minami et al., 1997; Vanegas y Schaible, 2001)

Las prostaglandinas probablemente ejerzan efectos excitatorios en receptores localizados sobre neuronas intrínsecas del asta dorsal. Se ha sugerido que la función retrograda también puede explicar el efecto de las prostaglandinas. Después de su liberación de las fibras aferentes nociceptivas o en sitios post-sinápticos, las prostaglandinas pueden aumentar la liberación de glutamato y sustancia P de las fibras aferentes nociceptivas, a través de un mecanismo que involucra el aumento de AMPc, Ca^{2+} y Na^+ (Vanegas y Schaible, 2001). Además, el ácido araquidónico y los leucotriénos, a través de su influencia sobre la PKC en terminales de las fibras aferentes nociceptivas, pueden aumentar de manera retrograda la liberación de glutamato/sustancia P.

El efecto de las prostaglandinas se debe a su interacción con receptores específicos a nivel de membrana. La PGD_2 y PGI_2 están acopladas a adenilato ciclasa. La PGE_2 , principal forma de prostaglandina pronociceptiva, se une a 4 tipos de receptores EP. Los receptores EP_1 (elevación de Ca^{2+}), EP_2 y EP_4 (activación de adenilato ciclasa) y EP_3 (inhibición de adenilato ciclasa y posiblemente generación de fosfoinosítidos y Ca^{2+}). El RNAm que codifica para los receptores EP_2 se concentra en las laminas I y II, mientras que el RNAm para los EP_1 y EP_3 se encuentra en neuronas sensoriales (Vanegas y Schaible, 2001).

Se ha sugerido que en el dolor de largo plazo después de la activación del receptor NMDA, las prostaglandinas probablemente actúen modificando la transcripción de genes en el asta dorsal. Reciente evidencia indica que las prostaglandinas derivadas de la COX-2 pueden tener una participación importante en la nocicepción prolongada.

1.2.4.6. Factor de desarrollo neural (FDN)

Bajo condiciones de inflamación del tejido, el FCN tiene una participación importante en la modificación de la actividad de las neuronas sensoriales, vía la modulación de la expresión de genes y el cambio correspondiente en su fenotipo (McMahon, 1996). Sin embargo, hay evidencias de que el FDN y otras neurotrofinas modifican rápidamente la liberación de neurotransmisores, la transmisión sináptica y la excitabilidad celular a través de procesos de fosforilación, alteraciones en el flujo iónico y cambios en los niveles de Ca^{2+} y proteínas cinasas (Winter, 1998).

1.2.4.9. Otros neurotransmisores

Existe evidencia de la presencia de receptores a adenosina, somatostatina, neuropéptido Y, péptido intestinal vasoactivo, colecistocinina, galanina y acetilcolina en el asta dorsal de la médula espinal, principalmente en la lamina I y II. Por lo tanto, se ha sugerido que pueden participar en el procesamiento de la información nociceptiva a este nivel.

1.2.5. Sensibilización supraespinal

Las respuestas adaptativas al dolor involucran alteraciones en respuestas neuronales junto con una reorganización de patrones de conectividad sináptica a nivel supraespinal. A la fecha hay evidencia de cambios a nivel cortical y en varios núcleos talámicos, incluyendo el complejo ventrobasal, el núcleo centrolateral del tálamo intralaminar y varios componentes del tálamo medio (Craig y Dostrovsky, 1997).

Las alteraciones en la sensibilidad periférica están siendo reproducidas a nivel supraespinal en los centros responsables de la sensación del dolor, de tal manera que un cambio en la sensibilidad periférica aumenta la excitabilidad de neuronas talámicas y potencia la respuesta a nivel cortical. Además, la existencia de circuitos bidireccionales interconectando al tálamo y a la corteza permite la modulación recíproca de su actividad.

La transferencia de información a centros superiores no es un proceso puramente pasivo. Existe evidencia de que los cambios supraespinales en el procesamiento nociceptivo, en particular en el área sensorial I y tálamo, pueden ocurrir de manera diferencial de aquellos que ocurren en estructuras descendentes. Las respuestas de neuronas somatosensoriales I y talámicas a estímulos mecánicos y térmicos de las patas se amplifica (alodinia) y el área somatosensorial I despliega una reorganización del estímulo somático. Además, hay un aumento de la participación del nervio safeno (Dong y Chundler, 1995; Craig y Dostrovsky, 1997). Asimismo, los procesos adaptativos en la corteza no reproducen simplemente los cambios adaptativos en estructuras subcorticales. La aparición de cambios supraespinales

distintivos es consistente con la participación del complejo aminoácidos excitadores/NMDA como transmisores/receptores en proyecciones ascendentes al tálamo, en proyecciones tálamo-corticales y en vías intracorticales, así como de influencias inhibitorias de mecanismos gabaérgicos sobre el procesamiento sensorial talámico y cortical.

1.2.5.1. Mecanismos gabaérgicos

Las interneuronas inhibitorias gabaérgicas tienen una participación notable para suprimir la excitabilidad neuronal y controlar de manera negativa la señal de salida de neuronas talámicas y corticales (Kapur et al., 1997). De hecho, la interrupción de la transmisión gabaérgica en la corteza o el tálamo produce dolor y expande los campos receptivos (hiperalgesia) de neuronas del núcleo grácil. Asimismo, la reducción en el control inhibitorio del tálamo a la corteza por interneuronas inhibitorias corticales puede activar circuitos sincronizados, ampliamente distribuidos del tipo convulsión (Berkley, 1997). El bloqueo de la transmisión gabaérgica en el tálamo u otras estructuras cerebrales desinhibe la transferencia y modulación de la información nociceptiva y contribuye a estados dolorosos.

1.2.5.2. Receptores a aminoácidos excitatorios, NMDA y Glum

Los receptores NMDA y glutamatérgicos del grupo I (Glum) participan en la inducción y mantenimiento del proceso de sensibilización en el asta dorsal. Además, estos mismos receptores, mediante mecanismos como la potenciación de largo plazo, tienen una participación clave para modular la plasticidad sináptica

en el hipocampo y otras estructuras cerebrales. Estas observaciones sugieren que los receptores NMDA, y posiblemente los GluR, puedan mediar eventos adaptativos en el tálamo y otros centros cerebrales que expliquen estados de dolor prolongado. Las evidencias que apoyan estas sugerencias son las siguientes. La activación de receptores NMDA y GluR produce la excitación de neuronas talámicas por: 1) La señal nociceptiva directa del tracto espinotalámico y otras vías ascendentes, 2) Circuitos cortico-talámicos, 3) La señal nociceptiva recibida por otras regiones involucradas en la integración de la información nociceptiva, tales como la sustancia gris periacueductal. Además, los receptores NMDA tienen una participación importante en la transmisión tálamo-cortical de la información nociceptiva y la estimulación de aferencias tálamo-corticales puede evocar la potenciación de largo plazo de manera dependiente del receptor NMDA (Dougherty et al., 1996; Vaccarino et al., 1997; Castro-Alamancos, 1997).

Las observaciones anteriores son consistentes con la noción de que los receptores NMDA tienen una participación importante en el tálamo, corteza y otras estructuras supraespinales bajo condiciones de estimulación nociceptiva prolongada. Experimentos recientes muestran que la activación de los receptores NMDA en el tálamo participan en el desarrollo y mantenimiento de la hiperalgesia inflamatoria, posiblemente a través de mecanismos que involucran la inducción de óxido nítrico y cFOS (Bester et al., 1997).

La administración de inhibidores de la COX en la sustancia gris periacueductal produce analgesia mediante la activación de vías descendentes inhibitorias (Vanegas et al., 1997). Además la activación de receptores NMDA aumenta la

producción cerebral de prostaglandinas, vía la activación de la COX-2. Este mecanismo se activa en neuronas corticales por un proceso de depresión amplificada.

1.2.5.3. Otros mediadores potenciales

Mediadores como la neurotrofina, la cual tiene interacciones recíprocas con receptores NMDA y gabaérgicos, puede tener una participación en la modulación de la transmisión nociceptiva en la corteza y otras regiones supraespinales.

Las citocinas, IL-1 β y TNF α , pueden tener una participación en la modulación de la transmisión de la información nociceptiva en la corteza y otros centros superiores.

El TNF α aumenta las corrientes iónicas mediadas por el receptor NMDA y la IL-6 modula la respuesta a estímulos sensoriales de neuronas del área somatosensorial I de la corteza (Shin et al., 1997).

1.3. ANALGÉSICOS ANTIINFLAMATORIOS NO ESTEROIDEOS

Desde su introducción en 1899, el ácido acetilsalicílico constituye la forma principal del grupo de los salicilatos. Hasta 1950, con la fenilbutazona, y posteriormente con la indometacina se introdujeron las nuevas clases de compuestos antiinflamatorios no esteroideos (AINEs), a los cuales ha seguido toda una explosión de nuevos agentes desarrollados por la industria farmacéutica (Smith, 1985).

Los analgésicos no narcóticos o AINEs son un grupo heterogéneo de compuestos con estructuras químicas diferentes, pero que comparten acciones farmacológicas y terapéuticas (Figura 3.1). A diferencia de los analgésicos narcóticos, no se unen a receptores opioides y no desarrollan tolerancia o dependencia. Los AINEs pueden usarse solos o en combinación con opioides o adyuvantes para aumentar su efecto. Estos fármacos se administran comúnmente por vía oral, aunque algunos están disponibles para administración parenteral, rectal o tópica. Se han descrito diversos efectos periféricos, espinales y supraespinales de los AINEs para explicar su efecto analgésico.

1.3.1. Efectos periféricos

1.3.1.1. Inhibición de la síntesis de prostaglandinas

Varios experimentos han demostrado que los AINEs producen diferentes grados de inhibición de la reacción inflamatoria y del dolor en modelos animales.

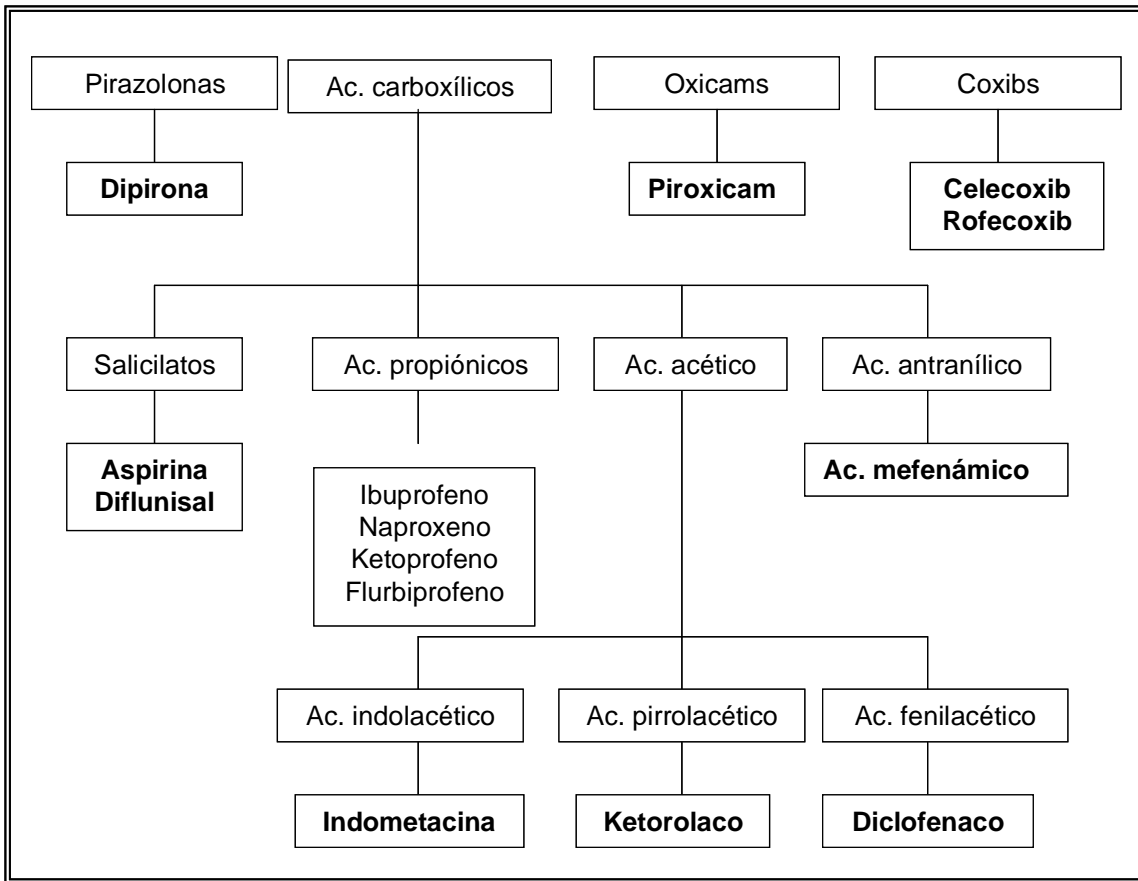


Figura 3.1. Clasificación de los AINEs de acuerdo a su estructura química.

En un inicio se demostró que los modelos en animales donde los AINEs eran activos tenían siempre un componente inflamatorio. Esas observaciones sugirieron un componente periférico importante en su actividad farmacológica. Los estudios de Lim y colaboradores (1964) indicaron que la aspirina tenía un componente periférico en su mecanismo de acción para bloquear las acciones nociceptivas evocadas por la administración local de bradicinina, mientras que los opioides tenían una acción central. La asociación entre la inflamación local y las acciones aparentes de los AINEs era consistente con la apreciación que el daño al tejido conduce a la liberación de sustancias activas que producen dolor cuando se administran parenteralmente en animales. Mas recientemente se ha continuado enfatizando la importancia mecánica de una acción periférica en el efecto analgésico de los AINEs.

Las prostaglandinas, liberadas durante el daño al tejido constituyen un componente importante para la generación de hiperalgesia y dolor. En estudios electrofisiológicos, bioquímicos y farmacológicos se ha demostrado la capacidad de las prostaglandinas para sensibilizar los nociceptores (Gold et al., 1996; Vanegas y Schaible, 2001). Se considera que los AINEs producen su efecto analgésico mediante la inhibición periférica de la síntesis de prostaglandinas bloqueando la enzima ciclooxigenasa (COX) que se encarga de sintetizar las prostaglandinas liberadas durante el proceso inflamatorio (Lim et al., 1964; Vane, 1971; Ferreira et al., 1972). Además, los AINEs disminuyen la sensibilización de los nociceptores a las acciones pronociceptivas de bradicinina, histamina y serotonina (Clissold, 1986).

Existe una clara disociación entre las acciones puramente analgésicas de los AINEs y su acción antiinflamatoria. Los AINEs no ácidos (acetaminofén, fenazona, dipirona) solo inhiben modestamente la síntesis de prostaglandinas en tejidos inflamados, y ésta es probablemente la razón por la cual no tienen efecto antiinflamatorio. En contraste, los AINEs ácidos (aspirina, diclofenaco, naproxeno, ibuprofeno, etc) inhiben la síntesis de prostaglandinas en el sitio de lesión y presentan un efecto antiinflamatorio importante aparte de su efecto analgésico.

Actualmente se sabe que existen dos isoformas de la COX, la COX-1 y la COX-2. La COX-1 es una enzima constitutiva, presente en endotelio, estómago, riñones, etc. (Masferrer et al., 1992). Se cree que la COX-1 produce prostaglandinas importantes para la regulación fisiológica en condiciones normales (Masferrer et al., 1992). La COX-2 es una enzima inducible por citocinas proinflamatorias *in vitro* o durante el proceso inflamatorio *in vivo* (Mitchell et al., 1993). Esto ha motivado a proponer que los efectos adversos de los AINEs correlacionan con su habilidad para inhibir la COX-1, mientras que los efectos terapéuticos de estos agentes se deben a la inhibición de la COX-2 (Mitchell et al., 1993). El análisis de la inhibición diferencial de la COX ha revelado que los AINEs tradicionales inhiben no selectivamente ambas enzimas (Warner et al., 1999). Sin embargo, ya se encuentran en la clínica los primeros fármacos selectivos de la COX-2 (Celecoxib, Rofecoxib, Etoricoxib, Parecoxib, etc). Estos analgésicos selectivos han mostrado efectos terapéuticos similares a los AINEs no selectivos, pero con una incidencia

menor de efectos adversos a nivel gastrointestinal (Simon et al., 1999; Langman et al., 1999).

1.3.1.2. Estimulación de la vía óxido nítrico-GMPc

Se ha propuesto que, bajo condiciones normales, existe un equilibrio entre los niveles de AMPc y GMPc en el nociceptor, durante el cual no existen sensaciones algésicas. Cuando el estímulo nocivo provoca la liberación de bradicinina, se liberan además prostaglandinas y aminas simpaticomiméticas. Las prostaglandinas al unirse a sus receptores producen el aumento de AMPc, con lo que se rompe el equilibrio y aparece la hiperalgesia.

Varios grupos de investigación (Duarte et al., 1990; Tonussi y Ferreira, 1994; Lorenzetti y Ferreira, 1996; Granados-Soto et al., 1995; 1997; Aguirre-Bañuelos et al. 2000) han demostrado que algunos AINEs liberan ON y consecuentemente GMPc, lo que permite restablecer el equilibrio AMPc/GMPc. Los AINEs que han demostrado este efecto son dipirona (metamizol), ketorolaco, diclofenaco, nimesulide y meloxicam.

Es probable que la activación de la vía ON-GMPc sea el común denominador en el modo de acción de los AINEs que bloquean directamente la hiperalgesia (Duarte et al., 1992). Los fármacos que activan la vía ON-GMPc periférica bloquean el dolor, pero no el edema, a diferencia de los inhibidores puros de la COX que bloquean ambos. La estimulación de la vía ON-GMPc permite bloquear directamente el dolor y no solo la sensibilización, lo cual explica porque se puede obtener un efecto analgésico más rápido con estos fármacos (Lorenzetti y

Ferreira, 1996). Además de los fármacos mencionados anteriormente, existe evidencia de que la morfina también es capaz de activar la vía ON-GMPc (Duarte et al., 1992; Granados-Soto et al., 1997).

1.3.1.3. Activación de canales de K⁺

La hiperalgesia está asociada a cierre de canales de K⁺ produciéndose una despolarización con la consecuente reducción del umbral del dolor, mientras que la analgesia está asociada con la hiperpolarización de las neuronas nociceptivas. Recientemente se ha demostrado farmacológicamente que algunos AINEs como diclofenaco, ketorolaco, dipirona y ácido mefenámico activan diferentes subtipos de canales de K⁺ lo que conduce a la hiperpolarización de las neuronas nociceptivas con la consecuente producción de analgesia (Lázaro-Ibáñez et al., 2001; Ortiz et al., 2002a; 2002b; Granados-Soto et al., 2002) (Figura 3.2)

El principal subtipo parece ser el canal de K⁺ sensible a ATP, sin embargo, otros subtipos como el canal de K⁺ activado por calcio o voltaje parecen participar dependiendo del analgésico administrado. En los experimentos anteriores, el efecto analgésico producido por ketorolaco o diclofenaco se bloquea de manera dependiente de la dosis por el pretratamiento con bloqueadores de los canales de K⁺ (glibenclamida y tolbutamida). La activación de canales de K⁺ parece darse por la activación de la vía ON-GMPc, ya que los bloqueadores de la síntesis de ON y GMPc también bloquean el efecto de diclofenaco y ketorolaco. Además, la analgesia producida por donadores de óxido nítrico o GMPc se bloquea por el pretratamiento con bloqueadores de los canales de K⁺ (Soares et al., 2000; Soares

y Duarte et al., 2001). En conjunto los datos sugieren que la activación de la vía ON-GMPc conduce a la apertura de algunos subtipos de canales de K^+ .

Aparte de la evidencia farmacológica, hay datos electrofisiológicos que apoyan estas observaciones. Se ha demostrado que el resveratrol, los fenamatos y el tenidap (AINEs) son capaces de potenciar las corrientes de K^+ de una manera reversible y dosis-dependiente como resultado del aumento en la probabilidad de apertura de los canales de K^+ (Ottolia y Toro, 1994; Li et al., 2000; Liu et al., 2002).

1.3.1.4. Interferencia con la activación de neutrófilos

El mecanismo fundamental del proceso inflamatorio es la activación de leucocitos, especialmente los neutrófilos. Mediante la quimiotaxis, los neutrófilos abandonan la circulación y llegan a las zonas lesionadas, a las que intentan fagocitar y destruir. Los neutrófilos abandonan la circulación gracias a su capacidad de adherirse al endotelio vascular. Se ha observado que el diclofenaco reduce de manera dependiente de la concentración la adhesividad y quimiotaxis inducida naturalmente por los atrayentes durante el proceso inflamatorio (Berradia et al., 1988). Este efecto parece estar mediado por la L-selectina (molécula de adhesión expresada en los polimorfonucleares que reconoce su contraparte en las células endoteliales). Otros AINEs, como el piroxicam, también inhiben la adhesividad de los neutrófilos, mediante la inhibición de la expresión de la L-selectina, lo que redundaría en una disminución de la quimiotaxis y en su agregación. Con estas acciones se reduce la cantidad de mediadores inflamatorios pronociceptivos en el sitio de la lesión (Weissmann, 1991).

En pacientes tratados con ibuprofeno se ha observado la inhibición de la quimiotaxis de neutrófilos, mientras que el salicilato de sodio y aspirina inhiben su agregación. Los metabolitos de la dipirona también han mostrado esta capacidad para inhibir la migración de neutrófilos.

1.3.2. Efectos centrales

1.3.2.1. Inhibición de la síntesis de prostaglandinas

Se ha sugerido y demostrado que los AINEs tienen efectos centrales que contribuyen de manera importante a su efecto analgésico. Existe bastante evidencia experimental que demuestra que las prostaglandinas espinales participan en el procesamiento de la información nociceptiva o dolorosa y que la administración espinal de sustancias que inhiben la síntesis de prostaglandinas revierte la hiperalgesia producida por estas sustancias (Malmberg y Yaksh, 1992; Chapman y Dickenson, 1992, revisado por McCormack, 1994). La evidencia se describe a continuación.

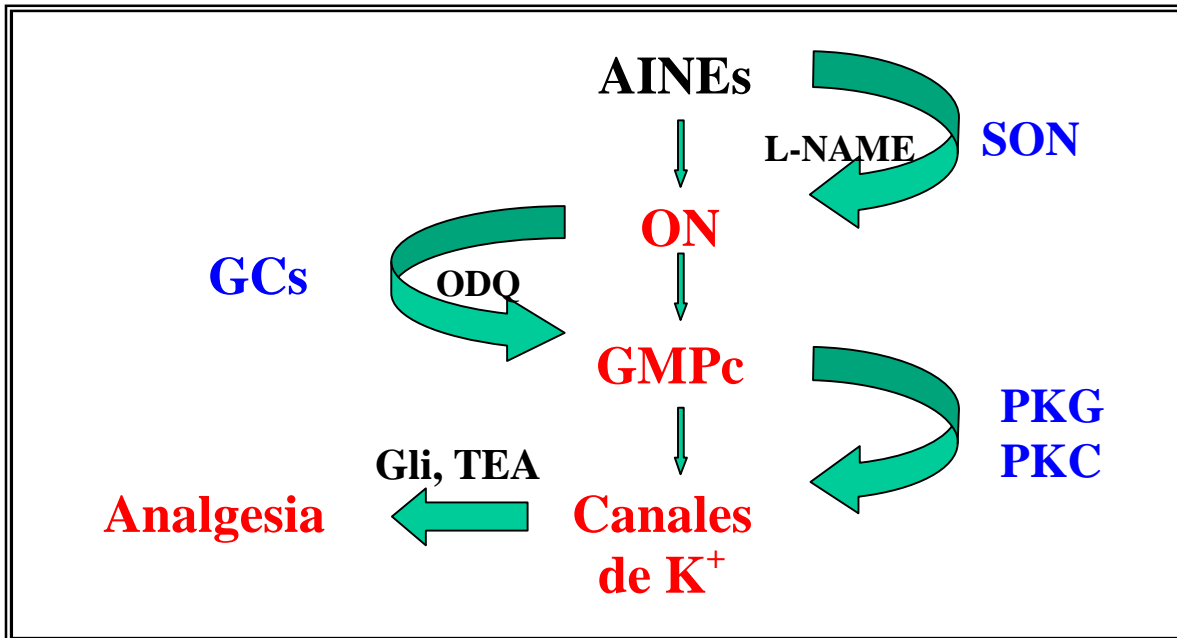


Figura 3.2. Representación de la vía ON-GMPc-canal de K⁺ en el mecanismo de acción de algunos AINEs (diclofenaco, ketorolaco, dipirona). L-NAME es un inhibidor de la síntesis de ON, ODO es un inhibidor de la guanilato ciclasa, Glibenclamida y TEA son bloqueadores de los canales de K⁺ (adaptado de Lázaro-Ibáñez et al., 2001 y Ortiz et al., 2002).

Las prostaglandinas, particularmente PGE₂, se liberan de la medula espinal posterior a la estimulación nociva de aferencias sensoriales de diámetro pequeño (fibras C). La administración *in vitro* o *in vivo* de capsaicina o sustancia P en la medula espinal conduce a la liberación de PGE₂ en el asta dorsal de la medula espinal (Malmberg y Yaksh, 1994). Además, la inyección de formalina en la pata de la rata produce una conducta sugestiva de dolor y la liberación de PGE₂ en la medula espinal y tanto la conducta nociceptiva como la liberación de prostaglandinas se reducen significativamente mediante la administración espinal de dosis analgésicas de ibuprofeno (Malmberg y Yaksh, 1992; 1995).

La inyección espinal de prostaglandinas, incluyendo a la PGE₂, produce hiperalgesia de una manera dosis-dependiente (Ferreira et al., 1978; Yaksh, 1982; Minami et al., 1994a; 1994b), mientras que la inyección espinal de antagonistas del receptor a PGE₂ disminuye los estados de hiperalgesia (Malmberg et al., 1994). Las prostaglandinas activan receptores de membrana, del tipo EP, a nivel presináptico aumentando la conductancia al calcio y disminuyendo las corrientes de K⁺. Este efecto conduce al aumento de la excitabilidad de las neuronas del ganglio de la raíz dorsal y a la liberación de neurotransmisores excitatorios (Vasko et al., 1994).

La inyección espinal de AINEs disminuye de manera dependiente de la dosis el estado hiperalgésico inducido por daño local al tejido o por inflamación, pero no modifica el umbral nociceptivo agudo (dolor por estímulo térmico) (Yaksh, 1982; Dirig et al., 1998). Se considera que el efecto intratecal de los AINEs se debe a un efecto completamente espinal y no a la redistribución sistémica ya que las dosis necesarias para producir analgesia similar por administración sistémica son del orden de 100-900 veces mayores que las requeridas por inyección espinal. A pesar de las diferencias en potencia de los diferentes AINEs, el efecto máximo alcanzado con estos fármacos es similar sugiriendo un mecanismo de acción común. Se creó que este mecanismo de acción común es la inhibición de la síntesis de prostaglandinas.

Además, algunos AINEs y en particular el diclofenaco suprimen la hiperalgesia inducida por la administración espinal de glutamato (Malmberg y Yaksh, 1992; Björkman, 1995). Se ha sugerido que el efecto espinal del diclofenaco en la

hiperalgesia inducida por glutamato se debe al bloqueo de las acciones de óxido nítrico a nivel espinal, ya que el pretratamiento con L-arginina, pero no D-arginina, revierte la analgesia producida por diclofenaco (Björkman, 1995) en ese modelo. Las áreas cerebrales también pueden ser importantes para el efecto de los AINEs y en particular para el diclofenaco son la sustancia gris periacueductal, el tálamo ventromedial, el área preóptica media, el núcleo magno del rafe y el asta dorsal de la medula espinal (Björkman et al., 1992; Malmberg y Yaksh, 1992).

1.3.2.2. Mecanismos independientes de prostaglandinas

Dada la diversidad estructural de los AINEs, es posible que diferentes mecanismos de acción participen de manera conjunta para producir analgesia. Existe evidencia de que el efecto analgésico espinal de ketorolaco se antagoniza parcialmente por la nor-binaltorfimina (antagonista del receptor opioide κ) (Uphouse et al., 1993).

El efecto espinal y supraespinal del diclofenaco se bloquea por la administración de la naloxona (antagonista de receptores opioides) (Vanegas y Schaible, 2001) indicando la posible participación de mecanismos opioidérgicos en su efecto analgésico a nivel central. Además, la administración espinal de antagonistas serotoninérgicos o toxinas que lesionan las vías serotoninérgicas reducen el efecto analgésico del diclofenaco en varios modelos de dolor, sugiriendo la participación de las vías serotoninérgicas en el efecto analgésico de este compuesto (Björkman, 1995). El acetaminofén produce analgesia central por el bloqueo de las acciones pronociceptivas del óxido nítrico. En contraste, el ácido salicílico bloquea la

transcripción del factor nuclear κ B (NF κ B) (Frantz y O'Neill, 1995). Algunos AINEs reducen la liberación espinal de sustancia P y glutamato (Schaible et al., 1998).

1.3.3. Efectos de los AINEs en seres humanos

La administración de AINEs para el alivio del dolor de leve a moderado es una práctica clínica muy común. Aparte de sus efectos analgésicos, estas sustancias también tienen, en mayor o menor grado, efectos antipirético y antiinflamatorio. La aplicación clínica principal de los AINEs es como antiinflamatorios en el tratamiento sintomático de enfermedades reumáticas como la artritis reumatoide, osteoartritis y espondilitis anquilosante. Sin embargo, también se utilizan en una gran variedad de padecimientos que cursan con dolor.

Los AINEs se han administrado por diferentes vías, aunque la principal y más importante es la vía oral. Con el objetivo de reducir los efectos adversos se ha intentado su administración por las vías periférica local y espinal. La liberación de concentraciones altas de fármaco en el sitio de daño puede aliviar el dolor con una incidencia reducida de efectos adversos. Los AINEs administrados por vía tópica penetran lentamente y en pequeñas cantidades a la circulación sistémica, alcanzando apenas entre el 5 y 15% de las concentraciones obtenidas por vía oral (Heyneman et al., 2000), reduciendo la probabilidad de efectos adversos. En enfermedades reumáticas, diferentes estudios clínicos han mostrado una eficacia muy variable (18-92%) por la administración local. Esta variabilidad se ha atribuido a la incidencia alta de efecto placebo, a la variabilidad en absorción percutánea y a

la variabilidad interindividual. Por otra parte, se ha demostrado que la administración intraarticular o en el sitio de lesión de diversos AINEs, produce alivio significativo del dolor postoperatorio cuando se compara con la administración sistémica de estos agentes (Heyneman, 1995; Elhakim et al., 1996; O'Hanlon et al., 1996; Dione et al., 1999; Galer et al., 2000; Romsing et al., 2000). Los reflejos nociceptivos (dolorosos) evocados por estimulación eléctrica directa de nervios sensoriales periféricos se disminuyen por la administración sistémica de AINEs como ketoprofeno, indometacina, ácido acetilsalicílico, diflunisal, zomepirac y acetaminofén, sugiriendo un componente central en las acciones analgésicas de esos fármacos en el ser humano (Willer et al., 1989; Piletta et al., 1991; Fabbri et al., 1992; Guieu et al., 1992). La administración espinal de acetilsalicilato de lisina produce alivio del dolor en pacientes con cáncer (Devoghel, 1983; Pellerin et al., 1987). Además, se ha demostrado que los AINEs no selectivos administrados por vía sistémica penetran a la medula espinal de los pacientes apoyando la idea de que se alcanzan concentraciones efectivas en ese sitio (Rice et al., 1993; Bannwarth et al., 1995). Hasta la fecha no hay datos sobre la penetración a la medula espinal de AINEs selectivos COX-2.

1.4. DICLOFENACO

1.4.1. Generalidades del diclofenaco

El diclofenaco (Figura 4.1), la sal sódica del ácido O-[(2,6-dicloro-fenil)amino]fenil acético, es un analgésico antiinflamatorio no esteroideo (AINE). Este compuesto se utiliza ampliamente en la clínica para el alivio del dolor en síndromes reumáticos y procesos degenerativos (Kantor, 1986). Además, se ha demostrado la eficacia de este fármaco para aliviar el dolor inflamatorio en cirugía dental, dismenorrea, dolor lumbar, dolor de cabeza y dolor postoperatorio (Kantor, 1986; Todd y Sorkin, 1988; Davies y Anderson, 1997). Los efectos del diclofenaco también se han observado en modelos de dolor e inflamación aguda y crónica en animales (Krupp et al., 1973; Menassé et al., 1978; Torres-López et al., 1994; 1997).

1.4.2. Propiedades farmacológicas

El diclofenaco tiene propiedades analgésicas, antipiréticas y antiinflamatorias. Este fármaco es más potente que fenilbutazona, aspirina, ibuprofeno y naproxeno y comparable al ketorolaco y piroxicam (Krupp et al., 1973; Menassé et al., 1978; Insel, 1996). Sin embargo, su eficacia clínica es similar a la de todos los AINEs y menor que la de los analgésicos opioides (Insel, 1996).

1.4.3. Usos terapéuticos

El diclofenaco sódico se utiliza para el tratamiento sintomático de largo plazo de artritis reumatoide, osteoartritis y espondilitis anquilosante. También es útil en el tratamiento a corto plazo del dolor músculo esquelético, dolor postoperatorio, cefalea y dismenorrea (Insel, 1996).

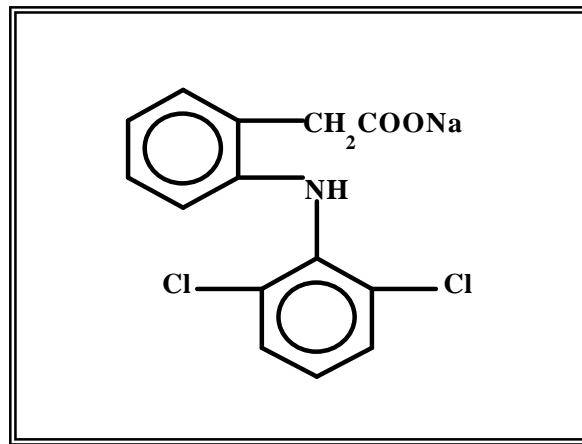


Figura 4.1. Estructura química del diclofenaco.

1.4.4. Toxicidad

El diclofenaco produce efectos adversos en aproximadamente 20% de los pacientes que toman este fármaco, siendo los efectos gastrointestinales los más comunes. Se ha observado sangrado y ulceración o perforación de la pared intestinal después de usar diclofenaco. También se han observado elevaciones reversibles en las aminotransferasas. En un porcentaje menor se han observado casos de reacciones alérgicas, ronchas en la piel, efectos en el sistema nervioso central, retención de

líquidos y edema y raramente afecta la función renal (Insel, 1996). La toxicidad de los AINEs parece deberse a su inespecificidad sobre la ciclooxigenasa inducible (COX-2) y constitutiva (COX-1) (Ver adelante; Kawi, 1998). El diclofenaco se ha asociado con misoprostol, un análogo de la prostaglandina E₁, para tratar de reducir su toxicidad. En combinación con misoprostol, el diclofenaco mantiene su eficacia analgésica y se reduce la incidencia de efectos adversos (Shield, 1998).

1.4.5. Mecanismos de acción del diclofenaco

1.4.5.1. Inhibición de la COX

Al igual que otros AINEs, el mecanismo de acción más importante para el diclofenaco es la inhibición de la síntesis de prostaglandinas tanto *in vitro* (Ku et al., 1975; García-Rafanell y Forn, 1979) como *in vivo* (Vane, 1971; Ferreira et al., 1971; Menassé et al., 1978; Oliw et al., 1978). El diclofenaco inhibe a la enzima responsable de la síntesis de prostaglandinas (COX) a partir del ácido araquidónico. La actividad inhibitoria del diclofenaco sobre la enzima es competitiva y reversible. El diclofenaco exhibe una selectividad ligeramente mayor por la COX-2 que por la COX-1 (CI₅₀: 0.075 µM por la COX-1 y 0.038 µM por la COX-2). Es poco probable que esta ligera diferencia en selectividad tenga algún impacto en el mejoramiento del perfil de toxicidad de diclofenaco, ya que cuando la COX-2 está inhibida un 80%, la COX-1 está inhibida aproximadamente un 70% (Warner *et al.*, 1999). Por lo tanto, el perfil de efectos colaterales del diclofenaco es consistente con su falta de especificidad para bloquear selectivamente a la COX-2 (Warner *et al.*, 1999).

1.4.5.2. Otros mecanismos periféricos

Hay evidencia que el diclofenaco disminuye la producción de leucotrienos y prostaglandinas de los leucocitos y células sinoviales de manera independiente de su acción inhibitoria sobre la COX. Este efecto parece deberse al hecho de que el diclofenaco estimula la reincorporación de ácido araquidónico hacia los triglicéridos de la membrana plasmática de esas células (Ku et al., 1986; O'Neill y Lewis, 1989).

El diclofenaco también tiene un efecto inhibitorio sobre la elastasa de los gránulos de los polimorfonucleares, la cual es una proteinasa que participa en la degradación del cartílago en los procesos reumáticos crónicos (Steinmeyer y Kalbhen, 1990). También se ha observado que el diclofenaco reduce de manera dependiente de la concentración la adhesividad y quimiotaxis inducida naturalmente por los atrayentes durante el proceso inflamatorio (Berradia et al., 1988). Este efecto parece estar mediado por la L-selectina (molécula de adhesión expresada en los polimorfonucleares que reconoce su contraparte en las células endoteliales). Además de evitar el proceso adhesivo de los neutrófilos, estudios *in vitro* han demostrado que el diclofenaco disminuye de manera muy rápida la expresión de la L-selectina, contribuyendo a la eficacia terapéutica de este fármaco.

Existe evidencia de que el diclofenaco activa la liberación de óxido nítrico (ON), ya que la administración local de inhibidores de la síntesis de ON (L-NAME, L-NMMA) disminuye de manera importante el efecto analgésico del este fármaco (Tonussi y Ferreira, 1994). El efecto de estos inhibidores sobre la acción antinociceptiva del diclofenaco se revierte parcialmente por la administración local de L-arginina, el

substrato natural de la sintasa de ON para generar ON (López-Muñoz et al., 1996). Además, el pretratamiento con azul de metileno, un inhibidor de la guanilato ciclasa, suprime el efecto analgésico del diclofenaco (Tonussi y Ferreira, 1994). Estos resultados indican que la activación periférica de la vía L-arginina-ON-GMPc participa de manera importante en el efecto analgésico del diclofenaco.

1.4.5.3. Mecanismos espinales y supraespinales

La administración espinal de diclofenaco produce analgesia en diferentes modelos de dolor en animales (Malmberg y Yaksh, 1992). El mecanismo de acción espinal del diclofenaco se debe a la inhibición de la síntesis de prostaglandinas. De hecho, hay una correlación entre la potencia relativa como inhibidores de la COX y la potencia analgésica espinal, lo cual provee apoyo para la participación de la inhibición de la COX en las acciones espinales de este tipo de compuestos. El efecto analgésico del diclofenaco parece involucrar también un componente supraespinal, ya que la administración i.c.v. de diclofenaco en ratas artríticas produce analgesia (Okuyama y Aihara, 1984; Jurna y Brune, 1990). Además, la administración sistémica de diclofenaco reduce de manera dependiente de la dosis la actividad evocada por un estímulo nocivo a las neuronas talámicas de la rata (Attal et al., 1988). Se ha reportado que en modelos de dolor visceral como el de contorsión abdominal y el de distensión colorrectal, la administración i.c.v. o espinal del diclofenaco produce un efecto analgésico dependiente de la dosis. Este efecto central se bloquea por la administración sistémica de naloxona o antagonistas de receptores serotoninérgicos (Vescovi et al., 1987; Björkman et al.,

1990; Björkman, 1995). Además, otros reportes indican que el diclofenaco estimula la liberación de péptidos opioides endógenos (Sacerdote et al., 1985). Las concentraciones de β -endorfinas en el plasma se incrementan después de la administración sistémica del diclofenaco (Sacerdote et al., 1985). Estos hallazgos hacen pensar que la presencia de estas sustancias favorece la analgesia de este fármaco. Sin embargo, en modelos que se consideran exclusivos o selectivos para opioides (plancha caliente y "tail flick") el diclofenaco no mostró propiedades analgésicas. Esta última evidencia está de acuerdo con el hecho de que el diclofenaco no se une a receptores opioides, sugiriendo que la acción central del diclofenaco es independiente de la activación directa o indirecta de receptores opioides.

Es probable que la inhibición de la COX sea un mecanismo de acción del diclofenaco más razonable, en virtud de la extensa distribución de la inmunorreactividad tipo COX encontrada en el cerebro y específicamente en varias regiones involucradas en el procesamiento de la información dolorosa (substancia gris periacueductal y núcleo del rafé magno) (Björkman et al., 1992). De hecho, hay evidencia que indica que el diclofenaco inhibe de manera dependiente de la dosis la formación *in vivo* de prostaciclina, PGE y PGF (Abdel-Halim et al., 1978; Attal et al., 1988).

También hay evidencia que sugiere que el diclofenaco produce sus acciones en parte mediante un mecanismo serotoninérgico central. El efecto analgésico de diclofenaco se reduce considerablemente en animales lesionados con la toxina 5,7-dihidroxi-triptamina, la cual selectivamente lesiona las vías serotoninérgicas centrales.

En otros experimentos, el pretratamiento con un inhibidor (PCPA) de la hidroxilasa de triptofano (enzima que participa en la síntesis de serotonina) antagonizó el efecto analgésico de diclofenaco administrado por vía i.c.v. (Björkman, 1995). Además, el pretratamiento con metiotepina (antagonista no selectivo de los receptores a serotonina) y ritanserina (antagonista 5-HT₂) redujo significativamente el efecto de diclofenaco (Leysen *et al.*, 1986; Björkman, 1995). Estos experimentos sugieren que el diclofenaco activa la vía descendente inhibitoria serotoninérgica, liberando de alguna manera serotonina en la medula espinal. La serotonina produce analgesia espinal mediante su interacción con el receptor a serotonina del tipo 5-HT₂.

1.5. VITAMINAS B₁, B₆ Y B₁₂ Y DOLOR

La dieta constituye la fuente de diversos nutrientes necesarios para el funcionamiento adecuado del organismo del ser humano. Entre ellos se encuentran las vitaminas. Estas constituyen sustancias orgánicas, requeridas en pequeñas cantidades por el ser humano, las cuales deben ser obtenidas del medio ambiente ya que no pueden ser sintetizadas o porque la velocidad de su síntesis es inadecuada para el mantenimiento de la salud (Shils, 1994).

Aunque las vitaminas difieren notablemente en su estructura y función, es posible hacer algunas generalizaciones sobre ellas. Las vitaminas hidrosolubles solo pueden ser almacenadas de manera limitada en el organismo y se requiere de su consumo frecuente para mantener la saturación de los tejidos. Las vitaminas liposolubles pueden ser almacenadas en grado importante, lo que les confiere una toxicidad potencial mayor que las vitaminas del grupo hidrosoluble. Asimismo, las vitaminas hidrosolubles participan como co-enzimas de enzimas específicas, mientras que las liposolubles, y particularmente la A y la D, suelen interactuar con receptores intracelulares específicos en sus órganos blanco (Marcus y Coulston, 2001).

El complejo B es un grupo de las vitaminas hidrosolubles conformado por una variedad de compuestos que difieren en su estructura química y actividad biológica. Sin embargo, están agrupadas en una misma clase debido a que se aislaron de las mismas fuentes (hígado y levadura). Se reconocen 11 miembros del complejo B: la tiamina (B₁), riboflavina, ácido nicotínico, piridoxina (B₆), ácido

pantoténico, biotina, ácido fólico, cianocobalamina (B₁₂), colina, inositol y el ácido paraaminobenzóico (Marcus y Coulston, 2001).

Las vitaminas del complejo B cumplen funciones metabólicas bien definidas. De la misma manera, su deficiencia genera condiciones patológicas características que, en los casos particulares de la tiamina, la piridoxina y la cianocobalamina se relacionan con el funcionamiento inadecuado del sistema nervioso.

1.5.1. Tiamina

La tiamina (Figura 5.1), también conocida como vitamina B₁ o aneurina, está formada por una pirimidina y un tiazol unidos por un grupo metileno. La tiamina se encuentra en el organismo como tiamina libre y en forma fosforilada como monofosfato de tiamina, trifosfato de tiamina y pirofosfato de tiamina; esta última constituye la forma activa (Rindi et al., 1996). El pirofosfato de tiamina interviene en el metabolismo en muchas reacciones esenciales. En el metabolismo de los carbohidratos funciona como coenzima en las reacciones de las enzimas piruvato deshidrogenasa y cetoglutarato deshidrogenasa, las cuales catalizan la descarboxilación del piruvato y del alfaacetoglutarato para formar acetil-CoA y succinil-CoA, respectivamente. Estas últimas con importantes acciones en la producción de energía. Asimismo, interviene como coenzima en la acción de la transacetolasa que cataliza las reacciones críticas de la vía metabólica de las pentosas fosfato, que utiliza las pentosas en la desviación de la hexosa monofosfato. Uno de los productos intermedios más importantes de esta vía es la ribosa-5-fosfato, requerida para la síntesis del ribonucleótidos de alta energía,

ATP, y GTP y de los ácidos nucleicos ADN y ARN (Brody, 1991). En los casos de deficiencia de tiamina, la oxidación de los cetoácidos se altera y aumenta la concentración de piruvato en la sangre.

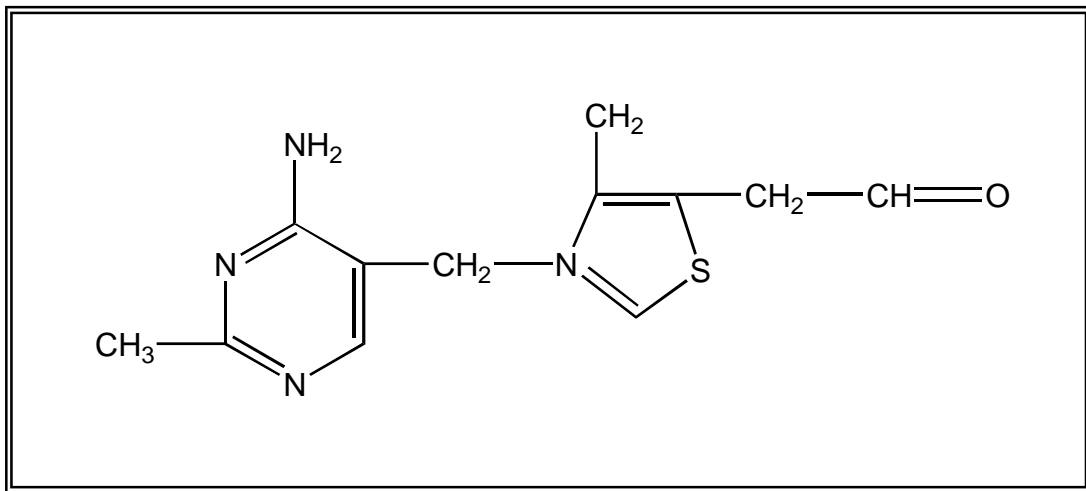


Figura 5.1. Estructura química de la tiamina.

Además de sus funciones como co-enzima, la tiamina se concentra en los nervios y células musculares. Al parecer la tiamina se une a receptores colinérgicos y su antimetabolito pirilamina afecta la neurotransmisión. Asimismo, los derivados fosforilados de la tiamina parecen estar asociados con los canales de sodio, sugiriendo su participación en la conducción axonal, y una posible explicación de los síntomas neurológicos observados tras su deficiencia (Bender, 1999). La deficiencia de tiamina produce una forma de polineuritis conocida como beriberi. La mayor parte de los síntomas de esta condición se relacionan con el sistema nervioso e incluyen neuritis periférica con trastornos de la sensibilidad en las extremidades, como hiperestesia o anestesia, disminución de la fuerza muscular y

parálisis (Tanphaichitr, 1999). También se producen trastornos de la personalidad como depresión, ausencia de iniciativa y disminución de la capacidad de memoria. En casos extremos se observa encefalopatía de Wernicke y psicosis de Korsakoff. También pueden observarse algunos síntomas cardiovasculares como disnea, taquicardia, depresión de la onda R, inversión de la T e insuficiencia cardiaca.

1.5.2. Piridoxina

La piridoxina, (Figura 5.2) o vitamina B₆ se encuentra en el organismo en 6 formas: piridoxal, piridoxina, piridoxamina, y sus derivados piridoxal 5'-fosfato, piridoxina 5'-fosfato y piridoxamina 5'-fosfato. El piridoxal 5'-fosfato es la forma activa de la coenzima y la de mayor importancia biológica de la serie (Leklem, 1991). La piridoxina está involucrada en diversas transformaciones metabólicas de aminoácidos, incluyendo descarboxilación, transaminación y racemización. La vitamina B₆ también interviene en la conversión del triptofano a 5-hidroxitriptamina. En los casos de deficiencia de vitamina B₆ se eliminan grandes cantidades de metabolitos de triptofano. Otros neurotransmisores como dopamina, norepinefrina y ácido γ -aminobutírico (GABA) son también sintetizadas con el concurso de enzimas dependientes del fosfato de piridoxal. La conversión de metionina a cisteína también depende de la vitamina B₆ (Leklem, 1999). La deficiencia de vitamina B₆ se asocia con lesiones seborreicas de ojos, nariz y boca, acompañadas de glositis y estomatitis. Pueden ocurrir convulsiones, las cuales pudieran obedecer a la disminución en las concentraciones de ácido gamma aminobutírico, ya que la glutamato descarboxilasasa que interviene en la síntesis

de este compuesto, requiere de acción de la piridoxina. Asimismo, la deficiencia de piridoxina se ha relacionado con la disminución de los neurotransmisores norepinefrina y serotonina. La deficiencia de piridoxina también se asocia con una forma de neuritis periférica que incluye inflamación y dolor sinovial conocido como síndrome del túnel del carpo (Bernstein, 1990; Leklem, 1991).

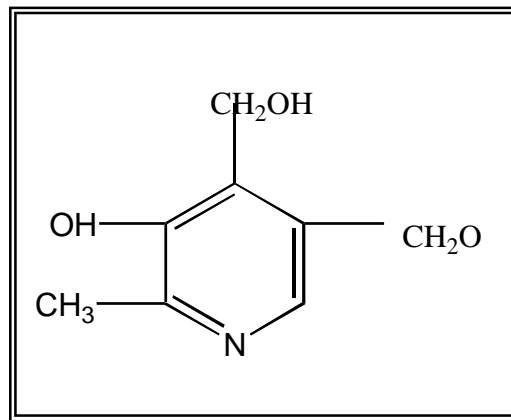


Figura 5.2. Estructura química de la piridoxina.

1.5.3. Cianocobalamina

La vitamina B₁₂ (cianocobalamina) presenta la estructura más grande y compleja de todas las vitaminas. Es única entre las vitaminas ya que contiene un ion metálico, el cobalto. Por esta razón se utiliza el término cobalamina para designar los compuestos provistos de actividad B₁₂. La metilcobalamina y la 5-desoxiadenosilcobalamina son las formas activas de vitamina B₁₂ en el cuerpo humano (Brody, 1991). La forma de cobalamina usada en los productos farmacéuticos es la

cianocobalamina, que se convierte rápidamente a 5-desoxiadenosil y metilcobalamina.

La metilcobalamina resulta esencial para la función de la enzima metionina sintasa. Esta enzima se requiere a su vez para la síntesis de la metionina a partir de homocisteína. La metionina se requiere para la síntesis de la S-adenosilmetionina, que actúa como donador de grupos metilo en muchas reacciones de metilación, incluso en varios sitios dentro de ADN y ARN. La función inadecuada de la metionina sintasa puede conducir a la acumulación de homocisteína que ha sido asociada con un riesgo mayor de enfermedades cardiovasculares. La 5-desoxiadenosilcobalamina es requerida por la enzima que cataliza la conversión de L-metilmalonil-CoA a succinil-CoA. Esta reacción bioquímica juega un papel importante en la producción de energía de las grasas y proteínas. La succinil-CoA también se requiere para la síntesis de hemoglobina.

La cianocobalamina resulta esencial en el crecimiento y división celular. Cuando existe deficiencia de vitamina B₁₂ los folatos permanecen como metiltetrahydrofolato y causan deficiencia de otras formas de ácido fólico.

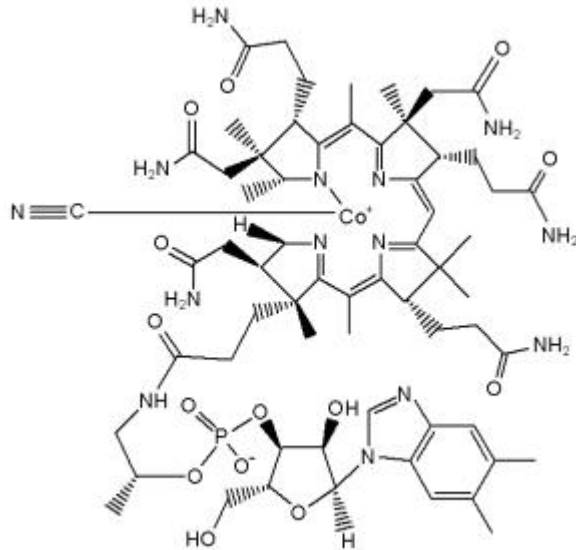


Figura 5.3. Estructura química de la cianocobalamina.

La deficiencia de vitamina B₁₂ produce deterioro en la actividad de la metionina sintasa y elevación en los niveles de homocisteina, mientras que la disminución de la actividad de la L-metilmalonil-CoA mutasa produce niveles aumentados de ácido metilmalónico (Shane, 2000).

La deficiencia de vitamina B₁₂ afecta la hematopoyesis al inhibir la regeneración del tetrahidrofolato y entrapa al folato en una forma no utilizable por el organismo. Esto conduce al trastorno conocido como anemia megaloblástica. En el sistema nervioso puede producir desmielinización y muerte neuronal. Esto puede dar lugar a síntomas como parestesias de manos y pies, disminución de los

sentidos de vibración y posición, hiporreflexia tendinosa, pérdida de la memoria y de la visión, alucinaciones y psicosis (Herbert, 1996; Baik y Russell, 1999).

1.5.4. Actividad terapéutica de las vitaminas B₁, B₆ y B₁₂

De manera general estas tres vitaminas del complejo B se utilizan principalmente en la profilaxis y el tratamiento de los trastornos resultantes de su deficiencia, y no se les considera capaces de generar acciones farmacológicas relevantes. Así, a la tiamina se le destaca porque sus reacciones tóxicas se circunscriben a casos raros de hipersensibilidad. La piridoxina tampoco muestra toxicidad aguda importante y no se le relaciona con efectos farmacológicos tras su administración oral o intravenosa. Sin embargo, la ingestión prolongada de dosis de 200 mg/día puede dar lugar al desarrollo de neurotoxicidad y dependencia (Parry y Bredesen, 1985; Canham, 1964). Finalmente, el uso de grandes dosis de vitamina B₁₂ oral o parenteral (1-5 g) no se asocia con la presentación de efectos secundarios (Institute of Medicine, Food and Nutrition Board, 1998).

Posiblemente debido a la baja toxicidad de estas vitaminas y a la relación de su deficiencia con la aparición de dolor crónico, es que se han ensayado en el control de diversos padecimientos que incluyen neuralgia del trigémino y otras neuropatías, y como tónico para pacientes con cansancio y fatiga (Marcus y Coulston, 2001). De hecho, desde hace mucho tiempo existen algunas combinaciones en el mercado mexicano que son utilizadas preconizando sus propiedades farmacológicas más que sus bondades nutricionales. Entre ellas se

encuentran algunas formulaciones de vitaminas B₁, B₆ y B₁₂ solas, o en combinación con diversos AINEs.

1.5.5. Actividad antineuropática de las vitaminas B

Se ha evaluado la eficacia de la tiamina y la piridoxina en el tratamiento sintomático de la neuropatía diabética. Se observó que la administración crónica de 25 mg diarios de cada una de esas vitaminas por cuatro semanas disminuyó la severidad del dolor, el entumecimiento y las parestesias en 48% de los pacientes tratados, en comparación con solo 11.4% del grupo placebo (Abbas y Swai, 1997). Asimismo, en otro estudio clínico doble ciego se evaluaron los efectos de la administración diaria de 3 grageas de vitamina B₁ (300 mg), vitamina B₆ (600 mg) y vitamina B₁₂ (0.6 mg), por 18 semanas en 33 pacientes con diabetes tipo 1 controlada afectados por neuropatía periférica. Se demostró una mejoría significativa, durante el período de tratamiento, en la sensibilidad térmica y en el dolor neuropático en manos y pies, en comparación con la terapia con placebo. No se observaron efectos de las vitaminas sobre el control de la propia diabetes (Janka, 1991).

Adicionalmente, existe evidencia de la actividad antineuropática de las vitaminas B₁, B₆ y B₁₂ en modelos animales. En el modelo de diabetes inducida por estreptozotocina se evaluó el efecto de la mezcla de vitaminas sobre la velocidad de conducción sensorial tras la estimulación eléctrica del nervio caudal por un periodo de 70 días. Tras la estimulación eléctrica con frecuencias altas (90 Hz) las ratas control tratadas con solución salina mostraron una disminución progresiva de

la velocidad máxima de conducción, mientras que en las ratas tratadas con la combinación de vitaminas B₁ (25 mg/kg), B₆ (50 mg/kg) y B₁₂ (0.5 mg/kg) este efecto resultó significativamente menos pronunciado (Reeh, 1991).

1.5.6. Actividad antinociceptiva de las vitaminas B

De la misma manera, las vitaminas del complejo B se han evaluado clínicamente en diversas condiciones dolorosas inflamatorias que incluyen lumbalgia, síndrome de tensión premenstrual (Wyatt et al., 1999) y aún en migraña (Schoenen et al., 1998) ya sea solas o en combinación con AINEs.

En un estudio doble ciego controlado con placebo, la administración de las vitaminas B₁, B₆ y B₁₂ mostró influencia clínica relevante en el control de lumbalgia recurrente. Los pacientes tratados con complejo B por 6 meses, mostraron un menor índice de recurrencias. Asimismo, se ha estudiado la eficacia de la administración intramuscular de fenilbutazona sola o en combinación con vitamina B₁₂ en pacientes con lumbalgia. Los resultados mostraron un alivio más rápido y mayor eficacia en los primeros dos días siguientes al tratamiento (Lettko, 1991).

En otro estudio relacionado se evaluó la eficacia de la combinación de vitaminas B₁, B₆ y B₁₂ más dipirona en pacientes con dolor lumbosacro secundario a afecciones de vejiga, próstata y órganos genitales femeninos. En caso de existencia de síntomas de infección pélvica, se administraron antibióticos después de realizar las pruebas bacteriológicas. La combinación mostró resultados buenos a excelentes en 77.4% y moderado en 15.1% de 53 pacientes evaluados. No existieron reacciones adversas relevantes ni intolerancia (Kunt, 1978). Otros

estudios han mostrado que la duración del tratamiento de lumbalgia puede ser reducido con la adición de vitaminas B al régimen terapéutico con diclofenaco. En un estudio multicéntrico participaron 256 pacientes a quienes se administraron diclofenaco (50 mg) o la misma dosis de diclofenaco más vitamina B₁ (50 mg), vitamina B₆ (50 mg) y vitamina B₁₂ (0.25 mg), tres veces al día, por un período máximo de 2 semanas, teniendo la opción de terminar el tratamiento en una semana, luego del alivio total del dolor. Veintinueve de 238 pacientes que pudieron ser evaluados suspendieron el tratamiento por alivio total del dolor. El 65.6% correspondieron al grupo de terapia combinada y sólo el 34.4% al grupo tratado solo con diclofenaco. Todos los parámetros de alivio de dolor evaluados indicaron la eficacia superior de la terapia combinada (Bruggemann et al., 1988). Resultados similares se observaron en 104 pacientes, 52 de los cuales recibieron 25 mg tres veces al día o la misma dosis de diclofenaco más 50 mg de cada una de las vitaminas B₁ y B₆ tres veces al día. En este estudio se observó que el 35% de los pacientes tratados con la combinación y el 11% de los pacientes tratados con diclofenaco concluyeron el tratamiento tres días después por un alivio total de dolor, y 47% y 37% luego de 7 días por iguales resultados (Meyer, 1991). En suma, se ha demostrado que la combinación de vitaminas B con diclofenaco reducen el dolor agudo más clara y rápidamente que el diclofenaco solo. Las diferencias son particularmente significativas en los casos tratados con dosis bajas. La evaluación final mostró que las vitaminas B permiten un mayor y más rápido alivio del dolor y reducen el riesgo de reacciones adversas.

A pesar de su amplio uso terapéutico, la evidencia preclínica sobre la actividad antinociceptiva de las vitaminas del complejo B es escasa, sobre todo con respecto a la caracterización de dicho efecto antinociceptivo en modelos de dolor inflamatorio, y también sobre los mecanismos de acción involucrados.

En modelos de dolor térmico (heat coil test) y químico (writhing test), Wild y Bartoszyk (1988) reportaron la existencia de efecto antinociceptivo dependiente de la dosis, tras la co-administración de altas concentraciones de las vitaminas B₁, B₆ y B₁₂ por las vías subcutánea e intraperitoneal. La administración individual de las vitaminas produjo en cada caso un efecto menor que en su conjunto, resultando mejor el de la tiamina y no dependiente de la dosis el de la cianocobalamina. Adicionalmente, se ha reportado que dichas vitaminas poseen actividad antiinflamatoria y analgésica en el modelo de edema inducido por carragenina (Hanck y Weiser, 1985). Sin embargo, otros autores han reportado resultados contrarios utilizando los modelos de hot plate test, writhing test, electric shock test (Eschalier et al., 1983).

Se ha observado que la administración sistémica de las vitaminas B se asocia con la inhibición de la actividad nociceptiva evocada en neuronas del asta dorsal de la médula espinal y del tálamo, lo cual pudiera implicar la depresión de la transmisión de los aferentes nociceptivos a las vías ascendentes. (Fu et al., 1988; Jurna et al., 1990). Estudios farmacodinámicos adicionales han indicado que la piridoxina y las vitaminas del complejo B aumentan la síntesis y la secreción de serotonina en diversas áreas del cerebro (Dakshinamurti et al., 1990). Sharma et al. (1990) han sugerido que la deficiencia de piridoxina reduce las concentraciones de GABA y

serotonina. Además, las vitaminas B son importantes para el transporte axonal, la excitabilidad neuronal y la síntesis de neurotransmisores (Zimmermann, 1988).

Aunque existe evidencia para postular la existencia de un papel de las vitaminas en la antinocicepción, los mecanismos neurofisiológicos son aún desconocidos. En el presente estudio se proponen una serie de estudios para evaluar la actividad analgésica de las vitaminas y explorar el o los posibles mecanismos de acción involucrados.

2. JUSTIFICACIÓN

Desde hace mucho tiempo, se comercializan en México diversas preparaciones farmacéuticas de complejo B, solas o en combinación con AINEs. Existen reportes sobre la potencial utilidad de estos fármacos en el tratamiento de diversas condiciones dolorosas tales como polineuropatía (Kunze, 1979), neuritis (Small, 1978), lumbalgia (Marcolongo, et al, 1988) y enfermedades reumáticas (Moller., et al, 1987). De la misma manera, se ha postulado que la administración conjunta de vitaminas y diclofenaco produce mejores resultados analgésicos en diversas condiciones dolorosas de origen inflamatorio. Algunos estudios han reportado que la mezcla de vitaminas B (tiamina, piridoxina y cianocobalamina) produce analgesia y reduce la dosis total de diclofenaco en síndromes vertebrales dolorosos (Vetter et al., 1988; Kuhlwein et al., 1990). En un estudio aleatorizado y doble ciego, la mezcla de vitaminas B mejoró significativamente el efecto analgésico de diclofenaco (Bruggemann et al., 1990). Sin embargo, también existen estudios que sostienen lo contrario, y ponen en tela de juicio la existencia de la actividad analgésica de las vitaminas B. En un estudio cruzado y doble ciego, la mezcla de vitaminas B resultó incapaz de producir analgesia o aumentar el efecto de diclofenaco (Bromm et al., 1995).

Por otro lado, diversos experimentos en animales han mostrado que las vitaminas B₁ (tiamina), B₆ (piridoxina) y B₁₂ (cianocobalamina), y su combinación, poseen actividad antinociceptiva en modelos de dolor inducido por la administración de sustancias químicas o por la aplicación de estímulos térmicos (Bartoszyk y Wild,

1989; Leuschner, 1992; França et al., 2001). Adicionalmente se ha reportado que pueden presentar efecto antiinflamatorio en el modelo de inflamación inducido por carragenina (Bartoszyk y Wild, 1989; Hanck y Weiser, 1985). De la misma manera, existen reportes en el sentido que la administración individual de las vitaminas B₁ y B₆ así como la B₂ (riboflavina) produce antinocicepción en el modelo de dolor inducido por ácido acético o en el modelo de dolor inducido por estimulación eléctrica supramáxima de las fibras C (França et al., 2001; Jurna et al., 1990). Además de producir antinocicepción por si misma, la tiamina ha mostrado aumentar el efecto antinociceptivo del diclofenaco en ratas artríticas (Stanislavchuk et al., 1988). Se ha observado un efecto similar utilizando la piridoxina o la mezcla de tiamina, piridoxina y cianocobalamina en el modelo de hiperalgesia inducida por carragenina y presión de la cola en la rata (Bartoszyk y Wild, 1989).. Sin embargo también existen reportes que ponen en controversia la actividad antinociceptiva de las vitaminas B. De esta manera, la vitamina B₁₂ no mostró actividad antinociceptiva en el modelo de dolor inducido por ácido acético (França et al., 2001) ni en otros modelos animales de dolor (Eschalier et al., 1983). Además, Las vitaminas B₆ o B₁₂ no produjeron alivio del dolor neuropático en ratas (Misumi et al., 1985).

Así, aunque las vitaminas B₁, B₆ y B₁₂, solas o en combinación con diclofenaco, son utilizadas en el tratamiento de diversas condiciones dolorosas, y en especial las de origen inflamatorio, la información sobre la actividad antinociceptiva de las vitaminas B en modelos de dolor inflamatorio y el posible mecanismo de acción involucrado es escasa.

Por lo tanto, la finalidad de este trabajo es tratar de explorar el papel del complejo de vitaminas B, en la proporción de dosis utilizadas clínicamente, en el alivio del dolor, su posible mecanismo de acción y su participación sinérgica con la co-administración de un AINE (diclofenaco) en diferentes modelos de dolor de origen inflamatorio en la rata.

3. HIPÓTESIS

La coadministración de tiamina, piridoxina y cianocobalamina ejercen actividad antinociceptiva intrínseca, además de un efecto sinérgico sobre la respuesta antinociceptiva al diclofenaco sódico en modelos de dolor inflamatorio.

4. OBJETIVOS

4.1. *Disfunción articular inducida por dolor*

4.1.1. *Objetivo general*

Estudiar el efecto antinociceptivo de las vitaminas B₁, B₆ y B₁₂ y su posible sinergismo con el diclofenaco sódico en el modelo de disfunción articular inducida por dolor en la rata.

4.1.2. *Objetivos particulares*

- Evaluar la actividad antinociceptiva del complejo de vitaminas B (B₁, B₆ y B₁₂) administrado por la vía oral.
- Evaluar el efecto antinociceptivo del diclofenaco.
- Estudiar el posible aumento del efecto analgésico del diclofenaco por las vitaminas del complejo B.
- Determinar cual de las vitaminas es la responsable principal del efecto antinociceptivo o del aumento de la actividad antinociceptiva del diclofenaco.

4.2. *Hiperalgnesia térmica*

4.2.1. *Objetivo general*

Evaluar el efecto analgésico del diclofenaco solo y combinado con el complejo de vitaminas B (B₁, B₆ y B₁₂) en el modelo de hiperalgnesia térmica.

4.2.2. Objetivos particulares

- Evaluar el posible efecto anti-hiperalgésico del complejo de vitaminas B en el modelo de hiperalgnesia térmica inducida por carragenina.
- Evaluar el efecto anti-hiperalgésico del diclofenaco en el modelo de hiperalgnesia térmica inducida por carragenina.
- Estudiar el posible aumento del efecto analgésico del diclofenaco por las vitaminas del complejo B.

4.3. *Formalina*

4.3.1. *Objetivo general*

Estudiar el efecto antinociceptivo de las vitaminas B₁, B₆ y B₁₂ y su posible sinergismo con el diclofenaco sódico en el modelo de la formalina.

4.3.2. *Objetivos particulares*

- Evaluar la actividad antinociceptiva del complejo de vitaminas B (B₁, B₆ y B₁₂) administrado por vía oral en el modelo de la formalina.
- Evaluar el efecto antinociceptivo del diclofenaco en el modelo de la formalina.
- Estudiar el posible aumento del efecto antinociceptivo del diclofenaco por las vitaminas del complejo B.
- Determinar cual de las vitaminas es la responsable principal del efecto antinociceptivo o del posible aumento de la actividad antinociceptiva del diclofenaco.

4.4 Mecanismo de acción de las vitaminas B

4.4.1 Objetivo general.

- Evaluar la posible participación de diferentes sistemas en el mecanismo de acción de las vitaminas del complejo B para producir antinocicepción en alguno de los modelos anteriores apropiado para ello.

4.4.2 Objetivo particular

- Evaluar el efecto de naloxona (un antagonista de receptores opioides), metiotepina (un antagonista no selectivo de los receptores a serotonina), glibenclamida (un bloqueador de los canales de K⁺ sensibles a ATP) y L-NAME (un inhibidor de la síntesis de óxido nítrico) en el efecto antinociceptivo inducido por el complejo de vitaminas B en el modelo más apropiado para ello.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1. Disfunción inducida por dolor en la rata

5.1.1. Animales

En el modelo de disfunción inducida por dolor se utilizaron ratas macho de 9 a 10 semanas de edad, con 180 g a 220 g de peso. Los animales tuvieron libre acceso al agua, pero 12 horas antes de iniciar los experimentos se les retiró el alimento. Todos los experimentos se realizaron de acuerdo a las Guías sobre aspectos éticos para la investigación de dolor experimental en animales (Zimmermann, 1983). Cada rata se utilizó solo una vez y se sacrificó en una cámara saturada con CO₂ al final del experimento.

5.1.2. Modelo de dolor

En este modelo de nocicepción de origen inflamatorio (Granados-Soto et al., 1992.) conocido como PIFIR por sus siglas en inglés *Pain-Induced Functional Impairment in the Rat*, se indujo dolor sostenido mediante la aplicación intraarticular de 50 µl de una suspensión de aceite mineral de ácido úrico al 30% en la rodilla trasera de la pata derecha del animal. Se asume que por el dolor producido, el animal evita utilizar la pata inyectada con una latencia de aproximadamente 2 horas, y dicha situación persiste por un tiempo aproximado de 4 horas. Posteriormente se aplicaron electrodos de plata en cada una de las plantas de las patas traseras de la rata. En los tiempos seleccionados, los animales se colocaron, por periodos de 2 minutos, en un cilindro rotatorio de acero

inoxidable de 30 cm, girando a 4 rpm. La conexión de los electrodos con sistemas contadores permitió el registro del número de los contactos de la pata sana y de la pata dañada de las ratas. Los resultados se expresaron mediante el índice de funcionalidad (FI), el cual representa el cociente del número de contactos de la pata dañada dividido entre el número de contactos de la pata sana multiplicado por 100. Después de 2.5 horas, durante las cuales los animales fueron colocados en el cilindro rotatorio por periodos de 2 minutos, cada 30 minutos, el número de contactos de la pata dañada del animal y el índice de funcionalidad, tendieron a un valor de cero. Este tiempo fue considerado el punto inicial para fines de registro, tras lo cual se administraron de inmediato los fármacos en estudio. Se obtuvieron registros cada hora, por espacio de 4 horas. La recuperación del índice de funcionalidad se consideró la expresión del efecto antinociceptivo de los fármacos evaluados.

5.1.3. Fármacos

El diclofenaco y las vitaminas B fueron proporcionadas por Merck, S.A. de C.V. (México, DF). El ácido úrico se obtuvo de Sigma Chemicals Co (San Luis Missouri, E.U.A). Los fármacos de prueba se disolvieron en solución salina.

5.1.4. Diseño del estudio

En una primera serie de experimentos se estudiaron 7 grupos de 8 ratas. Los animales del grupo 1 recibieron solución salina como control. Los animales de los grupos 2 a 5 recibieron diclofenaco sódico oral a las dosis de 0.31, 1.0, 3.1 y 5.7

mg/kg, respectivamente. Los grupos 6 y 7 recibieron una mezcla oral de vitaminas B₁ (tiamina), B₆ (piridoxina) y B₁₂ (cianocobalamina) (177:177:1.7 y 300:300:3.0 mg/kg, respectivamente). La asociación de tiamina, piridoxina y cianocobalamina se utilizó siempre en una proporción de 100:100:1. Esto significa que, por ejemplo, cuando se haga relación a una dosis de 177 mg/kg de vitaminas B, esto implicará la administración de 177 mg/kg de tiamina, 177 mg/kg de piridoxina y 1.7 mg/kg de cianocobalamina.

Los valores de recuperación del índice de funcionalidad más altos se observaron en la segunda hora (FI -2h) después de la administración del diclofenaco, y estos fueron seleccionados para la realización del análisis posterior. El diclofenaco produjo respuestas dependientes de la dosis que permitieron la estimación de la DE₄₀, dosis de diclofenaco que produce el 40% de la recuperación del FI-2h, la cual correspondió a 1.8 mg/kg. Esta dosis fue utilizada para estudiar la interacción analgésica potencial de las vitaminas del complejo B con la respuesta analgésica del diclofenaco.

En una segunda serie experimental se estudiaron 5 grupos de 8 ratas. Uno de ellos recibió diclofenaco (1.8 mg/kg), y los restantes el propio diclofenaco a la misma dosis, más la mezcla de vitaminas B₁, B₆ y B₁₂ (56:56:0.56, 87:87:0.87, 100:100:1.0 y 177:177:1.7 mg/kg, respectivamente), por la vía oral en todos los casos.

En una tercera serie experimental se estudiaron cuatro grupos de 8 ratas. Uno de ellos recibió diclofenaco (1.8 mg/kg). Los grupos restantes recibieron la misma

dosis de diclofenaco en combinación con dosis individuales de vitamina B₁ (100 mg/kg), vitamina B₆ (100 mg/kg) o vitamina B₁₂ (1.0 mg/kg).

5.2.5. Análisis de los datos

Los datos se expresaron como el promedio del índice de funcionalidad a las 2 horas (n= 8) de los diferentes grupos \pm el error estándar.

5.1.6. Análisis estadístico

Las comparaciones entre los grupos de cada serie experimental se evaluaron mediante análisis de varianza seguido por la Prueba de Dunnet. Se consideró la existencia de diferencias estadísticamente significativas con valores de $P < 0.05$

5.2. Hiperlagesia térmica

5.2.1. Animales

En el modelo de hiperalgesia térmica se utilizaron ratas Wistar hembra de 9-10 semanas de edad, con un peso de 180-200 g. A las ratas se les mantuvo con libre acceso al agua, retirándoles el alimento 10 horas antes de los experimentos. Todos los experimentos se realizaron de acuerdo a las Guías sobre aspectos éticos para la investigación de dolor experimental en animales (Zimmermann, 1983). Cada rata se utilizó solo una vez y se sacrificó en una cámara saturada con CO₂ al final del experimento.

5.2.2 *Modelo de Dolor*

Se utilizó el modelo de hiperalgesia térmica previamente validado y estandarizado por Dirig y colaboradores (1997). El equipo consta de una superficie de cristal, rodeada por paredes de acrílico, a manera de cubículo, donde los animales fueron colocados individualmente. La superficie de cristal se mantuvo a temperatura constante de $30 \pm 0.1^{\circ}\text{C}$. El estímulo térmico se dirigió mediante la manipulación de un brazo mecánico y una termocopla en la cual se encuentra un foco de luz orientado a la superficie interna del vidrio. La colocación de un espejo permite visualizar cada una de las patas del animal, lo cual facilita la dirección del haz de luz sobre éstas. El estímulo térmico, de 5.5 amperios, produce una temperatura de 30°C (temperatura del piso) al inicio e incrementa rápidamente hasta alcanzar los $41-42.5^{\circ}\text{C}$ a los 12 segundos aproximadamente. El cursor de tiempo se activa automáticamente al encender el interruptor de luz y se mide la latencia, constituida por el tiempo ocurrido desde este momento hasta aquel en el que la rata retira la pata de la superficie al sentir molestias originadas por el estímulo térmico. Este movimiento hace que los sensores de movimiento del equipo detengan el cursor de tiempo y el propio estímulo térmico. Con la finalidad de evitar el daño de las patas de las ratas en todos los casos el tiempo máximo de aplicación del estímulo fue de 20 segundos.

Previo al estudio fue necesario ambientar a las ratas durante 30 minutos en los cubículos de separación de acrílico, para evitar variaciones en la medición de la latencia originadas por estrés.

5.2.3. Fármacos

El diclofenaco sódico y las vitaminas del complejo B fueron proporcionados por Merck, S.A. de C.V. La carragenina λ se obtuvo de Sigma (S. Louis, MO, EUA). Los compuestos analgésicos se administraran por vía oral disueltos en carboximetilcelulosa al 0.5%.

5.2.4. Diseño del estudio

En todos los casos, se aplicó a los animales una inyección intraplantar de carragenina (50 μ l, 10 mg/ml), 10 minutos antes de la administración de los fármacos de prueba.

Los estímulos fueron aplicados antes y cada 30 minutos después de la administración de los fármacos en estudio, durante un período de 4 horas.

Se realizaron curvas tiempo-latencia tras la administración oral de diclofenaco sódico (1.8, 3.2 y 5.6 mg/kg). Y de la combinación de las vitaminas B₁, B₆ y B₁₂ (56:56:0.56, 100:100:1.0 y 177:177:1.7 mg/kg, respectivamente). Con la finalidad de explorar el sinergismo potencial de entre las vitaminas B y el diclofenaco, se probó la administración oral de la combinación de una dosis submáxima de diclofenaco (1.8 mg/kg) más la asociación de vitaminas B₁, B₆ y B₁₂ (18:18:0.18, 32:32:0.32 y 56:56:0.56 mg/kg, respectivamente).

La asociación de tiamina, piridoxina y cianocobalamina se utilizó siempre en una proporción de 100:100:1. Esto significa que, por ejemplo, cuando se haga relación a una dosis de 100 mg/kg de vitaminas B, esto implicará la administración de 100 mg/kg de tiamina, 100 mg/kg de piridoxina y 1.0 mg/kg de cianocobalamina.

5.2.5. Análisis de los datos

Los datos se expresaron como el promedio del tiempo de latencia para cada grupo experimental (n= 6) de los diferentes grupos \pm el error estándar. Se realizaron curvas de latencia contra tiempo para cada grupo y se calculó el área bajo la curva (ABC) por el método de los trapecoides.

5.2.6. Análisis estadístico

Se utilizaron análisis de varianza seguidos por la prueba de Tukey para comparar las diferencias entre los tratamientos, las cuales se consideraron estadísticamente significativas con valores de $P < 0.05$.

5.3. Formalina

5.3.1. Animales

En el modelo de formalina se utilizaron ratas Wistar hembra de 9-10 semanas de edad, con un peso de 180-200 g. A las ratas se les mantuvo con libre acceso al agua, retirándoles el alimento 10 horas antes de los experimentos. Todos los experimentos se realizaron de acuerdo a las Guías sobre aspectos éticos para la investigación de dolor experimental en animales (Zimmermann, 1983). Cada rata se utilizó solo una vez y se sacrificó en una cámara saturada con CO₂ al final del experimento.

5.3.2. Modelo de dolor

La antinocicepción se evaluó con la prueba de la formalina en la rata. Los animales se colocaron en cámaras de observación de acrílico por 30 minutos, para permitirles acostumbrarse a su ambiente de experimentación. Las ratas se inyectaron con 50 µl de formalina diluida (1%, s.c.) en el dorso de la pata derecha con una aguja calibre 30. Los animales se regresaron a las cámaras de acrílico para evaluar la conducta nociceptiva inmediatamente después de la inyección de formalina. Se colocaron espejos en la parte trasera de la cámara para permitir la observación integral de los movimientos de la pata de la rata. La conducta nociceptiva se cuantificó como el número de sacudidas de la pata inyectada durante periodos de 1 minuto cada 5 minutos hasta completar 1 hora (Wheller-Aceto y Cowan, 1991; Aguirre-Bañuelos y Granados-Soto, 2000). La sacudida de la pata se identificó y caracterizó como el reflejo de sacudida rápida y breve o la flexión de la pata inyectada (derecha trasera). La conducta nociceptiva observada (sacudidas de la pata inyectada) en la prueba de la formalina es bifásica. La fase inicial aguda, dependiente de la activación directa de los nociceptores (0-10 minutos), es seguida por una fase de respuesta tónica prolongada de origen inflamatorio (15-60 minutos). Al final del experimento los animales se sacrificaron en una cámara con CO₂.

5.3.3. Fármacos

Las vitaminas B y el diclofenaco sódico fueron proporcionadas por Merck, S.A. de C.V. (México, DF). El clorhidrato de naloxona, el éster metílico de N^G-L-nitro-

arginina (L-NAME) y el éster metílico de N^G -D-nitro-arginina (D-NAME) se obtuvieron de Research Biochemicals International (Natick, MA, EUA). La glibenclamida (glyburide) se compró en Sigma (St. Louis, MO, EUA). La metiotepina fue un regalo del Dr. Carlos M. Villalón (México, DF). La glibenclamida se disolvió en dimetilsulfóxido al 20%. Todos los demás fármacos se disolvieron en salina.

5.3.4. Diseño del estudio

En todos los casos, las vitaminas B y el diclofenaco se administraron 10 minutos antes de la aplicación de la formalina.

En una primera serie de experimentos, se aplicaron a las ratas dosis crecientes locales individuales de vitamina B₁, (10 – 300 µg) Vitamina B₆ (10 – 300 µg) o vitamina B₁₂, (1 – 3 µg) y la combinación de ellas (32 –178 µg). La asociación de tiamina, piridoxina y cianocobalamina se utilizó en una proporción de 100:100:1. Esto significa, por ejemplo, que la dosis de 100 µg correspondió a 100 µg de tiamina, 100 µg de piridoxina y 1 µg de cianocobalamina.

En experimentos adicionales, las ratas recibieron dosis orales crecientes de de la mezcla de vitaminas B (30-177 mg/kg), y dosis individuales de vitamina B₁ (100 mg/kg), B₆ (100 mg/kg) y B₁₂ (1 mg/kg).

Asimismo, se administraron dosis orales crecientes de diclofenaco (1.0 - 10 mg/kg), y para evaluar el sinergismo potencial entre las vitaminas B y el diclofenaco, se probó la administración oral de la combinación de una dosis

submáxima de diclofenaco (1.8 mg/kg) más la asociación de vitaminas B (18 – 56 mg/kg).

Finalmente, para explorar el posible mecanismo de acción de la vitaminas B se pretrataron los animales, 10 minutos antes de la aplicación de la formalina, con naloxona (2 mg/kg, s.c.), metiotepina (0.1 mg/kg, i.p.), L-NAME (3 mg/kg, s.c.) y glibenclamida (8 mg/kg, s.c.) y posteriormente se evaluó la actividad antinociceptiva de la asociación de las vitaminas B (100 mg/kg), 5 minutos antes de la aplicación de la formalina. La selección de las dosis de antagonistas se basó en estudios piloto realizados en el laboratorio.

5.3.5. Análisis de los datos

Los resultados se presentan como el promedio \pm el error estándar de al menos 6 animales por grupo. Se construyeron curvas graficando el número de sacudidas contra tiempo. El área bajo la curva (ABC), una expresión de la duración e intensidad del efecto, se calculó por el método trapezoidal.

5.3.6. Análisis estadístico

Se utilizaron análisis de varianza seguidos por la prueba de Tukey para comparar las diferencias entre los tratamientos, las cuales se consideraron estadísticamente significativas con valores de $P < 0.05$.

6. RESULTADOS

6.1. *Disfunción inducida por dolor en la rata*

La administración oral de diclofenaco produjo una recuperación dependiente de la dosis del índice de funcionalidad a las 2 horas (FI-2H) (Figura 6.1.1). La Dosis efectiva cuarenta (DE₄₀) calculada para el diclofenaco correspondió a 1.8 mg/kg. Por el contrario, la administración oral de la mezcla de las vitaminas B₁, B₆ y B₁₂ no produjo efecto antinociceptivo significativo, en relación con la solución salina, aún a la dosis 300 mg/kg (Figura 6.1.2). No obstante, la mezcla de vitaminas produjo un notable incremento del efecto antinociceptivo del diclofenaco (1.8 mg/kg). Este incremento en el efecto analgésico del diclofenaco resultó dependiente de la dosis, ya que la coadministración de la dosis submáxima del diclofenaco con dosis crecientes de las vitaminas B generó valores de FI-2h gradualmente mayores (Figura 9.1.3). El efecto adyuvante de las vitaminas B fue evidente desde la dosis de 56 mg/kg, y resultó máximo con la dosis correspondiente a 100 mg/kg de vitaminas B.

Debido a que la dosis de 100 mg de vitaminas B produjo el mayor incremento del efecto analgésico de la dosis submáxima del diclofenaco, se evaluaron los efectos individuales de cada uno de los componentes de la mezcla (100 mg/kg de vitamina B₁, 100 mg/kg de vitamina B₆ y 1 mg/kg de vitamina B₁₂) sobre la respuesta antinociceptiva al diclofenaco (1.8 mg/kg). Mientras las vitaminas B₁ y B₆ fueron incapaces de aumentar el efecto antinociceptivo del diclofenaco, la vitamina B₁₂

produjo un significativo incremento del efecto antinociceptivo de la dosis submáxima del diclofenaco sódico (Figura 6.1.4).

De los resultados obtenidos con el modelo de disfunción inducido por dolor (PIFIR), se desprenden las consideraciones siguientes:

1.- El diclofenaco, administrado por la vía oral, produce un efecto antinociceptivo, dependiente de la dosis, en el modelo PIFIR.

2.- La administración de la mezcla de las vitaminas B₁, B₆ y B₁₂ por la vía oral, no produce efecto antinociceptivo en el modelo PIFIR, aún a las altas dosis administradas.

3.- Las vitaminas B potencian notablemente, y de manera dependiente de la dosis, la respuesta analgésica al diclofenaco en el modelo PIFIR.

4.- La coadministración individual de las vitaminas B₁, B₆ o B₁₂ y diclofenaco, sugieren que la vitamina B₁₂ es la participante principal en el aumento del efecto analgésico del diclofenaco sódico en el modelo PIFIR.

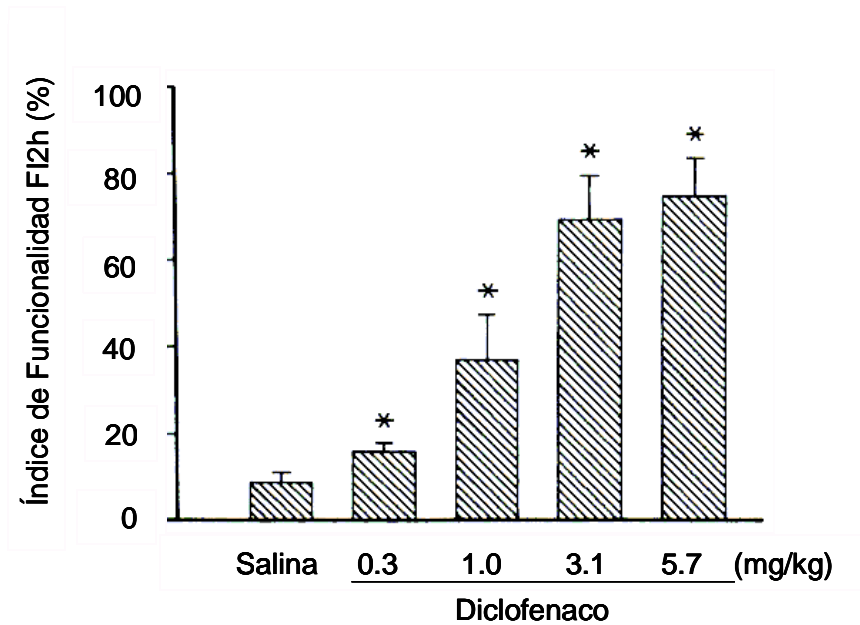


Figura 6.1.1. Efecto antinociceptivo oral de solución salina y dosis crecientes de diclofenaco sódico (0.3 – 5.7 mg/kg) en el modelo PIFIR. La antinocicepción se expresa como la recuperación del índice de funcionalidad 2 horas después de la administración del diclofenaco sódico (FI-2h). Las barras indican la media de 8 animales \pm E.E.M. * Diferencias significativas respecto al control ($p < 0.05$).

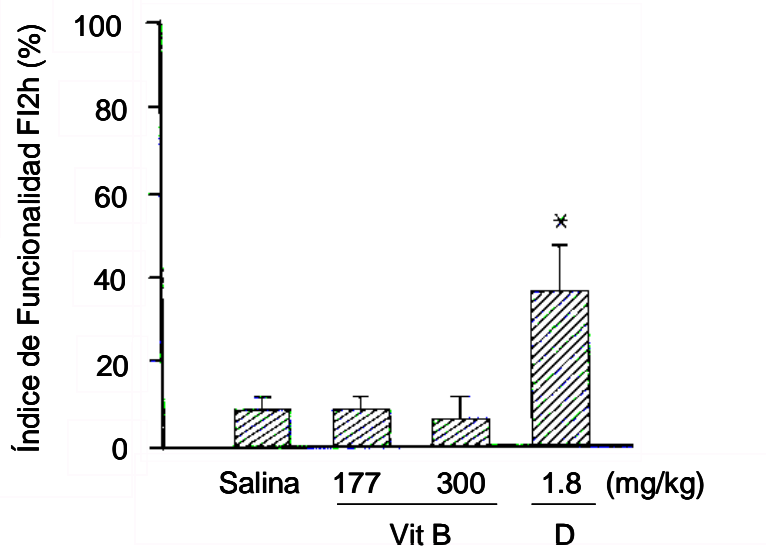


Figura 6.1.2. Efecto antinociceptivo oral de solución salina, vitaminas B₁, B₆ y B₁₂, en proporción 100:100:1 (p.ej., la dosis de 177 mg indica 177 mg de B₁, 177 mg de B₆ y 1.7 mg de B₁₂) y diclofenaco sódico (1.8 mg) en el modelo PIFIR. La antinocicepción se expresa como la recuperación del índice de funcionalidad 2 horas después de la administración de los fármacos (FI-2h). Las barras indican la media de 8 animales \pm E.E.M. * Diferencias significativas respecto al control ($p < 0.05$).

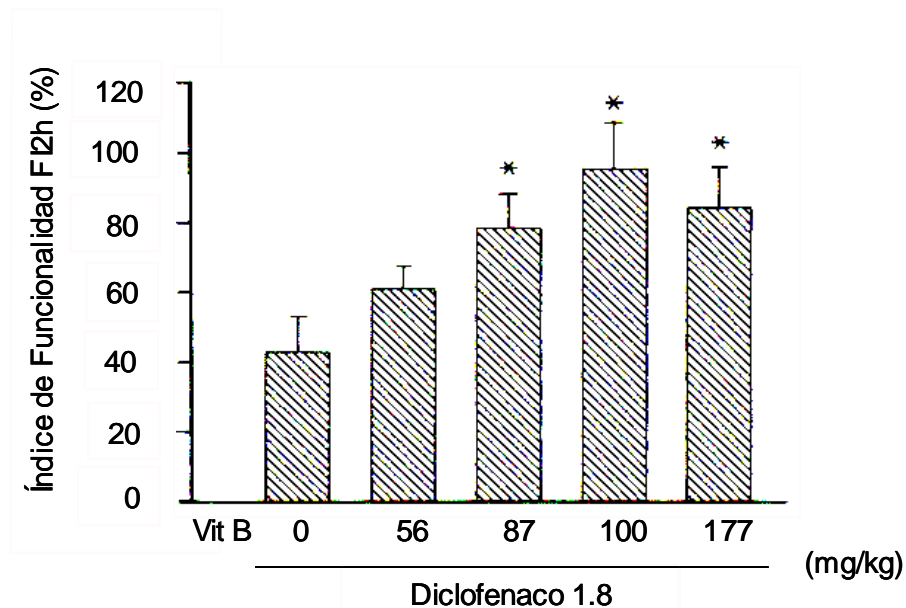


Figura 6.1.3. Efecto antinociceptivo oral de diclofenaco sódico (1.8 mg/kg) más dosis crecientes de vitaminas B₁, B₆ y B₁₂ en proporción 100:100:1 (p.ej., la dosis de 177 mg de vit B indica 177 mg de B₁, 177 mg de B₆ y 1.7 mg de B₁₂), en el modelo PIFIR. La antinocicepción se expresa como la recuperación del índice de funcionalidad a las 2 horas (FI-2h). Las barras indican la media de 8 animales ± E.E.M. * Diferencias significativas respecto al diclofenaco (p < 0.05)

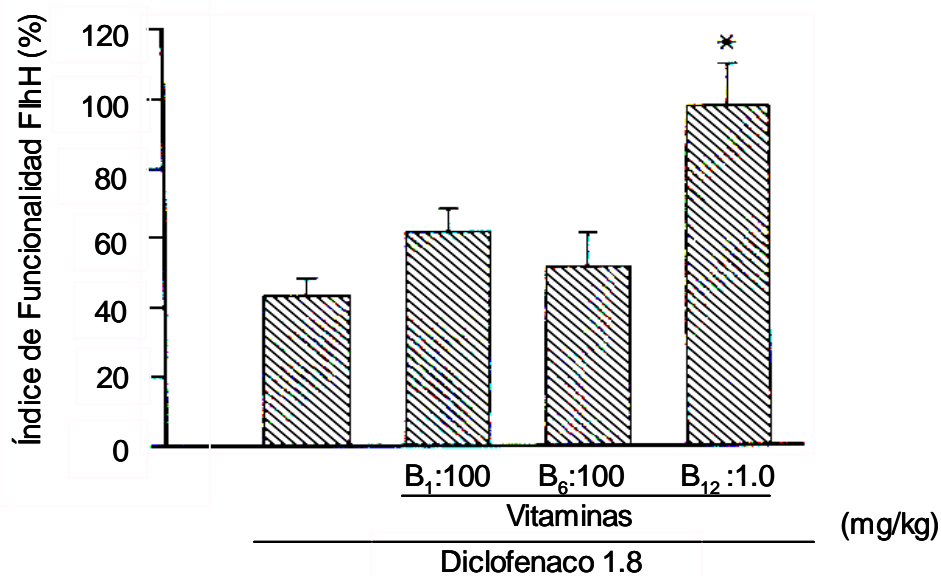


Figura 6.1.4. Efecto antinociceptivo oral de diclofenaco sódico (1.8 mg/kg) solo y combinado con dosis individuales de vitamina B₁ (100 mg), B₆ (100 mg) o B₁₂ (1 mg) en el modelo PIFIR. La antinocicepción se expresa como la recuperación del índice de funcionalidad a las 2 horas (FI-2h). Las barras indican la media de 8 animales ± E.E.M. * Diferencias significativas respecto al diclofenaco (p < 0.05)

6.2. Hiperlagesia térmica

La aplicación de carragenina en la pata de la rata produjo una disminución del tiempo de latencia de respuesta al estímulo térmico nociceptivo, en relación con la observada tras la aplicación de solución salina. El efecto hiperalgésico inducido por la carragenina se prolongó por espacio de aproximadamente 4 horas, y produjo la disminución del valor del área bajo la curva en aproximadamente la mitad con respecto al control (Figura 6.2.1).

La administración oral de diclofenaco produjo un claro efecto antihiperalgésico, dependiente de la dosis administrada, el cual fue evidente desde la dosis de 1.8 mg/kg hasta la máxima evaluada de 5.6 mg/kg (Figura 6.2.2).

En este modelo, la administración oral de vitaminas B produjo un discreto efecto antihiperalgésico, estadísticamente significativo solo a la dosis de 177 mg/kg (Figura 6.2.3). La coadministración oral de vitaminas B, en el intervalo de dosis de 18 a 56 mg/kg, produjo un notable incremento en la respuesta antihiperalgésica al diclofenaco a la dosis submáxima de 1.8 mg/kg. Sin embargo, este efecto no resultó dependiente de la dosis de vitaminas administrada (Figura 6.2.4).

De los resultados presentados, se desprenden las consideraciones siguientes:

- 1.- El diclofenaco sódico oral previene notablemente, y de manera dependiente de la dosis la hiperlagesia térmica inducida por la carragenina.

2.- La administración oral de vitaminas B previene solo de manera discreta, y a dosis altas, la hiperalgesia inducida por la carragenina.

3.- Las vitaminas B aumentan notablemente el efecto antihiperalgésico térmico del diclofenaco sódico.

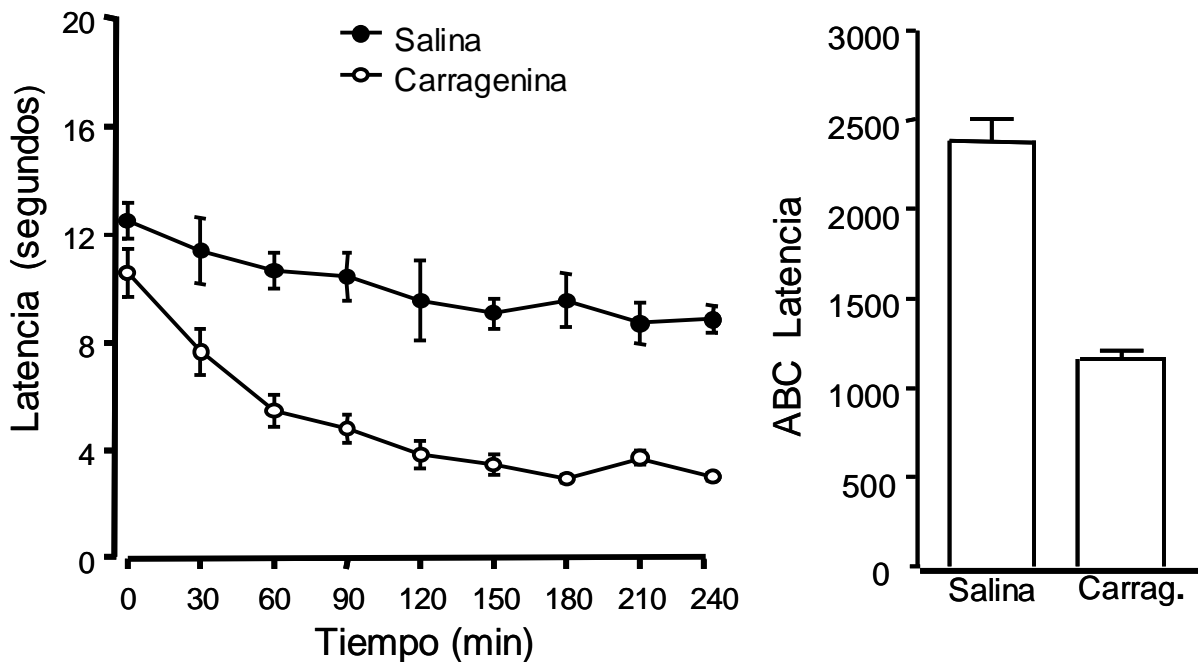


Figura 6.2.1. Curso temporal de la latencia y área bajo la curva (ABC), tras la aplicación intraplantar de solución salina y carragenina (carrag.). El Efecto hiperalgésico de la carragenina se observa como la disminución del tiempo de latencia, y del área bajo la curva correspondiente, a la aplicación de un estímulo térmico nociceptivo (n=6).

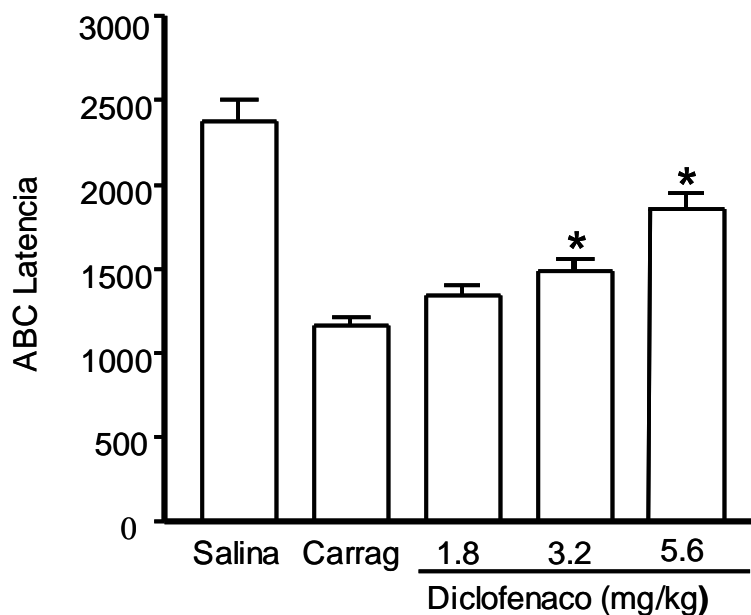


Figura 6.2.2. Efecto antihiperalgésico oral de diclofenaco sódico, en el modelo de hiperalgnesia inducida por carragenina (carrag.). Los datos se expresan como el área bajo la curva latencia contra tiempo. Las barras representan la media \pm E.E.M de 6 animales. * Diferencias significativas respecto al grupo de carragenina ($p < 0.05$).

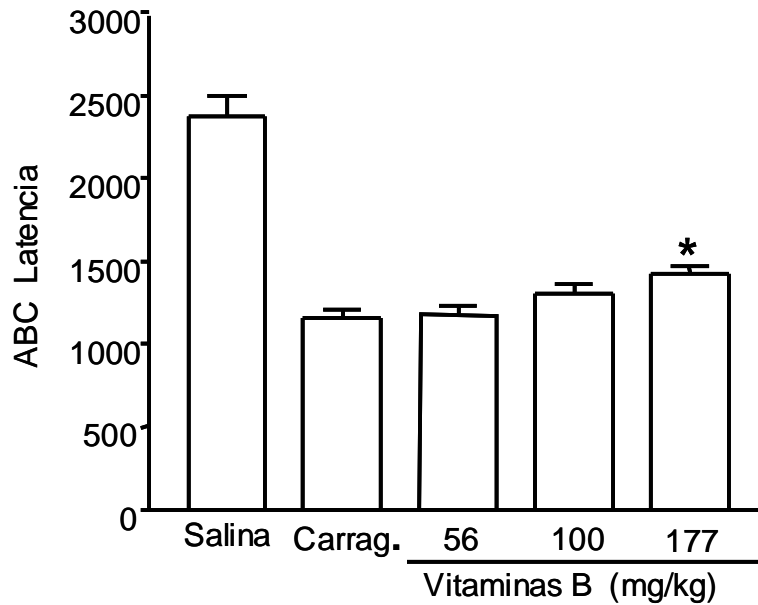


Figura 6.2.3. Efecto antihiperálgico oral de la asociación de vitaminas B₁, B₆ y B₁₂, en proporción 100:100:1 (p.ej., la dosis de 177 mg indica 177 mg de B₁, 177 mg de B₆ y 1.7 mg de B₁₂), en modelo de hiperálgia inducida por carragenina (carrag.). Los datos se expresan como el área bajo la curva latencia contra tiempo. Las barras representan la media ± E.E.M de 6 animales. * Diferencias significativas respecto al grupo de carragenina (p<0.05)..

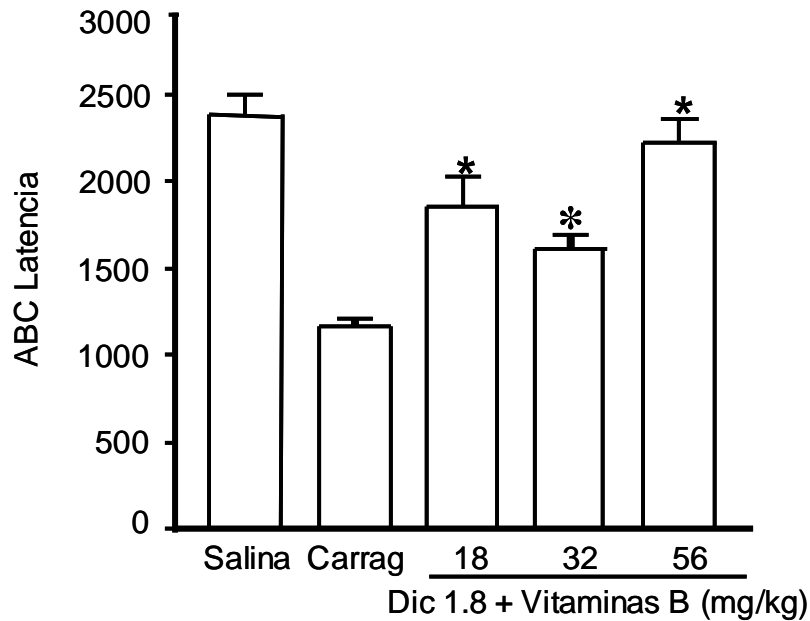


Figura 6.2.4. Efecto antihiperálgico de la administración oral de diclofenaco (Dic. 1.8 mg/kg) más dosis crecientes de la asociación de vitaminas B₁, B₆ y B₁₂, en proporción 100:100:1 (p.ej., la dosis de 56 mg indica 58 mg de B₁, 56 mg de B₆ y 0.56 mg de B₁₂), en el modelo de hiperálgia inducida por carragenina. Los datos se expresan como el área bajo la curva latencia contra tiempo. Las barras representan la media ± E.E.M de 6 animales. * Diferencias significativas respecto al grupo de carragenina (p<0.05)..

6.3. Formalina

La aplicación de la formalina produjo un perfil típico de sacudidas de la extremidad inyectada. Durante la fase 1, el número de sacudidas fue relativamente alto y después disminuyó gradualmente alrededor de los 10 minutos. En la segunda fase las sacudidas comenzaron a incrementarse alrededor de los 15 minutos y se prolongaron por espacio de una hora (Figura 6.3.1).

El pretratamiento periférico local con las vitaminas B₁ (10-300 µg/pata), B₆ (10-300 µg/pata) o B₁₂ (0.1-3.0 mg/pata), individuales o asociadas (32-177 µg/pata), no produjo respuesta antinociceptiva significativa en ninguna de las dos fases del modelo (Figuras 6.3.2, 6.3.3, 6.3.4 y 6.3.5). Sin embargo, la administración oral de las vitaminas B (32- 178 mg/kg) redujo, de manera dependiente de la dosis, la conducta nociceptiva inducida por la formalina al 1% durante la fase 2 (Figura 6.3.6). De la misma manera, la administración oral individual de las vitaminas B₁ (100 mg/kg), B₆ (100 mg/kg) o B₁₂ (1.0 mg/kg) produjo en todos los casos disminución significativa de la conducta nociceptiva de la fase 2 del modelo. (Figura 6.3.7).

La administración oral del diclofenaco sódico (1.0–10 mg/kg) produjo una reducción, dependiente de la dosis, del número de sacudidas observadas en el modelo durante la misma fase (Figura 6.3.8.). Al igual que en los modelos anteriores, la coadministración de una dosis submáxima de diclofenaco (1.8 mg/kg) más dosis crecientes de las vitaminas B (18 – 56 mg/kg) produjeron una reducción notable de la conducta nociceptiva inducida por la formalina en la fase 2 (Figura 6.3.9.)

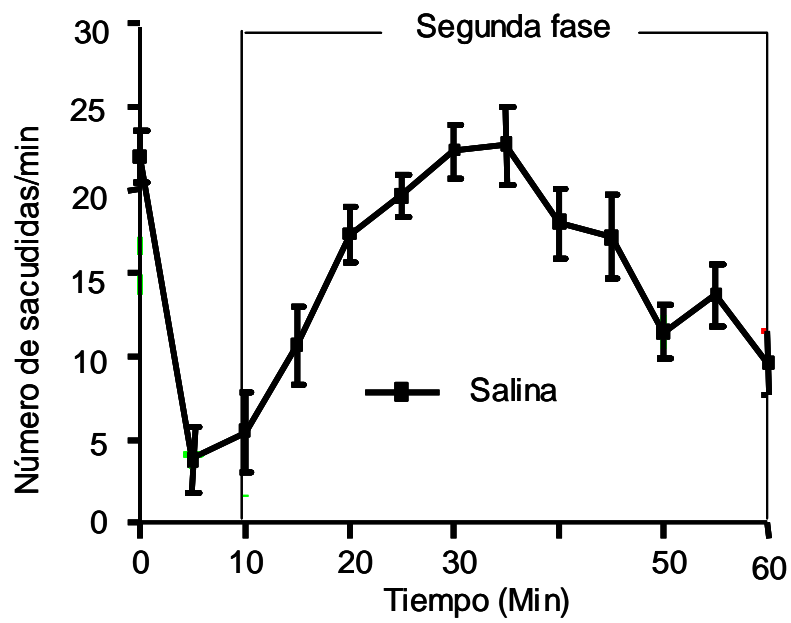


Figura 6.3.1.. Curso temporal de la frecuencia de sacudidas patelares tras la aplicación intraplantar de formalina como estímulo nociceptivo.(n=6).

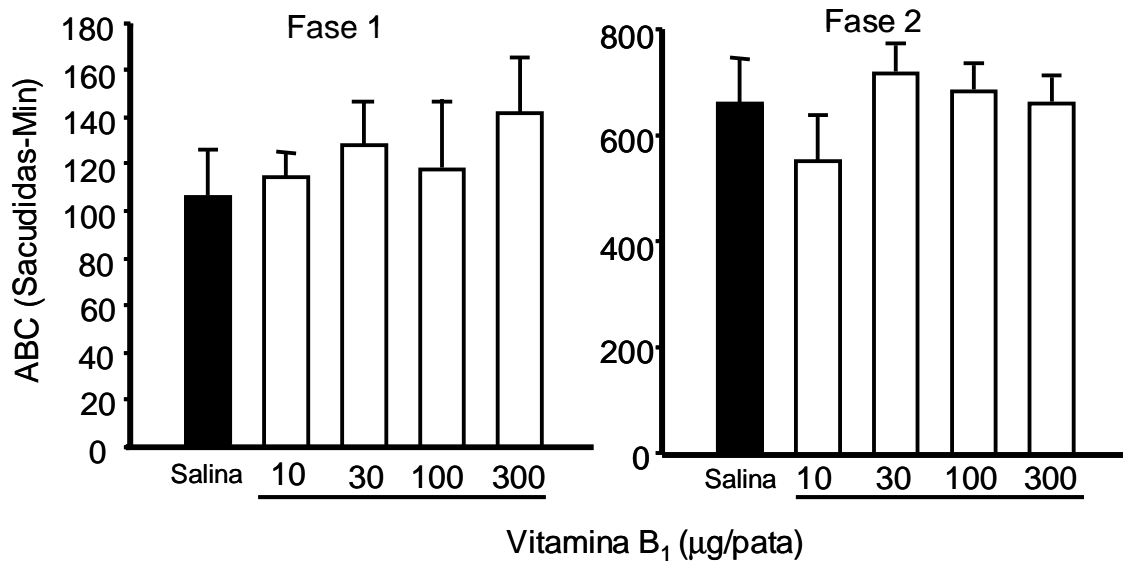


Figura 6.3.2.. Efecto antinociceptivo local de la vitamina B₁ (10 – 300 µg/pata) durante las fases 1 y 2 del modelo de la formalina. Las barras indican la media ± E.E.M. de 6 ratas.

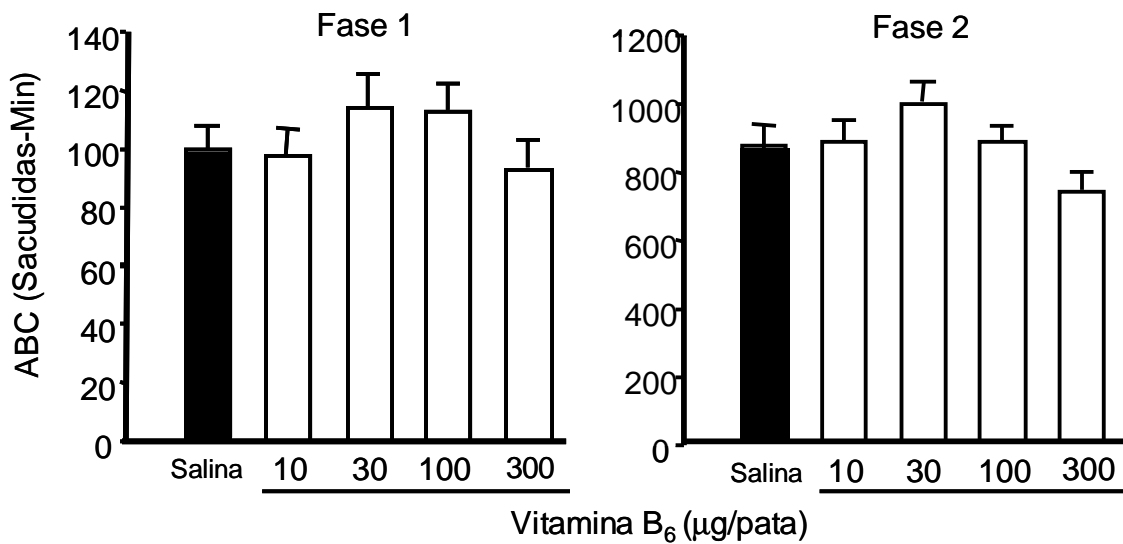


Figura 6.3.3.. Efecto antinociceptivo local de la vitamina B₆ (10 – 300 µg/pata) durante las fases 1 y 2 del modelo de la formalina. Las barras indican la media ± E.E.M. de 6 ratas.

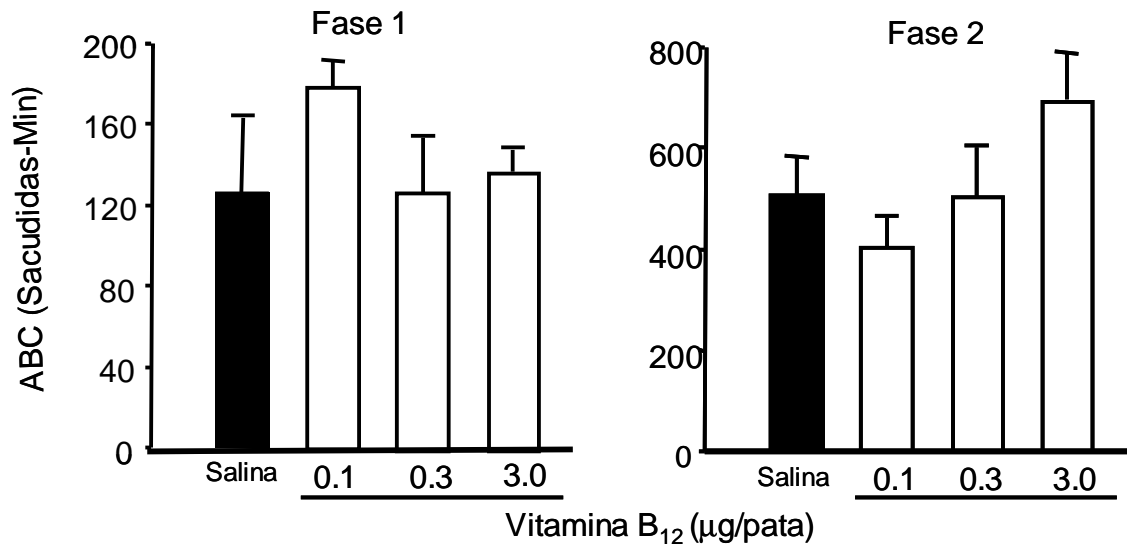


Figura 6.3.4.. Efecto antinociceptivo local de la vitamina B₁₂ (1 – 3 µg/pata) durante las fases 1 y 2 del modelo de la formalina. Las barras indican la media ± E.E.M. de 6 ratas.

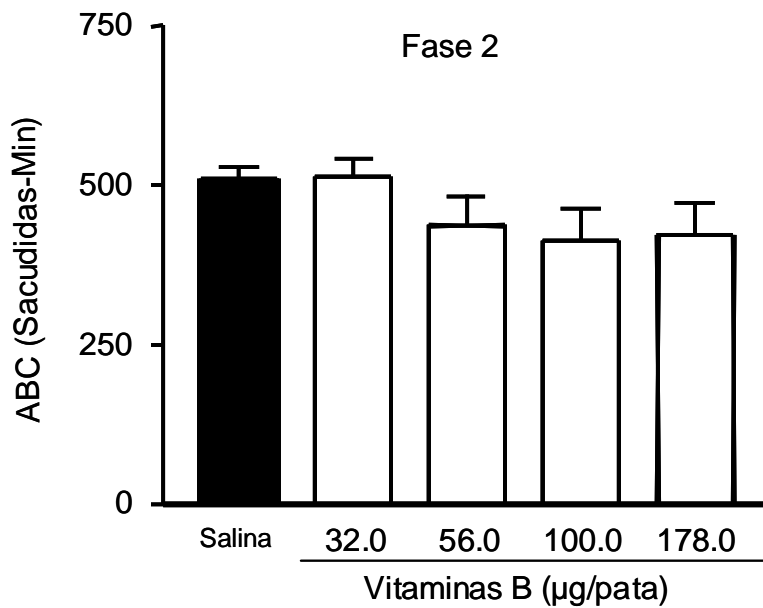


Figura 6.3.5.. Efecto antinociceptivo local de la asociación de las vitamina B₁, B₆ y B₁₂ en proporción 100:100:1 (p.ej., la dosis de 178 µg indica 178 µg de B₁, 178 µg de B₆ y 1.78 µg de B₁₂), (32 – 178µg/pata) durante las fases 1 y 2 del modelo de la formalina. Las barras indican la media ± E.E.M. de 6 ratas.

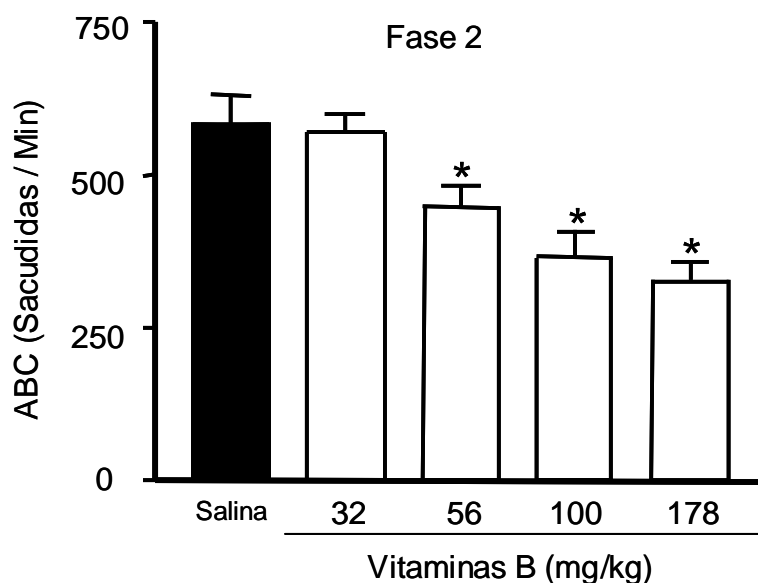


Figura 6.3.6. Efecto antinociceptivo oral de la asociación de las vitamina B₁, B₆ y B₁₂ en proporción 100:100:1 (p.ej., la dosis de 178 mg indica 178 mg de B₁, 178 mg de B₆ y 1.78 mg de B₁₂), durante las fase 2 del modelo de la formalina. Las barras indican la media \pm E.E.M. de 6 ratas. * Diferencias significativas respecto al grupo control ($p < 0.05$)

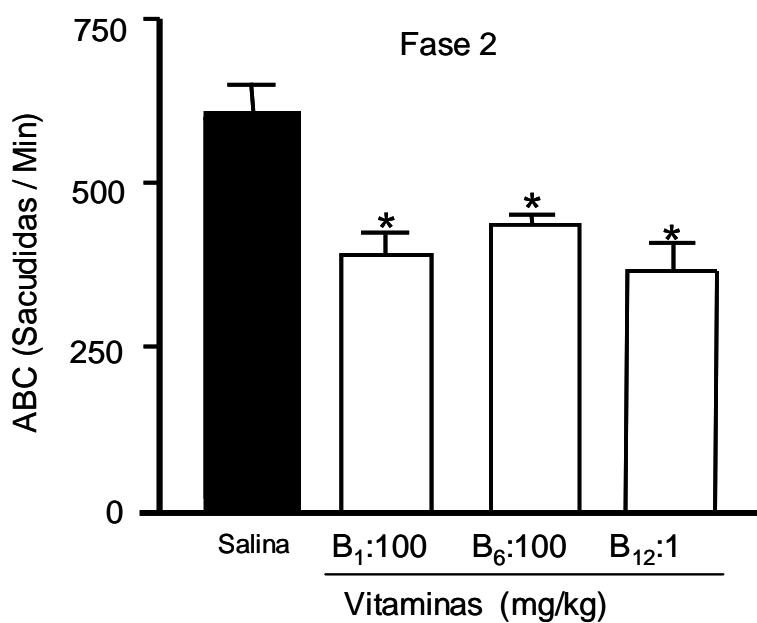


Figura 6.3.7. Efecto antinociceptivo oral individual de las vitaminas B₁(100 mg/kg) B₆ (100 mg/kg) y B₁₂ (1.0 mg/kg) durante la fase 2 del modelo de la formalina. Las barras indican la media \pm E.E.M. de 6 ratas. * Diferencias significativas respecto al grupo control ($p < 0.05$)

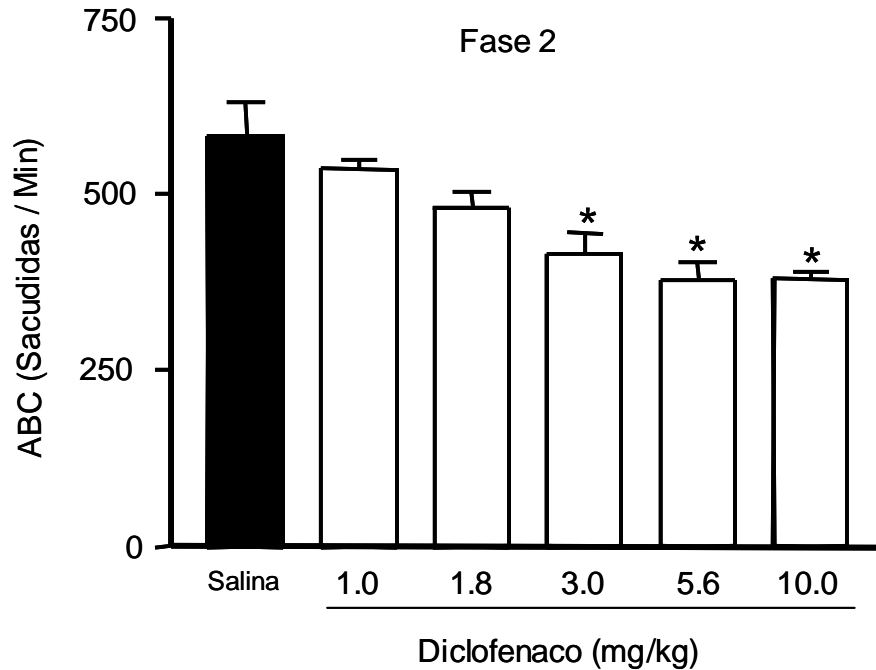


Figura 6.3.8. Efecto antinociceptivo oral del diclofenaco sódico (1.8 mg/kg) en la fase 2 del modelo de la formalina. Las barras indican la media \pm E.E.M. de 6 ratas. * Diferencias significativas respecto al grupo control ($p < 0.05$)

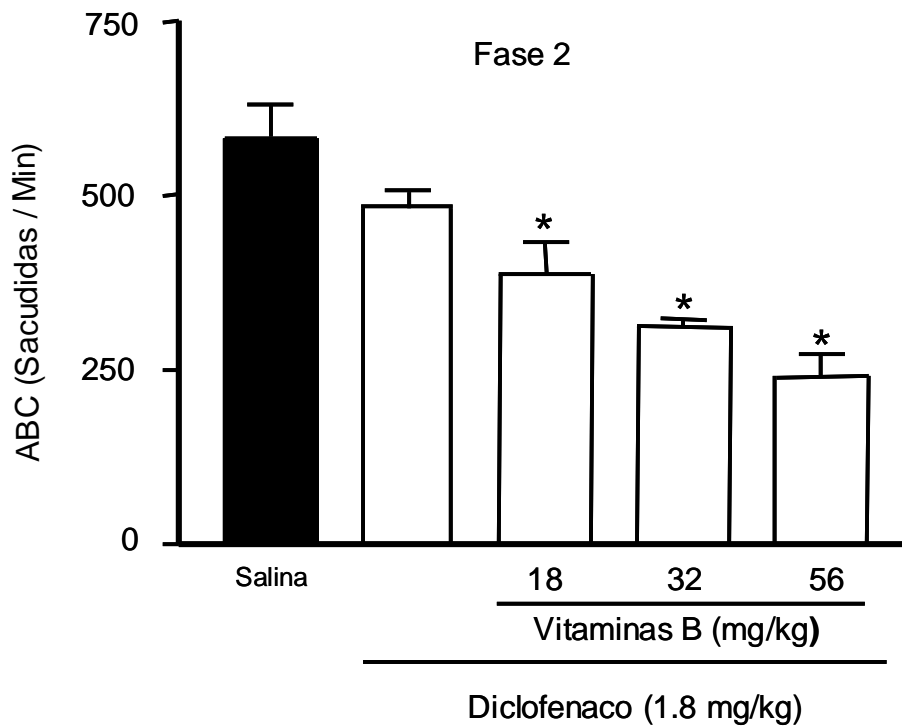


Figura 6.3.9. Efecto antinociceptivo oral del diclofenaco (1.8 mg/kg) mas dosis crecientes de la asociación de vitaminas B_6 y B_{12} , en proporción 100:100:1 (p.ej., la dosis de 56 mg indica 58 mg de B_6 , 56 mg de B_6 y 0.56 mg de B_{12}), en la fase 2 del modelo de la formalina. Las barras indican la media \pm E.E.M. de 6 ratas. * Diferencias significativas respecto al grupo control ($p < 0.05$).

Mecanismo de acción de las vitaminas B

Debido a que la asociación de las vitaminas B produjo antinocicepción dependiente de la dosis en el modelo de la formalina, este modelo resultó el idóneo para explorar el posible mecanismo de acción de los fármacos.

La administración subcutánea del antagonista de los receptores opioides naloxona (2 mg/kg) no produjo ninguna acción por si mismo, pero revirtió el efecto antinociceptivo de 100 mg/kg de las vitaminas B administradas por la vía oral (Figura 6.3.10). Efectos similares se observaron con la administración subcutánea de L-NAME (3.0 mg/kg) pero no de D-NAME (3 mg/kg), observándose una reversión prácticamente completa del efecto antinociceptivo inducido por la administración oral de 100 mg/kg de vitaminas B (Figura 6.3.11). La administración subcutánea del bloqueador de los canales de potasio sensibles a ATP glibenclamida (8 mg/kg) también revirtió significativamente el efecto antinociceptivo oral de las vitaminas B (100 mg/kg) (Figura 6.3.12). En contraste, la administración subcutánea del antagonista de los receptores serotoninérgicos metiotepina (0.1 mg/kg) resultó incapaz de bloquear la antinocicepción inducida por la administración oral de la misma dosis de vitaminas B (Figura 6.3.13).

De los resultados presentados, se desprenden las consideraciones siguientes:

1.- A las dosis utilizadas, las vitaminas del complejo B administradas de manera individual o combinada, no poseen efecto antinociceptivo local.

2.- Aunque ni las vitaminas B ni el diclofenaco poseen actividad antinociceptiva notable en la fase 1 del modelo de la formalina, la coadministración oral de estos fármacos, produce un efecto notable.

3.- El diclofenaco oral produce un efecto antinociceptivo dependiente de la dosis, en el modelo de la formalina.

4.- La administración oral de la mezcla de vitaminas B₁, B₆ y B₁₂ p.o. produce efecto antinociceptivo, dependiente de la dosis, en el modelo de la formalina. La administración oral individual de ellas, produce también efectos antinociceptivos significativos.

5.- Las vitaminas aumentan notablemente la respuesta analgésica al diclofenaco.

6.- A juzgar por los efectos de la naloxona, la glibenclamida y el L-NAME sobre la respuesta antinociceptiva a las vitaminas B, parecen estar involucrados en este efecto la activación de los receptores opioides, los canales de potasio sensibles a ATP y la producción de óxido nítrico.

7.- En el efecto analgésico de las vitaminas B no parecen estar involucrados los receptores 5-HT₁, 5-HT₂ y 5-HT₅, 5-HT₆ Y 5-HT₇.

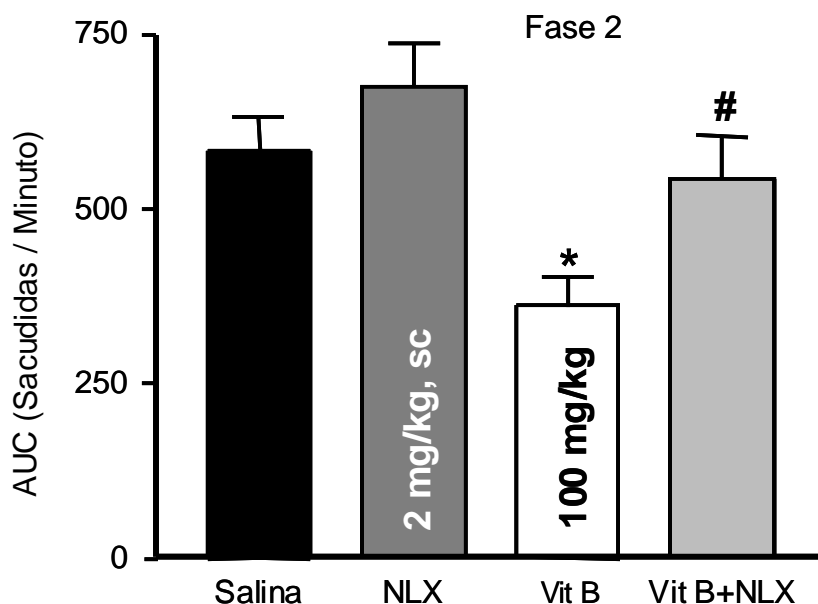


Figura 6.3.10. Efecto del pretratamiento subcutáneo (-10 min) con naloxona (NLX: 2 mg/kg) sobre la antinocicepción producida por la administración oral de la asociación de vitaminas B₁ (100 mg/kg), B₆ (100 mg/kg) y B₁₂ 1.0 mg/kg (Vit B: 100 mg/kg), durante la fase 2 del modelo de formalina en la rata. Las barras indican la media \pm E.E.M. de 6 ratas. * Diferencias significativas respecto al grupo control (salina). # Significativamente diferente respecto al grupo tratado con vitaminas B ($p < 0.05$).

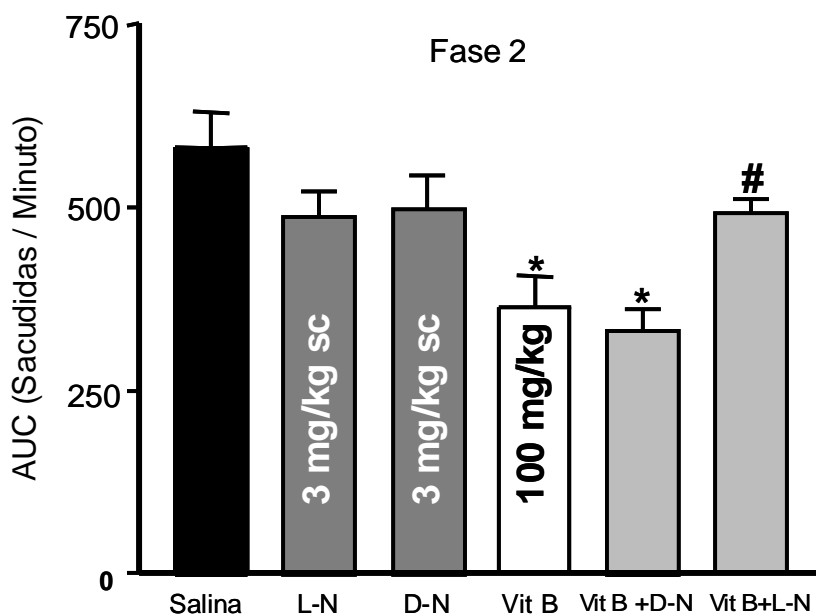


Figura (6.3.11. Efecto del pretratamiento subcutáneo (-10 min) con L-name (L-N : 3 mg/kg) y D-name (D-N : 3 mg/kg) sobre la antinocicepción producida por la administración oral de la asociación de vitaminas B₁ (100 mg/kg), B₆ (100 mg/kg) y B₁₂ 1.0 mg/kg (Vit B: 100 mg/kg), durante la fase 2 del modelo de formalina en la rata. Las barras indican la media \pm E.E.M. de 6 ratas. * Diferencias significativas respecto al grupo control (salina). # Significativamente diferente respecto al grupo tratado con vitaminas B ($p < 0.05$).

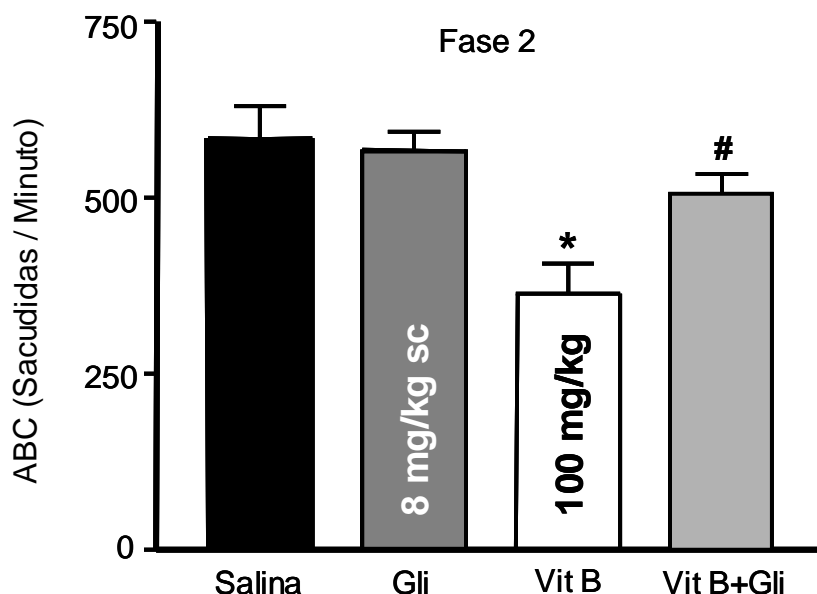


Figura 6.3.12. Efecto del pretratamiento subcutáneo (-10 min) con glibenclamida (Gli: 8 mg/kg) sobre la antinocicepción producida por la administración oral de la asociación de vitaminas B₁ (100 mg/kg), B₆ (100 mg/kg) y B₁₂ 1.0 mg/kg (Vit B: 100 mg/kg), durante la fase 2 del modelo de formalina en la rata. Las barras indican la media ± E.E.M. de 6 ratas. * Diferencias significativas respecto al grupo control(salina). # Significativamente diferente respecto al grupo tratado con vitaminas B (p< 0.05).

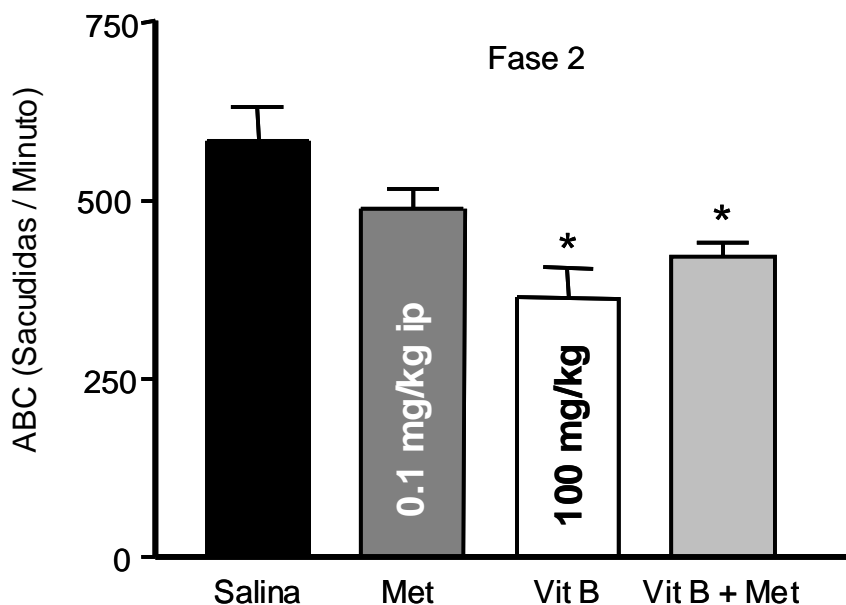


Figura 6.3.13. Efecto del pretratamiento subcutáneo (-10 min) con metioprepina (Met: 0.1 mg/kg) sobre la antinocicepción producida por la administración oral de la asociación de vitaminas B₁ (100 mg/kg), B₆ (100 mg/kg) y B₁₂ 1.0 mg/kg (Vit B: 100 mg/kg), durante la fase 2 del modelo de formalina en la rata. Las barras indican la media ± E.E.M. de 6 ratas. * Diferencias significativas respecto al grupo control(salina). # Significativamente diferente respecto al grupo tratado con vitaminas B (p< 0.05).

7. DISCUSIÓN

7.1. *Disfunción inducida por dolor en la rata*

El diclofenaco sódico produjo antinocicepción en el modelo de disfunción inducida por ácido úrico, con una dosis efectiva 40 (DE₄₀) de 1.8 mg/kg. Estos resultados son consistentes con los reportados previamente en éste (Torres López et al., 1994; 1997) y otros modelos de dolor (Attal et al., 1973; Menassé et al., 1978; Tonussi y Ferreira, 1994). Por otra parte, la mezcla de vitaminas B no produjo antinocicepción en este modelo, no obstante las altas dosis evaluadas (300 mg/kg). Estos resultados concuerdan con los reportados por Eschalié et al. (1983) y Misumi et al. (1985), quienes observaron la ausencia de actividad antinociceptiva de la mezcla de vitaminas B en diversos modelos de dolor en ratas y ratones. Sin embargo, otros investigadores han reportado que la mezcla de vitaminas es efectiva en toda una variedad de modelos experimentales térmicos, químicos e inflamatorios de dolor (Dimpfel et al., 1990; Fu et al., 1988; Jurna et al., 1990; Wild y Bartoszyk, 1988).

Jurna et al. (1990) propusieron que la controversia sobre las discrepancias en la eficacia analgésica observada con las vitaminas del complejo B se debe a la diferencia de los estímulos nociceptivos propios de cada modelo. Debe hacerse notar la consideración que la inyección intraarticular de ácido úrico produce un dolor de moderado a severo (López-Muñoz et al., 1993), y posiblemente por ello no resulta un modelo idóneo para evaluar la actividad antinociceptiva de las vitaminas B, que por otro lado pudieran pudieran generar solo un efecto antinociceptivo discreto.

Aunque el efecto sinérgico de la combinación de AINEs y vitaminas B ha sido también controversial (Bartoszyk, 1990), nuestros datos muestran que la mezcla de vitaminas B₁, B₆ y B₁₂ aumenta significativamente el efecto antinociceptivo del diclofenaco de manera dependiente de la dosis. Estos resultados confirman observaciones previas sobre la capacidad de las vitaminas B para incrementar la analgesia inducida por el diclofenaco en animales (Bartoszyk y Wild, 1989) y en humanos (Bruggemann et al., 1990; Kuhlwein et al., 1990; Vetter et al., 1988). Sin embargo, otros autores han observado que las preparaciones de vitaminas B no aumentan significativamente el efecto analgésico del diclofenaco (Bromm et al., 1995). Asimismo, debe hacerse notar que no hay una estandarización sobre la composición de las preparaciones de vitaminas B utilizadas como adyuvantes analgésicos. Por lo tanto, la composición, así como las dosis y proporciones de los diferentes elementos de la mezcla varían entre los diferentes estudios publicados. De esta manera, se decidió estudiar el sinergismo potencial del efecto antinociceptivo del diclofenaco por los componentes individuales de la mezcla de vitaminas B utilizada en este estudio. Nuestros resultados mostraron que la coadministración de vitamina B₁ o B₆ con diclofenaco no aumenta significativamente el efecto antinociceptivo de este AINE, a las dosis que fueron efectivas cuando se administraron como la mezcla de vitaminas B₁, B₆ y B₁₂. Por el contrario, la coadministración de vitamina B₁₂ y diclofenaco produjo un efecto antinociceptivo mayor que el correspondiente al diclofenaco solo. Estos resultados sugieren que la vitamina B₁₂ (cianocobalamina) es el ingrediente activo en la mezcla de vitaminas B, en el modelo PIFIR. Es por lo tanto altamente probable

que las discrepancias en los resultados reportados sobre la función de las vitaminas B como adyuvantes analgésicos del diclofenaco sea debida al uso de diferentes dosis y proporciones de los ingredientes individuales en las mezclas empleadas.

El mecanismo de acción por el cual las vitaminas B, y particularmente la vitamina B₁₂, producen un aumento del efecto analgésico de los AINEs no está aún bien establecido. Se ha mostrado que las vitaminas B producen inhibición de la actividad nociceptiva del asta dorsal de la médula espinal (Fu et al., 1988). Asimismo, se ha postulado que la participación sobre una vía inhibitoria serotoninérgica (Dimpfel et al., 1990) pudiera estar implicado en tal efecto. Sin embargo, la información disponible no es concluyente.

7.2. Hiperalgnesia térmica

Se sabe que la administración sistémica de diclofenaco produce antinocicepción en diversos modelos de dolor (Takashima et al., 1972; Menassé et al., 1978; Noguchi et al., 1984; López Muñoz et al., 1996; Torres López et al., 1997), y también muestra actividad analgésica útil en la terapéutica del dolor en humanos (Todd y Sorkin, 1988). En el presente estudio observamos que la administración oral de diclofenaco produjo efecto antinociceptivo, dependiente de la dosis administrada, en el modelo de dolor de hiperalgnesia térmica. Estos resultados muestran claramente la eficacia analgésica del diclofenaco tras su administración oral. Además los resultados concuerdan con observaciones previas acerca del hecho que los AINEs son capaces de reducir la hiperalgnesia térmica. Aunque la

administración de la mezcla de vitaminas B resultó esencialmente inactiva en la prueba de hiperalgesia térmica, aumentó notable y significativamente el efecto antihiperalgésico del diclofenaco. Estos resultados concuerdan con observaciones previas (Eschalier et al., 1983; modelo de disfunción inducido por dolor; esta tesis) acerca de la ausencia de actividad antinociceptiva de las vitaminas B, así como con evidencia previa sobre la capacidad de las vitaminas B para aumentar la eficacia del diclofenaco (Bartoszyk y Wild, 1989). Estos resultados apoyan también la posibilidad de alcanzar una mayor eficacia analgésica mediante la mezcla de fármacos en sistemas nociceptivos no afectados originalmente por los agentes individuales. De hecho, resulta notable que se requirieron dosis menores de vitaminas B (18-56 mg/kg) para aumentar significativamente el efecto antihiperalgésico del diclofenaco, con relación a otras reportadas previamente (100-250 mg/kg) (Bartoszyk y Wild, 1989; esta tesis).

La potencial mayor eficacia de la combinación podría obedecer a las diferencias intrínsecas de los modelos utilizados o al concurso de los, probablemente, diferentes mecanismos de acción del diclofenaco y las vitaminas B. Se sabe además que el diclofenaco puede bloquear directamente la sensibilización inflamatoria producida por carragenina por un mecanismo diferente a la inhibición de la síntesis de de prostaglandinas (Tonussi y Ferreira, 1994). Se ha sugerido que esta propiedad podría ser debida a la activación de la vía óxido nítrico – GMP cíclico – Canal de Potasio (López Muñoz et al., 1996; Ortiz et al., 2002).

7.3. Formalina

Los resultados indican que las vitaminas B, ya sea solas o combinadas, son capaces de modular la conducta nociceptiva inducida por la aplicación de la formalina al 1% cuando se administran por la vía oral, pero no cuando se aplican localmente. La administración oral de las vitaminas B redujo la conducta nociceptiva durante la fase 2 de la prueba de la formalina de manera dependiente de la dosis. La ausencia de efecto local, y la actividad antinociceptiva oral mostrada por las vitaminas B, indica que el mecanismo de acción subyacente no correspondería con la interacción de mediadores inflamatorios a nivel local, sino a un efecto central medular o supramedular. Nuestros resultados coinciden con observaciones previas acerca de la actividad antinociceptiva de las vitaminas B administradas aguda o crónicamente (Bartoszyk y Wild, 1989; Wild y Bartoszyk, 1988; França et al., 2001; Hanck y Weiser, 1985; Fu et al., 1988; Jurna et al., 1990; Leuschner, 1992). Sin embargo, otros investigadores (Eschalier et al., 1983; Misumi et al., 1985) han reportado que las vitaminas B carecen de actividad antinociceptiva en varios modelos de dolor.

En un estudio previo realizado en el modelo de la formalina en el ratón, la administración aguda (-60 min) de vitaminas del complejo B no produjo antinocicepción (França et al., 2001). En contraste, en este estudio la administración oral aguda (-10 min) de las vitaminas B produjo antinocicepción (aproximadamente 50%) en el modelo de la formalina en la rata. Las diferencias podrían ser debidas a las diferentes especies utilizadas en los estudios. En otros reportes, la vitamina B₁ produjo antinocicepción y aumentó el efecto

antinociceptivo del diclofenaco en la artritis por adyuvante (Stanislavchuk et al., 1988). Adicionalmente, la vitamina B₁₂ fue efectiva en el modelo de edema inducido por carragenina (Hank y Weisser, 1985) mientras la vitamina B₆ redujo la actividad nociceptiva de las neurona talámicas (Sharma et al., 1990). Nuestros resultados con la administración oral individual de las vitaminas concuerdan con lo reportado en estos estudios, ya que las 3 vitaminas por separado fueron capaces de producir analgesia. Los datos difieren de lo observado en el modelo de disfunción inducida por ácido úrico, ya que la vitamina B₁₂ fue la única que produjo un aumento significativo del efecto analgésico del diclofenaco. Una posible explicación a este hecho puede atribuirse a las diferencias propias de los modelos utilizados.

Sorprendentemente, el antagonista de los receptores opioides naloxona (2 mg/kg, s.c.) bloqueó el efecto antinociceptivo de las vitaminas B en el modelo de la formalina al 1% en la rata. Por el contrario, França et al. (2001) reportaron que la naloxona (10 mg/kg, i.p.) es incapaz de bloquear el efecto antinociceptivo de la mezcla de tiamina, piridoxina y cianocobalamina en el modelo de contorsiones inducidas por ácido acético en el ratón. Nuevamente, las diferencias observadas pueden deberse a las distintas especies y al estímulo utilizados en cada estudio. Nuestros datos sugieren que las vitaminas B podrían producir antinocicepción ya sea mediante la liberación de opioides endógenos o por la activación de receptores opioides. Dado que no existe evidencia que las vitaminas B se unan a receptores opioides, el efecto de la naloxona sobre la actividad antinociceptiva de las vitaminas B justifica la realización de futuros estudios.

El efecto antinociceptivo de las vitaminas B se revirtió parcialmente por el inhibidor de la síntesis de óxido nítrico L- NAME, pero no por el isómero inactivo D-NAME, lo cual sugiere que las vitaminas B podrían producir antinocicepción mediante la estimulación de la liberación de óxido nítrico. Resulta tentador sugerir que la vía del óxido nítrico–GMP cíclico desempeña un papel en la actividad antinociceptiva de las vitaminas B, como en el caso de algunos agentes antiinflamatorios y la morfina (Islas-Cadena et al., 1999; Granados –Soto et al., 1995; 1997; Tonussi y Ferreira, 1994). La morfina y otros analgésicos producen analgesia periférica y espinal mediante la apertura de canales de K^+ (Ocaña et al., 1990; Rodríguez y Duarte, 2000; Ortiz et al., 2002). Además, se ha sugerido que los analgésicos opioides al activar los canales de K^+ permiten la liberación de norepinefrina espinal, la cual a su vez aumenta la liberación de acetilcolina (Eisenach, 1999). La acetilcolina produce antinocicepción espinal mediante la liberación de óxido nítrico y más acetilcolina y norepinefrina. En este estudio, la glibenclamida (un inhibidor de los canales de potasio sensibles a ATP (Edwards y Weston, 1993) bloqueó el efecto antinociceptivo de las vitaminas B, sugiriendo que los canales de potasio sensibles a ATP, participan en la antinocicepción inducida por las vitaminas B, lo cual es consistente con el mecanismo analgésico espinal propuesto por Eisenach (1999) para analgésicos opioides (ver antes).

La metiotepina, un antagonista de los receptores serotoninérgicos (Hoyer et al., 1994), no redujo el efecto antinociceptivo de las vitaminas B, sugiriendo que estos receptores no participan en la antinocicepción inducida por las vitaminas B. Este dato no concuerda con el mecanismo serotoninérgico propuesto por Hank y

Weiser (1985) y Sharma (1990) para explicar la actividad antinociceptiva de las vitaminas B. Adicionalmente, esta propuesta sugiere que el efecto de las vitaminas B se debe a una acción crónica, y los efectos antinociceptivos observados en los tres modelos estudiados son eminentemente agudos. Sin embargo, debe destacarse que aunque la metiotepina es un antagonista serotoninérgico no selectivo, no bloquea los receptores 5-HT_{2B}, 5-HT₃ y 5-HT₄, cuya participación en el mecanismo antinociceptivo de las vitaminas B no podemos descartar (Hoyer et al., 1994).

El presente trabajo pone en relieve que las vitaminas B₁, B₆ y B₁₂ poseen actividad antinociceptiva cuando son administradas sistémicamente en las dosis apropiadas. Sin embargo, su lugar en la terapéutica de diversas condiciones inflamatorias parece estar más encaminado a su utilización como adyuvante, administrado en combinación con AINEs. Indudablemente, se requiere la realización de estudios clínicos que confirmen la utilidad real para aliviar el dolor y apoyen su amplio uso terapéutico actual. Recientemente se ha reportado un estudio piloto en el que la infusión intravenosa de vitaminas B₁, B₆ y B₁₂ a las dosis de 100 mg:100 mg:5 mg, respectivamente, cada 12 horas, disminuyó la necesidad de aplicación de diclofenaco intravenoso, manteniendo niveles de analgesia similares en ambos grupos (Perez-Flores et al., Comunicación personal).

8. CONCLUSIONES

1.- Las vitaminas B mostraron efecto antinociceptivo en el modelo de la formalina, pero no en el de hiperalgesia térmica y en el de disfunción inducida por dolor.

2.- Las vitaminas B no muestran actividad antinociceptiva local en el modelo de la formalina. Este dato sugiere que en el mecanismo de acción antinociceptivo de las vitaminas B no se debe a la inhibición de los mediadores de la inflamación liberados localmente. Los datos sugieren un efecto espinal o supraspinal.

3.- Las vitaminas B₁, B₆ y B₁₂ aumentan de manera significativa la actividad antinociceptiva del diclofenaco en los 3 modelos de dolor inflamatorio estudiados. Este efecto se pudo observar con dosis submáximas de ambos fármacos, hecho que pudiera resultar de utilidad clínica y que además valida las observaciones preclínicas y clínicas en ese sentido.

5.- Los datos sugieren que las vitaminas B producen su efecto analgésico mediante la activación de los receptores opioides, la liberación de óxido nítrico y la apertura de canales de potasio.

6.- Los datos sugieren que el efecto de las vitaminas B no se debe a la activación de los receptores serotoninérgicos 5-HT₁, 5-HT₂, 5-HT₅, 5-HT₆ y 5-HT₇. Con los

datos obserados no se puede descartar la participación de los receptores 5-HT₃ y 5-HT₄.

9. REFERENCIAS

- Abbadie C, Trafton J, Mantyh PW, Basbaum AI: Inflammation increases the distribution of dorsal horn neurons that internalize the neurokinin-1 receptor in response to noxious and non-noxious stimulation. *J Neurosci* 17: 8049-8060, 1997.
- Abbas ZG, Swai AB: Evaluation of the efficacy of thiamine and pyridoxine in the treatment of symptomatic diabetic peripheral neuropathy. *East Afr Med J*, 74: 12803-12808, 1997.
- Abbot FV, Hong Y, Blier P: Persisting sensitization of the behavioral response to formalin-induced injury in the rat through activation of serotonin -2A receptors. *Neuroscience* 77: 575-584, 1997.
- Abdel-Halim MS, Sjoqvist B, Anggard E: Inhibition of prostaglandin synthesis in rat brain. *Acta Pharmacol Toxicol* 43: 266-272, 1978.
- Aguirre-Bañuelos P, Granados-Soto V: Evidence for the participation of the nitric oxide-cyclic GMP pathway in the antinociceptive action of meloxicam in the formalin test. *Eur J Pharmacol* 395: 9-13, 2000.
- Aicher SA, Sharma S, Cheng PY, Pickel VM: The *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor is postsynaptic to substance P-containing axon terminals in the rat superficial dorsal horn. *Brain Res* 772: 71-81, 1997.
- Aley KO, Levine JD: Multiple receptors involved in peripheral α_2 , μ y A_1 antinociception, tolerance and withdrawal. *J Neurosci* 17: 735-744, 1997.

- Aloe L, Moroni R, Angelucci F y Fiore M. Role of TNF-alpha but not NGF in murine hyperalgesia induced by parasitic infection. *Psychopharmacology* 134 287-292, 1997.
- Alvarez B, Alonso JL, Alegre J: The pathophysiology of fibromyalgia syndrome at the threshold of understanding. *Med Clin (Barc)*, 112: 621-630, 1999.
- Amann R, Schuligoi R, Lanz I, Peskar BA: Effect of a 5-lipoxygenase inhibitor on nerve growth factor-induced thermal hyperalgesia in the rat. *Eur J Pharmacol* 306: 89-91, 1996.
- Anbar M, Grat BM. The role of nitric oxide in the physiopathology of pain. *J Pain Syntom Manage* 14:225-254, 1997.
- Attal N, Kayser V, Eschalier A, Benoist J, Guilbaud G: Behavioural and electrophysiological evidence for an analgesic effect of a non-steroidal anti-inflammatory agent sodium diclofenac. *Pain* 35: 341-348, 1973.
- Baik HW, Russell RM: Vitamin B12 deficiency in the elderly. *Ann Rev Nutrit* 19: 357-377, 1999.
- Bannwarth B, Lopicque F, Pehourcq F, Gillet P, Schaefferbeke T, Laborde C, Dehais J, Gaucher A, Netter P: Stereoselective disposition of ibuprofen enantiomers in human cerebrospinal fluid. *Br J Clin Pharmacol* 40: 266-269, 1995.
- Bartoszyk GD, Wild A: B-vitamins potentiate the antinociceptive effect of diclofenac in carrageenin-induced hyperalgesia in the rat tail pressure test. *Neurosci Lett* 101: 95-100, 1989.

- Bender DA: Optimum nutrition: thiamin, biotin, and pantothenate. Proc Nutr Soc 58: 427-433, 1999.
- Berkley KJ: On the dorsal columns: translating basic research hypotheses to the clinic. Pain 70: 103-107, 1997.
- Bernstein, A.L., 1990. Vitamin B6 in clinical neurology. Ann NY Acad Sci 585, 250-260.
- Berradia N, Marchand-Arvier M, Humbert J, Vigneron C: Effects of indomethacin and diclofenac on some functions of polymorphonuclear neutrophils. J Pharm Pharmacol 40: 806-808, 1988.
- Besson JM, Guilbaud G, Ollat H: *Forebrain areas involved in pain processing*. John Libbey, Eurotext, Paris, p. 283, 1995.
- Bester H, Matsumoto N, Besson JM, Bernard JF: Further evidence for the involvement of the spinoparabrachial pathway in nociceptive processes: a c-fos study in the rat. J Comp Neurol 383: 439-458, 1997.
- Bevan SJ, Geppetti P: Protons: small stimulants of capsaicin-sensitive sensory nerves. Trends Neurosci 17: 509-512, 1994.
- Bevan SJ, Yeats J: Protons activate a cation conductance in a sub-population of rat dorsal root ganglion neurons. J Physiol 433: 145-161, 1991.
- Bileviciute I, Theodorsson E, Lundeberg T: Effects of histamine on neuropeptide release into the knee joint perfusate and cerebrospinal fluid in rats. Neurosci Lett 226: 9-12, 1997.

- Björkman R, Hallman K, Hedner J, Hedner T, Henning M: Localization of the central antinociceptive effect of diclofenac in the rat. *Brain Res* 590: 66-73, 1992.
- Björkman R, Hedner J, Hedner T, Henning M: Central naloxone-reversible antinociception by diclofenac in the rat. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 342: 171-176, 1990.
- Björkman R: Central antinociceptive effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs and paracetamol. Experimental studies in the rat. *Acta Anaesthesiol Scand Suppl* 103: 1-44, 1995.
- Bonica JJ: Definitions and taxonomy of pain. En: J.J. Bonica (Ed). *The management of pain*. 2^a Edición. Filadelfia, Lea & Febiger, p. 18-27, 1990.
- Breder CD, Dewitt D, Kraig RP: Characterization of inducible cyclooxygenase in rat brain. *J Comp Neurol* 355: 296-315, 1995.
- Brody T: *Nutritional Biochemistry*, 2nd Edition. San Diego, CA. Academic Press, p. 603-609, 1991.
- Bromm K, Herrmann WM, Schulz H: Do the B-vitamins exhibit antinociceptive efficacy in men? Results of a placebo-controlled repeated-measures double-blind study. *Neuropsychobiol* 31: 156-165, 1995.
- Bruggemann G, Koehler CO, Koch EM: Results of a double-blind study of diclofenac + vitamin B₁, B₆, B₁₂ versus diclofenac in patients with acute pain of the lumbar vertebrae. A multicenter study. *Klin Wochenschr* 68: 116-120, 1990.

- Bruggemann R, Bruns H, Dorn R: Shortening diclofenac therapy by vitamins. Results of a randomized double-blind study, diclofenac 50 mg versus diclofenac 50 mg plus B vitamins in painful spinal diseases with degenerative changes. *Z Rheumatol* 47:351-362, 1988.
- Budai D, Larson AA: The involvement of metabotropic glutamate receptors in sensory transmission in dorsal horn of the rat spinal cord. *Neuroscience* 83: 571-580,, 1998.
- Buritova J, Chapman V, Honoré P, Besson JM: Selective cyclooxygenase-2 inhibition reduces carrageenan oedema and associated spinal c-Fos expression in the rat. *Brain Res* 715: 217-220, 1996.
- Buritova J, Chapman V, Honoré P, Besson JM: The contribution of peripheral bradykinin B2 receptors to carrageenan-evoked oedema and spinal c-Fos expression in rats. *Eur J Pharmacol* 320: 73-80, 1997.
- Burnstock G: A unifying purinergic hypothesis for the initiation of pain. *Lancet* 347: 1604-1605, 1996.
- Calixto JB, Cabrini D, Ferreira J, Campos MM: Kinins in pain and inflammation. *Pain* 87: 1-5, 2000.
- Canham JE, Nunes WT, Eberlin EW: Electroencephalographic and central nervous system manifestations of B6 deficiency and induced B6 dependency in normal human adults. En: *Proceedings of the Sixth International Congress of Nutrition*. E & S Livingstone Ltd, Edinburgh, p. 537, 1964.

- Carlton SM, Hargett GL, Coggeshall RE: Localization and activation of glutamate receptors in unmyelinated axons of rat glabrous skin. *Neurosci Lett* 197: 25-28, 1995.
- Carlton SM, Zhou M, Coggeshall RE: Localization and activation of substance P receptors in unmyelinated axons of rat glabrous skin. *Brain Res* 734: 103-108, 1996.
- Castro-Alamancos MA: Short-term plasticity in thalamo-cortical pathways: cellular mechanisms and functional roles. *Rev Neurosci* 8: 95-116, 1997.
- Caterina MJ, Julius D: The vanilloid receptor: A molecular gateway to the pain pathway. *Annu Rev Neurosci* 24: 487, 517, 2001.
- Cerveró F, Laird J: Fisiología del dolor. En: L. Aliaga, J.E. Baños, C. Barutell (Eds). *Tratamiento del dolor: Teoría y práctica*. Barcelona, MCR, p. 9-25, 1995.
- Cerveró F, Laird J: Visceral pain. *Lancet* 353: 2145-2148, 1999.
- Cerveró F: Neurobiología del Dolor. *Rev Neurol* 30: 551-555, 2000.
- Cerveró F: Sensory innervation of the viscera: peripheral basis of visceral pain. *Physiol Rev* 74: 95-138, 1994.
- Cerveró F: What is a nociceptor-specific class 3 cell? *Pain* 62: 123-124, 1995.
- Chapman V, Buritova J, Honoré P, Besson JM: Physiological contributions of neurokinin 1 receptor activation and interactions with NMDA receptors to inflammatory-evoked spinal c-Fos expression. *J Neurophysiol* 76: 1817-1827, 1996.

- Chapman V, Dickenson AH: The spinal and peripheral roles of bradykinin and prostaglandins in nociceptive processing in the rat. *Eur J Pharmacol* 219: 427-433, 1992.
- Chizh BA, Cumberbatch MJ, Herrero JF, Stirk GC, Headley PM: Stimulus intensity, cell excitation and the N-methyl-D-aspartate receptor component of sensory responses in the rat spinal cord in vivo. *Neuroscience* 80: 251-265, 1997.
- Clayton JS, Gaskin PJ, Beattie DT: Attenuation of fos-like immunoreactivity in trigeminal nucleus caudalis following trigeminovascular activation in the anaesthetized guinea-pig. *Brain Res* 775: 74-80, 1997.
- Clementi E, Meldosi J: The cross-talk between nitric oxide and Ca²⁺: a story with a complex past and a promising future. *Trends Pharmacol Sci* 18: 266-269, 1997.
- Clissold SP: Aspirin and related derivatives of salicylic acid. Non-narcotic analgesics today: benefits and risks. *Drugs* 32 (Suppl 4): 8-26, 1986.
- Coderre TJ, Melzack T: Central neural mediators of secondary hyperalgesia following heat injury in rats: neuropeptides and excitatory amino acids. *Neurosci Lett* 131: 71-74, 1991.
- Coderre TJ: The role of excitatory amino acid receptors and intracellular messengers in persistent nociception after tissue injury in rats. *Molecular Biol* 7: 229-246, 1993.
- Collins DR, Davis SN: Arachidonic acid metabolites and the synaptic potentiation evoked by activation of metabotropic glutamate receptors. *Eur J Pharmacol* 342: 213-216, 1998.

- Conn PJ, Pin JP: Pharmacology and function of metabotropic glutamate receptors. *A. Rev Pharmacol* 37: 205-237, 1997.
- Craig AD, Dostrovsky JO (1997): Processing of nociceptive information at supraspinal levels. En: *Anesthesia: Biologic Foundations*. Editado por TL Yaksh, C Lynch, WM Zapol, M Maze, JF Biebuyck y LJ Saidman (Lippincott-Raven), Primera Edición, p. 625-641.
- Crea F, Pupita G, Galassi A, El-Tamini H, Kaski JC, Davies G, Maseri A: Role of adenosine in pathogenesis of anginal pain. *Circulation* 81: 164-172, 1990.
- Dagnino J: Boletín de la Escuela de Medicina. Universidad Católica de Chile 23: 148-151, 1994.
- Dakshinamurti K, Sharma SK, Bonke D: Influence of B-vitamins on binding properties of serotonin receptors in the CNS of rats. *Klin Wochenschr* 68: 142-145, 1990.
- Davidson EM, Coggeshall RE, Carlton SM: Peripheral NMDA and non-NMDA glutamate receptors contribute to nociceptive behaviors in the rat formalin test. *NeuroReport* 8: 941-946, 1997.
- Davies NM, Anderson KE: Clinical pharmacokinetics of diclofenac. Therapeutic insights and pitfalls. *Clin Pharmacokinet* 33: 184-213, 1997.
- Devoghel JC: Small intrathecal doses of lysine-acetylsalicylate relieve intractable pain in man. *J Int Med Res* 11: 90-91, 1983.

- Dickinson AH: Mechanisms of central hypersensitivity: Excitatory amino acid mechanisms and their control. En: *The Pharmacology of Pain. Handbook of Experimental Pharmacology*. Editado por A Dickenson y JM Besson (Springer-Verlag, Berlin), Vol. 30:167-210, 1997.
- Dickinson AH: Pharmacology of pain transmission and control. En: J.F. Gebhart, D.L. Hammond, T. Jensen (eds). *Proceedings of the 8th World Congress on Pain. Progress in Pain Research and Management*, IASP Press, Seattle, p. 113-121, 1996.
- Dimpfel W, Spuler M, Bonke D: Influence of repeated vitamin B administration on the frequency pattern analyzed from rat brain electrical activity Tele-Stereo-EEG. *Klin Wschr* 68: 136-141, 1990.
- Dionne RA, Gordon, SM, Tahara M, Rowan J, Troullos E: Analgesic efficacy and pharmacokinetics of ketoprofen administered into a surgical site. *J Clin Pharmacol* 39: 131-138, 1999.
- Dirig DM, Isakson PC, Yaksh TL: Effect of COX-1 and COX-2 inhibition on induction and maintenance of carrageenan-evoked thermal hyperalgesia in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 285: 1031-1037, 1998.
- Dong WK, Chudler EH: Cortical nociceptive mechanisms. A review of neurophysiological and behavioral evidence in the primate. En: *Forebrain Areas Involved in Pain Processing*. Editado por JM Besson, G Guilbaud, H Ollat (John Libbey Eurotext, Paris), p. 183-196, 1995.

- Dougherty PM, Li YL, Lenz FA, Rowland L, Mittman S: Evidence that excitatory amino acids mediate afferent input to the primate somatosensory thalamus. *Brain Res* 728: 267-273, 1996.
- Dray A (1997): Pharmacology of peripheral afferent terminals. En: *Anesthesia: Biologic Foundations*. Editado por TL Yaksh, C Lynch, WM Zapol, M Maze, JF Biebuyck y LJ Saidman (Lippincott-Raven), Primera Edición, p. 543-555, 1997.
- Dray A, Urban L: New pharmacological strategies for pain relief. *A Rev Pharmacol Toxicol* 36: 253-280, 1996.
- Dray A, Urban L, Dickerson AH. Pharmacology of chronic pain. *Trends Pharmacol Sci* 15:190-197, 1994.
- Duarte IDG, dos Santos IR, Lorenzetti BB, Ferreira SH: Analgesia by direct antagonism of nociceptor sensitization involves the arginine-nitric oxide-cGMP pathway. *Eur J Pharmacol* 217: 225-227, 1992.
- Duarte IDG, Lorenzetti BB, Ferreira SH: Peripheral analgesia and activation of the nitric oxide-cyclic GMP pathway. *Eur J Pharmacol* 186: 289-293, 1990.
- Edvinsson L, Cantera L, Jansen-Olensen I, Uddman R: Expression of calcitonin gene-related peptide-1 receptor mRNA in human trigeminal ganglia and cerebral arteries. *Neurosci Lett* 229: 209-211, 1997.
- Eduards G, Weston AH: The pharmacology of ATP-sensitive potassium channels. *Ann. Rev. Pharmacol Toxicol* 33:597-637, 1993.
- Eisenach JC: Muscarinic mediated analgesia. *Life Sci* 64: 549 – 554, 1999.

- Elhakim M, Fathy A, Elkott M, Said MM: Intra-articular tenoxicam relieves post-arthroscopy pain. *Acta Anaesthesiol Scand* 40: 1223-1226, 1996.
- Eschalier A, Aumaitre O, Decamps A, Dordain G: A comparison of the effects of vitamin B₁₂ and aspirin in three experimental pain models in rats and mice. *Psychopharmacol* 81: 228-231, 1983.
- Eusebio Pérez-Flores, Roberto Medina-Santillán, Gerardo Reyes-García, Eduardo Mateos-García. Combination of diclofenac plus B vitamins in acute pain after tonsillectomy: A pilot study. *Proceedings of the Western Pharmacology Society 2003* (En revisión).
- Fabrizi A, Cruccu G, Sperti P, Ridolfi M, Ciampani T, Leardi MG, Ferracuti S, Bonifacio V: Piroxicam-induced analgesia: evidence for a central component which is not opioid mediated. *Experientia* 48: 1139-1142, 1992.
- Ferreira SH, Lorenzetti BB, Correa FM: Central and peripheral antialgesic action of aspirin-like drugs. *Eur J Pharmacol* 53: 39-48, 1978.
- Ferreira SH: Prostaglandins, aspirin-like drugs and analgesia. *Nature New Biol* 240: 200-203, 1972.
- Ferreira SH, Moncada S, Vane JR: Indomethacin and aspirin abolish the prostaglandin release from the spleen. *Nature New Biol* 231: 237-239, 1971.
- Fields HL, Basbaum AI: Central nervous system mechanisms of pain modulation. En: *Textbook of Pain*. Editado por PD Wall y R Melzack (Churchill-Livingstone), Tercera Edición, p. 243-257, 1994.
- Flores JR: El dolor: vías y mecanismos de transmisión y de control. En *Terapéutica farmacológica del dolor*. Pamplona: Eunsa, p. 19-39, 1993.

- França DS, Souza ALS, Almeida KR, Dolabella SS, Martinelli C, Coelho MM: B vitamins induce an antinociceptive effect in the acetic acid and formaldehyde models of nociception in mice. *Eur J Pharmacol* 421: 157-164, 2001.
- Frantz B, O'Neill EA: The effect of sodium salicylate and aspirin on NF-kappa B. *Science* 270: 2017-2019, 1995.
- Fu GQ, Carstens E, Stelzer B, Zimmermann M: B vitamins suppress spinal dorsal horn nociceptive neurons in the cat. *Neurosci Lett* 95: 192-197, 1988.
- Galer BS, Rowbotham M, Perander J, Devers A, Friedman E: Topical diclofenac patch relieves minor sports injury pain: results of a multicenter controlled clinical trial. *J Pain Symptom Manag* 19: 287-294, 2000.
- Gammon CM, Allen AC, Morell P: Bradykinin stimulates phosphoinositide hydrolysis and mobilization of arachidonic acid in dorsal root ganglion neurons. *J Neurochem* 53: 95-101, 1989.
- Garcia-Rafanel J, Forn J: Correlation between anti-inflammatory activity and inhibition of prostaglandin biosynthesis induced by various non-steroidal agents. *Arzneim-Forsch./Drug Research* 29: 630-633, 1979.
- Gold MS, Reichling DB, Shuster MJ, Levine JD: Hyperalgesic agents increase a tetrodotoxin-resistant Na^+ -current in nociceptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 1108-1112, 1996.
- Granados-Soto V, Flores-Murrieta FJ, López-Muñoz FJ, Salazar LA, Villarreal JE, Castañeda-Hernández G: Relationship between the paracetamol plasma levels and its analgesic effect in the rat. *J Pharm Pharmacol* 44: 741-744, 1992.

- Granados-Soto V, Flores-Murrieta FJ, Castañeda-Hernández G, López-Muñoz FJ: Evidence for the involvement of nitric oxide in the antinociceptive effect of ketorolac in the rat. *Eur J Pharmacol* 277: 281-284, 1995.
- Granados-Soto V, Rufino MO, Gomez Lopes LD, Ferreira SH: Evidence for the involvement of nitric oxide-cGMP pathway in the antinociception of morphine in the formalin test. *Eur J Pharmacol* 340: 177-180, 1997.
- Granados-Soto V, Torres-López JE, Argüelles CF, Ortiz MI: The peripheral antinociceptive effect of resveratrol is associated with activation of potassium channels. *Neuropharmacol* 43: 917-923, 2002.
- Grubb BD, McQueen DS, Iggo A, Birrell GJ, Dutia MB: A study of 5-HT receptors associated with afferent nerves located in normal and inflamed rat ankle joints. *Agents and Actions* 25: 216-218, 1988.
- Guieu R, Blin O, Pouget J, Serratrice G: Analgesic effect of indomethacin shown using the nociceptive flexion reflex in humans. *Ann Rheuman Dis* 51: 391-393, 1992.
- Hall JM: Bradykinin receptors. *Gen Pharmacol* 28: 1-6, 1997.
- Hanck A, Weiser H: Analgesic and anti-inflammatory properties of vitamins. *Int J Vitam Nutr Res Sup* 27: 189-206, 1985.
- Herbert V: Vitamin B12. In Ziegler, E.E. & Filer, L.J. Eds. *Present knowledge in nutrition*. Washington D.C., ILSI Press, p. 191-205, 1996.
- Heyneman CA, Lawless-Liday C, Wall GC: Oral versus topical NSAIDs in rheumatic diseases: a comparison. *Drugs* 60: 555-574, 2000.

- Heyneman CA: Topical non-steroidal anti-inflammatory drugs for acute soft tissue injuries. *Ann Pharmacother* 29: 780-782, 1995.
- Hoyer D, Clarke DE, Fozard JR, Harting PR, Martin GR, Mylecharane EJ, Saxena PR, Humprey PPA: VII International Union of Pharmacology Classification of receptors for 5-hydroxytryptamine (Serotonin). *Pharmacol Rev* 46, 157-203, 1994.
- Hu HZ, Li ZW, Si JQ: Evidence for the existence of substance P autoreceptor in the membrane of rat dorsal root ganglion neurons. *Neuroscience* 77: 535-541, 1997.
- IASP: Pain terms: A current list with definitions and notes on usage. *Pain (Supp. 3)*: S215-S221, 1986.
- Insel P: Analgesic-antipyretic and antiinflammatory agents and drugs employed in the treatment of gout. En: *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*. 9th edition. International Edition, p. 617-657, 1996.
- Institute of Medicine, Food and Nutrition Board. En: *Dietary Reference Intakes: Thiamin, Riboflavin, Niacin, Vitamin B-6, Vitamin B12, Pantothenic Acid, Biotin, and Choline*. Washington, DC, National Academy Press, p. 306-356, 1998.
- Islas-Cadena M, Aguirre-Bañuelos P, Granados-Soto V: Evidence for the participation of the nitric oxide-cyclic GMP pathway in the antinociception of nimesulide in the formalin test. *J Pharmacol Toxicol Meth* 42: 87-92, 1999.

- Janka UH: The pain-therapeutic efficacy of highly dosed B-complex vitamins in diabetic polyneuropathy. En: *Are B-complex vitamins useful as adjuvants to analgesics*. Der Schmerz 3: 171-176, 1991.
- Jeftinija S, Jeftinija K, Liu F, Skilling SR, Smullin DH, Larson AA: Excitatory amino acids are released from rat primary afferent neurons in vitro. *Neurosci Lett* 125: 191, 1991.
- Jurna I, Brune K: Central effect of the non-steroidal anti-inflammatory agents, indomethacin, ibuprofen, and diclofenac, determined in C fiber-evoked activity in single neurons of the rat thalamus. *Pain* 41: 71-80, 1990.
- Jurna I, Carlson KH, Bonke D, Fu QG, Zimmermann M: Suppression of thalamic and spinal nociceptive neuronal response by pyridoxine, thiamin, and cyanocobalamin. *Ann NY Acad Sci* 585: 492-495, 1990.
- Janicki PK, Jeske-Janicka M. Relevance of nitric oxide in pain. Mechanisms and pain management. *Current Review of Pain* 2(4):211-216, 1998
- Jurna I, Carlson KH, Bonke D, Fu QG, Zimmermann M: Suppression of thalamic and spinal nociceptive neuronal response by pyridoxine, thiamin, and cyanocobalamin. *Ann NY Acad Sci* 585: 492-495, 1990.
- Kantor TG: Use of diclofenac in analgesia. *Am J Med* 80: 64-69, 1986.
- Kapur A, Lytton WW, Ketchum KL, Haberly LB: Regulation of the NMDA component of EPSPs by different components of postsynaptic GABAergic inhibition: computer simulation analysis in piriform cortex. *J Neurophysiol* 78: 2546-2559, 1997.

- Kawamata M, Omote K: Involvement of increased excitatory amino acids and intracellular Ca^{2+} concentration in the spinal dorsal horn in an animal model of neuropathic pain. *Pain* 68: 85-96, 1996.
- Kawi S: Cyclooxygenase selectivity and the risk of gastrointestinal complications of various non-steroidal anti-inflammatory drugs: A clinical consideration. *Inflamm Res* 47 (Suppl): S102-S106, 1998.
- Khan AA, Raja SN, Manning DC, Campbell JN, Meyer RA: The effects of bradykinin and sequence-related analogs on the response properties of cutaneous nociceptors in monkey. *Somatosens Motor Res* 9: 97-106, 1992.
- Krupp P, Menassé R, Sallmann A, Wilhelmi G, Ziel R, Jaques R: Sodium [o-[(2,6-Dichlorophenyl)-amino]-phenyl]-acetate (GP45840), A new non-steroidal anti-inflammatory agent. *Experientia* 29: 450-452, 1973.
- Ku E, Wasvary J, Cash W: Diclofenac sodium (GP 45840, Voltaren), A potent inhibitor of prostaglandin synthetase. *Bioch Pharmacol* 24: 641-643, 1975.
- Ku EC, Lee W, Kothari HV, Scholer DW: Effect of diclofenac sodium on the arachidonic acid cascade. *Am J Med* 80 (Suppl 4B):18-23, 1986.
- Kuhlwein A, Meyer HJ, Koehler CO: Reduced diclofenac administration by B vitamins: results of a randomized double blind study with reduced daily doses of diclofenac (75 mg diclofenac versus 75 mg diclofenac plus B vitamins) in acute lumbar vertebral syndromes. *Klin Wochenschr* 68: 107-115, 1990.
- Kunt T: Complaints in the lumbosacral region and their management with Dolo-Neurobion. *Fortschr Med* 96: 6299-6300, 1978.
- Kunze K: Polyneuropathien. *Mat Med Nordm* 31:190-207, 1979.

- Langman MJ, Jensen DM, Watson DJ, Harper SE, Zhao PL, Quan H, Bolognese JA, Simon TJ: Adverse upper gastrointestinal effects of rofecoxib compared with NSAIDs. *JAMA* 282: 1929-1933, 1999.
- Lázaro-Ibáñez GG, Torres-López JE, Granados-Soto V: Participation of the nitric oxide-cyclic GMP-ATP-sensitive K⁺ channel pathway in the antinociceptive action of ketorolac. *Eur J Pharmacol* 426: 41-46, 2001.
- Leklem JE: Vitamin B6. En: *Handbook of Vitamins*. L. Machlin (Ed). New York, Marcel Decker Inc, p. 341-378, 1991.
- Leklem JE: Vitamin B6. En: *Nutrition in Health and Disease*, M. Shils (Ed). 9th Edition, Baltimore, Williams & Wilkins, p. 413-422, 1999.
- Lerea LS, Carlson NG, Simonato M, Morrow JD, Roberts JL, McNamara JO: Prostaglandin F2a is required for NMDA receptor-mediated induction of c-fos mRNA in dentate gyrus neurons. *J Neurosci* 17: 117-124, 1997.
- Lettko M: The analgesic efficacy of B-complex vitamins in degenerative illnesses of the vertebral column. En: *Are B-complex vitamins useful as adjuvants to analgesics*. *Der Schmerz* 3: 177-182, 1991.
- Leuschner J: Antinociceptive properties of thiamin, pyridoxine and cyanocobalamin following repeated oral administration to mice. *Arzneimittelforschung* 42: 2114-2115, 1992.
- Leyssen JE, Gompel VP, Gommeren W, Woestenborghs R, Janssen PA: Down regulation of serotonin-52 receptor sites in rat brain by chronic treatment with the serotonin-52 antagonist: ritanserin and setoperone. *Psychopharmacol* 88: 434-444, 1986.

- Li HF, Chen S-A, Wu S-N: Evidence for the stimulatory effect of resveratrol on Ca^{2+} -activated K^+ current in vascular endothelial cells. *Cardiovasc Res* 45: 1035-1045, 2000.
- Lim RKS, Guzmán F, Rodgers DW, Goto K, Braun C, Dickerson GD, Engle RJ: Site of action of narcotic and non-narcotic analgesics determined by blocking bradykinin-evoked visceral pain. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 152, 25-58, 1964.
- Liu Y, Liu D, Printzenhoff D, Coghlan MJ, Harris R, Krafft DS: Tenidap, a novel anti-inflammatory agent, is an opener of the inwardly rectifying K^+ channel hKir2.3. *Eur J Pharmacol* 435: 153-160, 2002.
- López-Muñoz FJ, Salazar LA, Castañeda-Hernández J, Villarreal JE: A new model to assess analgesic activity pain-induced functional impairment in the rat (PIFIR). *Drug Dev Res* 28: 169-175, 1993.
- López-Muñoz FJ, Castañeda-Hernández G, Torres-López JE, Picazo YF, Flores-Murrieta FJ, Granados-Soto V: Differences in the mechanism of antinociceptive action of non-steroidal anti-inflammatory drugs in the rat. *Pharm Sci* 2: 189-190, 1996.
- Lorenzetti BB, Ferreira SH: Activation of the arginine-nitric oxide pathway in primary sensory neurons contributes to dipyrrone-induced spinal and peripheral analgesia. *Inflamm Res* 45, 308-311, 1996.

- Malmberg AB, Brandon EP, Idzerda RL, Liu H Mcknight GS, Basbaum AI: Diminished inflammation and nociceptive pain with preservation of neuropathic pain in mice with a targeted mutation of the type I regulatory subunit of camp-dependent protein kinase. *J Neurosci* 17: 7462-7470, 1997.
- Malmberg AB, Yaksh TL: Antinociceptive actions of spinal nonsteroidal anti-inflammatory agents on the formalin test in the rat. *J Pharmacol Exp Ther* 263: 136-146, 1992.
- Malmberg AB, Yaksh TL: Spinal nitric oxide synthesis inhibition blocks NMDA induced thermal hyperalgesia and produces antinociception in the formalin test in rats. *Pain* 54: 291-300, 1993.
- Malmberg AB, Yaksh TL: Antinociception produced by spinal delivery of the S and R enantiomers of flurbiprofen in the formalin test. *Eur J Pharmacol* 256: 205-209, 1994.
- Malmberg AB, Yaksh TL: Cyclooxygenase inhibition and the spinal release of prostaglandin E₂ and amino acids evoked by paw formalin injection: a microdialysis study in unanesthetized rats. *J Neurosci* 15: 2766-2776, 1995.
- Marceau F: Kinin B₁ receptors: a review. *Immunology* 30: 1-26, 1995.
- Marcolongo R, Floriavanti A: Vitamins B1, B6 and B12 for lumboischialgia. En B-vitaminns in Pain: HU Gerbershagen, M Zimmermann (Eds). Frankfurt, p. 42-45, 1988.

- Marcus R, Coulston AM: Water-soluble vitamins. The vitamin B complex and ascorbic acid. En: *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*. J.G. Hardaman, L.E. Limbird, (Eds), 10th Ed, McGraw-Hill, p. 1753-1771, 2001.
- Masferrer JL, Seibert K, Zweifel B, Needleman P: Endogenous glucocorticoids regulate an inducible cyclooxygenase enzyme. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 3917-3921, 1992.
- McCormack K: Non-steroidal anti-inflammatory drugs and spinal nociceptive processing. *Pain* 59: 9-43, 1994.
- McMahon SB : Mechanisms of cutaneous, deep and visceral pain. En: *Textbook of Pain*. Editado por PD Wall y R Melzack (Churchill-Livingstone), Tercera Edición, p. 129-151, 1994.
- McMahon, SB: NGF as a mediator of inflammatory pain. *Philos Trans R Soc Lond (Biol)* 351: 431-440, 1996.
- Meller ST, Gebhart GF: Nitric oxide (NO) and nociceptive processing in the spinal cord. *Pain* 52: 127-136, 1993.
- Menassé R, Hedwell P, Kraetz J, Pericin C, Riesterer I, Sallmann A, Ziel R, Jaques R: Pharmacological properties of diclofenac sodium and its metabolites. *Scand J Rheumatol* 22 (Suppl): 5-16, 1978.
- Meyer HJ: B-complex vitamins shorten the duration of therapy of degeneratively related acute vertebral-column syndromes with diclofenac. Results of randomized double-blind investigations. En: *Are B-complex vitamins useful as adjuvants to analgesics*. *Der Schmerz* 3: 165-170, 1991.

- Millan MJ: The Induction of Pain: An integrative Review. *Prog Neurobiol* 57: 1-164, 1999.
- Minami T, Nishihara I, Horiguchi S, Ito S, Hyodo M, Hayaishi O: Allodynia evoked by intrathecal administration of prostaglandin E₂ to conscious mice. *Pain* 57: 217-223, 1994b.
- Minami T, Nishihara I, Uda R, Ito S, Hyodo M, Hayaishi O: Involvement of glutamate receptors in allodynia induced by prostaglandins E₂ and F_{2α} injected into conscious mice. *Pain* 57: 225-231, 1994a.
- Minami T, Okuda-Ashitaka E, Nishizawa M, Mori H, Ito S: Absence of prostaglandin E₂-induced allodynia in conscious mice by prostaglandin D₂. *Br J Pharmacol* 122: 605-610, 1997.
- Misumi J, Nagano M, Kaisaku J, Hitoshi T: Effects of vitamin B₁₂ and B₆ on 2,5-hexanedione-induced neuropathy. *Arch Toxicol* 56: 204-206, 1985.
- Mitchell JA, Akarasereenont P, Thiemermann C, Flower RJ, Vane JR: Selectivity of non-steroidal anti-inflammatory drugs as inhibitors of constitutive and inducible cyclooxygenase. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 11693-11697, 1993.
- Moller T, Hasse W: Die therapie von erkrankungen des rheumatischen formenkreises mit einer kombination von diclofenac and B-vitaminen. *Therapiewoche* 37: 876-884, 1987.
- Moncada S, Palmer RMJ, Higgs, EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol. Rev.* 43; 109-142, 1991.

- Murata T, Ushikubi F, Matsuoka T, Irata M, Yamasaki A, Sugimoto Y, Ichikawa A, Aze Y, Tanaka T, Yoshida N, Ueno A, Oh-Ishi S, Narulya S: Altered pain perception and inflammatory response in mice lacking prostacyclin receptors. *Nature* 388: 678-682, 1997.
- Ness TJ, Gebhart GF: Visceral pain: a review of experimental studies. *Pain* 41: 167-234, 1990.
- Noguchi Y, Ishiko J, Ohtsuki I: Comparative pharmacological profiles of piroxicam, indomethacin, phenylbutazone, diclofenac, ibuprofen and mephenamic acid. *Royal Society of Medicine, International Congress and Symposium Series* 67: 61-67, 1984.
- Ocaña M, Del Pozo E, Barrios M, Robles LI, Baeyens JM: An ATP-dependent potassium channel blocker antagonizes morphine analgesia. *Eur J Pharmacol* 186: 377-378, 1990.
- O'Hanlon JJ, McCleane G, Muldoon T: Preoperative application of piroxicam gel compared to a local anaesthetic field block for postoperative analgesia. *Acta Anaesthesiol Scand* 40: 715-718, 1996.
- O'Neill IAJ, Lewis GP: Inhibitory effects of diclofenac and indomethacin on interleukin-1-induced changes in PGE₂ release. A novel effect on free arachidonic levels in human synovial cells. *Biochem Pharmacol* 38: 3707-3711, 1989.

- Okuyama S, Aihara H: The mode of action of analgesic drug in adjuvant arthritic rats as an experimental model of chronic inflammatory pain: Possible central analgesic action of acidic nonsteroidal antiinflammatory drugs. *Japan J Pharmacol* 35: 95-103, 1984.
- Oliw E, Lunden I, Anggard E: In vivo inhibition of prostaglandin synthesis in rabbit kidney by non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Acta Pharmacol Toxicol* 42: 179-184, 1978.
- Ortiz MI, Castañeda-Hernández G, Granados-Soto V: Possible involvement of potassium channels in peripheral antinociception induced by metamizol: lack of participation of ATP-sensitive K⁺ channels. *Pharmacol Biochem Beh En prensa*: 1-6, 2002a.
- Ortiz MI, Torres-López JE, Castañeda-Hernández G, Rosas R, Vidal-Cantú GC, Granados-Soto V: Pharmacological evidence for the activation of K⁺ channels by diclofenac. *Eur J Pharmacol* 438: 85-91, 2002b.
- Ottolia M, Toro L: Potentiation of large conductance K_{Ca} channels by niflumic, flufenamic and mefenamic acids. *Biophysical J* 67: 2272-2279, 1994.
- Parry GJ, Bredesen DE: Sensory neuropathy with low-dose of pyridoxine. *Neurol* 35: 1466-1468, 1985.
- Pellerin M, Hardy F, Abergel A, Boule D, Palacci JH, Babinet P, Wingtin LN, Glowinski J, Amiot JF, Mechali D: Chronic refractory pain in cancer patients. Value of the spinal injection of lysine acetylsalicylate. 60 cases. *Presse Med* 16: 1465-1468, 1987.

- Piletta P, Porchet HC, Dayer P: Central analgesic effect of acetaminophen but not of aspirin. *Clin Pharmacol Ther* 49: 350-354, 1991.
- Rang HP, Bevan S, Dray A: Nociceptive peripheral neurons: Cellular properties. En: *Textbook of Pain*. Editado por PD Wall y R Melzack (Churchill-Livingstone), Tercera Edición, p. 57-78, 1994.
- Reeh PW: The effects of B-complex vitamins in experimental models of peripheral nerve lesions. En: *Are B-complex vitamins useful as adjuvants to analgesics*. *Der Schmerz* 3: 160-164, 1991.
- Rice AS, Lloyd J, Bullingham RE, O'Sullivan G: Ketorolac penetration into the cerebrospinal fluid of humans. *J Clin Anesth* 5:459-462, 1993.
- Rindi G: Thiamin. En: E.E. Ziegler, L.J. Filer (Eds). *Present knowledge in nutrition*. Washington D.C., ILSI Press, p. 160-166, 1996.
- Rodríguez ARA, Duarte IDG. The peripheral antinociceptive effect induced by morphine is associated with ATP-sensitive K⁺ channels. *Br J Pharmacol* 129: 110-114, 2000.
- Rodríguez-Alvarez J, Lafon-Cazal M, Blanco I, Bockaert J: Different routes of Ca²⁺ influx in NMDA-mediated generation of nitric oxide and arachidonic acid. *Eur J Pharmacol* 9: 867-870, 1997.
- Romsing J, Moiniche S, Ostergaard D, Dahl JB: Local infiltration with NSAIDs for postoperative analgesia: evidence for a peripheral analgesic action. *Acta Anaesthesiol Scand* 44: 672-683, 2000.

- Sacerdote P, Monza G, Mantegazza P, Panerai AE: Diclofenac and pirofen modify pituitary hypothalamic beta-endorphin concentrations. *Pharmacol Res Commun* 17: 679-684, 1985.
- Schaible HG, Grubb BD: Afferent and spinal mechanisms of joint pain. *Pain* 55: 5-54, 1993.
- Schaible HG, Neugebauer V, Geisslinger G, Beck U: The effects of S- and R-flurbiprofen on the inflammation-evoked intraspinal release of immunoreactive substance P-a study with antibody microprobes. *Brain Res* 798: 287-293, 1998.
- Schoenen J, Jacquy J, Lenaerts M: Effectiveness of high-dose riboflavin in migraine prophylaxis. A randomized controlled trial. *Neurol*, 50: 466-470, 1998.
- Shane B: Folic acid, vitamin B12, and vitamin B6. En: *Biochemical and Physiological Aspects of Human Nutrition*. M. Stipanuk (Ed). Philadelphia, PA, W.B. Saunders Co., p. 483-518, 2000.
- Sharma G, Stevens CF: A mutation that alters magnesium block of N-methyl-D-aspartate receptor channels. *Proc Natl Acad. Sci USA* 93: 9259-9263, 1996.
- Sharma SK, Bolster B, Dakshinamurti K: Effects of pyridoxine on nociceptive thalamic unit activity. *Ann NY Acad Sci* 585: 549-554, 1990.
- Shield MJ: Diclofenac/misoprostol: novel findings and their clinical potential. *J Rheumatol* 51(Suppl): 31-41, 1998.
- Shils ME, Olson JA, Shinke M: *Modern nutrition in health and disease*. Lea & Febiger, 8th edition, Philadelphia, 1994.

- Shin HC, Oh SJ, Jung SC, Park J, Won CK: Differential modulation of short and long latency sensory responses in the SI cortex by IL-6. *NeuroReport* 8: 2841-2844, 1997.
- Simon TJ, Weaver AL, Graham DY, Kivitz AJ, Lipsky PE, Hubbard RC, Isakson PC, Verburg KM, Yu SS, Zhao WW, Geis GS: Anti-inflammatory and upper gastrointestinal effects of celecoxib in rheumatoid arthritis. *JAMA* 282: 1921-1928, 1999.
- Small FB, Relief of pain by infiltration of autonomic ganglia with steroids. *Can Med Assoc J* 118: 375 – 379, 1978.
- Smith CJ, Freyberg RH y McEwen C: *History of Rheumatology in the United States*, Arthritis Foundation, Atlanta, 1985.
- Soares AC, Duarte IDG: Dibutyl-cyclic GMP induces peripheral antinociception via activation of ATP-sensitive K⁺ channels in the rat PGE₂-induced hyperalgesic paw. *Br J Pharmacol* 134: 127-131, 2001.
- Soares AC, Leite R, Tatsuo MAKF, Duarte IDG: Activation of ATP-sensitive K⁺ channels: mechanism of peripheral antinociceptive action of the nitric oxide donor, sodium nitroprusside. *Eur J Pharmacol* 400: 67-71, 2000.
- Sorkin LS: NMDA evokes an L-NAME sensitive spinal release of glutamate and citrulline. *NeuroReport* 4: 479-482, 1993.
- Stanislavchuk NA, Pentyuk AA, Lychik GZ, Lychko AP, Lutsyuk NB: Effects of inductors and inhibitors of enzymes of metabolism of xenobiotics, coenzymatic forms of vitamin B₁ and B₂ on anti-inflammatory action of voltaren. *FarmakolToksikol* 51: 69-71, 1988.

- Stein C. Peripheral mechanisms of opioid analgesia *Anesth Analg*. 76:182-191, 1993
- Steinmeyer J, Kalbhen D: Pharmacological influence on polymorphonuclear granulocytes elastase under various test conditions. *Arzneim Forsch/Drug Research* 40: 196-200, 1990.
- Takashima T, Kado Y, Ono T: Anti-inflammatory effects of GP 45,840. *Clin Rep* 6: 50-57, 1972.
- Tanphaichitr V: Thiamin. En: *Nutrition in Health and Disease*, M. Shils (Ed). 9th Edition. Baltimore: Williams & Wilkins, p. 381-389, 1999.
- Taylor B, Peterson MA, Basbaum AI: Persistent cardiovascular and behavioral responses to subcutaneous formalin require peripheral nerve input. *J Neurosci* 15: 7575-7584, 1995.
- Todd PA, Sorkin EM: Diclofenac sodium. A reappraisal of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic efficacy. *Drugs* 35: 244-285, 1988.
- Tonussi CR, Ferreira SH: Mechanism of diclofenac analgesia: direct blockade of inflammatory sensitization. *Eur J Pharmacol* 251: 173-179, 1994.
- Torres-López JE, Granados-Soto V, López-Muñoz FJ: Evaluación de curso temporal del efecto antinociceptivo del diclofenac con el modelo de disfunción inducida por dolor en la rata. *Universidad y Ciencia* 11: 125-131, 1994.
- Torrez-López JE, López-Muñoz FJ, Castañeda-Hernández G, Granados-Soto V: Pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling of the antinociceptive effect of diclofenac in the rat. *J Pharmacol Exp Ther* 282: 685-690, 1997.

- Uphouse LA, Welch SP, Ward CR, Ellis EF, Embrey JP: Antinociceptive activity of intrathecal ketorolac is blocked by the kappa-opioid receptor antagonist, nor-binaltorphimine. *Eur J Pharmacol* 242: 53-58, 1993.
- Vaccarino AL, Clemmons HR, Mader GJ, Magnusson JE: A role of periaqueductal grey NMDA receptors in mediating formalin-induced pain in the rat. *Neurosci Lett* 236: 117-119, 1997.
- Valerio A, Paterlini M, Boilava M, Memo M, Spano PF: Metabotropic glutamate receptor mRNA expression in rat spinal cord. *NeuroReport* 8: 2695-2699, 1997.
- Vane JR: Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nature* 231: 232-235, 1971.
- Vane JR: The evolution of non-steroidal anti-inflammatory drugs and their mechanism of action. *Drugs* 33 (suppl 1): 18-27, 1987.
- Vanegas H, Schaible HG: Prostaglandins and cyclooxygenases in the spinal cord. *Prog Neurobiol* 64: 327-363, 2001.
- Vanegas H, Tortorici V, Eblen-Zajjur A, Vásquez E: PAG-microinjected dipyrone (metamizol) inhibits responses of spinal dorsal horn neurons to natural noxious stimulation in rats. *Brain Res* 759: 1712-174, 1997.
- Vasko MR, Campbell WB, Waite KJ: Prostaglandin E₂ enhances bradykinin-stimulated release of neuropeptides from rat sensory neurons in culture. *J Neurosci* 14: 4987-4997, 1994.
- Vescovi P, Passeri M, Gerra G: Naloxone inhibits the early phase of diclofenac analgesia in man. *Pain Clinic* 19: 151-155, 1987.

- Vetter G, Bruggemann G, Lettko M, Schwieger G, Asbach H, Biermann W, Blasius K, Brinkmann R, Bruns H, Dorn E: Shortening diclofenac therapy by B vitamins. Results of a randomized double-blind study, diclofenac 50 mg versus diclofenac 50 mg plus B vitamin, in painful spinal diseases with degenerative changes. *Z Rheumatol* 47: 351-362, 1988.
- Vulchonova L, Riedl MS, Shuster SJ, Buell G, Surprenant A, North RA, Elde R: Immunohistochemical study of the P_{2X2} and P_{2X3} receptor subunits in rat and monkey sensory neurons and their central terminals. *Neuropharmacol* 36: 1229-1242, 1997.
- Wall PD, Melzack R: The dorsal Horn. En: *Textbook of pain* (2^a ed). Edinburgo, Churchill-Livingstone, p. 102-111, 1989.
- Warner TD, Guiliano F, Vojnovic J, Bukasa A, Mitchell JA, Vane JR: Nonsteroid drug selectivities for cyclo-oxygenase-1 rather than cyclo-oxygenase-2 are associated with human gastrointestinal toxicity: A full in vitro analysis. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 7563-7568, 1999.
- Weissmann G: The actions of NSAIDs. *Hosp Pract* 26: 60-68, 1991.
- Whalley ET, Clegg S, Stewarr JM, Vavrek RJ: The effect of kinin agonists and antagonists on the pain response of the human blister base. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 336: 652-655, 1987.
- Wheeler-Aceto H, Cowan A: Standardization of the rat paw formalin test for evaluation of analgesics. *Psychopharmacol* 104: 35-44, 1991.

- Wilcox GL, Seybold V: Pharmacology of spinal afferent processing. En: *Anesthesia: Biologic Foundations*. Editado por TL Yaksh, C Lynch, WM Zapol, M Maze, JF Biebuyck y LJ Saidman (Lippincott-Raven), Primera Edición, p. 557-576, 1997.
- Wild A, Bartoszyk GD: Additive antinociceptive effects of vitamin B1, B6 and B12 in the writhing test and antinociception in the heat coil test. En: H.U.Gerbershagen, M. Zimmerman M: *B-Vitamin in Pain*. Pml. Frankfurt, p. 9-17, 1988.
- Willer JC, De Broucker T, Bussel B, Roby-Brami A, Harrewyn JM: Central analgesic effect of ketoprofen in humans: electrophysiological evidence for a supraspinal mechanism in a double-blind and cross-over study. *Pain* 38: 1-7, 1989.
- Willingale HL, Gardiner NJ, McLymont N, Giblett S, Grubb BD: Prostanoids synthesized by cyclooxygenase isoformas in rat spinal cord and their contribution to the development of neuronal hyperexcitability. *Br J Pharmacol* 122: 1593-1604, 1997.
- Willis WD, Coggeshall RE: *Sensory mechanisms of the spinal cord*. 2a Edición, Plenum press, New York, p. 595, 1991.
- Winter J: Brain derived neurotrophic factor, but not nerve growth factor, regulates capsaicin sensitivity of rat vagal ganglion neurons. *Neurosci Lett* 241: 21-24, 1998.
- Wood JN, Docherty RJ: Chemical activators of sensory neurons. *A Rev Physiol* 59: 457-482, 1997.

- Wyatt KM, Dimmock PW, Jones PW, O'Brien PM: Efficacy of vitamin B-6 in the treatment of premenstrual syndrome: systematic review. *Br Med J* 318: 1375-1381, 1999.
- Yaksh TL, Malmberg AB: Central pharmacology of nociceptive transmission. En: *Textbook of Pain*. Editado por PD Wall y R Melzack (Churchill-Livingstone), Tercera Edición, p. 165-200, 1994.
- Yaksh TL: An introductory perspective on the study of nociception and its modulation. En: *Anesthesia: Biologic Foundations*. Editado por TL Yaksh, C Lynch, WM Zapol, M Maze, JF Biebuyck y LJ Saidman (Lippincott-Raven), Primera Edición, p. 471-482, 1997.
- Yaksh TL: Central and peripheral mechanism for the antialgesic action of acetylsalicylic acid. En: *Acetylsalicylic Acid: New Uses for an Old Drug*, Editado por Barnet JM, Hirsh J y Mustard JF. New York: Raven Press, p. 137-152, 1982.
- Yaksh TL: Spinal Systems and Pain Processing: development of novel action drugs with mechanistically defined models. *Trends Pharmacol Sci* 20: 329-337, 1999.
- Yamagata K, Andreasson KI, Kaufmann WE, Barnes C, Woeley PF: Expression of a mitogen-inducible cyclooxygenase in brain neurons: regulation by synaptic activity and glucocorticoids. *Neuron* 11: 371-386, 1993.

Yamamoto T, Nozaki-Taguchi N: Analysis of the effects of cyclooxygenase (COX-1 and COX-2) in spinal nociceptive transmission using indomethacin, a non-selective inhibitor, and NS398, a COX-2 selective inhibitor. Brain Res 739: 101-110, 1996.

Zimmerman M: Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. Pain 16: 109 – 110, 1983.

Zimmerman M: Basic concept of pain and pain therapy. Drug Res 31: 1053-1059, 1984.